

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

NICOLE FOLMANN LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE CELULOSE BACTERIANA: OTIMIZAÇÃO DO
PROCESSO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2023

NICOLE FOLMANN LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE CELULOSE BACTERIANA: OTIMIZAÇÃO DO
PROCESSO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**

**DEVELOPMENT OF BACTERIAL CELLULOSE: PROCESS OPTIMIZATION AND
EVALUATION OF PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Área de Concentração: Tecnologias e Processos Ambientais.

Linha de Pesquisa: Processos Químicos e Biotecnológicos de Tratamento e Valorização de Resíduos.

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk

CURITIBA

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite que outros distribuam, remixem, adaptem e criem a partir do seu trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que lhe atribuam o devido crédito pela criação original.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Curitiba



NICOLE FOLMANN LIMA

DESENVOLVIMENTO DE CELULOSE BACTERIANA: OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Ciência E Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologias E Processos Ambientais.

Data de aprovação: 24 de Abril de 2023

Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Fernanda Thais Vieira Rubio, Doutorado - Faculdade de Engenharia de Sorocaba (Facens)

Dra. Isabela De Andrade Arruda Fernandes, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná (Utfpr)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 24/04/2023.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de expressar minha profunda gratidão à minha família por sempre acreditar em mim e pelo inabalável apoio que me concederam durante toda a minha jornada acadêmica. Em especial, gostaria de agradecer à minha prima Etienne, que mesmo vivendo distante, esteve sempre presente para me oferecer suporte emocional e me ajudar a superar os desafios e as adversidades da vida. Sem a presença dela, talvez eu não tivesse conseguido chegar até aqui.

Aos meus amigos, que mesmo sem nenhum conhecimento na minha área de pesquisa, sempre me apoiaram e tentaram me ajudar da melhor forma possível. Em especial, gostaria de agradecer à Louise, que se prontificou a me auxiliar no que seus conhecimentos abrangiam, e ao Daniel, que sempre teve paciência para me ouvir e me oferecer palavras de incentivo nos momentos mais desafiadores.

Além disso, não poderia deixar de agradecer aos meus colegas de mestrado e de laboratório, cujo suporte foi fundamental para o meu desenvolvimento acadêmico e profissional. Em particular, gostaria de agradecer às Dras. Isabela, Débora e Alessandra, que sempre estiveram dispostas a me auxiliar em quaisquer dúvidas que eu tivesse,

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk e Profa. Dra Giselle Maria Maciel pelo conhecimento adquirido.

Ao Laboratório Multiusuário de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA) da UTFPR pela ajuda com a liofilização.

Ao Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais – CMCM da UTFPR-CT pela parceria e disponibilidade para utilizar os equipamentos.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA) pelos recursos financeiros a mim disponibilizados.

Por fim, agradeço de por todos que participaram dessa trajetória e colaboraram com este trabalho.

RESUMO

A kombucha é uma bebida fermentada tradicional chinesa, produzida a partir da fermentação do chá preto ou chá verde (*Camellia sinensis*) utilizando uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY) em um meio nutritivo por aproximadamente 7 a 10 dias. A membrana de celulose bacteriana (CB) produzida durante o processo de fermentação é atualmente alvo de muitos estudos, devido às suas diversas aplicações, no entanto, sua produção ainda é demorada e custosa. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo a otimização da produção de CB, além da caracterização do meio e da CB. Foram analisadas como hipóteses para maximizar o crescimento da CB os seguintes fatores: borra de café, chá verde, complexo vitamínico, sacarose, tamanho do SCOBY, tempo de incubação e kombucha. Os delineamentos experimentais de Plackett-Burman e Box-Behnken foram empregados para otimizar o meio de cultivo, onde a produção de CB (g celulose/dia.L) foi utilizada como parâmetro de avaliação. Os resultados indicaram que a sacarose em nível superior, a kombucha em nível superior e o tamanho do SCOBY em nível inferior foram os fatores mais significativos na produção de CB, comparados aos demais. A produção em meio otimizado foi cerca de 86,7% mais eficiente do que o meio básico de chá verde. O meio otimizado foi analisado para a cinética de fermentação em um período de 7 dias. Ao final da fermentação houve um aumento da concentração de fenólicos totais de 80% e em flavonoides totais de 22,5%. Também apresentou níveis de atividade antioxidante relevantes com 943,50 μM para DPPH e 2789,00 μM para ABTS. Além disso, a CB pura produzida apresentou alta capacidade de absorção de água (524,45%), permitindo a realização da adsorção de fenólicos da membrana em meio de chá verde, o que possibilitou a manutenção da presença de compostos bioativos mesmo depois da purificação da membrana. Com isso, o meio otimizado apresentou potencial tanto para a produção de bebida tipo kombucha rica em compostos bioativos, quanto para a produção de CB de maneira mais produtiva e eficiente, além de ser um potencial adsorvente de fenólicos.

Palavras-chave: Celulose bacteriana, Fermentação, Atividade antioxidante, Fenólicos, Flavonoides

ABSTRACT

Kombucha is a traditional Chinese fermented beverage produced by fermenting black or green tea (*Camellia sinensis*) using a symbiotic culture of bacteria and yeast (SCOBY) in a nutrient-rich medium for approximately 7 to 10 days. The bacterial cellulose (BC) membrane produced during the fermentation process is currently the subject of extensive research due to its various applications; however, its production is still time-consuming and costly. In this context, this study aimed to optimize the production of BC and characterize the medium and BC. The following factors were analyzed as hypotheses to maximize BC growth: coffee grounds, green tea, vitamin complex, sucrose, SCOBY size, incubation time, and kombucha. The Plackett-Burman and Box-Behnken experimental designs were employed to optimize the culture medium, with BC production (g cellulose/day.L) used as the evaluation parameter. The results indicated that sucrose at a higher level, kombucha at a higher level, and SCOBY size at a lower level were the most significant factors in BC production compared to others. The production in the optimized medium was approximately 86.7% more efficient than the basic green tea medium. The optimized medium was analyzed for fermentation kinetics over a period of 7 days. At the end of fermentation, there was an 80% increase in total phenolic concentration and a 22.5% increase in total flavonoids. It also exhibited relevant levels of antioxidant activity with 943.50 μM for DPPH and 2789.00 μM for ABTS. Furthermore, the pure BC produced showed high water absorption capacity (524.45%), enabling the adsorption of phenolics from the membrane in a green tea medium, which allowed the maintenance of bioactive compounds even after membrane purification. As a result, the optimized medium showed potential for the production of kombucha-like beverages rich in bioactive compounds, as well as for the more productive and efficient production of BC, serving as a potential adsorbent for phenolics.

Keywords: Bacterial cellulose, Fermentation, Antioxidant activity, Phenolics, Flavonoids

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Biofilme de CB produzido em meio de fermentação otimizado.	16
Figura 2 - Fluxograma do metabolismo principal realizado pela kombucha.	17
Figura 3 - Processo de formação do SCOBY.	19
Figura 4 - Gráfico de Pareto para o delineamento Plackett-Burman.	36
Figura 5 - Perfil dos valores previstos e da desejabilidade para o planejamento composto central.	38
Figura 6 - Concentração de fenólicos e flavonoides totais.	41
Figura 7 - Atividade antioxidante por DPPH e ABTS.	43
Figura 8 - Valores de pH e acidez total.	44
Figura 9 - Concentração de açúcares redutores totais.	46
Figura 10 - Concentração de proteínas totais.	47
Figura 11 - Determinação do ponto de carga zero.	49
Figura 12 - Imagens MEV da superfície da membrana de celulose pura.	51
Figura 13 - Imagens MEV da superfície da membrana de celulose adsorvida.	52
Figura 14 - Difratoograma de raios X da CB pura.	53
Figura 15 - Difratoograma de raios X da CB adsorvida.	54
Figura 16 - Curvas de termogravimetria derivada (DTG) das membranas.	56
Figura 17 - Curvas termogravimétricas (TGA) das membranas.	57
Figura 18 - Curvas calorimetria exploratória diferencial (DSC) das membranas.	58
Figura 19 - Curvas não lineares de Sips, Langmuir e Freundlich.	60
Figura 20 - Curvas não lineares de Jovanovic-monolayer, Toth, Temkin e Redlich-Peterson.	60
Figura 21 - Curva linear de Dubinin-Radushkevich.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições de meio de cultura para fermentação da kombucha.	17
Tabela 2 - Estudos de substratos alternativos para a fermentação da kombucha.	23
Tabela 3 - Variáveis de cultivo e seus níveis no delineamento Plackett-Burman para a produção de CB.	27
Tabela 4 - Variáveis de cultivo e seus níveis no delineamento Box-Behnken para a produção de CB.	28
Tabela 5 - Modelos e equações utilizados para calcular os parâmetros isotérmicos.	33
Tabela 6 - Planejamento Plackett-Burman para 7 variáveis com valores codificados e resultados para peso seco da membrana e produção de CB.	35
Tabela 7 - Planejamento Box-Behnken para 3 variáveis com valores codificados e resultados para peso seco da membrana e produção de CB.	37
Tabela 8 - CFT, FT, AA do meio de cultura durante a cinética.	39
Tabela 9 - pH, acidez total, AR, PT, produção de CB e peso CB seca durante a cinética.	39
Tabela 10 - Concentrações de proteínas totais, fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante.	50
Tabela 11 - Parâmetros da isoterma aplicados a celulose bacteriana adsorvida em chá verde.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Atividade antioxidante

ANOVA – Análise de variância

AR – Açúcares redutores

CAA – Capacidade de absorção de água

CB - Celulose bacteriana

CFT – Concentrações de fenólicos totais

CMC – Carboximetilcelulose

DCV's – Doenças cardiovasculares

DNS – Ácido 3,5-dinitrosalicílico

FT – Flavonoides totais

PB – Plackett-Burman

PT – Proteínas totais

SCOBY – Cultura simbiótica de bactérias e leveduras

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. OBJETIVOS	14
1.1.1. Objetivo Geral	14
1.2.2. Objetivos Específicos	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. CELULOSE BACTERIANA	15
2.1.1. Características	15
2.1.2. Desenvolvimento da CB	16
2.1.3. Fatores que influenciam a fermentação da kombucha	18
2.1.3.1. Cultura simbiótica de bactérias e leveduras	18
2.1.3.2. Microrganismos	19
2.1.3.3. Substratos	20
2.1.3.4. pH	21
2.1.3.5. Tempo e temperatura	21
2.1.4. Aplicações da CB	22
2.2. SUBSTRATOS ALTERNATIVOS AO CHÁ	23
2.3. BENEFÍCIOS À SAÚDE DA KOMBUCHA	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. MATÉRIA-PRIMA	27
3.1.1. Microrganismos e Materiais	27
3.2. SELEÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA	27

3.2.1. Cálculo de produtividade.....	28
3.3. PRODUÇÃO E TRATAMENTO DA CB.....	28
3.4. CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO.....	28
3.4.1. pH E ACIDEZ TOTAL.....	29
3.6. ANÁLISES COLORIMÉTRICAS.....	29
3.6.1. Compostos fenólicos totais (CFT).....	29
3.6.2. Flavonoides totais (FT).....	29
3.6.3. Atividade antioxidante (AA).....	30
3.6.4. Açúcares redutores (AR).....	30
3.6.5. Proteínas totais (PT).....	31
3.7. CARACTERIZAÇÃO DA CB.....	31
3.7.1. Capacidade de absorção de água (CAA).....	31
3.7.2. Ponto de carga zero (pH_{pcz}).....	32
3.7.3. Dessorção dos compostos bioativos.....	32
3.7.4. Cristalinidade.....	32
3.7.5. Identificação das microestruturas.....	32
3.7.6. Estabilidade térmica.....	33
3.8. ISOTERMAS DE ADSORÇÃO.....	33
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1. SELEÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA.....	34

4.2. AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO.....	39
4.2.1. CFT e FT	40
4.2.2. AA	42
4.2.3. pH e acidez total	43
4.2.4. Açúcares redutores	44
4.2.5. Proteínas totais.....	46
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA	47
4.3.1. Capacidade de absorção de água	47
4.3.2. Ponto de carga zero (PCZ).....	48
4.3.3. Determinação de proteínas totais, fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante	49
4.3.3. Identificação das microestruturas	50
4.3.4. Cristalinidade.....	52
4.3.5. Estabilidade térmica	54
4.3.6. Isotermas.....	58
5. CONCLUSÃO.....	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

A kombucha é uma bebida fermentada originária do Nordeste da China. Habitualmente é produzida através da fermentação do chá da planta *Camellia sinensis*, sendo os chás preto e verde os mais utilizados. O processo é realizado a partir da fermentação de uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY) em um meio nutritivo por aproximadamente 7 a 10 dias (LEAL et al., 2018), cujo resultado será a produção de um novo SCOBY e da kombucha (CHEN; LIU, 2000).

Devido à presença de diversas cepas de bactérias e leveduras, durante a fermentação são produzidos ácido acético, etanol, ácido lático, ácido glucônico e ácido glucurônico, assim como uma alta concentração de compostos fenólicos (CHAKRAVORTY et al., 2016; JAYABALAN; MARIMUTHU; SWAMINATHAN, 2007). Também é produzida pelas bactérias ácido acéticas um filme composto de fibrilas de celulose pura, que apresenta uma grande capacidade de retenção de água, cristalinidade e estabilidade térmica (EMILJANOWICZ; MALINOWSKA-PAŃCZYK, 2020). Além disso, possui características como a biodegradabilidade, pureza e biocompatibilidade, as quais viabilizam sua aplicação para diversas áreas (KESHK, 2014).

A celulose bacteriana (CB) é um material muito versátil que pode ser aplicado em diversas áreas da indústria, incluindo embalagens alimentícias, polímeros biodegradáveis, tecidos para uso biomédico e até mesmo dispositivos médicos e eletrônicos (PARK; JUNG; KHAN, 2009). A CB possui a mesma fórmula molecular da celulose vegetal, a qual faz parte do grupo de carboidratos, entretanto, existem diferenças significativas em suas estruturas, que as diferem em características físicas e mecânicas. Uma das principais diferenças é a presença de celulose tipo I e II na CB, enquanto a celulose vegetal apresenta apenas celulose I (LIMA et al., 2015).

No entanto, um dos principais desafios reside em tornar a CB mais atraente para o mercado, dado que sua produção atualmente é caracterizada por baixa eficiência, longo tempo de fabricação e alto custo (CASTRO et al., 2012). Diante dessa situação, diversos estudos estão sendo realizados com o destaque na utilização resíduos industriais como substrato alternativo para a produção da CB. Esses resíduos podem conter fontes nutricionais que são utilizadas como fonte de energia pelas bactérias, o que reduz o custo de produção. Além disso, a utilização de resíduos industriais para a produção de CB pode contribuir para a solução dos problemas de gestão de resíduos, resultando em um menor impacto ambiental em comparação ao uso de matérias-primas convencionais (TSOUKO et al., 2015).

O Brasil é o maior produtor mundial de café, atingindo uma produção de aproximadamente 50,91 milhões de sacas no último ano (OIC, 2022). A borra de café é rica em cafeína, aminoácidos, polifenóis, minerais e polissacarídeos o que a torna uma fonte promissora para a produção de CB. Além disso, a utilização da borra de café como substrato alternativo pode reduzir o volume de resíduos gerados pela indústria do café, contribuindo para a gestão de resíduos e para a preservação do meio ambiente (ZABANIOTOU; KAMATEROU, 2019).

Este estudo foi conduzido com o objetivo de otimizar a produção de CB por meio de delineamentos experimentais. A justificativa para este trabalho é a importância da otimização da produção de CB para tornar sua produção mais eficiente e sustentável, contribuindo para a redução de custos e impactos ambientais. Além disso, a CB é um material versátil e com diversas aplicações na indústria, o que torna a otimização da sua produção uma estratégia importante para a promoção do desenvolvimento sustentável. Para atingir esse objetivo, foi realizado o delineamento de Plackett-Burman para identificar as variáveis significativas para o crescimento da CB, seguido pelo delineamento de Box-Behnken para estabelecer o meio de cultura mais otimizado.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo Geral

Desenvolver um meio de cultivo otimizado para a produção de CB, com caracterização do meio e da celulose produzida.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver, através do delineamento Plackett-Burman e de Box-Behnken, o biofilme de CB;
- Caracterizar a cinética de fermentação do meio de cultura otimizado a partir da determinação de compostos bioativos, atividade antioxidante, pH, acidez total, açúcares redutores e proteínas totais;
- Caracterizar a CB produzida por meio das análises de capacidade de absorção de água, ponto de carga zero (PH_{pcz}), compostos fenólicos totais, flavonoides totais, proteínas totais e atividade antioxidante, cristalinidade, estabilidade térmica, identificação das microestruturas e isoterma de adsorção.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CELULOSE BACTERIANA

2.1.1. Características

A CB é considerada um polissacarídeo extracelular, geralmente formado por bactérias dos gêneros *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella* e entre outros, através da fermentação acética. Entretanto, o gênero *Gluconacetobacter* (*Komagataeibacter*) demonstra ser o mais eficiente para a produção de CB (CHAWLA et al., 2009; KLEMM et al., 2005). Descoberta em 1886 por Brown, a cepa de bactérias ATCC 23767 foi nomeada *Bacterium xylinum*. A qual passou a ser chamada de *Acetobacter aceti subsp. xylinum* por De Ley e Frateur em 1974 e em 1998 Yamada et al. as denominaram como *Gluconacetobacter xylinus*. Em 2012 foi estabelecido por Yamada et al. (2012) o novo gênero de bactérias nomeado *Komagataeibacter*, conseqüentemente a espécie de bactérias passou a ser chamada de *Komagataeibacter xylinus* (YAMADA et al., 2012).

A CB produzida é formada por microfibrilas de aproximadamente 100 vezes menores do que aquelas geradas por vegetais. Em vista disso, está cada vez mais sendo utilizada como um substituto. Um exemplo disso é a utilização da celulose de kombucha para a produção de carboximetilcelulose (CMC). O éter CMC é comercialmente muito requisitado, portanto, alternativas para sua produção são bastante ponderadas (GARGEY et al., 2019). Em questão de estrutura, a CB é mais fina e não ramificada ao ser comparada à celulose vegetal. Podendo contribuir para diversos atributos presentes na CB, como alta área superficial, aumento da absorção de água e melhor resistência mecânica no estado úmido (CHAWLA et al., 2009; GAYATHRY; GOPALASWAMY, 2014). Outras propriedades como alta cristalinidade, biocompatibilidade, não toxicidade e alta porosidade a tornam um material conveniente para aplicações tecnológicas em bioplásticos, bioenergia, fortificação de alimentos e embalagens (CHAWLA et al., 2009). Podemos observar um exemplo de biofilme de CB na FIGURA 1:

Figura 1 - Biofilme de CB produzido em meio de fermentação otimizado.



FONTE: A autora (2023).

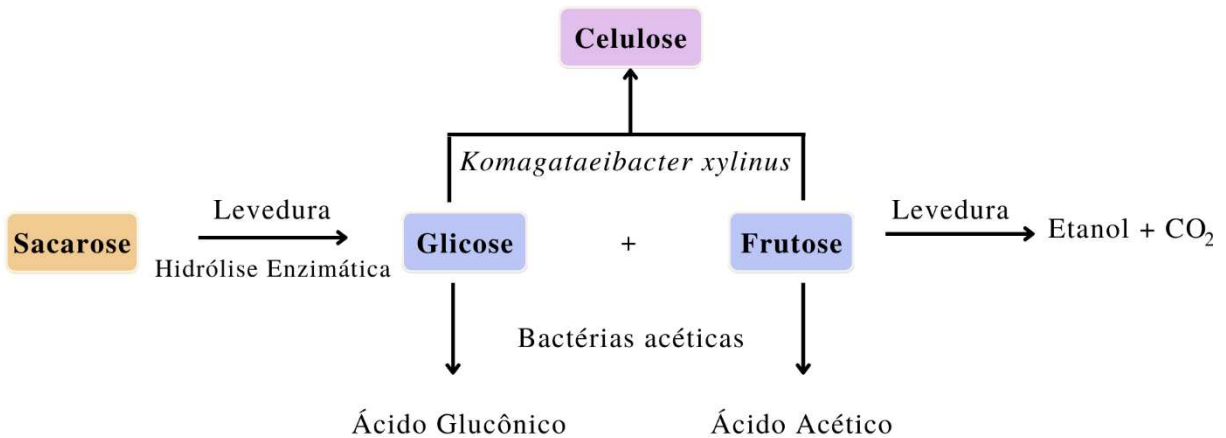
2.1.2. Desenvolvimento da CB

A celulose é formada sobre a superfície da kombucha em condições favoráveis de temperatura (cerca de 30 °C) e de oxigenação, se espalhando por toda a superfície do meio (DUTTA; GACHHUI, 2007). Nessas condições, são utilizadas bactérias para a produção de celulose, por possibilitarem a aceleração do crescimento (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991). A CB pode ser produzida por método de cultivo estático ou agitado. Tradicionalmente utilizado, o cultivo estático forma uma película na interface ar/líquido, em contrapartida, no cultivo agitado a película fica dispersa no meio em formato de grânulos ou fios fibrosos (EL-SAIED; BASTA; GOBRAN, 2004).

A enzima invertase pode ser encontrada nas leveduras presentes no SCOBY e tem a função de hidrolisar a sacarose em frutose e glicose, as quais serão posteriormente transformadas em etanol e dióxido de carbono (JAYABALAN et al., 2014). Algumas leveduras tem preferência pelo tipo de substrato utilizado, as do gênero *Saccharomyces* preferem a glicose, já as do gênero *Zygosaccharomyces* consomem a frutose (CABRAL et al., 2015). As bactérias acéticas transformam a glicose em ácido glucônico e a frutose em ácido acético (CHEN; LIU, 2000). Então, produzem etanol que posteriormente é utilizado pelas mesmas para seu desenvolvimento e também na produção de ácido acético, processo que pode ser observado na FIGURA 2 (CHEN; LIU, 2000; SIEVERS et al., 1995). O etanol e o ácido acético possuem ação antimicrobiana contra bactérias patogênicas que poderiam se desenvolver no meio,

indicando que naturalmente têm uma melhor adaptação com a capacidade de inibição de desenvolvimento de microrganismos contaminantes (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000).

Figura 2 - Fluxograma do metabolismo principal realizado pela kombucha.



FONTE: Adaptado de Markov et al. (2003).

