



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

Jéssica Schroeder

KOMBUCHA FERMENTADA A PARTIR DE RESÍDUO DE ACEROLA

Florianópolis

2019

Jéssica Schroeder

KOMBUCHA FERMENTADA A PARTIR DE RESÍDUO DE ACEROLA

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina apresentado como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Patrícia Poletto

Coorientador: Dr. Felipe Andre Pavan.

Florianópolis

2019

Jéssica Schroeder

KOMBUCHA FERMENTADA A PARTIR DE RESÍDUO DE ACEROLA

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Engenharia de Alimentos” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos.

Florianópolis, 05 de junho de 2019.

Prof. João Borges Laurindo, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof^a. Patrícia Poletto, Dr^a.
Orientadora
Universidade de Caxias do Sul

Guilherme Zin, Dr.
Universidade do Estado de Santa Catarina

José Francisco dos Santos Silveira Junior, Dr.
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Este trabalho é dedicado aos meus pais e ao meu irmão, que são meus exemplos, me apoiam e me incentivam todos os dias.

RESUMO

Kombucha é uma bebida tradicionalmente preparada com chá verde, fermentada por um consórcio de microrganismos, caracterizada por uma alta concentração de polifenóis. Neste estudo, o resíduo de acerola verde, também rico em polifenóis, foi utilizado como meio alternativo para a fermentação de kombucha com o objetivo de caracterizar a nova bebida produzida. Resíduo seco de acerola foi utilizado para preparar extratos em três diferentes concentrações 2%, 6% e 10% (m/v) em água mantidos sob agitação a 150 rpm, 50 °C por 4 h. Os extratos foram inoculados com 10% (v/v) de kombucha preparada previamente com 4% (m/v) do biofilme da mesma kombucha contendo o consórcio de microrganismos. A bebida fermentada também foi preparada com o tradicional extrato de chá verde. A fermentação foi realizada por um período de 21 dias e amostras foram retiradas a cada três dias. Todas as concentrações de extrato de acerola (2, 6 e 10%) e do chá verde apresentaram queda do pH durante o período de fermentação, o que sugere a formação de ácido acético. O aumento na atividade total de polifenol e da atividade antioxidante durante a fermentação foi também observado com destaque para o sistema de 6%, o qual apresentou o melhor resultado. O biofilme formado na superfície da bebida apresentou maior rendimento nos extratos de acerola do que no extrato de chá verde. Estes resultados sugerem que compostos como polifenóis, ácidos orgânicos ou açúcares, presentes em resíduos de acerola, poderiam estar melhorando a capacidade de produção de biofilme.

Palavras-chave: Resíduo de acerola. Kombucha. Polifenóis. Atividade antioxidante.

ABSTRACT

Kombucha is a drink traditionally prepared with green tea, fermented by a consortium of microorganisms, characterized by a high concentration of polyphenols. In this study, green acerola residue, also rich in polyphenols, was used as an alternative for kombucha fermentation with the aim of characterizing the new beverage produced. Dry matter of acerola was used to prepare extracts at three different concentrations 2%, 6% and 10% (m / v) in water kept under stirring at 150 rpm, 50 °C for 4 h. The extracts were inoculated with 10% (v/v) kombucha previously prepared with 4% (w/v) of the biofilm of the same kombucha containing the consortium of microorganisms. The fermented drink was also prepared with the traditional green tea extract. The fermentation was performed for a period of 21 days and samples were withdraw every three days. All concentrations of acerola extract (2, 6 and 10%) and green tea showed a drop in pH during the fermentation period, suggesting the formation of acetic acid. The increase in total polyphenol activity and antioxidant activity during fermentation was also observed with emphasis on the 6% system that presented the best result. The biofilm formed on the beverage surface presented higher yields in the acerola extracts than in the green tea extract. These results suggest that compounds such as polyphenols, organic acids or sugars, present in acerola residues could be improving biofilm production capacity.

Keywords: Acerola residue. Kombucha. Polyphenols. Antioxidant activity

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	OBJETIVOS.....	10
1.1.1	Objetivo geral	10
1.1.2	Objetivos específicos.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	DEFINIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BEBIDA FERMENTADA	12
2.2	BENEFÍCIOS À SAÚDE.....	12
2.3	FERMENTAÇÃO DA KOMBUCHA.....	14
2.4	FATORES QUE INFLUENCIAM A FERMENTAÇÃO DA KOMBUCHA	16
2.4.1	Microrganismos	16
2.4.2	Substratos.....	17
2.4.3	pH.....	17
2.4.4	SCOBY – Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts	18
2.5	SUBSTRATOS ALTERNATIVOS AO CHÁ.....	19
2.6	EXTRATO DO RESÍDUO DA ACEROLA.....	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1	MATERIAIS	22
3.1.1	Acerola.....	22
3.1.2	Chá verde	22
3.1.3	Sacarose.....	23
3.1.4	SCOBY	23
3.2	PRODUÇÃO DA KOMBUCHA.....	23
3.2.1	Extrato de acerola	24
3.2.2	Preparo do chá.....	24
3.2.3	Preparo do sistema para fermentação.....	24
3.3	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	26

3.3.1	Medidas de pH.....	26
3.3.2	Compostos fenólicos totais (CFT)	27
3.3.3	Método do sequestro do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	27
3.3.4	Massa de celulose produzida	27
3.3.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1	BIOFILME	30
4.2	EVOLUÇÃO DA ACIDEZ AO LONGO DA FERMENTAÇÃO	33
4.3	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	35
4.4	CAPACIDADE DE SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES	36
5	CONCLUSÃO	39
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	41
	REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

A kombucha é uma bebida levemente doce e gaseificada, tradicionalmente obtida pela fermentação da infusão de *Camellia Sinenses*, popularmente conhecido como chá verde, por uma associação de bactérias e leveduras. A palavra kombucha é derivada das palavras japonesas “alga” (*kombu*) e “chá” (*chá*) (FILIPPIS *et al.*, 2018). Conforme salientam Jayabalan, Marimuthu e Swaminathan (2007), o consumo da kombucha pelo mundo todo está relacionado com a composição apresentada pela bebida milenar, originária da Ásia, dentre as principais funções, estão: ação antioxidante, controle do índice glicêmico e prevenção de câncer, devido à presença de algumas vitaminas, polifenóis e de ácidos como ácido glucônico, ácido glucurônico, ácido lático, aminoácidos, e outros micronutrientes produzidos durante a fermentação. O chá fermentado também contém níveis significativos de flavonoides das catequinas, um dos poucos grupos de compostos flavonoides que possuem significativa biodisponibilidade (CHAKRAVORTYA *et al.*, 2016).