O formato do local de fermentação tem importância para a produção de CB, uma vez que a taxa de transferência de oxigênio influencia na produção de celulose e de metabólitos. A maior razão entre a superfície e altura do âmbito proporciona uma maior produção de etanol, enquanto uma menor razão é benéfica à produção de ácido acético (VILLARREAL-SOTO et al., 2019). Em virtude da formação de ácidos orgânicos ao longo do processo fermentativo, o pH da kombucha decresce. A cor do líquido fica mais clara devido às alterações nos compostos fenólicos relacionada ao aumento da concentração de prótons (MCGEE, 2004) e à ação enzimática sobre os polifenóis (JAYABALAN; MARIMUTHU; SWAMINATHAN, 2007). Entretanto, algumas condições são estabelecidas para que ocorra a fermentação da kombucha e, conseqüentemente a produção de CB, como a presença de um substrato, fonte energética, cultura de bactérias, temperatura e tempo adequados; a TABELA 1 apresenta os parâmetros encontrados na literatura.

Tabela 1 - Condições de meio de cultura para fermentação da kombucha.

Substrato	Sacarose	SCOBY	Kombucha	Temperatura (°C)	Tempo (dias)	Referência
Chá preto (4g/L)	100 g/L	-	10% (v/v)	30	15	(CHU; CHEN, 2006)
Chá preto/Chá verde (10g/L)	100 g/L	20 g/L	30 ml/L	20 e 30	21	(DE FILIPPIS et al., 2018)

Chá preto (6g/L)	90 e 110 g/L	3% (m/v)	10% (v/v)	30±3	8	(GOH et al., 2012)
Chá verde (5g/L)	100 g/L	24 g/L	-	20 e 22	17	(REISS, 1994)
Chá preto (1g/L)	100 g/L	5 g/L	100 mL/L	29±1	8	(NGUYEN et al., 2015)
Chá preto (0,49m/v)	10% (m/v)	-	10% (v/v)	23 °	10	(MARSH et al., 2014)
Chá preto/ Chá verde/ Resíduos de chá (1,2%)	10% (m/v)	3% (m/v)	10% (v/v)	24±3	18	(JAYABALAN et al., 2008)
Chá verde/ Chá preto/ Rooibos (8g/L)	80 g/L	30 g/L	100 mL/L	27±1	14	(GAGGIÀ et al., 2019)
Pó de café (10g/L)	10% (m/v)	3% (m/v)	-	24±3	7	(WATAWANA; JAYAWARDENA; WAISUNDARA, 2015)

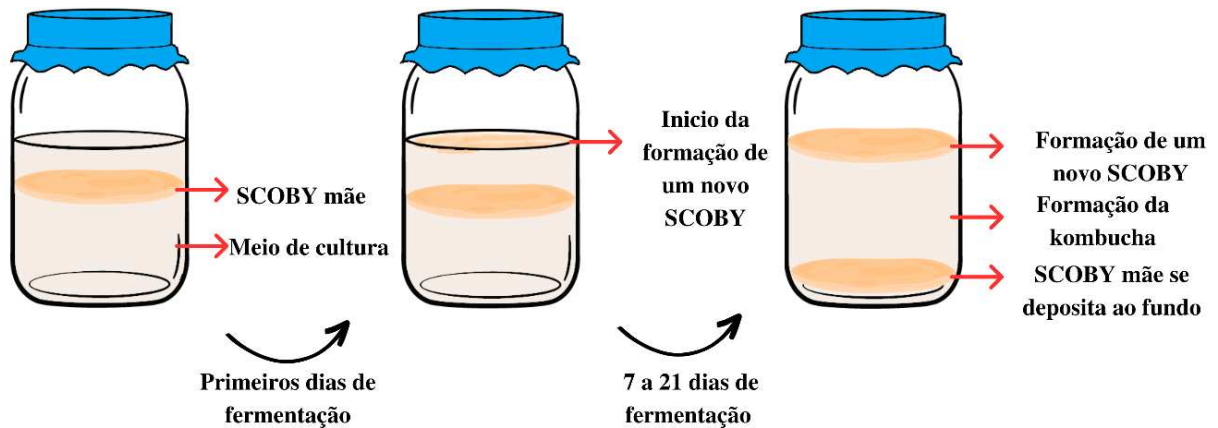
FONTE: A autora (2022).

2.1.3. Fatores que influenciam a fermentação da kombucha

2.1.3.1. Cultura simbiótica de bactérias e leveduras

SCOBY (*symbiotic culture of bacteria and yeast*) é nome dado para a cultura simbiótica de bactérias e leveduras que é utilizada para produzir a kombucha. O SCOBY é o biofilme de CB produzido, principalmente, pela bactéria *Komagataeibacter xylinus* quando cultivada em condições adequadas de temperatura e pH (CHAWLA et al., 2009). Essa cultura é utilizada como uma cultura starter para a produção de CB e da kombucha (WATAWANA et al., 2015). O processo se inicia pela reprodução das bactérias produtoras de celulose que consomem o oxigênio presente no meio. Então, o microrganismo sintetiza celulose para a formação de camadas sobrepostas na superfície do meio. Com a geração de novas camadas a espessura da membrana aumenta, formando uma estrutura suspensa (VILLARREAL-SOTO et al., 2018) como podemos observar na FIGURA 3.

Figura 3 - Processo de formação do SCOBY.



FONTE: A autora (2023).

Os microrganismos dominantes presentes no SCOBY são praticamente os mesmos que são observados na cultura formada na kombucha (TEOH; HEARD; COX, 2004). De acordo com o estudo de Chakravorty et al. (2016) ao longo do processo de fermentação a comunidade bacteriana não apresentou alteração e as leveduras manifestaram poucas mudanças.

O SCOBY é considerado um exemplar de CB, mesmo que seja uma cultura simbiótica, a celulose é produzida apenas por meio de bactérias e algumas características como a estrutura básica, o processo biossintético seguido pela bactéria e a finalidade da síntese desse glicano são semelhantes às cepas de CB produzidas comercialmente (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). O biofilme produzido ainda possui algumas funções no seu meio de crescimento, como na fixação e proteção das células de condições extremamente desfavoráveis, sendo essas a radiação ultravioleta, alta pressão hidrostática ou quaisquer outras adversidades ambientais. Também ajuda na constante exposição das bactérias a um ambiente aeróbico, uma vez que o mesmo é essencial para a fermentação da kombucha (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

2.1.3.2. Microrganismos

O grupo de microrganismos presentes na kombucha pode ser dividido em duas partes, a que se encontra no filme de celulose e a que se localiza na parte líquida. Mesmo que os microrganismos estejam relacionados com o processo de fermentação da bebida serem diferentes conforme a sua localização no meio, as principais famílias, espécies e gêneros das leveduras e bactérias continuam as mesmas em todas as porções da Kombucha (EL-SALAM, 2012).

O estudo de Jayabalan et al. (2014) apontou que as cepas mais comuns encontradas no SCOBY são de bactérias ácido-acéticas pertencentes aos gêneros *Gluconobacter*, *Acetobacter*

e de leveduras dos gêneros *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces*. As leveduras encontradas na kombucha podem variar de acordo com a cepa utilizada. A pesquisa de Chakravorty et al. (2016) identificou a maior presença de leveduras do gênero *Candida*, tanto na CB quanto no líquido. Em contrapartida Marsh et al. (2014) encontraram predominantemente os gêneros *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*. Entretanto, o tipo de microrganismo presente no biofilme formado vai depender de diversos fatores, como a origem, tipo de substrato utilizado na fermentação, metabólitos produzidos, clima e local do cultivo (MUKADAM et al., 2016; WATAWANA et al., 2015).

A espécie de bactéria *Komagataeibacter xylinus* que está presente majoritariamente no biofilme e é uma das responsáveis pela produção da celulose bacteriana e fixação do nitrogênio (DE ROOS; DE VUYST, 2018). Nessa cultura, as bactérias ácido-acéticas são responsáveis pela conversão da glicose em ácido glucônico, e da frutose em ácido acético, já as leveduras metabolizam o açúcar e o transformam em glicose e frutose, assim como a transformação dos mesmos em etanol e CO₂ (LONČAR et al., 2014). Ao final da fermentação, a presença de ácido acético e o aumento do etanol no meio podem provocar a inibição do crescimento de leveduras (PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 2000). Durante o processo de fermentação da kombucha o pH diminui devido à produção de ácidos orgânicos (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000).

2.1.3.3. Substratos

A cultura inicial utilizada para a produção da CB depende do fornecimento de uma fonte de carbono para realizar tal ação. O carbono é uma fonte essencial para o desenvolvimento de quase todos os microrganismos vivos, sendo responsável por seus desenvolvimentos e metabolismos gerais (GOH et al., 2012). Os microrganismos associados à produção da kombucha são denominados quimiorganotróficos, uma vez que recebem energia e carbono da decomposição de matéria orgânica (RIGO, 2006). A sacarose é uma das principais fontes de carbono utilizada no processo de fermentação da kombucha, entretanto, não é totalmente utilizada durante o processo (JAYABALAN et al., 2014). A utilização de outros tipos de açúcar, como a frutose, glicose ou lactose, pode causar uma ação diferente na produção do etanol e ácido lático, apesar disso não apresenta grandes modificações no sabor final da kombucha (REISS, 1994).

A *Camellia sinensis* é a planta responsável pela produção dos principais tipos de chá utilizados na fermentação da kombucha. Sendo eles o chá preto, chá verde, chá oolong e chá branco. O chá verde é o mais utilizado para a fermentação da kombucha por apresentar um

efeito estimulante melhor do que os outros chás de mesmo parâmetro, proporcionando um menor tempo de produção (WATAWANA et al., 2015).

2.1.3.4. pH

O processo de fermentação da kombucha gera ácidos orgânicos que causam a diminuição do pH do meio (SIEVERS et al., 1995). Os ácidos formados têm sido atribuídos como responsáveis pelas suas propriedades funcionais, o que torna o pH um dos parâmetros de importância para a sua produção, estando também relacionado com o crescimento do meio e suas alterações estruturais (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). A utilização de uma proporção inicial de kombucha em uma nova fermentação pode ser benéfica para diminuir o pH do meio, evitando o crescimento de microrganismos indesejáveis (WATAWANA et al., 2015). Além de influenciar no crescimento dos microrganismos, também é importante para o sabor da kombucha e interfere na estabilidade das catequinas que, conseqüentemente, atingirá a atividade antioxidante do meio (CHU; CHEN, 2006). Nos primeiros dias de fermentação, o pH da kombucha diminui rapidamente, se estabilizando por conta dos efeitos tamponantes ocasionados pelos ácidos (JAYABALAN et al., 2008). Esse efeito é causado pela síntese de ácidos orgânicos fracos ao interagirem com os componentes minerais do chá (MALBAŠA et al., 2011).

2.1.3.5. Tempo e temperatura

A CB é formada em condições favoráveis de temperatura, aproximadamente 30 °C, e de oxigenação (DUTTA; GACHHUI, 2007), sendo importante para um crescimento microbiano potencializado e atuando positivamente na atividade enzimática do processo fermentativo (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). Pelo fato de a temperatura ter ação no metabolismo dos microrganismos, ela pode propiciar o desenvolvimento de diferentes espécies, gerando um produto final com variados níveis de ácidos orgânicos (DE FILIPPIS et al., 2018). O aumento da temperatura também pode contribuir para a síntese de metabólitos e de vitamina C (LONČAR et al., 2006). Assim, a mudança de temperatura pode alterar a simbiose entre os microrganismos do SCOBY, isso torna o produto final difícil de obter uma padronização estável, podendo apresentar variações sensoriais e bioquímicas em lotes diferentes e sucessivos (DE FILIPPIS et al., 2018; LONČAR et al., 2006; NEFFE-SKOCIŃSKA et al., 2017).

O tempo de produção tem influência na alteração da atividade antioxidante (CHU; CHEN, 2006), nas concentrações de etanol, ácidos orgânicos e no pH do meio de fermentação

(LONČAR et al., 2006). Em fermentações mais longas há um aumento da capacidade antioxidante da kombucha, entretanto, também ocorre um aumento de ácidos orgânicos o que pode deixar a bebida imprópria para o consumo (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). Portanto, o tempo de fermentação irá depender das características desejadas para o produto. Geralmente ocorre de 7 a 14 dias para que a kombucha apresente aspectos recomendáveis para o consumo (GREENWALT; LEDFORD; STEINKRAUS, 1998; VILLARREAL-SOTO et al., 2018).

2.1.4. Aplicações da CB

A CB é um material muito versátil que pode ser aplicada em diversas áreas da indústria, pode ser utilizada na indústria de alimentos, papéis, biomédica, entre outras (PARK; JUNG; KHAN, 2009). Na indústria de alimentos, a CB vem sendo aplicada como um hidrocolóide, sendo representado por diversos polissacarídeos e proteínas que são utilizados em variados sectores industriais. São utilizados no espessamento e gelificação de soluções aquosas, estabilização de espumas, emulsões e dispersões, inibição da formação de gelo e de cristais de açúcar, também possui a função de liberação controlada de sabores, e outros (DOURADO et al., 2016). Um dos principais desafios é tornar a CB atrativa para o mercado, pois sua produção é demorada e ineficiente, e as matérias-primas são custosas (CASTRO et al., 2012).

Na Ásia, a Nata de coco é uma sobremesa tradicional produzida a partir da CB. Sendo estudada para aplicações na indústria alimentícia, como em forma de suplementos alimentares ou como substituto para a carne vegetariana (ULLAH; SANTOS; KHAN, 2016). Também é sugerido apresentar um potencial promissor para emulsificantes de grau alimentício (ZHAI et al., 2018a). Além disso, a BC tem mostrado ser uma possível fonte de fibra dietética, podendo ser utilizada para tratamentos de condições gástricas (ZHAI et al., 2018b).

A CB é um material que está sendo estudado para a utilização em cicatrização de feridas, pois apresenta características buscadas no aperfeiçoamento da medicina nesse quesito. Ela realiza a remoção do excesso de exsudado, causa difusão, controle térmico e de pH, possui uma remoção indolor de seu curativo, previne infecções e apresenta um melhor custo benefício (SULAEVA et al., 2015).

A CB também pode ser utilizada como um material filtrante ecológico. A adição de diferentes componentes à CB pode ser propícia para o aumento da sua seletividade e peso molecular de corte. Sendo um material vantajoso para a purificação de água e para indústrias farmacêuticas (FANG et al., 2016). O desenvolvimento sustentável é um fator muito importante nos dias atuais, demonstrando uma contínua tentativa de utilizar a biomassa para desenvolver

sistemas sustentáveis para a produção de bioetanol (BALAT, 2011; JANG et al., 2017). A CB é capaz de ser uma fonte alternativa de açúcar renovável para a fermentação em bioetanol. Uma vez que a lignina e a hemicelulose não estão presentes na CB, a etapa de pré-tratamento industrial pode ser descartada, conseqüentemente reduzindo os custos de produção. Para a maior diminuição dos custos é sugerido o uso de resíduos industriais como meio de cultivo (TSOUKO et al., 2015).

2.2. SUBSTRATOS ALTERNATIVOS AO CHÁ

No Brasil, para a produção de kombucha voltada à meios comerciais e de consumo, é obrigatória a utilização da infusão de *Camellia sinensis*. Apenas como ingredientes opcionais é permitido a utilização adicional de vegetais e frutas (BRASIL, 2019). Entretanto, o meio consegue ser fermentado por qualquer outro tipo de chá, algumas espécies de plantas e frutas (EBERSOLE et al., 2017; VILLARREAL-SOTO et al., 2018). Algumas frutas apresentam elevadas concentrações de bioativos e propriedades vantajosas para a indústria. Além disso, a utilização de outros substratos como matérias-primas alternativas tem demonstrado vantagens, evidenciando a importância da investigação de diferentes meios. A TABELA 2 apresenta alguns exemplos de estudos de substratos alternativos.

Tabela 2 - Estudos de substratos alternativos para a fermentação da kombucha.

Substrato alternativo	Objetivo do estudo	Referência
Goji berry preto e vermelho	Estudo comparativo da concentração de fenólicos totais e palatabilidade em kombucha de chá preto, goji berry preto e vermelho.	(ABUDUAIBIFU; TAMER, 2019)
Salak	Estudo comparativo da atividade antidiabética da kombucha de Salak e de chá preto em ratos diabéticos.	(ZUBAIDAH et al., 2019)
Mirtilo, framboesa, cenoura	Estudo investigativo dos efeitos do uso de diferentes matérias-primas na composição e nas propriedades sensoriais da kombucha.	(ULUSOY; TAMER, 2019)
Uva	Estudo com objetivo de desenvolver uma kombucha utilizando suco de uva vermelha como substrato alternativo.	(AYED; BEN ABID; HAMDI, 2017)

Cereja	Estudo com objetivo de otimizar a produção de ácido glucurônico usando suco de cereja azeda como substrato para a kombucha.	(YAVARI et al., 2010)
Cacto de pera espinhosa	Utilização de suco de cacto de pera espinhosa como um substrato para a fermentação da kombucha com o objetivo de desenvolver uma bebida com melhores propriedades nutricionais.	(AYED; HAMDI, 2015)
Grama de trigo	Meio de cultura mix de chá preto e suco de grama de trigo foi estudado em diversas proporções com o objetivo de aumentar os compostos fenólicos e a atividade antioxidante da kombucha.	(SUN; LI; CHEN, 2015)
Leite	Foram investigados os efeitos do leite como substrato de fermentação da kombucha e comparados com produtos lácteos fermentados por probiótico comercial e iogurte.	(HRNJEZ et al., 2014; MALBAŠA et al., 2009)
Soro de leite	Foram testados três tipos de soro de leite (doce fresco, ácido fresco e doce reconstituído) para a produção da kombucha.	(BELLOSO-MORALES; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, 2003)
Pó de café	Estuda as atividades antioxidantes e inibitórias da hidrólise do amido, assim como os teores de polifenóis de três pós de café torrado (café moído fino, café moído grosso e café instantâneo).	(WATAWANA; JAYAWARDENA; WAISUNDARA, 2015)
Folhas de mostarda	Teve como objetivo a produção de uma bebida fermentada com a utilização de folhas de mostarda, medindo sua composição química e bioatividade.	(RAHMANI et al., 2019)
Chá de rooibos	Estudo comparativo das características da kombucha produzida com chá verde, chá preto e chá de rooibos.	(GAGGIÀ et al., 2019)
Chá de erva-cidreira	Produção de kombucha utilizando chá de erva-cidreira como substrato e avaliação da possibilidade de ser um substituto para a <i>Camelia sinensis</i> .	(VELICANSKI et al., 2014)

Casca de batata	Explorar a possibilidade de utilizar resíduos de casca de batata como matéria prima para produção de celulose bacteriana.	(ABDELRAOF; HASANIN; EL-SAIED, 2019)
-----------------	---	--------------------------------------

FONTE: A autora (2023).

Com a crescente preocupação com a sustentabilidade e a preservação do meio ambiente, a busca por formas alternativas de utilização de subprodutos agroindustriais e de alimentos tem se tornado cada vez mais relevante. Nesse contexto, os subprodutos vegetais têm ganhado destaque devido às suas propriedades nutricionais e bioativas, como a atividade antioxidante e antimicrobiana (MACAGNAN, 2013). O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e o segundo maior consumidor. A estimativa é que o consumo mundial de café aumente 3,3% no ano de 2022, alcançando 50,91 milhões de sacas de café (OIC, 2022). O café, um dos principais produtos agrícolas do Brasil, tem atraído a atenção de pesquisadores devido às suas propriedades terapêuticas relacionadas à presença de compostos fenólicos. Além disso, a fermentação microbiana é uma técnica promissora para aumentar as propriedades benéficas de bebidas contendo fenólicos, como demonstrado por Watawana, Jayawardena e Waisundara (2015), que desenvolveram uma bebida fermentada de kombucha a partir de café com propriedades terapêuticas significativas. Vale ressaltar que as atividades antioxidantes estão relacionadas aos ácidos totais e à quantidade de vitamina C presente nos produtos (MALBAŠA et al., 2011). Diante disso, torna-se importante explorar o potencial de utilização de subprodutos do café, como a borra, para a produção de produtos com valor agregado, visando não só a redução do desperdício, mas também a promoção da saúde e bem-estar.

2.3. BENEFÍCIOS À SAÚDE DA KOMBUCHA

A população mundial tem se preocupado cada vez mais em consumir produtos que trazem efeitos positivos à saúde, que incluem o bem-estar físico e emocional (BIRCH; BONWICK, 2019; DINI, 2019). Os alimentos funcionais estão em destaque nesse quesito, pois são caracterizados por oferecerem benefícios à saúde geral do consumidor ou ao reduzir risco de desenvolvimento de doenças específicas (KAPSAK et al., 2011). Em vista disso, a kombucha está tornando um produto muito popular (DE FILIPPIS et al., 2018). Nos Estados Unidos, a kombucha é um produto que apresenta um crescimento exponencial desde seu lançamento nos anos 90. Em 2021 o valor do mercado global de kombucha foi estimado em US \$2,68 bilhões e tem a projeção de alcançar US \$9,69 bilhões, com uma taxa de crescimento anual composto de 15,63%, até 2028 (IMIR, 2022). Já no Brasil, apesar de haverem apenas

estudos iniciais sobre o consumo da kombucha e de sua produção, não temos dados concretos sobre sua estatística (BLAUTH, 2019).

Um estudo de Barros e Crispim de Freitas (2020) buscou traçar o perfil do consumidor de kombucha, que se caracterizou como alguém que busca melhorar a qualidade de vida substituindo as bebidas carbonatadas por aquelas com funcionalidade bioativa; podendo também abranger o consumidor que tem algum problema de saúde como colesterol alto, pressão alta, diabetes e problemas gastrointestinais devido ao produto ser conhecido por ter ação no combate dessas doenças, como por exemplo, as cardiovasculares (DCV's). É sugerido que o consumo de kombucha poderia ajudar na redução da pressão arterial, alívio de inflamação articular, aumento da imunidade, maior expectativa de vida e teria uma melhor resposta anticancerígena (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000; HARTMANN et al., 2000). O ácido glucurônico seria o apontado como responsável por essas ações, o qual é um composto que atua no mecanismo de desintoxicação das células. Podendo ser produzido durante a fermentação da kombucha, mas será dependente do conjunto de bactérias e leveduras que estão presentes no meio, assim como as condições de fermentação e do substrato utilizado (NGUYEN et al., 2015). Também podem ser evidenciados antioxidantes provenientes do chá utilizado após sua fermentação. Os quais são conhecidos pela proteção das células contra os efeitos de radicais livres, tornando-os aliados da saúde humana (JAYABALAN et al., 2014; MALBAŠA et al., 2011).

Apesar de ser uma bebida tradicional consumida há séculos em alguns países, a kombucha ainda é considerada uma novidade em outros lugares do mundo. Por isso, a sua segurança e eficácia ainda são temas de interesse em pesquisas científicas. Consequentemente, a legislação Brasileira ainda não permite que a kombucha seja considerada um alimento funcional (BRASIL, 2018). Por se tratar de um processo artesanal com microrganismos vivos, sua produção é instável. Podendo apresentar diferença de microrganismos entre kombuchas, mesmo em matrizes iguais de mesmo fabricante, o que torna difícil sua padronização e a presença de características desejáveis em todo o lote produzido (MARTIN et al., 2018). Por essa razão, é importante que a produção seja realizada em condições controladas e em conformidade com as regulamentações sanitárias locais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATÉRIA-PRIMA

3.1.1. Microrganismos e Materiais

A cultura starter (SCOBY) foi obtida de uma fonte local na região de Curitiba, Paraná, a qual foi mantida em meio padrão (70 g/L de sacarose e 3 g/L de chá verde) e em estufa bacteriológica a 28 ± 2 °C. Foi utilizada sacarose PA (Neon, Suzano, Brasil). O chá verde e o complexo vitamínico foram adquiridos comercialmente em uma loja de produtos naturais de Curitiba, Paraná. A borra de café foi gentilmente cedida pela área de Pesquisa e Desenvolvimento da empresa Café Iguaçu de Cornélio Procópio, Paraná.

3.2. SELEÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Para a determinação dos fatores que influenciam a produção da CB foi utilizado o delineamento de Plackett-Burman, (PLACKETT; BURMAN, 1946) com 7 variáveis independentes em níveis superiores (+1) e inferiores (-1) (TABELA 2) com de 8 experimentos em duplicata.

Tabela 3 - Variáveis de cultivo e seus níveis no delineamento Plackett-Burman para a produção de CB.

Símbolos	Variáveis	Nível inferior (-1)	Nível superior (+1)
X ₁	Borra de café (g/L)	6	12
X ₂	Chá verde (g/L)	3	5
X ₃	Complexo vitamínico (mg/L)	500	1000
X ₄	Sacarose (g/L)	50	70
X ₅	Tamanho do SCOBY (m/v)	2,5	5
X ₆	Tempo de incubação (dias)	7	10
X ₇	Kombucha (v/v)	10	20

FONTE: A autora (2022).

A partir do Plackett-Burman foram analisadas as variáveis mais relevantes e então foi realizado o delineamento de Box-Behnken (BOX; BEHNKEN, 1960) para definir o meio de cultura mais otimizado com 3 variáveis independentes nos níveis inferior (-1), base (0) e superior (+1) de 15 experimentos (TABELA 3).

Tabela 4 - Variáveis de cultivo e seus níveis no delineamento Box-Behnken para a produção de CB.

Símbolos	Variáveis	Nível (-1)	Nível (0)	Nível (+1)
X ₁	Sacarose (g carboidrato/L)	70	90	110
X ₂	Kombucha (v/v)	20	30	40
X ₃	Tamanho do SCOBY (m/v)	5	7,5	10

FONTE: A autora (2022).

3.2.1. Cálculo de produtividade

A partir dos resultados obtidos nos delineamentos, foi calculada a produção diária de CB (g celulose/dia.L) pela EQUAÇÃO 1 (DE SOUZA et al., 2021; FERNANDES, 2019):

$$\text{Produção de Celulose Bacteriana} = \left(\frac{M_{cb}}{T_c * V_c} \right) \quad (1)$$

onde,

M_b: Massa seca da celulose bacteriana (gramas);

T_c: Tempo de cultivo (dias);

V_c: Volume do meio de cultura (litros).

3.3. PRODUÇÃO E TRATAMENTO DA CB

O delineamento de Plackett-Burman, juntamente com o delineamento de Box-Behnken foram utilizados para definir a formulação que influenciaria significativamente na produção de CB. Foram estudadas sete variáveis independentes, dentre elas estão nutrientes como a sacarose, chá verde, borra de café, complexo vitamínico e kombucha, além de fatores físicos como tamanho do SCOBY e tempo de incubação. Os experimentos tiveram como padrão a água destilada autoclavada para a produção de 150 mL de meio de cultivo e a incubação em estufa bacteriológica a 28 ± 2 °C. Após estabelecer o meio de cultura otimizado, as membranas foram purificadas utilizando uma solução de NaOH 0,1 mol/L à $80 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ por 2 h e lavadas com água destilada. Para determinar a produção de CB, a CB purificada foi seca a 50 °C por 48 h até atingir peso constante (SOUZA et al., 2021).

3.4. CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO

A partir da formulação otimizada do meio de cultura, foi realizada a avaliação cinética de sua fermentação em um período de 7 dias. Em estufa bacteriológica a 28 ± 2 °C foram utilizados béqueres contendo 40 mL de amostra. Para a avaliação da cinética de fermentação os

pontos foram retirados a cada 24 h e o experimento realizado em duplicata. A CB foi coletada diariamente e utilizada para o cálculo de produtividade do meio. O meio fermentado produzido foi utilizado para as análises de pH, fenólicos totais, flavonoides totais, atividade antioxidante, açúcares redutores e proteínas totais.

3.4.1. pH E ACIDEZ TOTAL

As análises de pH foram realizadas para a cinética a cada 24 h, considerando o dia inicial até o 7º dia de fermentação. Para as medições foi utilizado um pHmetro de bancada Gehaka de modelo PG1800. A acidez total foi determinada através de titulação gravimétrica com NaOH 0,1 mol/L previamente padronizado, até o ponto de viragem com o indicador fenolftaleína. Sendo calculada pela EQUAÇÃO 2:

$$C_{\text{Ácido Acético}} \times V_{\text{Ácido Acético}} = C_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}} \quad (2)$$

onde,

C = Concentração (mol/L)

V = Volume (L)

3.6. ANÁLISES COLORIMÉTRICAS

3.6.1. Compostos fenólicos totais (CFT)

A determinação de CFT foi realizada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965). Em tubos de ensaio de 10 mL foram adicionados 7,35 mL de água destilada, 150 µL de extrato puro e 0,5 mL do reativo Folin-Ciocalteu. Após repousar por 3 minutos, foram adicionados 2,0 mL de Na₂CO₃ a 15% (m/v) a cada tubo e seguido de agitação em vórtex. Após 2h de reação, a absorbância foi determinada em um espectrofotômetro (BEL, UV-M51 UV/VIS, MI, Itália) a 765 nm. Os cálculos foram baseados em uma curva de calibração ($y = 0,0012x + 0,0031$; $R^2 = 0,9914$) obtida com ácido gálico (Sigma, São Paulo, SP, Brasil).

3.6.2. Flavonoides totais (FT)

A determinação de FT foi realizada pelo método colorimétrico de cloreto de alumínio (ZHUANG; LU; YANG, 1992). Em tubos de ensaio de 10 mL foram adicionados 1 mL de amostra, seguido de adição de 4 mL de água deionizada e 300 µL de solução de Nitrito de sódio (NaNO₂) 5% (m/v). Após repousar por 5 min foi adicionado 300 µL de solução de cloreto de

alumínio (AlCl_3) a 10% (m/v) e foi deixado reagir por mais 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L. A absorbância foi determinada em um espectrofotômetro (BEL, UV-M51 UV/VIS, MI, Itália) a 510 nm. Os valores foram calculados a partir de uma curva de calibração ($y = 0,0065x - 0,04$; $R^2 = 0,9979$) obtida com o padrão de catequina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

3.6.3. Atividade antioxidante (AA)

A determinação da AA foi realizada pelo método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e pelo método ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS). Para o método de DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995), foram adicionados em tubos de 10 mL 500 μL da amostra com 2,36 mL de álcool etílico e 2,14 mL da solução de DPPH preparada em álcool etílico a 1000 $\mu\text{mol/L}$. Então foi mantida no escuro por 30 minutos e sua absorbância determinada a 517 nm em espectrofotômetro (BEL, UV-M51 UV/VIS, MI, Itália). Os valores foram calculados a partir de uma curva de calibração ($y = -0,0004x + 0,4305$; $R^2 = 0,9937$) obtida com o padrão de Trolox (Acros Organics, Geel, Bélgica).

Para a determinação pelo método ABTS (RE et al., 1999) foram preparados 7 mmol/L de solução de ABTS e 140 mmol/L de solução de persulfato de potássio. Para o preparo do radical ABTS foram adicionados 5 mL da solução estoque ABTS com 88 μL da solução de persulfato de potássio. Então, foi colocado em um vidro âmbar e mantido no escuro, em temperatura ambiente por 16 h. Após o período, foi diluído 1 mL desta solução em 100 mL de álcool etílico até obter uma absorbância de $0,7 \text{ nm} \pm 0,05 \text{ nm}$ em espectrofotômetro (BEL, UV-M51 UV/VIS, MI, Itália) a 734 nm. Em tubos de ensaio foram adicionados 30 μL de amostra para 3 mL da solução radical ABTS. Foi deixado em descanso por 6 minutos e então a absorbância foi determinada a 734 nm (BEL, UV-M51 UV/VIS, MI, Itália). Os valores foram calculados de calibração ($y = -0,0002x + 0,5885$; $R^2 = 0,994$) obtida com o padrão de Trolox (Acros Organics, Geel, Bélgica).

3.6.4. Açúcares redutores (AR)

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (COUGHLAN; MOLONEY, 1988). O reagente foi preparado com 10 g de ácido dinitrosalicílico e 300 g de sódio tartarato de potássio adicionados a 800 mL de NaOH a 0,5 N. A solução foi aquecida suavemente e mantida sob agitação magnética até estar dissolvida. O volume foi completado para 1 L com água destilada e a ajuda de um balão

volumétrico. Em tubos de 10 mL foram adicionados 1 mL de amostra e 4 mL do reativo DNS preparado. Posteriormente colocados em banho-maria por ebulição por 5 minutos e então foram colocados em banho de gelo por mais 5 min até atingir a temperatura ambiente. A sua absorbância foi determinada a 540 nm em espectrofotômetro (BEL, UV-M51 UV/VIS, MI, Itália). Os cálculos foram baseados em uma curva de calibração ($y = 1,3653x - 0,0555$; $R^2 = 0,9972$) obtida com glicose (Neon, Suzano, Brasil).

3.6.5. Proteínas totais (PT)

A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Onde o reagente foi preparado dissolvendo 100 mg de azul brilhante de Coomassie em 50 mL de etanol 95%, então a solução foi misturada com 100 mL de ácido fosfórico a 85% e completado até 1 L de água destilada com o auxílio de um balão volumétrico. Posteriormente foi filtrado em papel filtro Whatman nº1. Em tubos de ensaio de 10 mL foram adicionados 100 µL de amostra e 5 mL do reagente preparado. Então, foram misturados suavemente em vórtex e deixado em repouso por 5 min. A sua absorbância foi determinada a 595 nm em espectrofotômetro (BEL, UV-M51 UV/VIS, MI, Itália). Os cálculos foram baseados em uma curva de calibração ($y = 0,0025x + 0,1766$; $R^2 = 0,9952$) obtida com albumina do soro bovino (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

3.7. CARACTERIZAÇÃO DA CB

3.7.1. Capacidade de absorção de água (CAA)

A CAA foi determinada por meio da imersão das membranas secas em água deionizada e armazenadas até o equilíbrio (aproximadamente 48 h), em estufa à 35 ± 2 °C. Então, as membranas foram removidas da água e o excesso de água retirado da superfície. O peso das membranas hidratadas foi medido por balança analítica, sendo repetido até o equilíbrio. A CAA foi calculada de acordo com a EQUAÇÃO 3 (SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010).

$$CAA (\%) = \left(\frac{W_h - W_d}{W_d} \right) \times 100 \quad (3)$$

onde,

W_h : peso da CB hidratada;

W_d : peso da CB seca.

3.7.2. Ponto de carga zero (pH_{pcz})

O pH_{pcz} da membrana pura foi determinado a partir da metodologia do “experimento dos 11 pontos” de Regalbuto e Robles (2004) com modificações. O procedimento consistiu na adição de 20 mg da membrana em 20 mL de solução aquosa com diferentes condições de pH (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) ajustados com soluções de 0,1 M de ácido clorídrico (HCL) e 0,1 M de hidróxido de sódio (NaOH). Após 24 h em contato foi obtido o pH em equilíbrio das soluções utilizando um pHmetro de bancada Gehaka de modelo PG1800. O pH_{pcz} foi determinado de acordo com a faixa média onde o pH permaneceu constante.

3.7.3. Dessorção dos compostos bioativos

Para realizar os testes colorimétricos as membranas passaram pelo processo de dessorção baseado na metodologia de Buran et al. (2014), com modificações. Onde, 1 g das membranas foram colocadas em Erlenmeyr com 50 mL de etanol 80%, onde permaneceram em temperatura ambiente por 4 h em agitador a 45 rpm.

3.7.4. Cristalinidade

As amostras de membrana purificada e adsorvida foram analisadas em um difratômetro de raios X Shimadzu de modelo XRD-7000, no Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais (CMCM) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O equipamento foi operado a 30 kV e 30 mA com varredura de $2^\circ/\text{min}$ e ângulos de 5 a 100° (2θ). A metodologia utilizada foi baseada no estudo de DU et al. (2018), com as devidas adaptações para atender às especificações do equipamento utilizado.

3.7.5. Identificação das microestruturas

A identificação das microestruturas das membranas pura e adsorvida foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) pelo Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss de modelo EVO MA 15, no Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais (CMCM) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Para a preparação das imagens as membranas foram revestidas com 90 nm de ouro, o equipamento foi operado a 20 kV e foi ampliado de 500-5000 vezes até o máximo de resistência das membranas ao calor do equipamento.

3.7.6. Estabilidade térmica

A determinação da estabilidade térmica das membranas foi determinada por meio de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) pelo equipamento SDT Q600 da TA Instruments. Utilizou-se aproximadamente 4 a 8 mg das amostras de celulose bacteriana pura seca e adsorvida seca em cadinho de alumínio hermeticamente fechado sob taxa de aquecimento de 10°C/min até 600°C utilizando atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min. A metodologia utilizada foi baseada no trabalho de Vieira et al. (2013), com as modificações necessárias para atender às especificações do equipamento utilizado.

3.8. ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

O parâmetro estudado para as isotermas de adsorção foi o equilíbrio entre a concentração de fenólicos presentes no meio de chá verde inicial e a quantidade de fenólicos presentes após a adsorção por meio da membrana de celulose pura. Para a realização das isotermas de adsorção foi utilizado 15 mL de chá verde em diferentes concentrações (1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L, 6 g/L, 7 g/L, 8 g/L, 9 g/L, 10 g/L) e 0,680 g de adsorvente, as amostras foram mantidas estáticas, no escuro a 30°C por 2 h. Para a análise dos resultados da adsorção de fenólicos foram utilizados os modelos de isotermas descritos na TABELA 4. Foram incluídos os modelos não lineares por meio do programa OriginPro 2023 (OriginLab, Northampton, Massachusetts, Estados Unidos) e o melhor ajuste foi determinado com base no coeficiente de correlação (R^2).

Tabela 5 - Modelos e equações utilizados para calcular os parâmetros isotérmicos

Modelo	Equação	
Sips	$q_e = \frac{q_{max} \cdot K_s \cdot C_e^S}{1 + K_s \cdot C_e^S}$	4
Freundlich	$q_e = K_F C_e^{1/n}$	5
Langmuir	$q_e = \frac{q_{max} \cdot K_L \cdot C_e}{1 + K_L \cdot C_e}$	6
Redlich-Peterson	$q_e = \frac{K_{RP} C_e}{(1 + a_{rp} C_e^\alpha)}$	7
Jovanovic-monolayer	$q_e = q_{max}(1 - \exp^{-K_{JM} C_e})$	8
Temkin	$q_e = B_T \ln(K_T C_e)$	9

Toth	$q_e = \frac{q_{max} K_{TO} C_e}{[1 + (K_{TO} C_e)^t]^{1/tn}}$	10
Dubinin-Radushkevich	$q_e = q_{max,exp}(-K_{DR} \varepsilon^2),$ $\varepsilon = RT \left(1 + \frac{1}{C_e}\right), \quad E = \frac{1}{\sqrt{2K_{DR}}}$	11, 12, 13

LEGENDA: q_e : capacidade de adsorção em equilíbrio (mg/g); q_{max} : capacidade de adsorção máxima (mg/g); C_e : concentração de equilíbrio do soluto (mg/L); K_s : constante de adsorção (mg/L)^{-1/n}; s : parâmetro de Sips; K_F : constante de Freundlich (L/g); n : parâmetro de heterogeneidade de superfície; K_L : constante de Langmuir (L/g); K_{RP} : constante de Redlich-Peterson (L/g); a_{rp} : parâmetro de Redlich-Peterson (L/mg); α : fator exponencial de Redlich-Peterson ($0 < \alpha \leq 1$); K_{JM} : constante de Jovanovic-monolayer (L/mg); B_i : constante relacionada com o calor da adsorção (J/mol); K_T : constante de Temkin (L/g); K_{TO} : constante de Toth; tn : fator exponencial de Toth ($0 < n \leq 1$); K_{DR} : constante de Dubinin-Radushkevich; ε : potencial de adsorção; R : constante universal do gases (8,314 J/mol K); T : temperatura (K); E : energia livre de adsorção (kJ/mol).

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas em duplicata. Os dados obtidos foram apresentados como média \pm desvio padrão. A análise estatística dos dados foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para determinar diferença significativa das amostras no intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$), o qual foi representado pelas letras sobrescritas nos valores de desvio padrão. O software Statistica 8.0 (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, Estados Unidos) foi utilizado para os delineamentos experimentais de Plackett-Burman e Box-Behnken assim como para suas respectivas análises, para todas as análises colorimétricas, pH, acidez total e pH_{pcz}. O software OriginPro 2023 (OriginLab, Northampton, Massachusetts, Estados Unidos) foi aplicado nas análises de determinação de cristalinidade da CB, estabilidade térmica e nas isotermas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. SELEÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Para o planejamento de Plackett-Burman de oito replicatas, cada coluna representa uma variável independente e cada linha representa um experimento. Os sinais +1 e -1 representam, respectivamente, os níveis superiores e inferiores das variáveis independentes estudadas. Os valores decodificados estão presentes na Tabela 2. Os resultados do delineamento de Plackett-

Burman sobre os efeitos das 7 variáveis de cultivo na produção de CB e peso seco da membrana estão resumidos na TABELA 6.

Tabela 6 - Planejamento Plackett-Burman para 7 variáveis com valores codificados e resultados para peso seco da membrana e produção de CB.

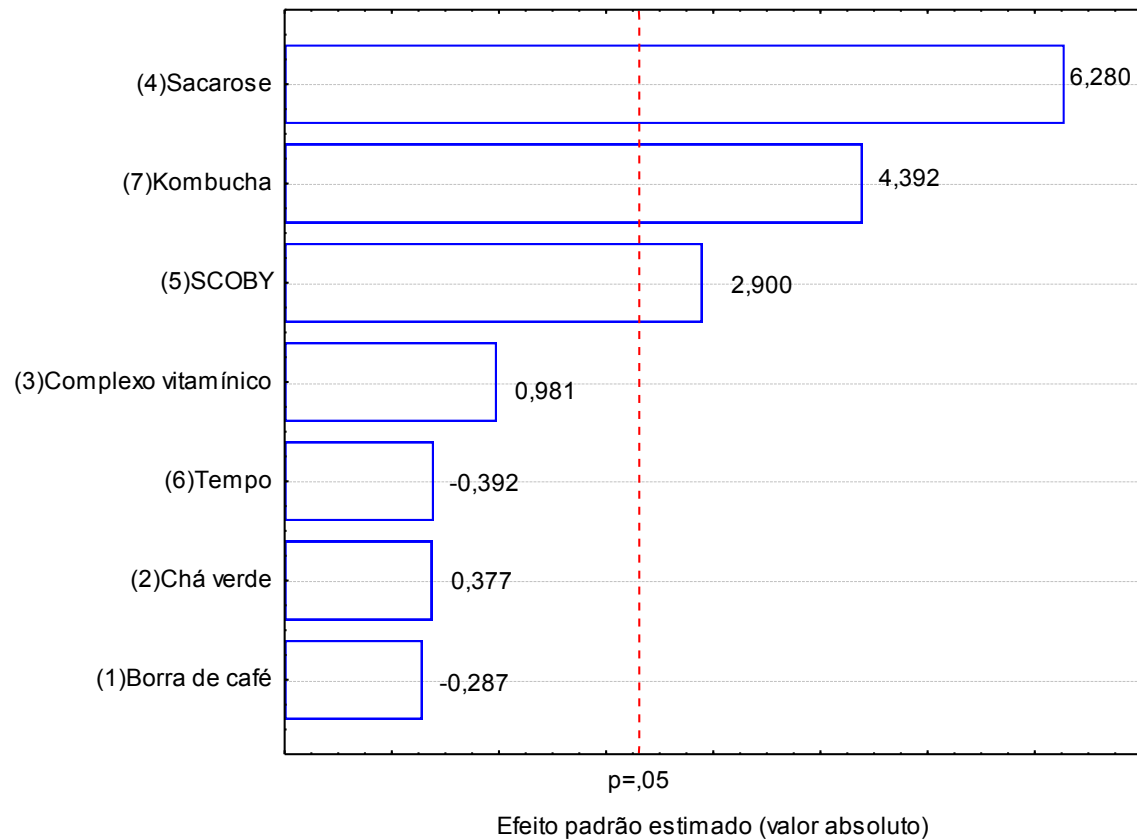
Experimentos	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	Produção CB (g/dia.L)	Peso CB seca (g/L)
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0,23 ^{cd} ±0,02	2,30 ^{ab} ±0,22
2	-1	-1	1	1	-1	-1	1	0,28 ^{de} ±0,00	1,94 ^a ±0,00
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1	0,21 ^{bc} ±0,01	1,48 ^a ±0,09
4	-1	1	1	-1	-1	1	-1	0,10 ^a ±0,00	1,00 ^a ±0,02
5	1	-1	-1	-1	-1	1	1	0,18 ^{a±} 0,04	1,82 ^a ±0,45
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1	0,14 ^{ab} ±0,00	0,86 ^a ±0,14
7	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0,20 ^a ±0,07	1,33 ^a ±0,63
8	1	1	1	1	1	1	1	0,32 ^e ±0,00	3,21 ^a ±0,03

FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: X₁: Borra de café, X₂: Chá verde, X₃: Complexo vitamínico, X₄: Sacarose, X₅: SCOBY, X₆: Tempo de incubação e X₇: Kombucha.