A fermentação da kombucha usualmente decorre ao longo de um período de 7 a 14 dias. Uma infusão de *Camellia Sinenses* é adoçada, recebe um pequeno volume da bebida já fermentada e um fino biofilme celulósico, denominado SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts). O biofilme em questão é uma película de celulose bacteriana, constituída, sobretudo, por proteína e fibras (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018). Ao longo dos dias, o açúcar é consumido pelos microrganismos e produz uma nova SCOBY, diversos novos compostos resultantes do metabolismo da fermentação, além de etanol e dióxido de carbono, produtos característicos de uma fermentação.

Pelo fato de a fermentação ser baseada no consumo do açúcar pelo consórcio de bactérias e leveduras, é possível imaginar que o preparo da kombucha pode acontecer em diferentes meios além do chá. Estudos anteriores relatam tentativas de aplicação de substratos não tradicionais para a fermentação do kombucha como refrigerante Coca-Cola, vinho tinto, vinho branco, vinagre, extrato de alcachofra de Jerusalém, leite, soro doce fresco, soro doce reconstituído, soro ácido, equinácea, menta, entre outros (JAYABALAN *et al.*, 2014). O objetivo destes estudos foi analisar o comportamento dos microrganismos expostos a meios com composições variadas, que podem inibir ou potencializar a fermentação em diferentes níveis, obtendo-se bebidas fermentadas com outra intensidade de sabor e cor, além de provocar a formação de novos compostos que não estariam presentes na kombucha tradicional.

Resíduos gerados pelas cadeias produtivas das indústrias de frutas precisam ser tratados para descarte ou podem ter soluções criativas e serem transformados em novos produtos. Visto que esses resíduos ainda podem apresentar grande valor nutricional e conteúdo de compostos bioativos, é necessário realizar um tratamento no caso de descarte no ambiente. Outra solução é criar novos produtos a partir do resíduo, o que não somente poderia trazer retorno financeiro como também um impacto positivo nas questões ambientais, pois diminuiria o acúmulo de resíduos com potencial poluente.

No cenário da indústria de sucos de frutas, a acerola se destaca por ser uma super fruta rica em vitamina C e em compostos fenólicos (PRAKASH; BASKARAN, 2018). No processamento de suco de acerola é gerado a borra, composto de cascas e sementes, na etapa de filtração ou prensagem. Além disso, os sólidos solúveis retidos no decantador são um resíduo com teor significativo de compostos bioativos, no caso do suco de acerola, o resíduo do decanter contém uma grande quantidade de compostos antioxidantes, apresentando grande potencial para ser reutilizado na indústria de alimentos e em outros setores, como o farmacêutico.

Seguindo a vertente dos estudos de viabilidade de diferentes substratos, o presente trabalho explora a possibilidade da fermentação de kombucha utilizando como meio o extrato do resíduo de acerola.

Os ensaios apresentados a seguir visam a caracterizar e comparar a kombucha preparada utilizando extratos de acerola com a kombucha tradicional preparada a partir do chá verde.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da concentração do extrato de acerola na produção de kombuchas e compará-la com a do extrato de chá verde tradicionalmente usado.

1.1.2 Objetivos específicos

Para que o objetivo geral fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- Preparar kombuchas empregando três concentrações diferentes de extrato de acerola (2%, 6% e 10 % m/v);
- Quantificar pH, compostos fenólicos e atividade antioxidante das kombuchas fermentadas;
- Avaliar o rendimento dos biofilmes produzidos;
- Comparar os resultados das kombuchas preparadas com extrato de acerola com os das preparadas com extrato de chá verde.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DEFINIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BEBIDA FERMENTADA

A kombucha é produzida pela fermentação de chá e açúcar por uma associação simbiótica de bactérias e leveduras formando um “chá de fungos” (GOH *et al.*, 2012b). A fermentação é estática e ocorre em temperatura ambiente. Em condições anaeróbicas, a associação simbiótica da kombucha é capaz de converter o substrato composto por sacarose e chá preto ou verde, no período de 7 a 10 dias, em uma bebida levemente carbonatada, suavemente avinagrada e refrescante (MALBAŠA *et al.*, 2011).

Chá Kombucha ganhou imensa popularidade nos últimos tempos devido aos seus benefícios à saúde. Os efeitos desta bebida derivam, principalmente, dos polifenóis e metabólitos secundários que são produzidos durante a fermentação (WATAWANA *et al.*, 2015). A cinética de fermentação da kombucha é complexa devido à variedade de microrganismos e suas interações, resultando na produção de uma gama de compostos durante a fermentação, entre os quais se destacam: ácido glucônico, glucurônico, L-lático, acético, málico, tartárico, cítrico e oxálico, etanol, diversos aminoácidos, vitaminas hidrossolúveis, antibióticos ativos e enzimas hidrolíticas.

Além disso, o processo de fermentação também leva à formação do SCOBY – um biofilme flutuante na superfície do meio de crescimento (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018). A celulose produzida durante a fermentação por *Acetobacter xylinum* aparece como uma membrana fina na superfície do caldo de chá, onde a massa celular de bactérias e leveduras é fixada. Essa mistura de microrganismos e celulose é provavelmente o motivo pelo qual o kombucha também é chamado de “fungo do chá”. A celulose preparada a partir de películas de *A. xylinum* tem uma característica única em termos de estabilidade química, estrutura molecular e resistência mecânica (JAYABALAN *et al.*, 2014).

2.2 BENEFÍCIOS À SAÚDE

Diversos estudos relatam os efeitos do chá e seus principais constituintes na saúde humana, e hoje o interesse está crescendo porque estudos científicos indicam que o chá pode trazer benefícios para a saúde e ajudar a prevenir doenças crônicas (DUFRESNE; FARNWORT, 2000).

Muitas mudanças bioquímicas ocorrem durante a fermentação e afetam a composição nutricional e, conseqüentemente, as propriedades do produto final como a bioatividade e a digestibilidade (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018). Em Watatawana *et al.* (2015), a atividade antimicrobiana e antifúngica da kombucha é atribuída ao pH ácido da bebida, devido a presença, por exemplo, de ácidos orgânicos, e principalmente do ácido acético e das catequinas, que inibem o crescimento de uma série de microrganismos Gram positivos e Gram negativos, como *Helicobacter pylori*, causador de úlceras pépticas, e *Escherichia coli*, causador da diarreia comum.