O delineamento experimental de Plackett-Burman foi utilizado para definir quais variáveis apresentam influência significativa para a produção da CB. Podemos observar que dentro das condições estudadas a melhor combinação entre nutrientes e parâmetros físicos o meio de cultivo do experimento 8 apresentou a maior produção de CB ($0,32 \pm 0,00$) e peso seco da membrana ($3,21 \pm 0,03$). A partir do gráfico de Pareto (FIGURA 4) é possível verificar as variáveis que exerceram efeito significativo na produção da CB.

Figura 4 - Gráfico de Pareto para o delineamento Plackett-Burman.



FONTE: A autora (2022).

Observou-se que as concentrações de sacarose, kombucha e do SCOBY exerceram um efeito significativo positivo na produção de CB em um nível de confiança $p < 0,05$. No entanto, as concentrações de complexo vitamínico, chá verde, borra de café e o tempo de incubação não apresentaram efeitos significativos. Os resultados indicam que tais fatores podem não ser significativos para a produção do SCOBY, ou necessitam de investigações mais aprofundadas para compreender plenamente seu efeito no processo produtivo. É importante ressaltar que esses resultados são específicos para o estudo atual e que podem variar dependendo das condições experimentais utilizadas. Portanto, é fundamental realizar análises estatísticas adequadas para avaliar o efeito dos diferentes fatores e otimizar o meio de cultivo de acordo com as necessidades específicas de cada processo de produção. Uma possível explicação para o fato de apenas alguns fatores serem significativos pode ser o efeito sinérgico, com a combinação dos três fatores relevantes gerando um efeito positivo maior do que seria observado se cada fator fosse testado individualmente. Esse tipo de efeito sinérgico é comum em processos biológicos complexos.

Conforme evidenciado, a melhor composição para o meio requer níveis superiores de sacarose, kombucha e SCOBY. Como resultado, foram selecionadas para o delineamento experimental de Box-Behnken apenas as variáveis que apresentaram significância de acordo com o delineamento de Plackett-Burman.

Para o planejamento de Box-Behnken com quinze replicatas, cada coluna representa uma variável independente e cada linha representa um experimento. Os sinais +1, 0 e -1 representam os níveis das variáveis independentes estudadas. Os valores decodificados estão presentes na Tabela 3. Os resultados do delineamento de Box-Behnken sobre os efeitos das 3 variáveis de cultivo na produção de CB e peso seco da membrana estão resumidos na TABELA 6.

Tabela 7 - Planejamento Box-Behnken para 3 variáveis com valores codificados e resultados para peso seco da membrana e produção de CB.

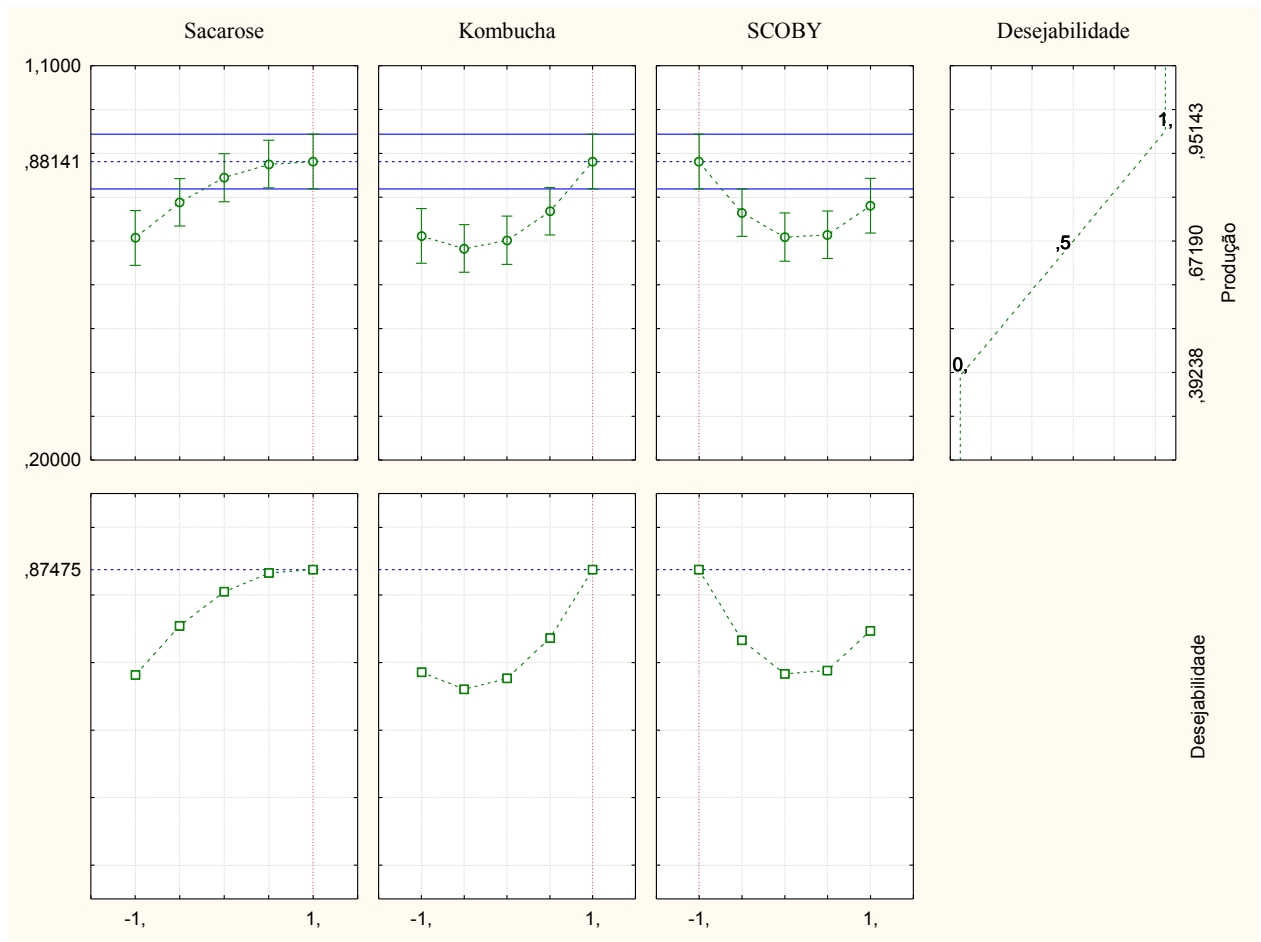
Experimentos	X ₁	X ₂	X ₃	Produção CB (g/dia.L)	Peso CB seca (g/L)
1	-1	-1	0	0,40 ^a ±0,02	2,83 ^a ±0,11
2	1	-1	0	0,49 ^{ab} ±0,01	3,44 ^{ab} ±0,04
3	-1	1	0	0,49 ^{ab} ±0,02	3,43 ^{ab} ±0,12
4	1	1	0	0,76 ^c ±0,02	5,34 ^c ±0,16
5	-1	0	-1	0,50 ^b ±0,02	3,53 ^b ±0,12
6	1	0	-1	0,67 ^{de} ±0,02	4,71 ^{de} ±0,14
7	-1	0	1	0,45 ^{ab} ±0,01	3,18 ^{ab} ±0,07
8	1	0	1	0,62 ^d ±0,02	4,37 ^d ±0,14
9	0	-1	-1	0,65 ^d ±0,01	4,55 ^d ±0,08
10	0	1	-1	0,92 ^f ±0,05	6,45 ^f ±0,30
11	0	-1	1	0,61 ^{cd} ±0,04	4,26 ^{cd} ±0,25
12	0	1	1	0,66 ^d ±0,03	4,61 ^d ±0,18
13	0	0	0	0,53 ^{bc} ±0,02	3,71 ^{bc} ±0,15
14	0	0	0	0,49 ^{ab} ±0,01	3,40 ^{ab} ±0,09
15	0	0	0	0,46 ^{ab} ±0,03	3,23 ^{ab} ±0,18

FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: X₁: Sacarose, X₂: Kombucha, X₃: SCOBY.

O delineamento de Box-Behnken foi utilizado para determinar qual o melhor meio de cultivo para a produção de celulose bacteriana. Para obter as melhores condições de otimização foi utilizada a função de desejabilidade do programa Statistica 8.0, o qual permite obter os valores ótimos para os parâmetros estudados. A FIGURA 5 apresenta os gráficos dos perfis dos valores otimizados, contendo a função de desejabilidade e os valores otimizados das variáveis.

Figura 5 - Perfil dos valores previstos e da desejabilidade para o planejamento composto central.



FONTE: A autora (2022).

Os gráficos foram utilizados para analisar a variação da produção de CB para cada variável, mantendo os outros fatores em valores fixos críticos. O quarto gráfico apresenta a faixa de desejabilidade aceitável, que varia de $p \leq dj \leq 1$. O valor máximo de D indica a condição otimizada do sistema. Os três últimos gráficos mostram a desejabilidade individual para cada variável, que indica o efeito de cada variável na produção de CB. Sendo, sacarose em nível superior (+1), kombucha em nível superior (+1) e SCOBY em nível inferior (-1). A desejabilidade global foi de 0,87475, indicando que a combinação desses três fatores em níveis específicos resultou em um meio de cultivo otimizado para a produção de CB. Os gráficos foram utilizados para analisar a variação da produção de CB para cada variável, mantendo os outros fatores em valores fixos críticos. O quarto gráfico apresenta a faixa de desejabilidade aceitável, que varia de $p \leq dj \leq 1$. O valor máximo de D indica a condição otimizada do sistema. Os três últimos gráficos mostram a desejabilidade individual para cada variável, que indica o efeito de cada variável na produção de CB.

Assim, a partir dos níveis ideais para a produção de CB, foi possível obter a composição otimizada do meio de cultivo, que consistem 110 g/L de sacarose, 40% (v/v) de kombucha padrão, 5% (m/v) de SCOBY e 3 g/L de chá verde. Esses resultados podem ser utilizados para otimizar o processo de produção de CB e melhorar sua eficiência em larga escala.

Para avaliar a eficácia do meio otimizado, foram realizadas produções de CB utilizando um meio básico de chá verde (composto por 3g de chá verde, 70g de sacarose, 10% de kombucha e 5% de SCOBY) e o meio otimizado pelo método Box Behnken. No meio básico de chá verde, a produção de CB foi de $0,491 \pm 0,02$ g/dia.L, enquanto no meio otimizado, a produção aumentou significativamente para $0,855 \pm 0,03$ g/dia.L. Isso representa uma porcentagem de otimização de aproximadamente 86,7%, evidenciando a eficácia do meio otimizado em melhorar a produção de CB em comparação com o meio básico de chá verde.

4.2. AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO

A avaliação cinética do meio de cultura foi utilizada para determinar os processos ocorridos durante a fermentação da kombucha e produção da celulose bacteriana. A TABELA 8 resume os resultados obtidos das CFT, FT e AA para cinética de 7 dias do meio de cultura otimizado e a TABELA 9 apresenta os dados obtidos para as concentrações de pH, AR, PT, produção de CB e peso da CB seca para cinética de mesmo âmbito.

Tabela 8 - CFT, FT, AA do meio de cultura durante a cinética.

Dia de Produção	CFT (mg/L)	FT (mg/L)	AA (μ M)	
			DPPH	ABTS
0	371,75 ^a ±13,26	41,72 ^a ±0,69	945,00 ^a ±6,01	2346,75 ^a ±0,02
1	387,63 ^a ±15,91	41,21 ^a ±0,77	942,75 ^{ac} ±7,77	2451,00 ^a ±0,08
2	416,75 ^{ab} ±22,10	40,60 ^a ±0,81	926,12 ^{abc} ±6,54	2460,00 ^a ±0,00
3	474,25 ^{bc} ±15,03	40,42 ^a ±0,09	923,75 ^{abc} ±4,59	2306,25 ^a ±0,00
4	500,50 ^c ±0,88	40,25 ^a ±0,40	919,25 ^{bc} ±1,06	2227,25 ^a ±0,00
5	560,50 ^d ±22,10	41,15 ^a ±0,08	913,62 ^{bc} ±7,60	2350,75 ^a ±0,01
6	586,13 ^d ±12,37	46,92 ^b ±0,71	936,50 ^{abc} ±7,77	2592,50 ^a ±0,03
7	668,63 ^e ±5,30	51,12 ^b ±0,10	943,50 ^a ±1,76	2789,00 ^a ±0,01

FONTE: A autora (2022).

Tabela 9 - pH, acidez total, AR, PT, produção de CB e peso CB seca durante a cinética.

Dia de Produção	pH	Acidez total (g/100mL)	AR (g/L)	PT (g/L)	Produção (g/dia.Litro)	Peso CB seca (g/L)
-----------------	----	------------------------	----------	----------	------------------------	--------------------

0	2,69 ^c ±0,00	0,40 ^c ±0,00	24,77 ^a ±0,36	0,59 ^b ±0,00	0,00 ^b ±0,00	0,00 ^a ±0,00
1	2,67 ^c ±0,01	0,63 ^a ±0,02	27,43 ^b ±0,06	0,61 ^d ±0,00	0,00 ^b ±0,00	0,00 ^a ±0,00
2	2,59 ^c ±0,01	0,64 ^a ±0,04	30,07 ^c ±0,08	0,52 ^a ±0,00	2,29 ^d ±0,05	4,58 ^b ±0,09
3	2,55 ^d ±0,01	0,69 ^{ab} ±0,02	34,97 ^d ±1,03	0,53 ^a ±0,00	1,71 ^c ±0,08	5,14 ^{bc} ±0,24
4	2,49 ^b ±0,01	0,73 ^{ab} ±0,00	45,77 ^c ±0,66	0,53 ^a ±0,00	1,42 ^a ±0,12	5,70 ^c ±0,48
5	2,45 ^b ±0,00	0,77 ^b ±0,04	58,94 ^f ±0,42	0,56 ^b ±0,00	1,48 ^{ac} ±0,01	7,41 ^c ±0,07
6	2,41 ^a ±0,01	0,95 ^d ±0,04	64,40 ^g ±0,54	0,63 ^c ±0,00	1,48 ^a ±0,07	8,85 ^d ±0,42
7	2,38 ^a ±0,00	1,09 ^c ±0,02	76,96 ^h ±0,44	0,70 ^f ±0,00	1,40 ^a ±0,02	9,83 ^d ±0,16

FONTE: A autora (2022).

4.2.1. CFT e FT

O processo de fermentação da kombucha é conhecido por influenciar positivamente a concentração de compostos fenólicos presentes no chá verde, uma vez que esses compostos são mais estáveis em solução ácida do que em solução alcalina. Dessa forma, o processo de fermentação da kombucha é capaz de aumentar a concentração de CFT no chá (JAYABALAN; MARIMUTHU; SWAMINATHAN, 2007).

Podemos observar na FIGURA 6 um crescimento esperado para a produção de kombucha. A concentração de compostos fenólicos no chá fermentado teve um aumento de aproximadamente 80% ao longo de 7 dias.

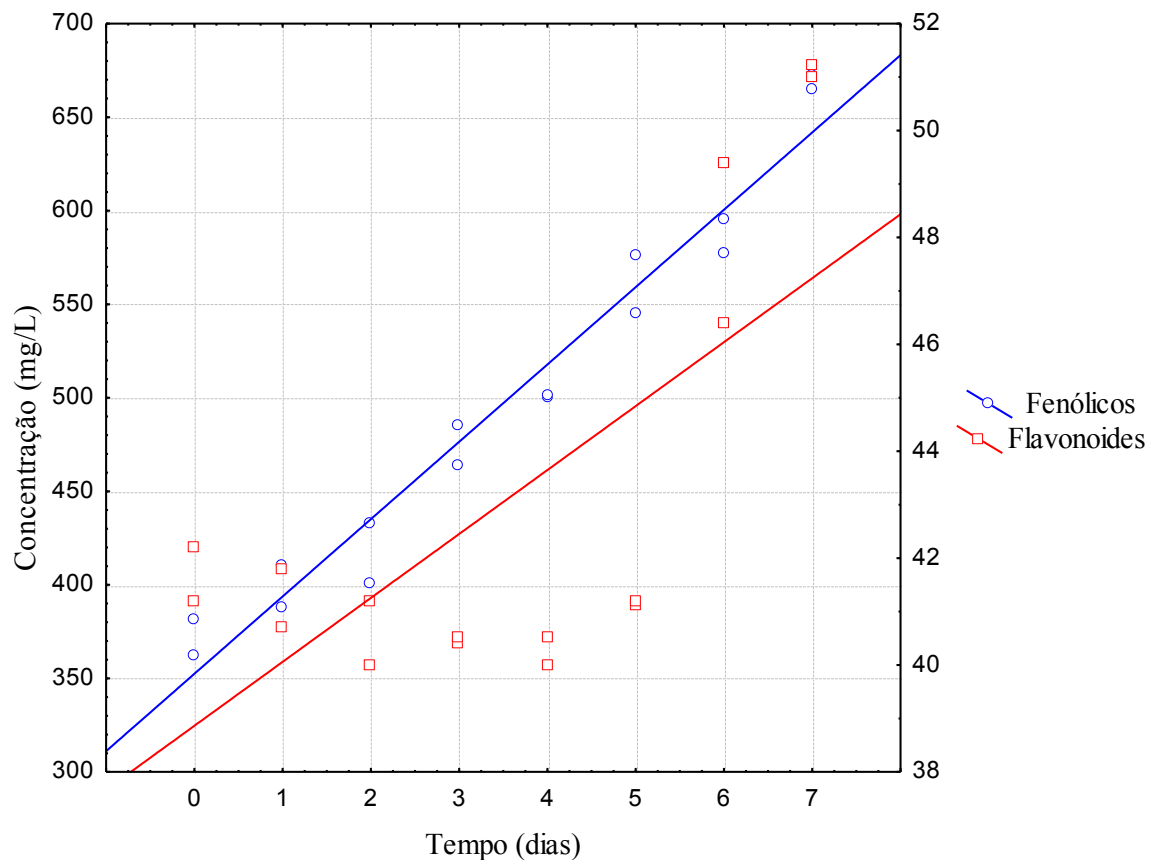
O estudo de Chakravorty et al. (2016) demonstrou que a fermentação de chá preto resultou em um aumento de 54% na concentração de compostos fenólicos totais após 21 dias. Por outro lado, Özdemir e Çon (2017) observaram um aumento de cerca de 20% em compostos fenólicos para a kombucha de chá verde e 10% para a de chá preto. Gaggia et al. (2019) obtiveram um aumento máximo de aproximadamente 35% no 7º dia da fermentação de chá verde. É importante destacar que vários fatores podem influenciar a variação de compostos fenólicos no meio, como tempo de fermentação, procedência e tipo de chá utilizado, assim como a composição da cultura starter (OLBA DO COUTO; DE LIMA, 2022). Entretanto, o meio de cultura otimizado utilizado no atual estudo apresentou uma capacidade superior de produção de compostos fenólicos em comparação a outros estudos.

No início da fermentação, há uma maior atividade metabólica das bactérias e leveduras, o que pode levar à degradação de alguns flavonoides. Porém, conforme a fermentação prossegue, os metabólitos produzidos pelas bactérias e leveduras começam a influenciar a atividade das enzimas, levando a uma maior estabilidade dos flavonoides no meio. Além disso, alguns metabólitos produzidos durante a fermentação, como os ácidos orgânicos, podem ajudar a extrair e solubilizar os flavonoides presentes no chá (SREERAMULU; ZHU; KNOL, 2000).

Por esses motivos, é comum observar uma oscilação na concentração de flavonoides totais durante a fermentação da kombucha, com uma diminuição e um aumento posterior.

Embora a concentração final de flavonoides tenha sido inferior em comparação a outros estudos, com um total de $51,12 \pm 0,10$ mg/L, houve um aumento significativo de 22,5% ao final da fermentação. Em estudo realizado por Li et al. (2022), houve um aumento de 14% na concentração de flavonoides para a kombucha tradicional de chá verde, passando de 318,21 para 362,90 mg/L durante a fermentação. Jakubczyk et al. (2020) obtiveram uma concentração total de $146,8 \pm 3,4$ mg/L de flavonoides em 7 dias de fermentação. De acordo com Gaggia et al. (2019), os valores mais altos de flavonoides são observados em 7 dias de fermentação, onde obtiveram um aumento de 11,6% em meio de chá verde, havendo uma diminuição em fermentações mais longas.

Figura 6 - Concentração de fenólicos e flavonoides totais.



FONTE: A autora (2022).

4.2.2. AA

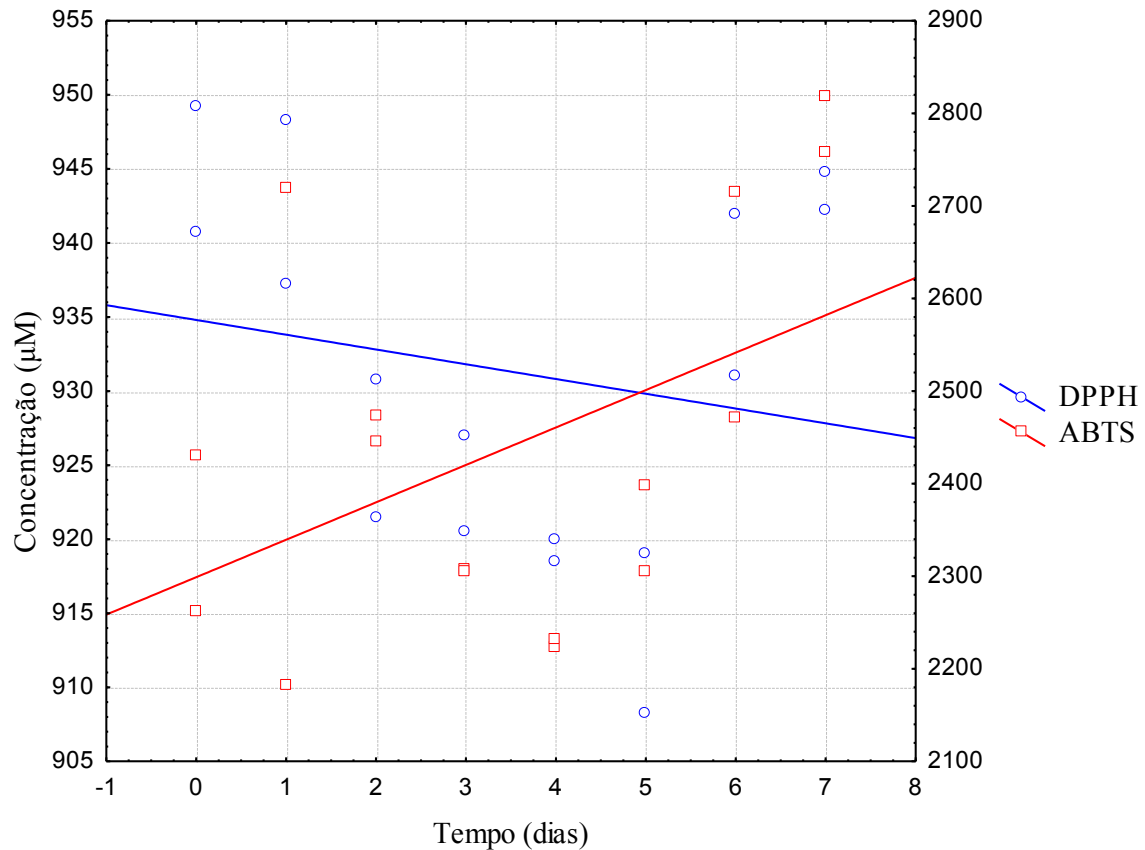
A AA da kombucha está diretamente relacionada à concentração de compostos fenólicos e sua capacidade de reagir com radicais livres, e esta atividade aumenta ao longo do tempo de fermentação. Em fermentações mais longas, é possível observar um maior aumento na AA. Por exemplo, no estudo de Chakravorty et al. (2016), a AA dos radicais DPPH e ABTS aumentou em 39,7% e 38,4%, respectivamente, em uma fermentação de 21 dias. No entanto, a AA depende de vários fatores, incluindo o tipo de substrato, tempo de fermentação e microrganismos presentes. Khosravi et al. (2019) relataram um aumento de 7% na AA do radical DPPH em kombucha de chá preto fermentada por 15 dias. Chu e Chen (2006) determinaram um aumento de 70% e 40%, respectivamente, na AA dos radicais DPPH e ABTS em kombucha de chá preto fermentada por 7 dias.

No presente estudo, foram avaliados dois testes antioxidantes, o DPPH e o ABTS, ao longo de sete dias de fermentação da kombucha. Observou-se na FIGURA 7 que a AA do DPPH apresentou uma queda nos primeiros dias, resultando em uma diminuição de 0,16% em relação ao primeiro dia. No entanto, a AA voltou a crescer após o 6º dia e tem a tendência de continuar aumentando, o que indica que a kombucha pode ser uma fonte promissora de compostos antioxidantes.

Já a AA do ABTS também apresentou uma queda nos primeiros dias, mas teve um aumento de 18,85% ao final do 7º dia. Esses resultados sugerem que a kombucha pode ter um efeito antioxidante significativo, especialmente em fermentações mais longas. Uma possível explicação para a diminuição da AA nos primeiros dias da fermentação da kombucha é que, como mencionado anteriormente, no início da fermentação há uma maior atividade metabólica das bactérias e leveduras, que utilizam os compostos fenólicos como substrato para o seu crescimento, o que pode levar à degradação desses compostos e, conseqüentemente, a uma redução temporária na AA.

No entanto, é importante destacar que essas diminuições na AA nos primeiros dias da fermentação não devem ser consideradas negativas, uma vez que fazem parte de um processo natural e necessário para a produção da kombucha e que, em fermentações mais longas, é possível observar um aumento significativo na AA. A AA também pode ter variações de acordo com o tipo de teste utilizado, e outros fatores, como a concentração de outros compostos bioativos, que podem influenciar a AA da kombucha.

Figura 7 - Atividade antioxidante por DPPH e ABTS.



FONTE: A autora (2022).

4.2.3. pH e acidez total

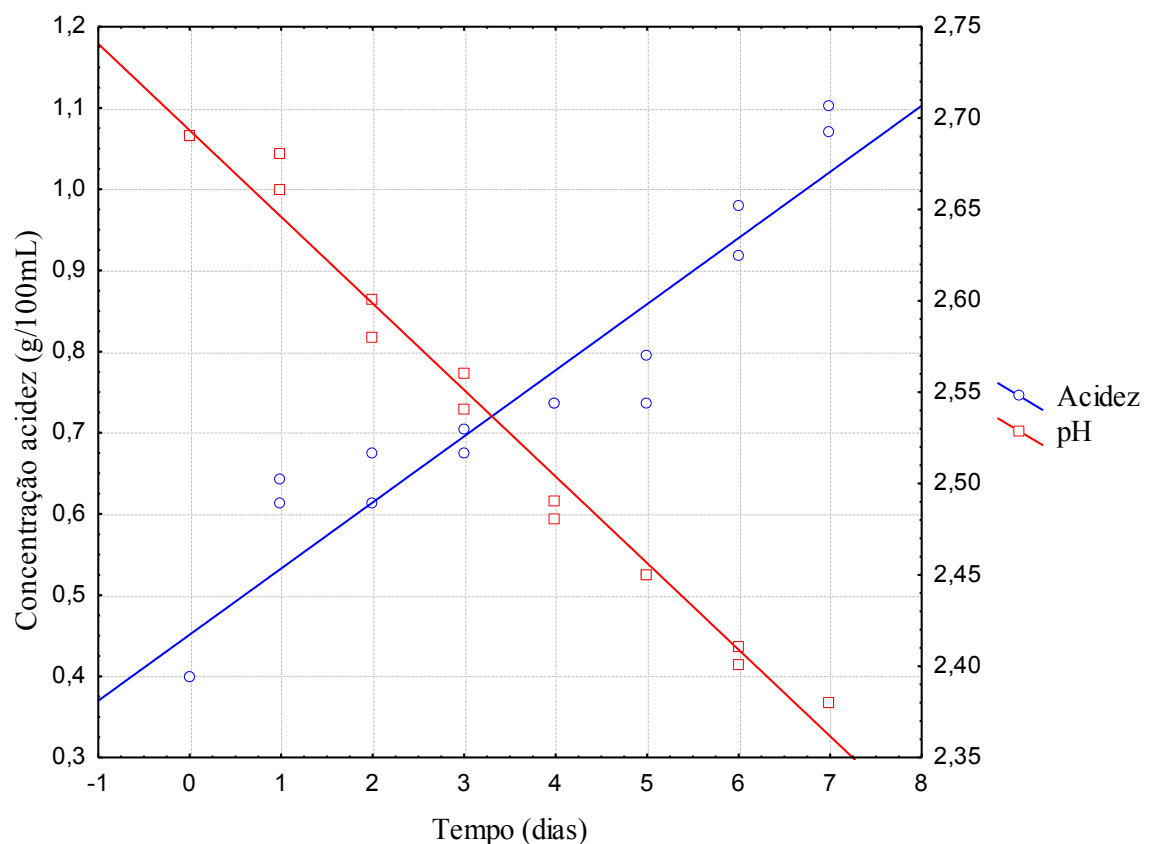
A FIGURA 8 apresenta a cinética do processo de acidificação da fermentação na produção de kombucha, que é um processo fermentativo que utiliza uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY). Durante a fermentação, as bactérias e leveduras presentes na SCOBY utilizam o açúcar do chá para produzir ácidos orgânicos, principalmente o ácido acético e o ácido glucônico, que são responsáveis por acidificar o meio (Chakravorty et al., 2016).

O pH inicial do meio era de 2,69 e diminuiu para 2,38 no 7º dia, indicando que houve uma acidificação do meio ao longo da fermentação. Observou-se uma queda mais brusca entre os dias 2 e 5 e, entre os dias 6 e 7, diminuiu constantemente. Segundo Jayabalan et al. (2008), após alguns dias de fermentação, a kombucha tem a tendência de tornar o decréscimo do pH mais lento por conta do efeito tampão oriundo da dissociação de dióxido de carbono (CO₂), que ocorre pela reação entre os íons de hidrogênio (H⁺) provenientes dos ácidos orgânicos e os ânions de bicarbonato (HCO₃⁻).

Além da acidificação do meio, também foi observado um aumento na acidez total ao longo da fermentação, expressa em g de ácido acético/100g. A produção de ácido acético é uma característica da produção de kombucha devido à presença de bactérias produtoras de ácido acético no SCOBY. A acidez total iniciou em 0,40 g/100mL e atingiu 1,09 g/100mL ao final do 7º dia.

Em resumo, a FIGURA 8 apresenta a cinética do processo de acidificação da fermentação na produção de kombucha, evidenciando a produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido acético e o ácido glucônico, que são responsáveis por acidificar o meio. Além disso, também foi observado um aumento na acidez total ao longo da fermentação, devido à produção de ácido acético pelas bactérias presentes no meio.

Figura 8 - Valores de pH e acidez total.



FONTE: A autora (2022).

4.2.4. Açúcares redutores

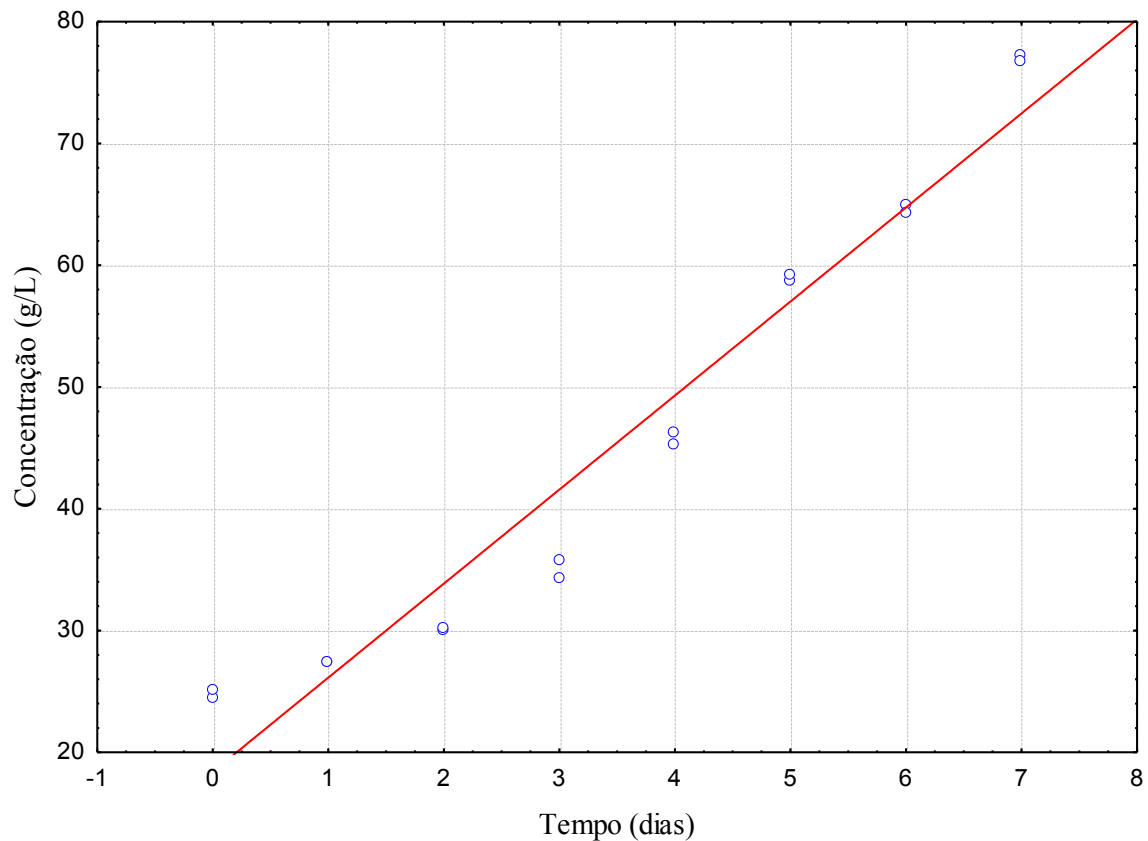
Açúcares redutores são carboidratos que possuem grupo aldeído ou cetona livre em sua estrutura, o que permite a redução de íons metálicos, como o íon cúprico (Cu^{2+}), para íons

cuprosos (Cu^+), em soluções alcalinas. A glicose e a frutose são exemplos de monossacarídeos redutores, enquanto a sacarose, um dissacarídeo composto por uma molécula de glicose e uma de frutose, não apresenta grupo aldeído ou cetona livre e, portanto, é considerada um açúcar não redutor. No entanto, a sacarose pode se tornar um açúcar redutor em determinadas condições, como a ação enzimática ou a hidrólise ácida, que quebram a molécula de sacarose em seus componentes de glicose e frutose, que são açúcares redutores (SANTOS et al., 2018). Isso é importante para a produção de kombucha, pois a fermentação dessa bebida envolve a quebra da sacarose do chá em açúcares redutores, que são utilizados pelas bactérias e leveduras do SCOBY para produzir ácidos orgânicos e outras substâncias.

A FIGURA 9 apresenta a quantidade de açúcares redutores ao longo do processo de fermentação da kombucha, sendo que a concentração inicial de açúcares redutores no meio era de 24,77 g/L. O gráfico mostra que a quebra da sacarose em açúcares redutores foi mais vagarosa nos primeiros 3 dias e, a partir do 4º dia, ocorreu de forma mais rápida, atingindo 77,05 g/L ao final do 7º dia. Esse aumento na quantidade de açúcares redutores é esperado na produção de kombucha, uma vez que a bebida é produzida a partir da fermentação da sacarose presente no chá.

É importante notar que a concentração final de açúcares redutores na fermentação de kombucha pode variar dependendo das condições do processo de fermentação, como a quantidade de açúcar adicionada ao chá e o tempo de fermentação. Neste estudo, foi utilizado 40% (v/v) de kombucha previamente fermentada, o que significa que a bebida utilizada já apresenta em sua composição açúcares redutores e, uma vez que a sacarose não é totalmente consumida na primeira semana de fermentação (JAYABALAN et al., 2014), isso pode explicar a quantidade relativamente alta de açúcares redutores ao final do processo de fermentação.

Figura 9 - Concentração de açúcares redutores totais.



FONTE: A autora (2022).

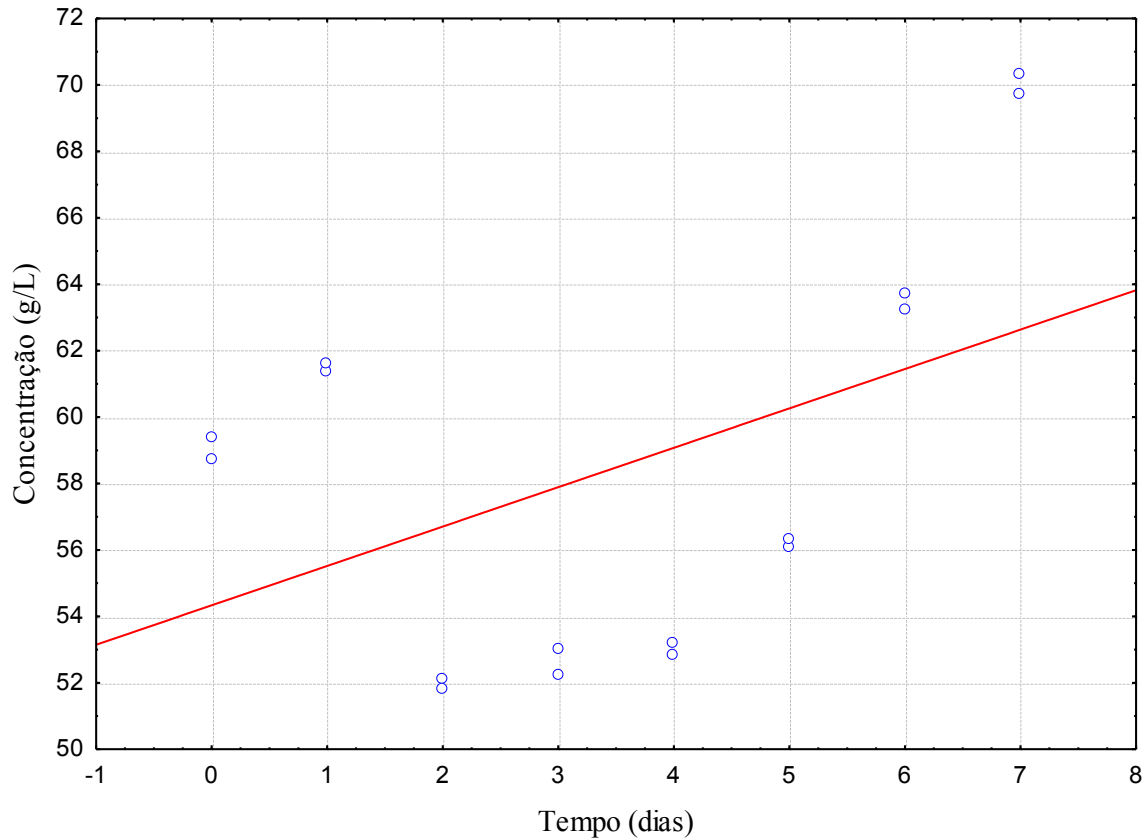
4.2.5. Proteínas totais

Durante o processo de fermentação da kombucha, há uma melhoria na digestibilidade dos nutrientes presentes no meio de cultivo. Esse benefício é atribuído ao SCOBY, que é capaz de sintetizar enzimas, como proteases e lipases, que auxiliam na quebra de proteínas e lipídios presentes nos ingredientes do meio de cultivo. Com isso, os nutrientes são transformados em formas mais simples, tornando-os mais acessíveis para o crescimento microbiano (TEOH; HEARD; COX, 2004).

A cinética da concentração de proteínas no meio de cultivo foi analisada e observou-se um aumento de 18,6% em sete dias de fermentação, atingindo um valor final de 0,70 g/L (FIGURA 10). Esse resultado está de acordo com a literatura, que indica que o valor total de proteínas deve estar em torno de 1g/L (GRAHAM, 1992; NAGAO et al., 2005). É importante destacar que o decréscimo da concentração nos primeiros dias se deve ao consumo de nitrogênio pelos microrganismos durante o processo de fermentação (KHOSRAVI et al., 2019). Estudos anteriores, como o de Kallel et al. (2012), mostraram que o valor de 0,66 g/L de proteínas totais foi alcançado em meio de chá verde fermentado por seis dias, apresentando um crescimento de

40%. Por outro lado, Sreeramulu, Zhu e Knol (2000) encontraram uma concentração de proteínas de aproximadamente 0,20 g/L em 14 dias de fermentação utilizando cultura de chá preto. Essas diferenças podem ser explicadas pelas variações nos ingredientes do meio de cultivo, tempo de fermentação e cepas de microrganismos utilizadas em cada estudo.

Figura 10 - Concentração de proteínas totais.



FONTE: A autora (2022).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA

4.3.1. Capacidade de absorção de água

A membrana purificada produzida em meio otimizado de chá verde apresentou uma capacidade de absorção de água de $524,48 \pm 9,20\%$. Esse resultado condiz com os obtidos por outros autores quando a celulose foi produzida em meio de chá verde, onde Vieira et al. (2013) obteve $529,0 \pm 4\%$, Saibuatong e Phisalaphong (2010) apresentaram uma capacidade de 490% para a CB pura. Entretanto, a composição do meio é determinante para a variação encontrada entre diferentes estudos (VIEIRA et al., 2013). A membrana adsorvida também foi testada para

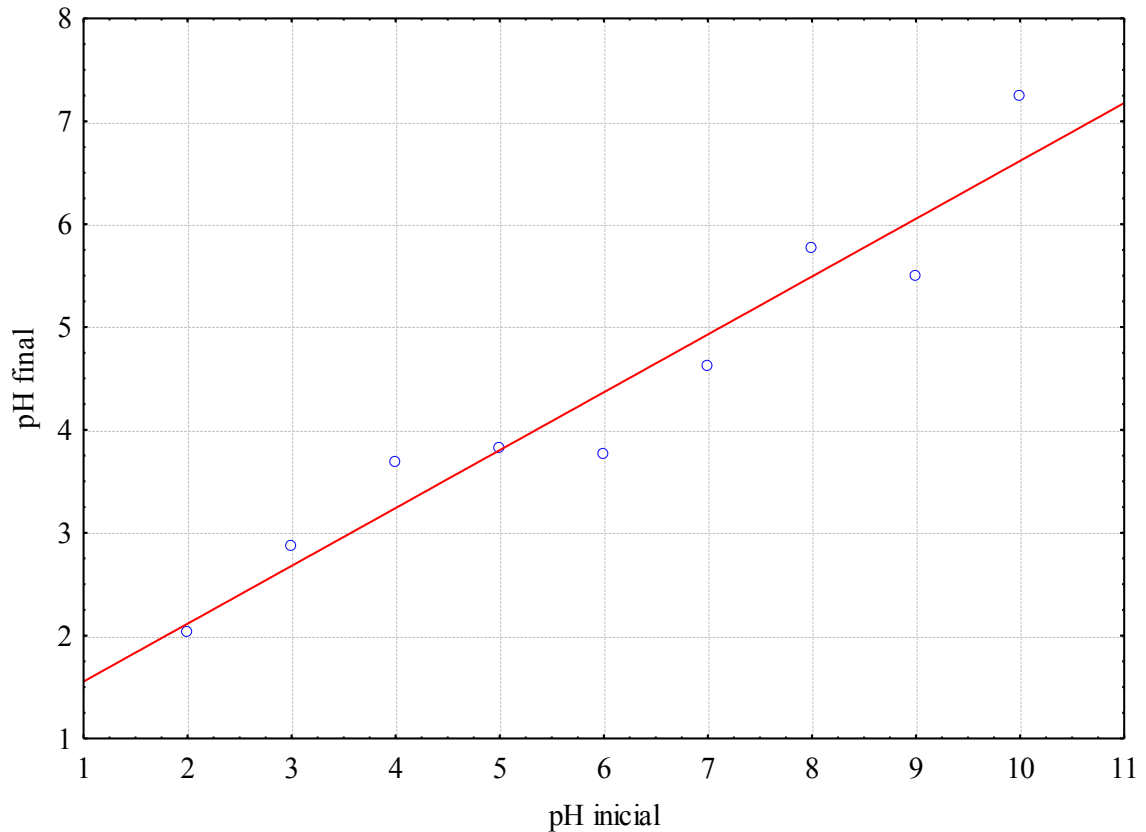
sua capacidade de absorção de água após seca, porém sua capacidade diminuiu em 47% ($277,71 \pm 2,28\%$). A diminuição da capacidade de absorção de água da membrana adsorvida pode estar relacionada à alteração da estrutura da celulose causada pela adsorção dos compostos presentes no chá verde, que pode afetar a capacidade da membrana de reter e absorver água.