Substratos para fermentação de kombucha contêm antioxidantes que se originaram das folhas de chá. Estes são principalmente polifenóis, especialmente catequinas, que pertencem ao grupo dos flavonoides. Além de polifenóis, a bebida de kombucha contém vitamina C, B2, B6 e catalase, que têm uma capacidade de aprisionamento de radicais livres ou podem atuar sinergicamente com antioxidantes como o ácido cítrico (MOHAMMADSSHIRAZI; KALHOR, 2016). Esses fitoquímicos presentes na kombucha atribuem várias das propriedades funcionais à bebida correlacionadas com prevenção de câncer, aumento da imunidade, e alívio de inflamações e artrite (JAYABALAN *et al.*, 2014).

A presença do ácido glucurônico na kombucha proporciona benefícios à saúde, auxiliando na eliminação de impurezas e toxinas prejudiciais à saúde. A conjugação do ácido glucurônico com compostos indesejáveis aumenta a sua solubilidade e facilita seu transporte e eliminação do corpo (AYED; ABID; HAMDI, 2017). A bebida também fortalece o sistema imunológico, agindo como uma bebida probiótica, equilibrando a microbiota gastrointestinal humana (JAYABALAN *et al.*, 2014).

Entre os diversos benefícios para a saúde associados ao consumo da kombucha, citam-se: promover a melhoria da saúde do cabelo, da pele e das unhas, diminuir os distúrbios nervosos, reduzir a insônia, aliviar dores de cabeça, reduzir o desejo por álcool de uma pessoa alcoólatra, prevenir a formação de infecções da bexiga, reduzir a calcificação renal, diminuir os distúrbios menstruais e as ondas de calor na menopausa, melhorar a visão, promover a regeneração celular, estimular os sistemas glandulares no corpo, aliviar a bronquite e a asma, aumentar o metabolismo geral (WATAWANA *et al.*, 2015).

2.3 FERMENTAÇÃO DA KOMBUCHA

A popularidade do kombucha expandiu-se como muitas outras bebidas tradicionais, devido aos seus efeitos benéficos na saúde humana e à sua facilidade na preparação doméstica. As quantidades de chá, açúcar e de SCOBY, *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*, usadas na fermentação variam de acordo com a região geográfica de preparo; entretanto, o procedimento usual se dá como segue: ferve-se um litro de água e adiciona-se em torno de 50 gramas de açúcar refinado, sacarose. Adiciona-se cinco gramas de folhas de chá, mantendo em infusão por 5 minutos. O chá é filtrado para retirada das folhas e, após o arrefecimento até temperatura ambiente, 20 °C, inocula-se o chá com 24 gramas da cultura, SCOBY. A mistura é vertida para um recipiente previamente esterilizado com água fervente. O crescimento de microrganismos indesejáveis é inibido pela adição de 0,2 litros de kombucha pronta, o que diminui o pH ativando também as bactérias ácido acéticas. O recipiente é coberto com uma toalha de papel para evitar a entrada de insetos. A incubação deve ser realizada na faixa de 20 °C e 30 °C. Na Tabela 1, são citadas as condições de temperatura utilizadas em diversos trabalhos. Durante o período de fermentação, ocorre a formação de uma membrana fina transparente em forma de gel na superfície. Esta é a nova SCOBY que se forma como uma nova camada acima do SCOBY que foi inoculado para iniciar a fermentação. Neste momento, o chá começará a ter um cheiro peculiar de fermentado e haverá a presença de bolhas de gás carbônico provenientes da fermentação. Após um período de 10 a 14 dias, a nova SCOBY terá se desenvolvido na superfície do chá como um disco de aproximadamente 2 cm de espessura cobrindo todo o diâmetro do recipiente. Então, o SCOBY recém-formado é removido, sendo mantido em um pequeno volume de chá fermentado. A bebida restante é filtrada e armazenada em garrafas tampadas a 4°C (JAYABALAN *et al.*, 2014).

Tabela 1 – Referências de condições de tempo e temperatura para a fermentação de kombucha

Meio de fermentação	Dias de Fermentação	Temperatura (°C) de fermentação	Referência
Chá preto	21 dias	24 ±3 °C	(JAYABALAN <i>et al.</i> , 2010)
Chá preto	25 dias	20 °C	(BLANC, 1996).
Suco de uva	12 dias	30 °C	(AYED; ABID; HAMDI, 2017)
Chá preto	15 dias	30 °C	(CHU; CHEN, 2006)
Chá preto Chá verde	21 dias	20 °C e 30 °C	(FILIPPIS <i>et al.</i> , 2018)
Chá preto	56 dias	Temperatura ambiente	(AMARASINGHE; WEERAKKODY; WAISUNDARA, 2018)
Chá preto	8 dias	30 ± 3 °C	(GOH <i>et al.</i> , 2012a)
Chá verde	17 dias	20 – 22 °C	(REISS, 1994)
Chá preto Chá verde	10 dias	28 °C	(MALBAŠA <i>et al.</i> , 2011)
Chá preto	21 dias	28 ± 2 °C	(CHAKRAVORTYA <i>et al.</i> , 2016)
Chá preto	60 dias	20 – 22 °C	(SIEVERS <i>et al.</i> , 1995)
Chá preto	8 dias	Temperatura ambiente	(NGUYEN <i>et al.</i> , 2015)
Chá preto	10 dias	23 °C	(MARSH <i>et al.</i> , 2014)
Leite	14 dias	42 °C	(HRNJEZ <i>et al.</i> , 2014)
Chá preto	10 dias	30 °C	(LONČAR <i>et al.</i> , 2014)
Chá verde Chá preto	18 dias	24 ± 3 C	(JAYABALAN; MARIMUTHU; SWAMINATHAN, 2007)
Chá preto	14 dias	24 ± 3 °C	(CHEN; LIU, 2000)
Extrato de alcachofra	14 dias	28 °C	(LONČAR; MALBAŠA; KOLAROV, 2007)