A absorção de água é uma propriedade importante para a celulose bacteriana, pois afeta diretamente sua aplicação em diferentes áreas. Por exemplo, em aplicações biomédicas, a capacidade de reter água é importante para manter a umidade adequada em tecidos danificados, como queimaduras ou feridas (BÄCKDAHL et al., 2006). Por outro lado, em aplicações alimentícias, a capacidade de absorção de água é importante para melhorar a textura e estabilidade de alimentos (LIN; CHEN; CHEN, 2011). Além disso, a absorção de água também pode afetar as propriedades mecânicas e a porosidade da celulose bacteriana, o que pode ser útil em aplicações como membranas de filtração e suporte para reações enzimáticas (ISIK; UNYAYAR; DIZGE, 2018). Portanto, entender e controlar a capacidade de absorção de água da celulose bacteriana é crucial para sua aplicação em diferentes campos.

4.3.2. Ponto de carga zero (PCZ)

A FIGURA 11 apresenta a relação entre o pH inicial e final das soluções com diferentes concentrações de pH em contato com a membrana de celulose pura. Então, o ponto de carga zero foi calculado a partir da média aritmética dos pontos onde o pH final obteve carga neutra, sendo o resultado obtido de $\text{pH}_{\text{pcz}} 2,45$. Esse resultado pode ser explicado pela adaptabilidade dos microrganismos presentes no SCOBY em ambientes ácidos. O meio de cultura otimizado neste estudo apresenta naturalmente um pH mais ácido devido à presença inicial da kombucha, favorecendo o crescimento dos microrganismos que melhor se adaptam a esse tipo de ambiente. Essa característica pode ser interessante para aplicações que requerem materiais com superfície ácida, podendo ser utilizada em processo de separação e purificação que envolva a adsorção seletiva de moléculas carregadas positivamente ou neutralização de cargas superficiais negativas de moléculas. No entanto, é importante salientar que o pH_{pcz} pode variar de acordo com diferentes condições de cultivo e cepas de bactérias produtoras de celulose bacteriana.

Figura 11 - Determinação do ponto de carga zero.



FONTE: A autora (2022).

4.4.3. Determinação de proteínas totais, fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante

A TABELA 10 apresenta os resultados obtidos para determinação de proteínas totais, fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante, onde indicam que a celulose bacteriana purificada não apresenta concentrações detectáveis de fenólicos e flavonoides totais, nem atividade antioxidante em ambos os ensaios realizados (DPPH e ABTS). Isso pode ser explicado pelo fato de que a celulose bacteriana é composta principalmente de celulose pura, sem a presença significativa de compostos fenólicos ou flavonoides. Por outro lado, quando a celulose bacteriana foi adsorvida em meio de chá verde, foram detectadas concentrações significativas de fenólicos totais ($884,04 \pm 42,92$ mg/L) e flavonoides totais ($32,31 \pm 1,54$ mg/L), além de atividade antioxidante DPPH ($224,79 \pm 10,10$ μ M) e ABTS ($963,75 \pm 7,50$ μ M). Isso sugere que a adsorção da celulose bacteriana em meio de chá verde possibilitou a transferência dos compostos bioativos para a superfície da membrana, o que a conferiu propriedades

antioxidantes. Esses resultados são esperados, uma vez que o chá verde é uma fonte conhecida de compostos fenólicos e antioxidantes.

Além disso, observou-se que a atividade antioxidante medida pelo ensaio ABTS foi significativamente maior do que a medida pelo ensaio DPPH. Isso pode ser explicado pelas diferentes reações químicas que ocorrem em cada ensaio, com diferentes radicais livres sendo utilizados. O radical ABTS é uma molécula maior e hidrofílica, enquanto o radical DPPH é uma molécula menor e hidrofóbica. Portanto, os antioxidantes podem ter diferentes afinidades por esses radicais, o que resulta em diferentes atividades antioxidantes.

Embora exista uma ligeira variação na concentração de proteínas totais entre a celulose bacteriana purificada e a adsorvida, é importante destacar que outros parâmetros devem ser considerados antes de tirar conclusões definitivas.

Em resumo, os resultados indicam que a celulose bacteriana pura não apresenta propriedade antioxidante, mas pode ser enriquecida com compostos antioxidantes através da adsorção em meios contendo tais compostos. Sugerem também que a adsorção de compostos fenólicos em membranas de celulose bacteriana pode ser uma estratégia promissora para a produção de materiais com propriedades antioxidantes e de potencial aplicação em diferentes áreas, como embalagens de alimentos e produtos farmacêuticos.

Tabela 10 - Concentrações de proteínas totais, fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante.

Membrana	PT (g/L)	CFT (mg/L)	FT (mg/L)	AA (µM)	
				DPPH	ABTS
CB-Pura	7,09 ^a ±0,23	0,00 ^a ±0,00	0,00 ^a ±0,00	0,00 ^a ±0,00	0,00 ^a ±0,00
CB-CV	7,23 ^a ±0,23	884,04 ^b ±42,92	32,31 ^b ±1,54	224,79 ^b ±10,10	963,75 ^b ±7,50

FONTE: A autora (2023).

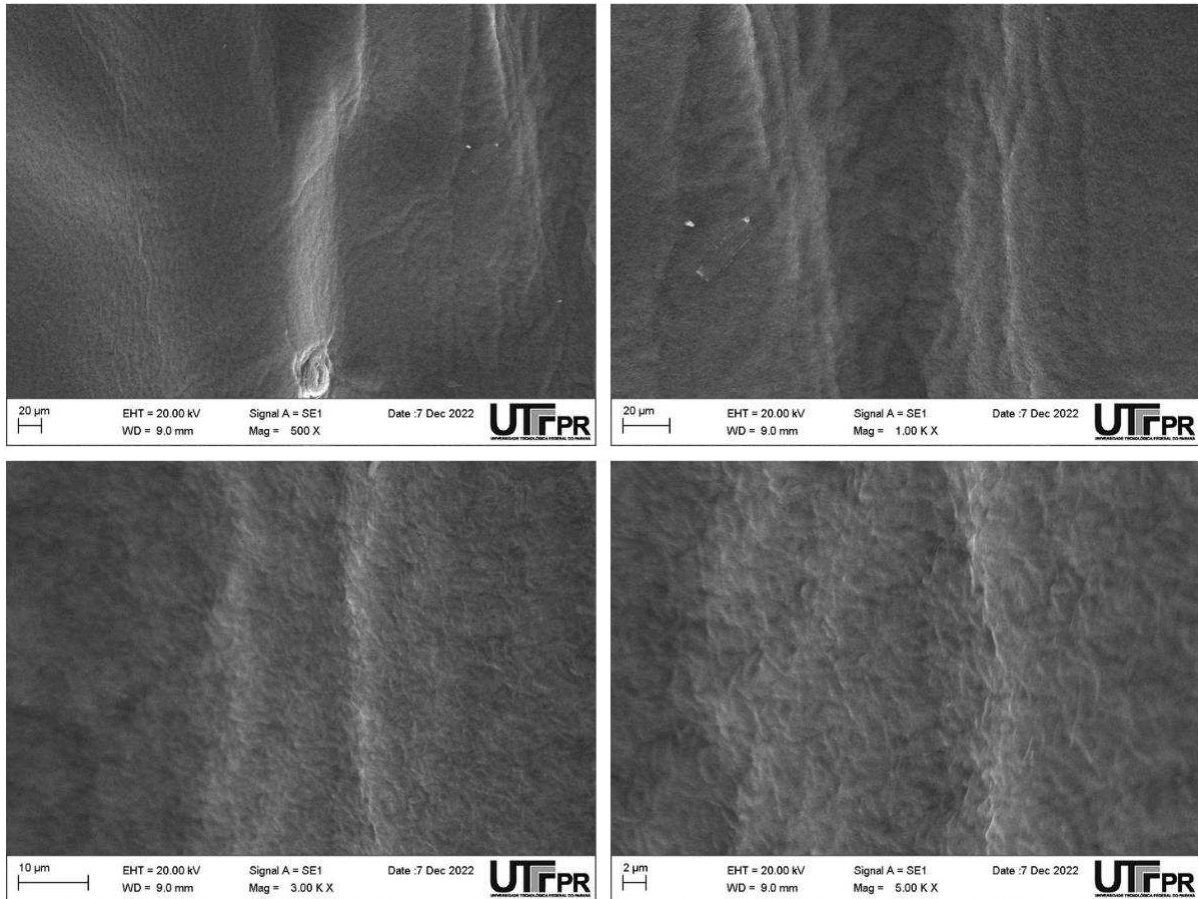
LEGENDA: PT: proteínas totais; CFT: fenólicos totais; FT: flavonoides totais; AA: atividade antioxidante; CB-Pura: celulose bacteriana purificada; CB-CV: celulose bacteriana adsorvida em chá verde.

4.3.3. Identificação das microestruturas

As FIGURAS 12 e 13 mostram as micrografias MEV de visão superior da morfologia das membranas de celulose pura e adsorvida respectivamente. A CB pura apresenta uma superfície mais lisa e uniforme, sem grandes sedimentos visíveis, enquanto a CB adsorvida apresenta uma superfície mais rugosa e com sedimentos aparentes. Esse resultado pode ser explicado pela presença de compostos do chá verde na superfície da membrada, que podem ter

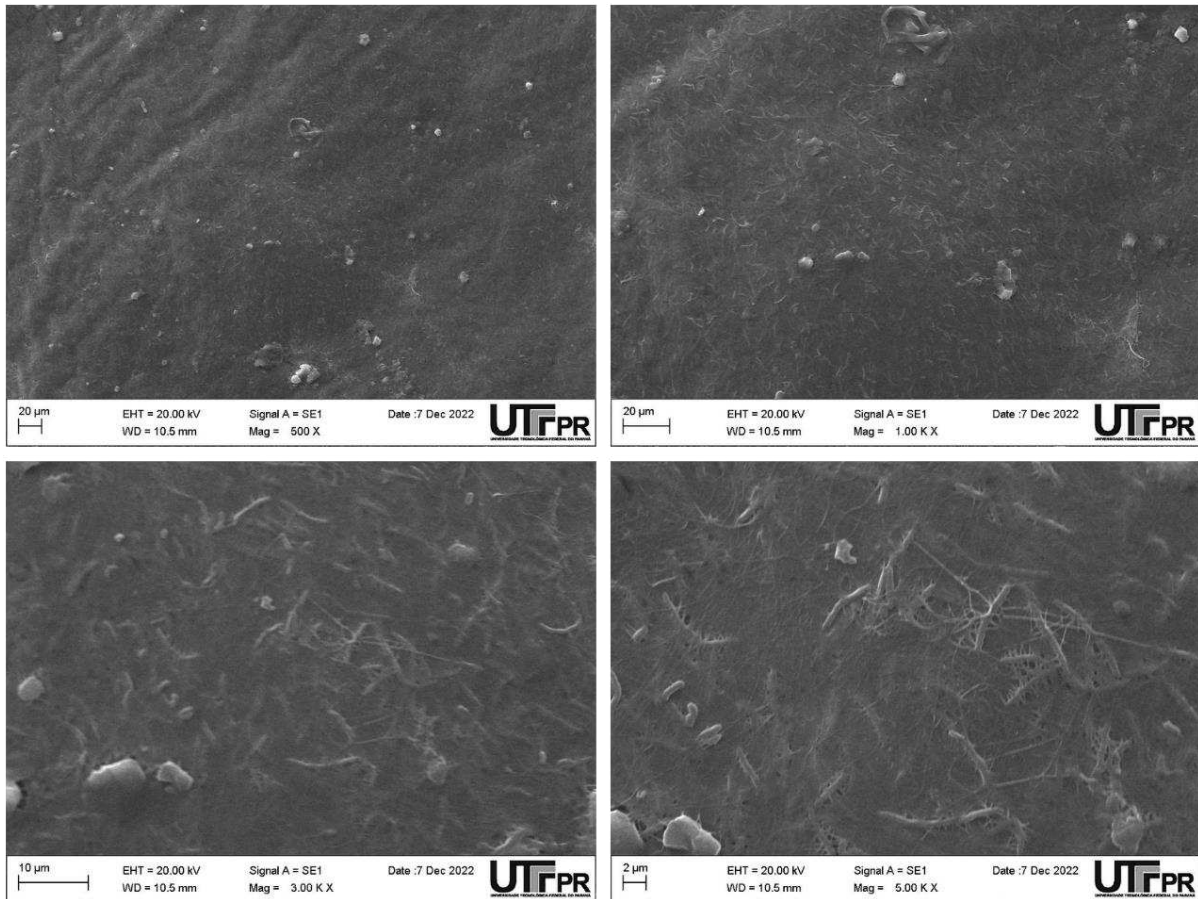
interagido com a estrutura da CB, causando formação de sedimentos e rugosidades em sua superfície.

Figura 12 - Imagens MEV da superfície da membrana de celulose pura.



FONTE: A autora (2022).

Figura 13 - Imagens MEV da superfície da membrana de celulose adsorvida.



FONTE: A autora (2022).

4.3.4. Cristalinidade

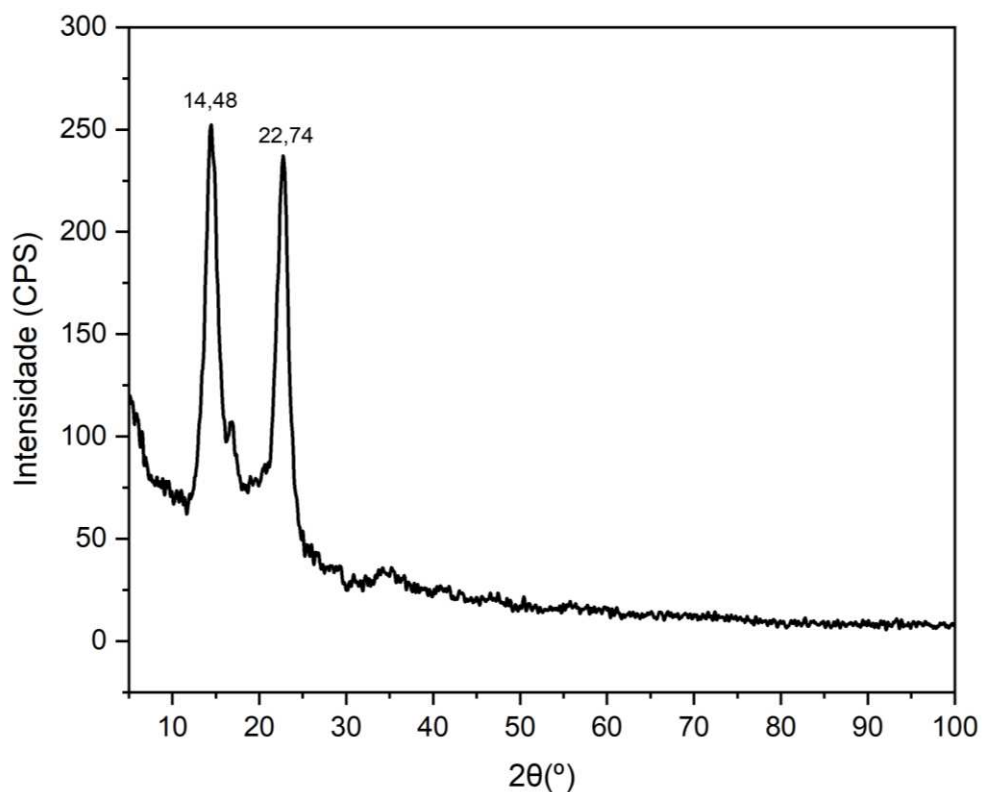
As FIGURAS 14 e 15 apresentam os difratogramas de raios X das amostras de CB purificada e adsorvida. Os picos observados nos difratogramas correspondem às reflexões dos planos cristalinos da celulose, que são indicativos da estrutura cristalina da celulose. A estrutura cristalina da CB é composta por cadeias longas e organizadas em fibrilas que formam camadas cristalinas intercaladas com regiões amorfas.

É possível observar que para ambas amostras os picos foram semelhantes, em $14,48^\circ$ e $22,74^\circ$ para a CB pura e $14,44^\circ$ e $27,78^\circ$ para a CB adsorvida. Esses picos foram semelhantes aos resultados apresentados na pesquisa de Fernandes et al. (2020) para a CB adsorvida em chá verde, com picos em $14,6^\circ$ e $22,8^\circ$ e para CB pura com picos em $14,6^\circ$ e $22,7^\circ$. Além disso, o estudo de Vieira et al. (2013) também mostrou que a membrana de CB com chá verde apresentou dois picos em $15,0^\circ$ e $22,4^\circ$, confirmando que esses são picos característicos da cristalinidade da celulose bacteriana.

Os índices de cristalinidade para as CB pura e adsorvida foram de 79,82% e 78,64%, respectivamente. Esses resultados sugerem que a adsorção em meio de chá verde não alterou significativamente a estrutura cristalina da celulose bacteriana. Sendo o teor de cristalinidade maior que dos outros estudos, onde Fernandes et al. (2020) obteve 53% de índice de cristalinidade para a CB pura e 48,9% para a CB adsorvida em chá verde. Vieira et al. (2013) atingiu um índice de 60% de cristalinidade para a CB produzida em meio de chá verde.

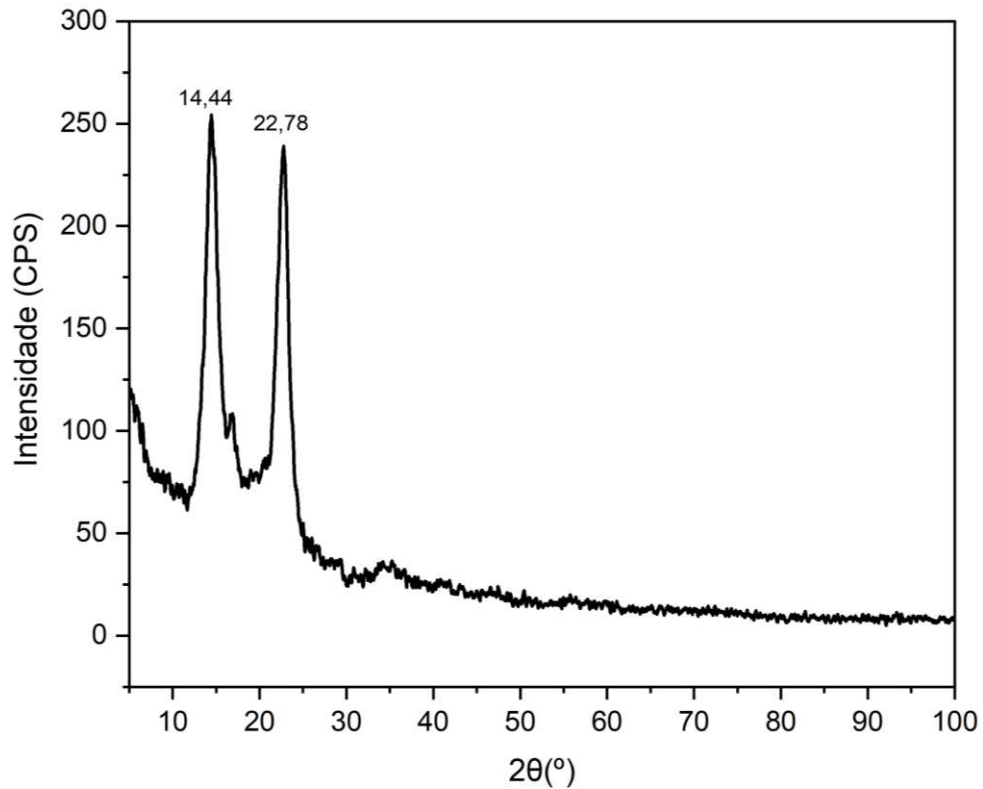
Os resultados obtidos mostraram que as CB pura e adsorvida apresentaram altos índices de cristalinidade, com valores de 79,82% e 78,64%, respectivamente. Esses resultados sugerem que a adsorção em meio de chá verde não afetou significativamente a estrutura cristalina da celulose bacteriana. Os valores obtidos foram maiores do que os encontrados em outros estudos, como o de Fernandes et al. (2020), que obteve um índice de cristalinidade de 53% para a CB adsorvida em chá verde e 48,9% para a CB pura. O estudo de Vieira et al. (2013) também mostrou um índice de cristalinidade de 60% para a CB produzida em meio de chá verde. Esses resultados demonstram a relevância da produção de celulose bacteriana em meio otimizado para a obtenção de um material com alta cristalinidade, o que pode ter implicações significativas em aplicações futuras.

Figura 14 - Difratoograma de raios X da CB pura.



FONTE: A autora (2023).

Figura 15 - Difratoograma de raios X da CB adsorvida.



FONTE: A autora (2023).

4.3.5. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da celulose bacteriana pode ser determinada a partir de análises termogravimétricas (TGA), análises termogravimétricas diferenciais (DTG) e análises calorimétricas diferenciais de varredura (DSC). Essas análises podem ser utilizadas para avaliar a estabilidade térmica da celulose bacteriana e auxiliar na definição de condições de processamento e armazenamento adequadas.

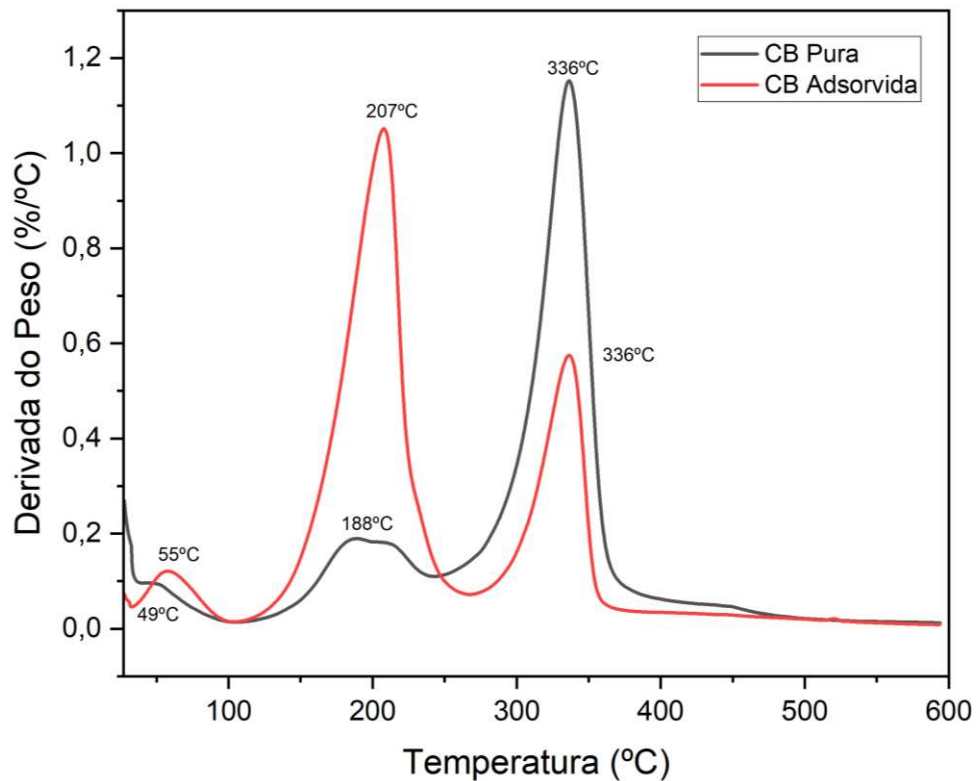
Na análise DTG, a taxa de variação de perda de massa em relação à temperatura é registrada. A partir dessa análise, é possível determinar as taxas de decomposição da celulose bacteriana em diferentes temperaturas e o ponto de máxima taxa de decomposição. No caso da CB pura e adsorvida, a DTG revelou a existência de três picos distintos de decomposição de cada uma delas apresentados na FIGURA 16. O primeiro pico, observado em torno de 49-55 °C para ambas as amostras, pode ser atribuído à perda de umidade na superfície das membranas. O segundo pico, observado em torno de 188-207 °C para ambas as amostras, pode ser associado à decomposição de componentes não celulósicos presentes na CB. O terceiro pico, observado em torno de 336 °C para ambas as amostras, pode ser associado à decomposição da celulose propriamente dita. Esse terceiro pico é considerado um indicativo da estabilidade térmica da

celulose bacteriana, uma vez que a decomposição da celulose ocorre em temperaturas elevadas e pode ser afetada por diferentes fatores, como a presença de impurezas ou a adsorção de outros compostos. A literatura sugere que os picos observados entre a temperatura ambiente e 200 °C são atribuídos à presença de água e outras substâncias (TREESUPPHARAT et al., 2017), enquanto o pico que ocorre em temperaturas superiores a 300 °C é resultado da decomposição das membranas de CB (GEORGE et al., 2005).

Os resultados da DTG indicam que as amostras de celulose bacteriana pura e adsorvida apresentam comportamentos térmicos semelhantes. A diferença de peso derivado observado nos picos pode ser explicada pelas diferentes composições químicas das amostras. A celulose bacteriana pura é composta principalmente por celulose, enquanto a celulose bacteriana adsorvida possui compostos adicionais proveniente do chá verde. Com a presença de compostos do chá verde na amostra adsorvida, pode haver um efeito na sua decomposição térmica, resultando em diferentes picos no DTG. No caso do segundo pico, que foi maior na CB adsorvida, isso provavelmente ocorreu devido à presença de compostos do chá verde que têm uma temperatura de decomposição próxima à faixa de temperatura desse pico. O terceiro pico foi maior para a CB pura, provavelmente devido à maior concentração de celulose na amostra, que é a principal componente da celulose bacteriana e possui uma temperatura de decomposição mais elevada.

De acordo com as análises realizadas, verificou-se que ambas as amostras de CB apresentaram alta estabilidade térmica em temperaturas elevadas, o que pode indicar um grande potencial para sua aplicação na indústria de embalagens. Potencialmente, a CB pode suportar as temperaturas utilizadas em processos de esterilização de embalagens, que variam entre 121 °C e 134 °C em processos de autoclave e entre 160 °C e 180 °C em processos de calor seco. Entretanto, é necessário realizar mais estudos para avaliar se os compostos fenólicos presentes na CB adsorvida permaneceriam estáveis após tais procedimentos, a fim de determinar sua viabilidade como embalagem ativa.

Figura 16 - Curvas de termogravimetria derivada (DTG) das membranas.

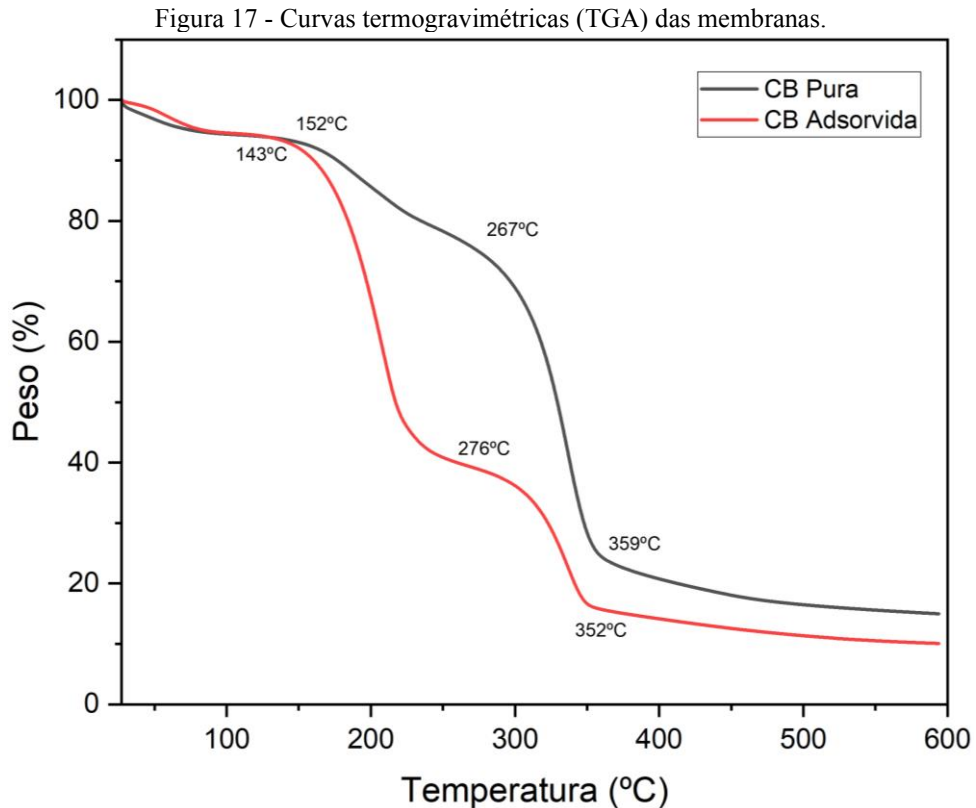


FONTE: A autora (2023).

Na análise TGA a amostra é aquecida gradualmente e a perda de massa é registrada em função da temperatura. A partir dessa análise, é possível determinar a temperatura de decomposição da celulose bacteriana. Os resultados das análises TGA e DTG das amostras de CB pura e adsorvida apresentam comportamentos semelhantes. No caso da TGA, ambas amostras apresentaram três declínios em relação ao peso inicial, como podemos observar na FIGURA 17. Para a CB pura, foram observados declínios na curva TGA em três pontos distintos de temperatura: 152 °C, 267 °C e 359 °C. Esses declínios representam a decomposição da CB, iniciando-se a partir de 152 °C, com perda de 5,26% de massa, seguido por outro declínio até 267 °C, com perda de 18,77% de massa, e por fim, o terceiro declínio até 359 °C, com perda de 50,39% de massa. Já a CB adsorvida em chá verde apresentou declínios em três pontos de temperatura diferentes: 143 °C, 276 °C e 352 °C. A amostra adsorvida apresentou um comportamento térmico diferente da CB pura, com um segundo declínio mais intenso, onde a amostra perdeu cerca de 55,16% de sua massa na faixa de 143 até 276 °C. O terceiro declínio ocorreu a partir de 276 °C, com perda de 22,65% de massa e estabilização em 352 °C.

Esses resultados sugerem que a adsorção da CB em chá verde pode afetar suas propriedades térmicas, já que a temperatura de início da decomposição foi reduzida e o segundo declínio foi mais intenso em comparação com a CB pura. Essas informações podem ser úteis

para entender como a adição de compostos bioativos como o chá verde pode afetar as propriedades físicas e químicas da CB, o que pode ter implicações para seu uso em diferentes aplicações, como na produção de materiais biodegradáveis e sustentáveis.



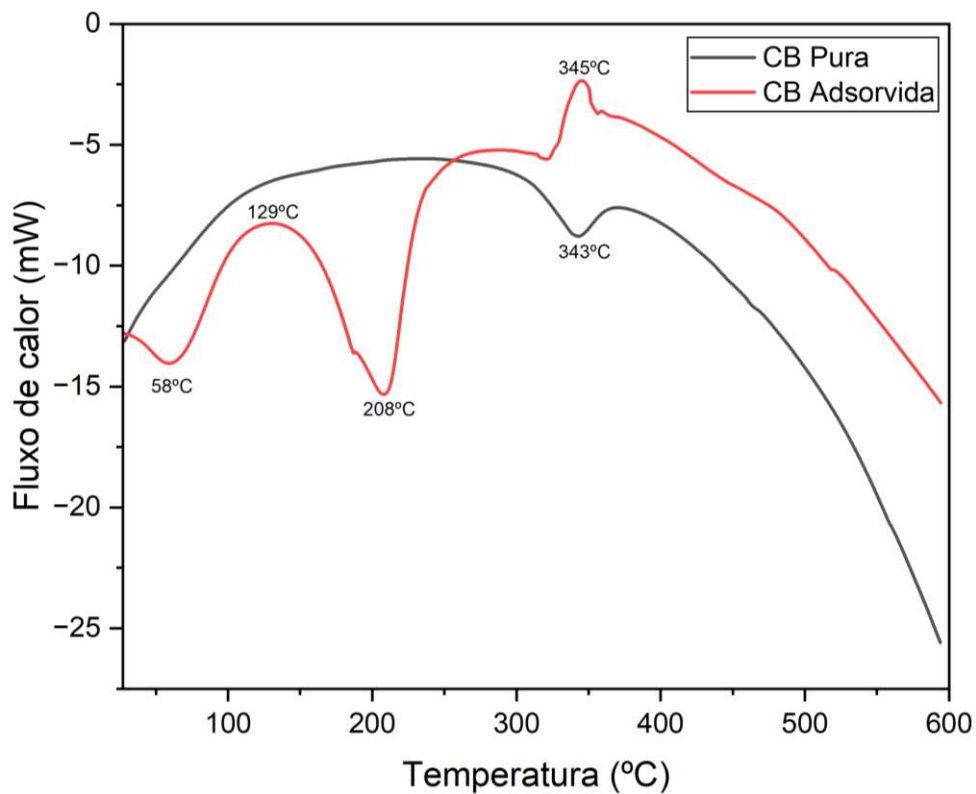
FONTE: A autora (2023).

A análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi utilizada para investigar o comportamento térmico da CB adsorvida em chá verde e da CB pura. Podemos observar na FIGURA 18 que a CB adsorvida em chá verde apresentou três estágios de resposta térmica, enquanto a CB pura apresentou apenas um.

Na CB adsorvida, a primeira reação endotérmica observada em 58 °C pode estar relacionada à perda de água. Já a reação endotérmica observada em 208 °C pode estar associada à degradação de substâncias pertencentes ao chá verde. A terceira reação endotérmica observada em 345 °C pode estar relacionada à queima da celulose bacteriana. A CB pura, por outro lado, apresentou uma única reação exotérmica em 343 °C. Essa reação também pode estar relacionada à decomposição térmica da celulose, estando em temperatura muito próxima a reação que ocorreu na CB adsorvida.

Os resultados sugerem que a presença de chá verde pode alterar as propriedades térmicas da CB adsorvida, indicando uma possível interação entre a CB e os compostos presentes no chá verde. Além disso, a presença de múltiplas reações endotérmicas observadas na CB adsorvida em chá verde sugere uma maior complexidade em sua estrutura, possivelmente devido a interações adicionais com os compostos do chá verde.

Figura 16 - Curvas calorimetria exploratória diferencial (DSC) das membranas.



FONTE: A autora (2023).

4.3.6. Isotermas

A TABELA 11 apresenta os valores de R^2 e os parâmetros para cada modelo de isoterma estudados. As isotermas de adsorção são utilizadas para descrever a relação entre a quantidade de adsorvente (CB) e a quantidade de adsorvato (CFT) em equilíbrio, a uma determinada temperatura (~ 25 °C). Os valores de R^2 indicam a qualidade do ajuste do modelo matemático aos dados experimentais. Os resultados mostraram que todos os modelos apresentaram ajuste adequado aos dados experimentais, com valores de R^2 acima de 0,8. O modelo de Sips apresentou o melhor ajuste, com um valor de R^2 de 0,988, seguido pelos modelos de Redlich-Peterson, Toth e Jovanovic-monolayer com valores de R^2 acima de 0,94. Os modelos de Temkin, Langmuir, Freundlich e Dubinin-Radushkevich apresentaram ajustes menos

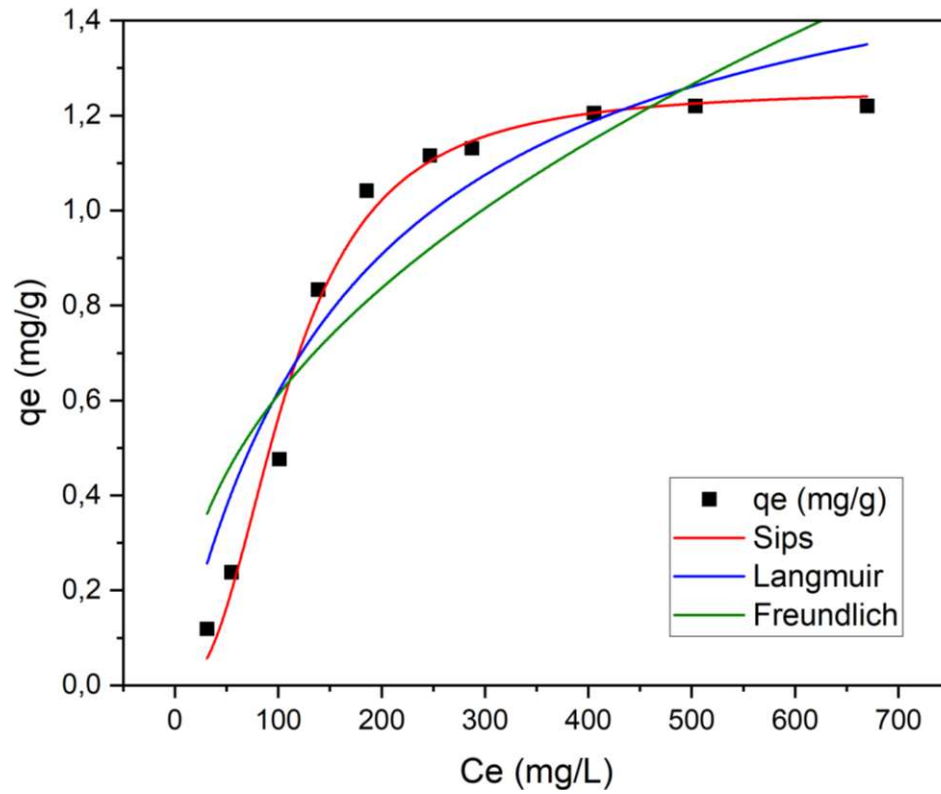
satisfatórios, com valores de R^2 abaixo de 0,92. Portanto, pode-se concluir que a CB apresentou uma capacidade de adsorver fenólicos, e que esta relação foi adequadamente descrita pelos diferentes modelos matemáticos avaliados, sendo o modelo de Sips o que melhor se ajustou aos dados experimentais. Podemos visualizar as curvas dos modelos isotérmicos nas FIGURAS 19, 20 e 21.

Tabela 11 - Parâmetros da isoterma aplicados a celulose bacteriana adsorvida em chá verde.

Modelo	R^2	Parâmetros	
Sips	0,988	K_S	$1,122 \times 10^{-5} \pm 1,714 \times 10^{-5}$
		S	$2,430 \pm 0,331$
		q_{max}	$1,255 \pm 0,0377$
Redlich-Peterson	0,969	K_{RP}	$0,0062 \pm 7,895 \times 10^{-4}$
		a_{RP}	$1,391 \times 10^{-5} \pm 3,843 \times 10^{-5}$
		A	$-1,861 \pm 0,4130$
Toth	0,969	K_{TO}	$0,0025 \pm 3,877 \times 10^{-4}$
		tn	$1,860 \pm 0,346$
		q_{max}	$4,676 \pm 1,039$
Jovanovic-monolayer	0,943	K_{JM}	$1,305 \pm 0,0826$
		q_{max}	$0,0064 \pm 0,0011$
Temkin	0,919	B_T	$0,417 \pm 0,0438$
		K_T	$0,0430 \pm 0,0103$
Langmuir	0,913	K_L	$0,0057 \pm 0,0018$
		q_{max}	$1,704 \pm 0,208$
Freundlich	0,807	K_F	$0,0766 \pm 0,0445$
		N	$2,216 \pm 0,494$
Dubinin-Radushkevich	0,842	E	0,00039
		E	35,801
		q_{max}	1,007

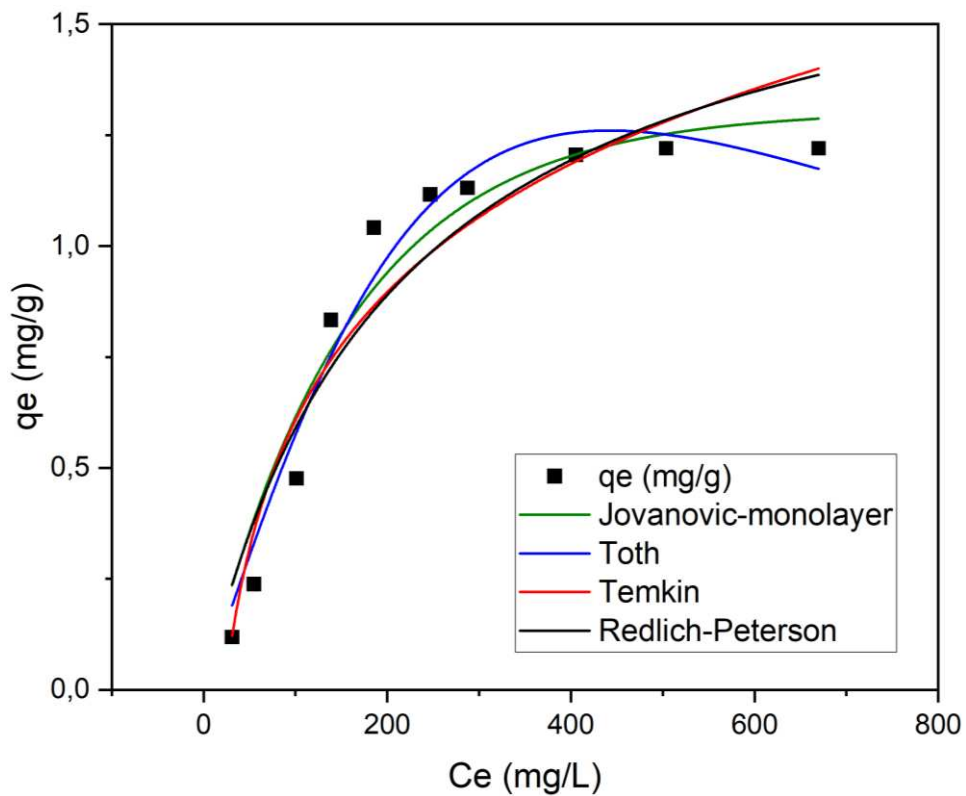
FONTE: A autora (2023).

Figura 17 - Curvas não lineares de Sips, Langmuir e Freundlich.



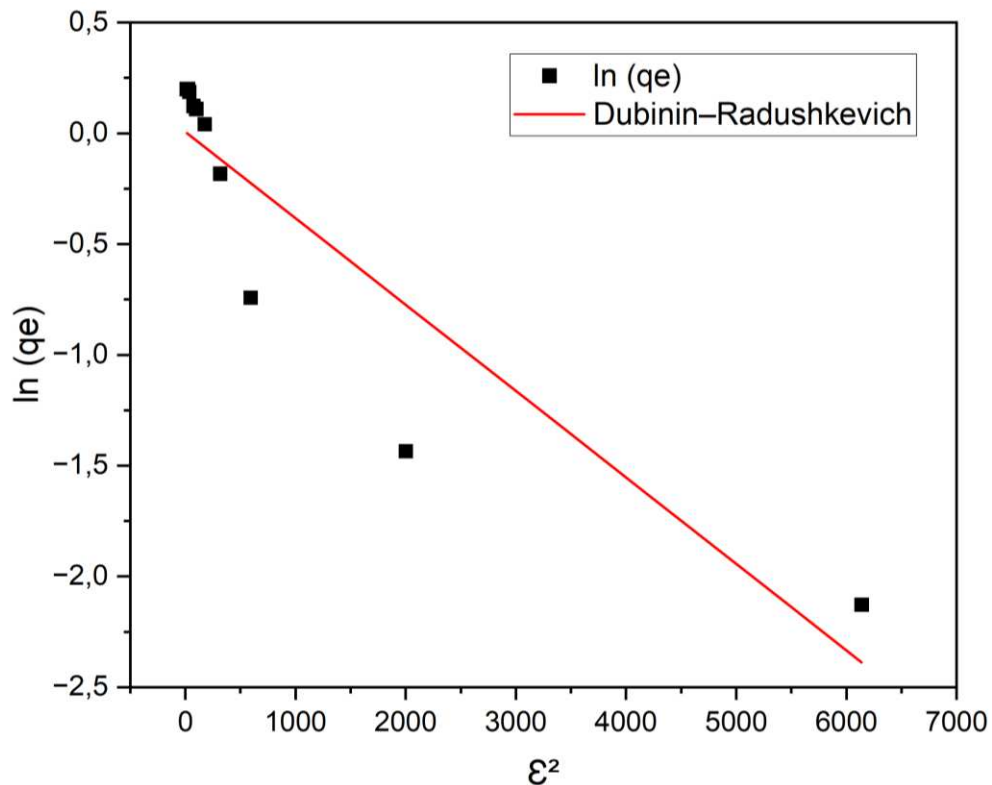
FONTE: A autora (2023).

Figura 18 - Curvas não lineares de Jovanovic-monolayer, Toth, Temkin e Redlich-Peterson.



FONTE: A autora (2023).

Figura 19 - Curva linear de Dubinin-Radushkevich.