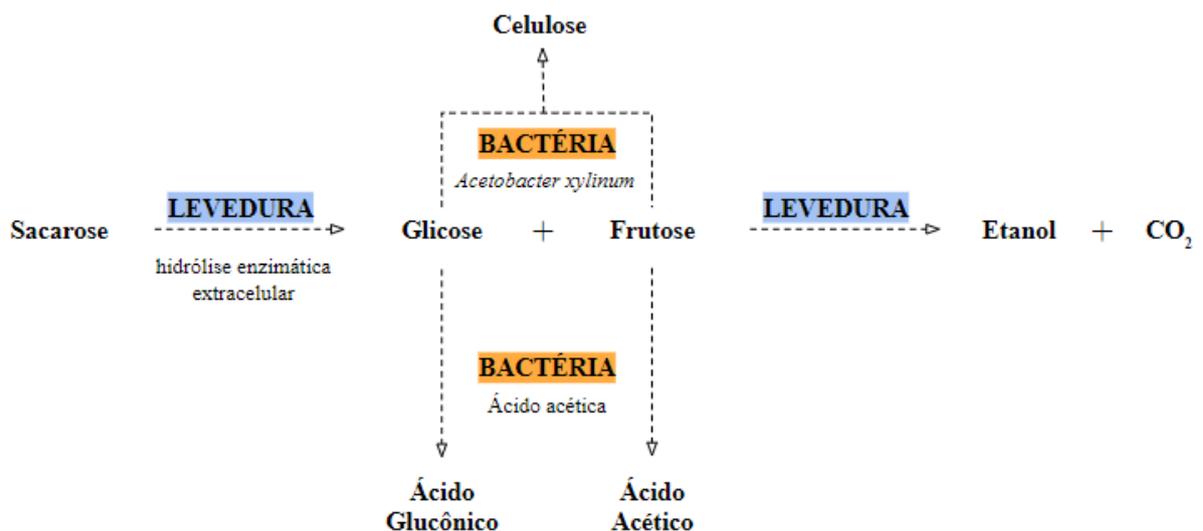
Fonte: Elaborada pela autora (2019).

2.4 FATORES QUE INFLUENCIAM A FERMENTAÇÃO DA KOMBUCHA

2.4.1 Microrganismos

Estudos reportam que o espectro microbiano da bebida é dominado por bactérias ácido-acéticas e leveduras (CHAKRAVORTYA *et al.*, 2016). Sabe-se que a composição microbiana da cultura do chá de Kombucha varia de uma cultura para outra, dependendo de fatores como a localização geográfica, o clima, as espécies locais de bactérias e leveduras e a origem do inóculo (WATAWANA *et al.*, 2015). O consórcio microbiano da kombucha apresenta atividades metabólicas que utilizam substratos de maneiras diferentes e complementares. Foi comprovado que as células de leveduras são responsáveis pela hidrólise enzimática extracelular da sacarose em glicose e frutose e pela transformação de glicose e frutose em etanol e CO₂; por outro lado, bactérias ácido-acéticas convertem glicose em ácido glucônico e cetoglucônico, e frutose em ácido acético (LONČAR *et al.*, 2014). O esquema da conversão dos substratos na fermentação é apresentado na Figura 1. O valor de pH da bebida da kombucha diminui devido à produção de ácidos orgânicos durante a fermentação (DUFRESNE; FARNWORT, 2000).

Figura 1 – Fluxograma de produção de celulose durante a fermentação da kombucha



Fonte: Adaptada de Villarreal-Soto *et al.* (2018).

2.4.2 Substratos

A sacarose é a fonte de carbono mais empregada na fermentação da kombucha. Contudo, grande parte não é fermentada durante o processo (JAYABALAN *et al.*, 2014). Quase todos os microrganismos vivos requerem fonte de carbono para seu crescimento e metabolismo gerais. Além disso, o carbono é um componente de todas as substâncias que constituem o protoplasma. A cultura “mãe” (inicial) da celulose bacteriana depende do fornecimento de uma fonte de carbono, uma vez que não pode produzir a celulose em quantidades adequadas por conta própria (GOH *et al.*, 2012a).

Entre os compostos de fermentação mais comuns, destacam-se os chás verde e preto. O chá verde demonstrou ter um melhor efeito de estimulação na fermentação da kombucha em comparação com a fermentação do chá preto, levando à formação do produto em um período de tempo mais curto (WATAWANA *et al.*, 2015). Chá preto, verde e oolong são os três principais tipos de chá, que são preparados pela infusão de folhas secas da *Camellia sinensis* em água quente. Watawana *et al.* (2015) também destacam que o chá é uma das bebidas mais populares no mundo e que vem sendo consumido há séculos, ganhando destaque, sobretudo, por seus componentes alcaloides purínicos, como cafeína, teaflavinas, galotaninos, triterpeno, saponinas, flavonoides, compostos minerais, carboidratos e vitaminas.

2.4.3 pH

Em seus estudos, Goh *et al.* (2012a) enfatizam que o pH é um dos mais importantes parâmetros que afetam a fermentação da kombucha, pois os ácidos formados como acético e glucônico têm sido atribuídos como responsáveis pelas atividades funcionais das bebidas resultantes. Também está intimamente relacionado com o crescimento microbiano e as alterações estruturais dos compostos que apresentam atividade antioxidante (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018). No início da fermentação, uma pequena porção do caldo de Kombucha previamente preparado pode ser adicionado ao novo chá para diminuir o pH, a fim de impedir o crescimento de microrganismos indesejáveis (WATAWANA *et al.*, 2015). A queda do pH acontece devido à formação de ácidos. Por ser um consórcio de microrganismos, sabe-se que cada um deles têm uma faixa típica de pH dentro da qual o seu

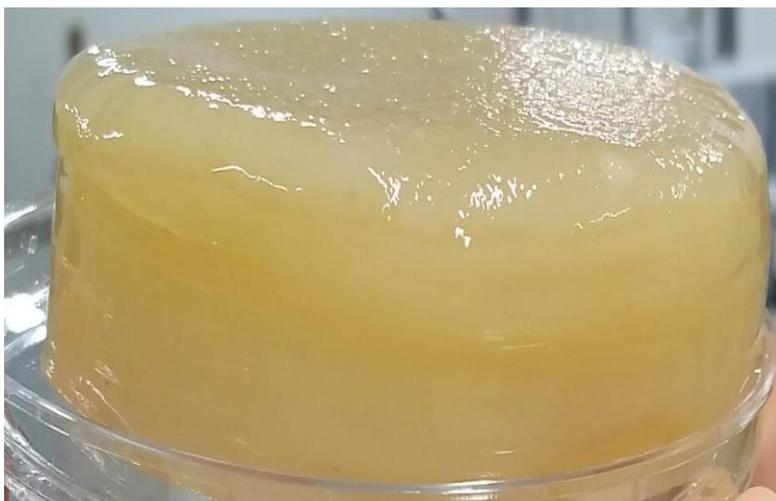
crescimento é favorecido. Portanto, o pH desempenha um papel importante no crescimento microbiano e na síntese de celulose bacteriana (GOH *et al.*, 2012a).

2.4.4 SCOBY – Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts

SCOBY, *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*, é o biofilme de celulose bacteriana produzido por *Acetobacter xylinum*, em adequadas condições de temperatura e pH, que são dois parâmetros cruciais que afetam o crescimento da película de celulose. CHAWLA *et al.* (2009) observou que na maioria dos experimentos, que a produção máxima de celulose foi entre 28 e 30 °C.

O biofilme de celulose adicionado inicialmente ao chá é utilizado como um inóculo; com isso, um novo biofilme é formado na superfície do chá durante a fermentação (WATAWANA *et al.*, 2015). Primeiramente, as bactérias produtoras de celulose se multiplicam, consumindo o oxigênio dissolvido no meio. Posteriormente, o microrganismo sintetiza certa quantidade de celulose formando camadas sobrepostas na interface ar/líquido. À medida que o tempo de fermentação avança, a espessura da membrana aumenta pela geração de novas camadas em sua superfície, formando uma estrutura suspensa no meio de cultura (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018), conforme ilustra a Figura 2.

Figura 2 – Biofilme de celulose produzido durante a fermentação no meio de extrato de acerola



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

2.5 SUBSTRATOS ALTERNATIVOS AO CHÁ

Diversos estudos utilizaram outros materiais além do chá como substrato alternativo para o Kombucha (AYED; ABID; HAMDI, 2017). Alguns dos trabalhos investigaram o potencial de bebidas de kombucha preparadas a partir de diferentes substratos estão apresentados no Quadro 1. As referências mostram o crescente interesse na produção de kombucha em diferentes meios de maneira a potencializar e criar bebidas alternativas. No presente estudo, será avaliado o potencial do uso do extrato do resíduo de acerola proveniente do processo de extração de vitamina C para a fermentação da kombucha. E visto que a propriedade antioxidante é fortemente atribuída à bebida, o conteúdo de polifenóis e a atividade antioxidante serão algumas das análises feitas com a kombucha produzida.

Quadro 1 – Estudos de fermentação de kombucha em substratos alternativos

Substrato	Objetivo do estudo	Referência
Suco de uva	Produção de ácido glucurônico usando suco de uva para fermentação de kombucha. Avaliação do potencial de suco de uva vermelha para a fermentação de Kombucha.	(YAVARI <i>et al.</i> , 2011) (AYED; ABID; HAMDI, 2017).
Suco de cereja	Produção de ácido glucurônico através da fermentação de kombucha no suco de cereja azeda adoçado	(YAVARI <i>et al.</i> , 2010)
Leite	Fabricação de bebidas lácteas por meio da fermentação da Kombucha em leite. Comparar efeitos do inóculo de kombucha como nova cultura inicial para a fermentação do leite com produtos lácteos fermentados obtidos por probiótico comercial e iogurte.	(MALBAŠA <i>et al.</i> , 2009) (HRNJEZ <i>et al.</i> , 2014)
Chá de cidreira (<i>Melissa officinalis L.</i>)	Uso do chá de erva-cidreira (<i>Melissa officinalis L.</i>) como meio alternativo para produção da Kombucha.	(VELIĆANSKI <i>et al.</i> , 2007)
Erva-cidreira, tomilho hortelã-pimenta e sálvia	Análise da possibilidade de obtenção de Kombucha a partir erva-cidreira, tomilho, hortelã e sálvia.	(VELIĆANSKI; VETKOVIĆ; MARKOV, 2013)
Soro de queijo	Explora a possibilidade de usar três tipos de soro para fazer uma bebida	(BELLOSO-MORALES, G.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ,

	fermentada usando uma cultura de Kombucha como inóculo.	2003)
Alcachofra	Investigar a influência de diferentes cultivares de alcachofra sobre a atividade metabólica da kombucha.	(LONČAR; MALBAŠA; KOLAROV, 2007)
Suco de cacto pêra (<i>Opuntia ficus-indica</i>)	Suco de cacto pera foi utilizado como substrato para a fermentação da kombucha, a fim de desenvolver uma nova bebida com propriedades nutricionais aprimoradas.	(AYED; HAMDI, 2015).
Café	Investigar se o potencial antioxidante do café poderia ser melhorado com a fermentação da kombucha.	(WATAWANA; JAYAWARDENA; WAISUNDARA, 2015)
Frutos de serpente (<i>Salacca zalacca</i> (<i>Gaerth.</i>) Voss)	Investigar a fermentação de Frutos de serpente com o consórcio Kombucha.	(ZUBAIDHAHA <i>et al.</i> , 2018)
Alho e vinagre	Estudar e comparar a composição química de alhos fermentados em vinagre de uva vermelha, em kombucha e alho fresco.	(PURE <i>et al.</i> , 2017)

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

2.6 EXTRATO DO RESÍDUO DA ACEROLA

Subprodutos como resíduos de frutas (bagaço, casca e sementes) também podem ser ingredientes em formulações de alimentos ou matérias-primas para a extração de compostos bioativos (fenólicos, carotenoides, polifenóis, minerais, óleos essenciais e vitaminas). Os resíduos das indústrias de sucos de frutas podem responder por até 60% da massa do fruto, sendo uma preocupação da indústria agregar valor a estes, porque o descarte desses resíduos e subprodutos de frutas e vegetais frequentemente é de responsabilidade do fabricante. Desse modo, o uso desses compostos possibilitaria a geração de benefícios econômicos (SANCHO *et al.*, 2015). O aproveitamento dos subprodutos originados do processamento de sucos de frutas, por consequência, pode ser estudado com a finalidade de obter um valioso extrato.

A acerola é um fruto tropical de grande valor econômico e nutricional, principalmente, pelo seu alto conteúdo de vitamina C, carotenoides e antocianinas, o que destaca esse fruto no campo dos alimentos funcionais (FREITAS *et al.*, 2006a).

As indústrias brasileiras processadoras de frutas tropicais processam cerca de 34,4 mil toneladas de acerolas por ano, o que equivale a 7,16% do total de frutas beneficiadas por esse mercado. As acerolas processadas geram aproximadamente 18 mil toneladas de sucos e polpas por ano (FREITAS, *et al.*, 2006b).