FONTE: A autora (2023).

Essas isotermas podem ser usadas para entender como a CB interage com a adsorção de fenólicos.

Abaixo, segue as principais diferenças entre os modelos de isotermas utilizados:

- **Isoterma de Langmuir:** este modelo é baseado na suposição de que a superfície do adsorvente é homogênea e que a quantidade de adsorção atinge um limite máximo quando todas as superfícies disponíveis estão ocupadas. Essa isoterma é útil quando a adsorção ocorre em superfícies planas e homogêneas (LANGMUIR, 1918).
- **Isoterma de Freundlich:** este modelo é mais geral do que o modelo de Langmuir e é baseado na suposição de que a superfície do adsorvente não é homogênea. A isoterma de Freundlich é representada por uma curva com uma inclinação que diminui à medida que a quantidade de adsorbato aumenta. Essa isoterma é útil quando a adsorção ocorre em superfícies porosas e/ou heterogêneas (FREUNDLICH, 1906).
- **Isoterma de Sips:** é uma combinação dos modelos de Langmuir e Freundlich, que permite descrever a adsorção em sistemas com sítios de adsorção heterogêneos e independentes. Essa isoterma é útil quando há interações entre os sítios de adsorção (SIPS, 1948).

- **Isoterma de Redlich-Peterson:** é uma combinação dos modelos de Langmuir e Freundlich, com um parâmetro extra que controla a curvatura da isoterma. Essa isoterma é útil quando a energia de adsorção varia com a cobertura da superfície (REDLICH; PETERSON, 1959).
- **Isoterma de Toth:** é semelhante ao modelo de Freundlich, mas leva em consideração a heterogeneidade da superfície do adsorvente. Essa isoterma é útil quando a energia de adsorção diminui com a cobertura da superfície (TOTH, 1971).
- **Isoterma de Jovanovic-Monolayer:** é uma combinação da isoterma de Langmuir e da isoterma de Freundlich, que considera que a adsorção ocorre em uma única camada com diferentes sítios de adsorção com diferentes afinidades. Essa isoterma é útil quando há sítios de adsorção com diferentes afinidades na superfície (JOVANOVIĆ, 1969).
- **Isoterma de Temkin:** este modelo é baseado na suposição de que a energia de adsorção diminui à medida que a quantidade de adsorbato aumenta. Essa isoterma é útil quando a energia de adsorção diminui com a cobertura da superfície (TEMKIN; PYZHEV, 1940).
- **Isoterma de Dubinin-Radushkevich:** este modelo é usado para descrever a adsorção em sistemas porosos e é baseada na suposição de que a adsorção ocorre em uma superfície heterogênea com distribuição de energia de adsorção. Essa isoterma é útil quando a energia de adsorção varia com a cobertura da superfície e é mais sensível a mudanças na energia de adsorção do que outras isotermas (DUBININ; RADUSHKEVICH, 1947).

Dentre várias isotermas estudadas para a adsorção de fenólicos em CB, o modelo de Sips apresentou um valor mais elevado para o coeficiente de determinação (R^2). O que indica uma melhor adequação desse modelo aos dados experimentais e uma melhor descrição do comportamento de adsorção observado. Ao obter um ajuste adequado aos dados experimentais, o modelo de Sips permite estimar parâmetros importantes, como capacidade de adsorção máxima, constante de afinidade e coeficiente de heterogeneidade. Esses parâmetros são fundamentais para compreender o mecanismo de adsorção e otimizar processos de adsorção em escala industrial.

5. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram a otimização de um meio de cultura para a produção de CB e a caracterização da membrana de celulose bacteriana produzida, assim como a cinética de sua fermentação. Na fermentação foi observado um aumento significativo nos teores de fenólicos totais e flavonoides, além de uma grande capacidade antioxidante. Esses resultados sugerem que a kombucha produzida a partir dessa formulação otimizada pode ser uma fonte importante de compostos bioativos para consumo humano. A membrana de CB produzida apresentou uma alta capacidade de absorção de água, indicando sua alta capacidade de retenção de líquidos. Além disso, a análise da capacidade de adsorção de fenólicos pela membrana revelou que a celulose adsorvida em chá verde apresentou uma capacidade significativa de adsorção de fenólicos, apresentando resultados promissores. Vale destacar que a CB pura não possui compostos fenólicos ou atividade antioxidante.

Além disso, foi possível descrever matematicamente a relação de adsorção de fenólicos pela membrana de CB, utilizando diferentes modelos, sendo o modelo de Sips o que melhor se ajustou aos dados experimentais. Esses resultados podem ser úteis para a produção de compostos bioativos por bactérias, além de fornecer informações importantes sobre a aplicação da membrana de celulose bacteriana como um adsorvente de fenólicos.

Os dados da dissertação podem ter implicações em vários setores, incluindo a indústria alimentícia e farmacêutica, contribuindo para o desenvolvimento de produtos mais saudáveis e sustentáveis. Assim, a formulação otimizada apresenta um grande potencial tanto para a produção de uma bebida tipo kombucha com uma alta quantidade de compostos bioativos, quanto para a produção de celulose bacteriana de maneira mais produtiva e eficiente.

Apesar de não terem sido encontrados dados relevantes no estudo para demonstrar que a borra de café seja um potencializador de crescimento da celulose bacteriana, é importante destacar que seu potencial não deve ser descartado, uma vez que existem outras propriedades interessantes associadas a ela, como sua atividade antioxidante e antimicrobiana. Porém, para que possamos avaliar melhor seu potencial na produção de celulose bacteriana, são necessários mais estudos que permitam explorar suas características e propriedades.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELRAOF, M.; HASANIN, M. S.; EL-SAIED, H. Ecofriendly green conversion of potato peel wastes to high productivity bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 211, p. 75–83, 1 maio 2019.

ABUDUAIBIFU, A.; TAMER, C. E. Evaluation of physicochemical and bioaccessibility properties of goji berry kombucha. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 9, 1 set. 2019.

AYED, L.; BEN ABID, S.; HAMDI, M. Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 111–121, 1 jan. 2017.

AYED, L.; HAMDI, M. Manufacture of a beverage from cactus pear juice using “tea fungus” fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 2293–2299, 1 dez. 2015.

BÄCKDAHL, H. et al. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 2141–2149, mar. 2006.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011.

BARROS, V. C.; CRISPIM DE FREITAS, A. PERFIL DE CONSUMIDORES DE KOMBUCHA NO BRASIL E NO MUNDO. **convibra**, 2020.

BELLOSO-MORALES, G.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H. Manufacture of a beverage from cheese whey using a “tea fungus” Fermentation. **Revista Latinoamerica Microbiologia**, v. 45, n. 1–2, p. 5–11, 2003.

BIRCH, C. S.; BONWICK, G. A. Ensuring the future of functional foods. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 5, p. 1467–1485, 2019.

BLAUTH, C. M. **KOMBUCHA: tecnologia de produção e composição**. Porto Alegre: UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE, 2019.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. **Technometrics**, v. 2, n. 4, p. 455–475, nov. 1960.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT –Food Science and Technology**, v. 28, p. 25–30, 1995.

BRASIL. **RDC nº 241, de 26 de julho de 2018. Agência Nacional de Vigilância Sanitária** Brasília, BrasilMinistério da Saúde, , 2018.

BRASIL.

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 41, DE 17 DE SETEMBRO DE 2019. Diário Oficial da União, 2019.

BURAN, T. J. et al. Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins and polyphenols from blueberries using macroporous adsorbent resins. **Journal of Food Engineering**, v. 128, p. 167–173, maio 2014.

CABRAL, S. et al. Occurrence of FFZ genes in yeasts and correlation with fructophilic behaviour. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 161, n. 10, p. 2008–2018, 1 out. 2015.

CASTRO, C. et al. Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter* genus. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1033–1037, 1 ago. 2012.

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

CHAWLA, P. R. et al. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 47, n. 2, p. 107–124, 2009.

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.

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.

COUGHLAN, M. P.; MOLONEY, A. P. Isolation of 1,4- β -D-Glucan 4-Glucanohydrolases of *Talaromyces emersonii*. **Methods in enzymology**, v. 160, p. 365, 1988.

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

DE ROOS, J.; DE VUYST, L. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 115–119, 1 fev. 2018.

DE SOUZA, K. C. et al. Kinetic study of a bacterial cellulose production by *Komagataeibacter rhaeticus* using coffee grounds and sugarcane molasses. **Materials Research**, v. 24, n. 3, 22 mar. 2021.

DINI, I. An overview of functional beverages. **Functional and Medicinal Beverages**, v. 11, p. 1–40, 1 jan. 2019.

DOURADO, F. et al. Celluloses as Food Ingredients/Additives: Is There a Room for BNC? **Bacterial Nanocellulose: From Biotechnology to Bio-Economy**, p. 123–133, 11 jul. 2016.

DU, R. et al. Production and characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* isolated from Chinese persimmon vinegar. **Carbohydrate Polymers**, v. 194, p. 200–207, 15 ago. 2018.

DUBININ, M. M.; RADUSHKEVICH, L. V. The Equation of the Characteristic Curve of the Activated Charcoal. **Proceedings of the Union of Soviet Socialist Republics Academy of Sciences**, v. 55, p. 331–33, 1947.

DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. Tea, Kombucha, and health: a review. **Food Research International**, v. 33, p. 407–421, 2000.

DUTTA, D.; GACHHUI, R. Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov., isolated from Kombucha tea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 353–357, fev. 2007.

EBERSOLE, B. et al. Determination of ethanol in Kombucha products: Single-laboratory validation, first action 2016.12. **Journal of AOAC International**, v. 100, n. 3, p. 732–736, 1 maio 2017.

EL-SAIED, H.; BASTA, A. H.; GOBRAN, R. H. Research progress in friendly environmental technology for the production of cellulose products (Bacterial cellulose and its application). **Polymer - Plastics Technology and Engineering**, v. 43, n. 3, p. 797–820, maio 2004.

EL-SALAM, S. S. A. Bacterial Cellulose of Kombucha Mushroom Tea. **New York Science Journal**, v. 5, n. 4, p. 81–87, 2012.

EMILJANOWICZ, K. E.; MALINOWSKA-PAŃCZYK, E. Kombucha from alternative raw materials—The review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 19, p. 3185–3194, 27 out. 2020.

FANG, Q. et al. Freestanding bacterial cellulose-graphene oxide composite membranes with high mechanical strength for selective ion permeation. **Scientific Reports**, v. 6, 12 set. 2016.

FERNANDES, I. DE A. A. Desenvolvimento de biofilme de celulose bacteriana enriquecido com compostos bioativos de origem vegetal e colágeno hidrolisado. **Dissertação Mestrado em Engenharia de Alimentos - Universidade Federal do Paraná**, p. 89, 2019.

FERNANDES, I. DE A. A. et al. Hybrid bacterial cellulose-collagen membranes production in culture media enriched with antioxidant compounds from plant extracts. **Polymer Engineering and Science**, v. 60, n. 11, p. 2814–2826, 1 nov. 2020.

FREUNDLICH, H. M. Over the Adsorption in Solution. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 57, p. 385–471, 1906.

GAGGIÀ, F. et al. Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity. **Nutrients**, v. 11, n. 1, 1 jan. 2019.

GARGEY, I. A. et al. Optimization of Etherification Reactions for Recycling of Tea Fungal Biomass Waste into Carboxymethylcellulose. **Green Buildings and Sustainable Engineering**, p. 337–346, 2019.

GAYATHRY, G.; GOPALASWAMY, G. Production and characterisation of microbial cellulosic fibre from *Acetobacter xylinum*. **Indian Journal of Fibre & Textile Research**, v. 39, p. 93–96, 2014.

GEORGE, J. et al. Characterization of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) biopolymer: Some thermo-mechanical properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, n. 4, p. 189–194, 15 dez. 2005.

GOH, W. N. et al. Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 1, p. 109–117, 2012.

GRAHAM, H. N. Green Tea Composition, Consumption, and Polyphenol Chemistry. **PREVENTIVE MEDICINE**, v. 21, p. 334–350, 1992.

GREENWALT, C. J.; LEDFORD, R. A.; STEINKRAUS, K. H. Determination and Characterization of the Antimicrobial Activity of the Fermented Tea Kombucha. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v. 31, p. 291–296, 1998.

HARTMANN, A. M. et al. Effects of Chronic Kombucha Ingestion on Open-field Behaviors, Longevity, Appetitive Behaviors, and Organs in C57-BL/6 Mice: A Pilot Study. **Nutrition**, v. 16, n. 9, p. 755–761, 2000.

HRNJEZ, D. et al. The biological activity of fermented dairy products obtained by kombucha and conventional starter cultures during storage. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 336–345, 1 set. 2014.

IMIR. Kombucha Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Conventional, Hard), By Distribution Channel (On-trade, Off-trade), COVID-19 Impact

Analysis, Regional Outlook, Growth Potential, Price Trends, Competitive Market Share & Forecast, 2022 - 2028. **Intellectual Market Insights research**, p. 198, 2022.

ISIK, Z.; UNYAYAR, A.; DIZGE, N. Filtration and Antibacterial Properties of Bacterial Cellulose Membranes for Textile Wastewater Treatment. **Avicenna Journal of Environmental Health Engineering**, v. 5, n. 2, p. 106–114, 29 dez. 2018.

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

JANG, W. D. et al. Bacterial cellulose as an example product for sustainable production and consumption. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 1181–1185, 1 set. 2017.

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, n. 4, p. 538–550, 2014.

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.

JOVANOVIĆ, D. S. Physical adsorption of gases I. **Kolloid-Z.u.Z.Polymer**, v. 235, p. 1203–1213, 1969.

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.

KAPSAK, W. R. et al. Functional Foods: Consumer Attitudes, Perceptions, and Behaviors in a Growing Market. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 111, n. 6, p. 804–810, jun. 2011.

KESHK, S. M. A. S. Vitamin C enhances bacterial cellulose production in *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 98–100, 2014.

KHOSRAVI, S. et al. Development of fermented date syrup using Kombucha starter culture. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 2, 1 fev. 2019.

KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 30 maio 2005.

LANGMUIR, I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. **Journal of the American Chemical Society**, v. 40, n. 9, p. 1361–1403, 1918.

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

LI, S. et al. Effect of Fermentation Time on Physiochemical Properties of Kombucha Produced from Different Teas and Fruits: Comparative Study. **Journal of Food Quality**, v. 2022, 2022.

LIMA, H. L. et al. CELULOSE BACTERIANA OBTIDA POR DIFERENTES FONTES AGROINDUSTRIAIS. **Anais do 13º Congresso Brasileiro de Polímeros**, 2015.

LIN, S. BIN; CHEN, L. C.; CHEN, H. H. Physical characteristics of surimi and bacterial cellulose composite gel. **Journal of Food Process Engineering**, v. 34, n. 4, p. 1363–1379, ago. 2011.

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

LONČAR, E. S. et al. Kinetics of saccharose fermentation by kombucha. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, v. 20, n. 3, p. 345–352, 2014.

MACAGNAN, F. T. **POTENCIAL TECNOLÓGICO E NUTRICIONAL DE SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE FRUTAS**. Santa Maria: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS, 2013.

MALBAŠA, R. V. et al. Milk-based beverages obtained by Kombucha application. **Food Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 178–184, 1 jan. 2009.

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.

MARKOV, S. et al. KOMBUHA- FUNKCIONALNI NAPITAK: SASTAV, KARAKTERISTIKE I PROCES BIOTRANSFORMACIJE. **Hem Ind**, v. 57, n. 10, p. 456–462, 2003.

MARSH, A. 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, abr. 2014.

MARTIN, V. et al. Oenological impact of the *Hanseniaspora/Kloeckera* yeast genus on wines — A review. **Fermentation**, v. 4, n. 76, p. 21, 10 set. 2018.

MCGEE, H. **ON FOOD AND COOKING The Science and Lore of the Kitchen**. SCRIBNER, p. 898, 2004.

MUKADAM, T. A. et al. Isolation and Characterization of Bacteria and Yeast from Kombucha Tea. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 6, p. 32–41, 15 jun. 2016.

NAGAO, T. et al. Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men 1-3. **Am J Clin Nutr**, v. 81, p. 122–129, 2005.

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

NGUYEN, N. K. et al. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. **LWT**, v. 64, n. 2, p. 1149–1155, 2015.

OIC. Relatório sobre o mercado de Café. **Organização Internacional do Café**, p. 10, 2022.

OLBA DO COUTO, G.; DE LIMA, C. P. Determinação de compostos fenólicos totais do chá verde e chá preto não fermentados e suas respectivas kombuchas. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 20, n. 2, p. 21–30, 14 abr. 2022.

ÖZDEMİR, N.; ÇON, A. H. Kombucha and Health. **Journal of Health Science**, v. 5, p. 244–250, 28 out. 2017.

PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Energetics of the effect of acetic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 184, n. 1, p. 69–72, mar. 2000.

PARK, J. K.; JUNG, J. Y.; KHAN, T. Bacterial cellulose. **Handbook of Hydrocolloids: Second Edition**, p. 724–739, 28 maio 2009.

RAHMANI, R. et al. Kombucha fermentation of African mustard (*Brassica tournefortii*) leaves: Chemical composition and bioactivity. **Food Bioscience**, v. 30, 1 ago. 2019.

RE, R. et al. ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL CATION DECOLORIZATION ASSAY. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

REDLICH, O.; PETERSON, D. L. A USEFUL ADSORPTION ISOTHERM. **J. Phys. Chem.**, v. 63, n. 6, p. 1024–1024, 1959.

REGALBUTO, J. R.; ROBLES, J. O. The Engineering of Pt/Carbon Catalyst Preparation For application on Proton Exchange Fuel Cell Membrane. **University of Illinois**, p. 14, 2004.

REISS, J. Original paper Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. **Z Lebensm Unters Forsch**, v. 198, p. 258–261, 1994.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria. **MICROBIOLOGICAL REVIEWS**, v. 55, n. 1, p. 35–58, 1991.

SAIBUATONG, O. ARD; PHISALAPHONG, M. Novo aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 455–460, 20 jan. 2010.

SANTOS, Y. et al. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE KOMBUCHA A BASE DE CHÁS DE HIBISCO E PRETO. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 8, n. 3, p. 32–37, 2018.

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.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. JR. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

SIPS, R. On the structure of a catalyst surface. **The Journal of Chemical Physics**, v. 16, n. 5, p. 490–495, 1948.

SREERAMULU, G.; ZHU, Y.; KNOL, W. Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2589–2594, jun. 2000.

SULAEVA, I. et al. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1547–1571, 2015.

SUN, T. Y.; LI, J. S.; CHEN, C. Effects of blending wheatgrass juice on enhancing phenolic compounds and antioxidant activities of traditional kombucha beverage. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 4, p. 709–718, 2015.

TEMKIN, M. J.; PYZHEV, V. Recent Modifications to Langmuir Isotherms. **Acta Physiochim URSS**, v. 12, p. 217–225, 1940.

TEOH, A. L.; HEARD, G.; COX, J. Yeast ecology of Kombucha fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 119–126, 1 set. 2004.

TOTH, J. State equation of the solid-gas interface layers. **Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 69, p. 311–317, 1971.

TREESUPPHARAT, W. et al. Synthesis and characterization of bacterial cellulose and gelatin-based hydrogel composites for drug-delivery systems. **Biotechnology Reports**, v. 15, p. 84–91, 1 set. 2017.

TSOUKO, E. et al. Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 14832–14849, 1 jul. 2015.

ULLAH, H.; SANTOS, H. A.; KHAN, T. Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery. **Cellulose**, v. 23, n. 4, p. 2291–2314, 1 ago. 2016.

ULUSOY, A.; TAMER, C. E. Determination of suitability of black carrot (*Daucus carota* L. spp. sativus var. atrorubens Alef.) juice concentrate, cherry laurel (*Prunus laurocerasus*), blackthorn (*Prunus spinosa*) and red raspberry (*Rubus ideaus*) for kombucha beverage production. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 13, n. 2, p. 1524–1536, 15 jun. 2019.

VELIĆANSKI, A. S. et al. Antioxidant and Antibacterial Activity of the Beverage Obtained by Fermentation of Sweetened Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Tea with Symbiotic Consortium of Bacteria and Yeasts. **Food Technol. Biotechnol**, v. 52, n. 4, p. 420–429, 2014.

VIEIRA, D. M. et al. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* and *Saccharomyces cerevisiae* in green tea leaves and fruits juice medium. **Asian Journal of Pharmaceutical and Health Sciences**, v. 3, n. 2, p. 690–698, 2013.

VILLARREAL-SOTO, S. A. et al. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 3, p. 580–588, 1 mar. 2018.

VILLARREAL-SOTO, S. A. et al. Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. **Process Biochemistry**, v. 83, p. 44–54, 1 ago. 2019.

WATAWANA, M. I. et al. Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. **Journal of Chemistry**, v. 2015, p. 11, 2015.

WATAWANA, M. I.; JAYAWARDENA, N.; WAISUNDARA, V. Y. Enhancement of the Functional Properties of Coffee Through Fermentation by “Tea Fungus” (Kombucha). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 2596–2603, 1 dez. 2015.

YAMADA, Y. et al. Subdivision of the genus *Gluconacetobacter* Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: The proposal of *Komagatabacter* gen. nov., for strains accommodated to the *Gluconacetobacter xylinus* group in the α -Proteobacteria. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 849–859, jun. 2012.

YAVARI, N. et al. Response Surface Methodology for Optimization of Glucuronic Acid Production Using Kombucha Layer on Sour Cherry Juice. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, n. 8, p. 3250–3256, 2010.

ZABANIOTOU, A.; KAMATEROU, P. Food waste valorization advocating Circular Bioeconomy - A critical review of potentialities and perspectives of spent coffee grounds biorefinery. **Journal of Cleaner Production**, v. 211, p. 1553–1566, 20 fev. 2019.

ZHAI, X. et al. Emulsions stabilized by nanofibers from bacterial cellulose: New potential food-grade Pickering emulsions. **Food Research International**, v. 103, p. 12–20, 1 jan. 2018a.

ZHAI, X. et al. Bacterial Cellulose Relieves Diphenoxylate-Induced Constipation in Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 16, p. 4106–4117, 25 abr. 2018b.

ZHUANG, X. P.; LU, Y. Y.; YANG, G. S. Extraction and determination of flavonoid in ginkgo. **Chinese Herbal Medicine**, v. 23, p. 122–124, 1992.

ZUBAIDAH, E. et al. Comparison of in vivo antidiabetes activity of snake fruit Kombucha, black tea Kombucha and metformin. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 465–469, 1 jan. 2019.