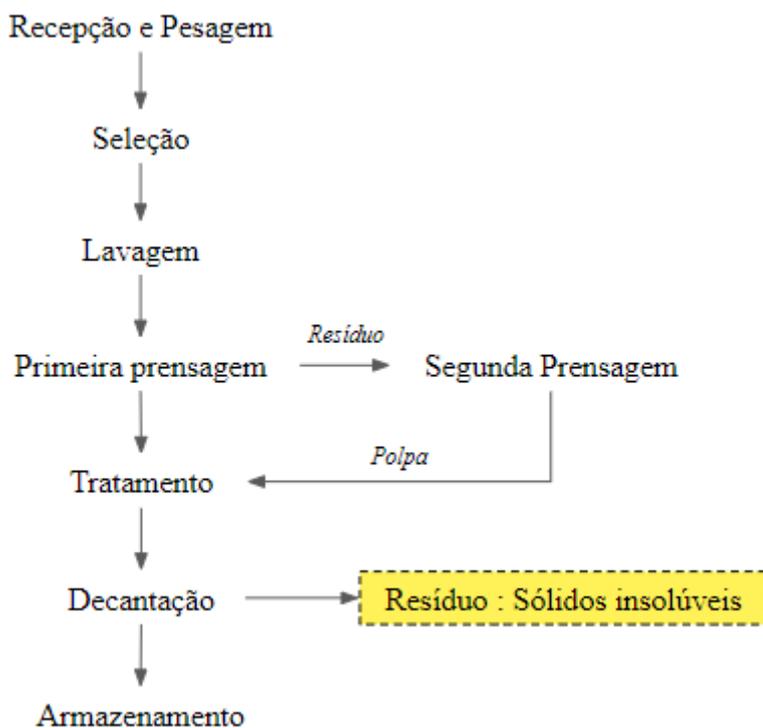
Os resíduos da acerola são subprodutos do processamento normalmente descartado nas indústrias de suco e polpa; contudo, apresentam níveis relativamente altos de antocianinas, flavonoides, vitamina C e ácidos fenólicos, os quais são distribuídos tanto na casca da fruta como na polpa (VENDRAMINI; TRUGO, 2004).

Os fenólicos representam um grande grupo de metabólitos, que consistem em um ou mais anéis aromáticos com graus variáveis de metoxilação, hidroxilação e glicosilação, dando cor, adstringência e amargor aos frutos. A acerola possui fitoquímicos como antocianinas e compostos fenólicos com atividade antioxidante e antimicrobiana (SANCHO *et al.*, 2015).

Em comparação com os dados de teor de fenólicos totais reportados para várias frutas e vegetais, obtidos em condições experimentais semelhantes, os resíduos de acerola apresentam um valor superior ao da pera, morango, carambola, maçã e beterraba vermelha (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

O fluxograma apresentado na Figura 3, elaborado com base em Maia *et al.* (2007), é um esquema simplificado da produção de polpa de acerola, que contém as etapas iniciais básicas aplicadas também no processo de extração de vitamina C da acerola. A etapa destacada indica onde foi gerado o resíduo utilizado neste estudo, sendo o resíduo composto de sementes e resto de polpa de acerola.

Figura 3 – Fluxograma de obtenção do suco de acerola



Fonte: Adaptada de Maia *et al.* (2007).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Acerola

O resíduo de acerola, utilizado para o preparo do extrato, foi fornecido pela empresa Amway Nutrilite do Brasil (Ubajara, CE). Esta empresa extrai vitamina C de frutos de acerola colhidos ainda verdes, devido à maior concentração de vitamina C.

3.1.2 Chá verde

O chá verde (*Camellia Sinenses*) foi utilizado na forma de folhas desidratadas de chá, obtida em comércio da região de Barra Velha, Santa Catarina, conforme ilustra a Figura 4.

Figura 4 – A) Folhas de chá verde (*Camellia Sinenses*) desidratadas. B) Pacote de 1,1 Kg de chá verde (*Camellia Sinenses*) da marca Sabor Verde (Linea Verde, Curitiba, PR).



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

3.1.3 Sacarose

Foi utilizado como fonte de sacarose no preparo da kombucha o açúcar refinado, adquirido em comércio local da região de Florianópolis, Santa Catarina.

3.1.4 SCOBY

A SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts) utilizada neste estudo provém de um preparo doméstico de kombucha na região de Florianópolis, Santa Catarina. O biofilme foi mantido refrigerado imerso na própria kombucha até a sua utilização.

3.2 PRODUÇÃO DA KOMBUCHA

Todo o estudo foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Biológica (LiEB) localizado no departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), incluindo equipamentos como agitadores, centrífugas, espectrofotômetros, estufas, autoclaves e vidraria para auxílio nas análises.

3.2.1 Extrato de acerola

Para obter os extratos do resíduo de acerola em diferentes concentrações, o resíduo seco foi pesado e diluído com água destilada nas proporções de 2%, 6% e 10% (m/v) em erlenmeyer aletado. A vidraria foi coberta com filme de parafina armazenada em agitador orbital a temperatura de 50 °C e 150 rpm, da marca Tecnal (modelo TE-424) durante 4 horas. Ao fim da etapa de extração, foi realizada a filtração a vácuo com filtro de papel para a separação dos sólidos e a obtenção dos extratos.

3.2.2 Preparo do chá

Para a infusão, folhas de chá verde (*Camellia Sinensis*) foram pesadas e adicionadas em um recipiente com água a 100 °C na concentração de 5 g/L. Após 5 minutos de infusão, o chá foi coado com filtro de papel e deixado esfriar.

3.2.3 Preparo do sistema para fermentação

Os extratos obtidos da acerola e o chá foram submetidos à pasteurização a frio, passando por uma membrana de microfiltração com filtro de acetato de celulose, tamanho de poro de 0,22 µm. A Figura 5 apresenta o sistema de membrana utilizado, o qual foi previamente esterilizado a 115 °C por 15 minutos. Esse procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar.

Figura 5 – A) Sistema de filtro a vácuo por membrana (acetato 0,22 μm). B) Filtração dentro da câmara de fluxo laminar



Fonte: A) RBR Vidros (2019). B) Elaborada pela autora (2019).

Em seguida, adicionou-se 198 ml de solução de sacarose 70 g/L, preparada e autoclavada previamente, ao extrato de acerola e ao chá verde.

Os meios foram inoculados com 10% (v/v) da bebida kombucha e 4% (m/v) de SCOBY. Todos os ensaios de fermentação foram realizados em triplicada (A, B e C) e mantidos em incubadora com temperatura controlada a 30 ± 2 °C, sem agitação.

Figura 6 – Esquema de disposição dos frascos para fermentação

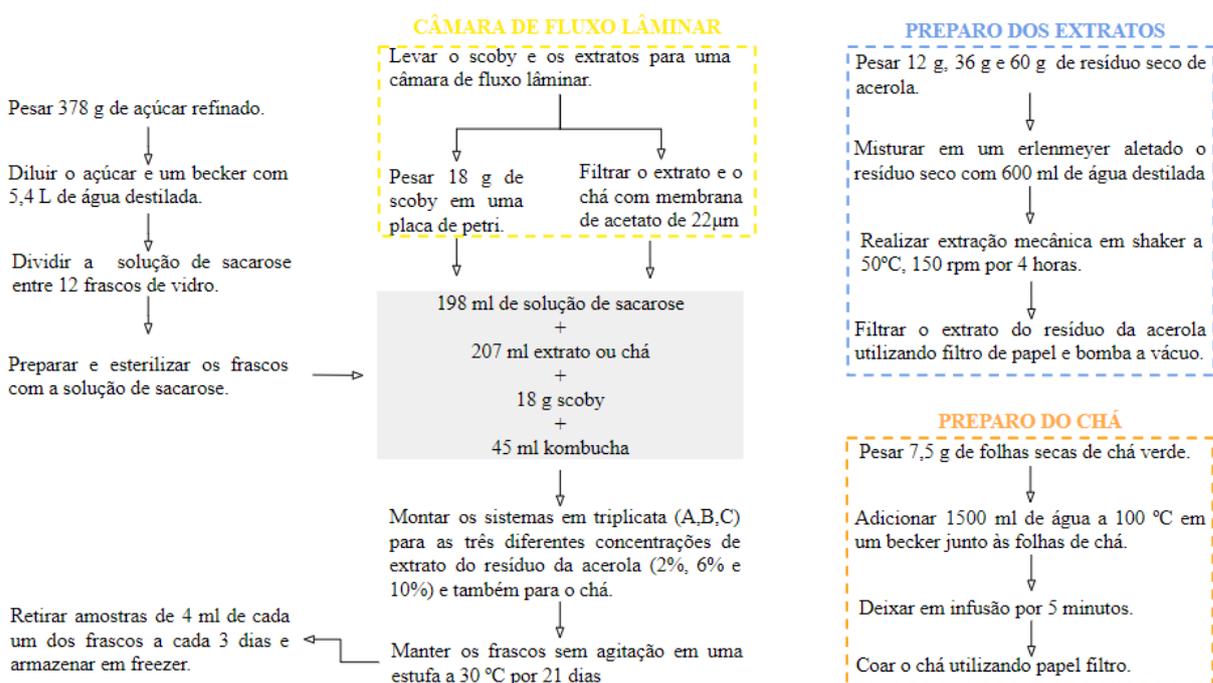


Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Amostras de 4 ml foram coletadas a cada 72h, desde o primeiro até o 21º dia, armazenadas em microtubo de 2 mL, identificados e protegidos da ação da luz por folha de alumínio. As amostras foram congeladas até o momento das análises.

A Figura 7 esquematiza todas as etapas e os processos realizados para preparar as kombuchas para fermentação.

Figura 7 – Fluxograma do preparo para fermentação da kombucha



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

3.3 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

3.3.1 Medidas de pH

Os valores de pH foram medidos utilizando um pHmetro de bancada Kasvi modelo K39-2014B. Para realizar a medição, o equipamento foi calibrado com soluções de pH conhecido, de acordo com as instruções do fabricante. A sonda foi limpa com água destilada entre a troca de cada amostra que era lida.

3.3.2 Compostos fenólicos totais (CFT)

A variação da quantidade de compostos fenólicos presentes nos extratos concentrados e resíduos foram avaliadas baseado no método colorimétrico descrito por Singleton e Rossi (1965 *apud* CÂNDIDO; SILVA; AGOSTINI-COSTAC, 2015) com algumas modificações. 20 µL das amostras (previamente diluídas se necessário) foram adicionadas de 1580 µL de água destilada e 100 µL de reagente Folin-Ciocalteu em microtubos de 2 mL. Após 8 minutos de reação, 300 µL de solução de carbonato de sódio 20% (m/v) foi adicionado ao meio reacional e os microtubos agitados por 10 segundos em um agitador vortex mixer. Após incubação a 40 °C por 30 minutos, a absorbância das amostras foi lida a 765 nm em espectrofotômetro. A concentração dos compostos fenólicos foi obtida através de uma curva de calibração, construída previamente com ácido gálico (GAE), relacionando os valores lidos de absorbância com o teor de ácido gálico em gramas por litro da amostra (g/L).

3.3.3 Método do sequestro do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

As amostras foram avaliadas pela metodologia DPPH. O método de inibição do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. Um volume de 50 µL da amostra previamente diluída é misturado com 1950 µL da solução de DPPH ($6,3 \times 10^{-5}$ M). Após 60 minutos de reação, a absorbância é medida em 517 nm e os resultados expressos em mg de Trolox/mL obtidos através de curva de calibração previamente construída, de acordo com a metodologia utilizada em Cândido, Silva e Agostini-Costac (2015).

3.3.4 Massa de celulose produzida

Ao fim do período de fermentação, a produção de celulose foi avaliada por meio da massa de SCOBY produzida. Os biofilmes foram recolhidos purificados para remover as impurezas e microrganismos fixados. Na purificação, as membranas ficaram imersas em solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L durante pelo menos 24 horas em estufa a 50 °C. A SCOBY foi lavada e colocada em nova solução a cada 24 horas, até que todas as membranas

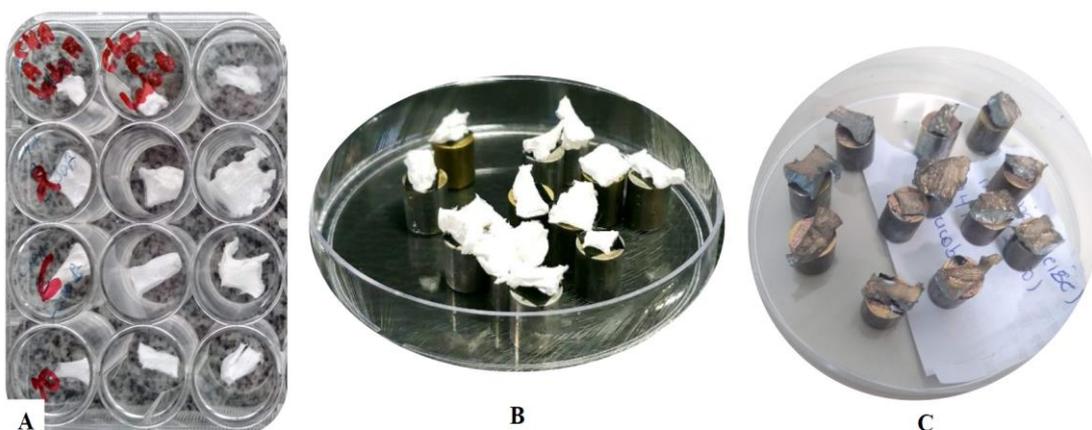
fossem purificadas. Para verificar o andamento do processo de purificação, o pH da solução onde se encontravam as membranas era medido no final do período de 24 horas. Quando o pH neutro foi atingido e as membranas apresentaram coloração branca em todas as camadas, foi concluído que não existiam mais impurezas fixadas nas camadas e nos poros da SCOBY.

As membranas purificadas foram pesadas, liofilizadas durante um período de 24 a 72 horas, dependendo da espessura da membrana, e pesadas novamente para obtenção do peso seco. Assim, foi possível estimar a massa de celulose produzida durante a fermentação.

3.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para avaliar a microestrutura da celulose produzida, foi realizada a análise de microscopia eletrônica de varredura MEV em equipamento marca Jeol 6390 LV, JEOL Ltda., Tóquio, Japão. Alíquotas dos biofilmes previamente purificados foram armazenadas a -80 °C, por aproximadamente 24 horas, liofilizadas durante 24 horas e colocadas sobre um suporte de alumínio e recobertas com ouro.

Figura 8 – A) Amostras liofilizadas. B) Amostras fixadas no suporte de alumínio. C) Amostras recobertas com ouro



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

A análise foi realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, LCME-UFSC.

Figura 9 – Equipamento marca Jeol 6390 LV, JEOL Ltda., Tóquio, Japão



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

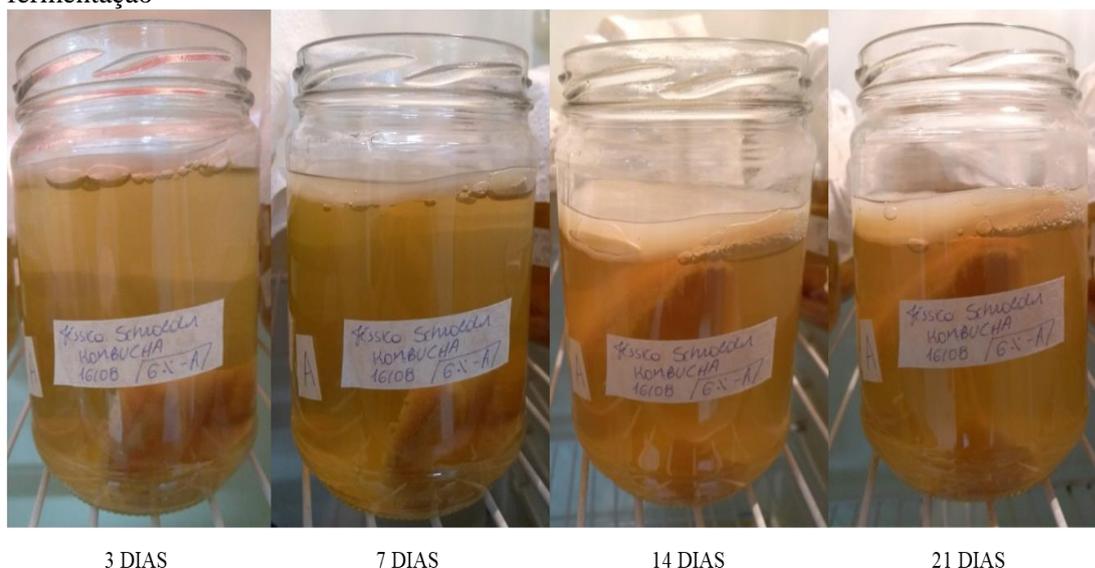
Os dados das análises realizadas nas amostras de kombuchas produzidas com acerola e chá verde foram avaliados de modo a comparar a evolução ao longo do processo. Portanto, os resultados foram padronizados relacionando o dado obtido nas análises de pH, CFT e DPPH com os tempos, em dias, de fermentação, 0, 7, 14 e 21 dias, sendo o dia 0 o dia em que se deu início à fermentação.

Para a membrana de celulose produzida, são apresentados dados de massa e imagens da morfologia e distribuição dos poros das membranas.

4.1 BIOFILME

Na sequência de fotos a seguir, é possível observar como evolui a formação do biofilme durante a fermentação do sistema preparado com extrato de acerola a 6%.

Figura 10 – Evolução do biofilme em kombucha preparada com extrato de acerola 6% ao longo da fermentação



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

A celulose é produzida pela bactéria *Acetobacter xylinum* e forma uma película na superfície que acomoda parte da microbiota da kombucha, promovendo, assim, a associação entre bactérias e leveduras. Uma atividade bioquímica específica dessa bactéria é a oxidação da glicose em ácido glucônico, que é encontrado na fase líquida, e outra rota metabólica leva à síntese da celulose microbiana formando o biofilme que permanece na superfície do líquido (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

A celulose microbiana é produzida extracelularmente na forma de fibrilas, e uma das principais características da celulose é sua capacidade de absorver água. Na Tabela 2, é possível comparar a diferença do peso úmido e do peso seco das membranas de celulose produzidas ao final da fermentação.

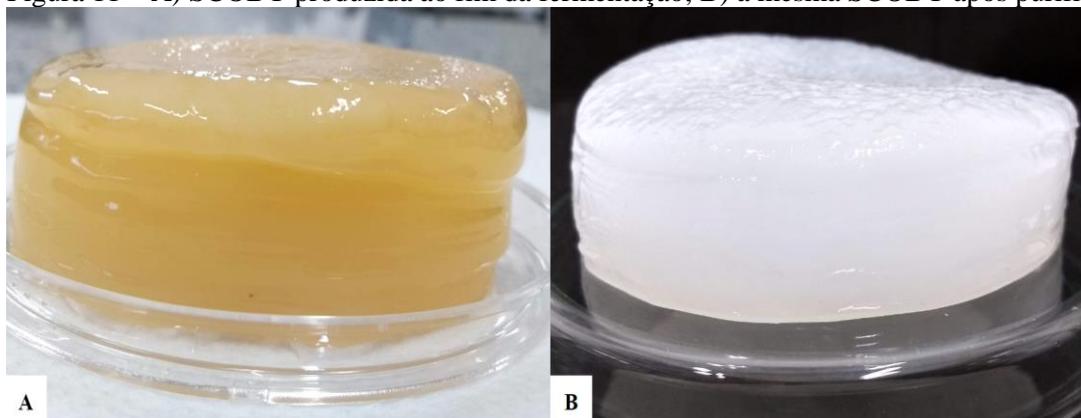
As aferições de peso e espessura, medidas em balança analítica e com um paquímetro, apresentadas foram realizadas após a purificação da membrana, que elimina microrganismos e sólidos aderidos a SCOBY. Após a secagem, as massas dos biofilmes produzidos foram muito semelhantes entre os extratos de acerola, uma média de 0,74 gramas, enquanto o biofilme no chá verde foi de apenas 0,25 gramas.

Tabela 2 – Peso úmido, peso seco e espessura das membranas de celulose produzidas durante a fermentação das kombuchas

SCOBY	Peso Úmido (g)	Peso Seco (g)	Espessura (mm)
2%	87,09	0,64	15,33
6%	90,33	0,77	18,00
10%	78,96	0,82	15,67
Chá	22,81	0,25	3,33

Fonte: Elaborada pela autora (2019).

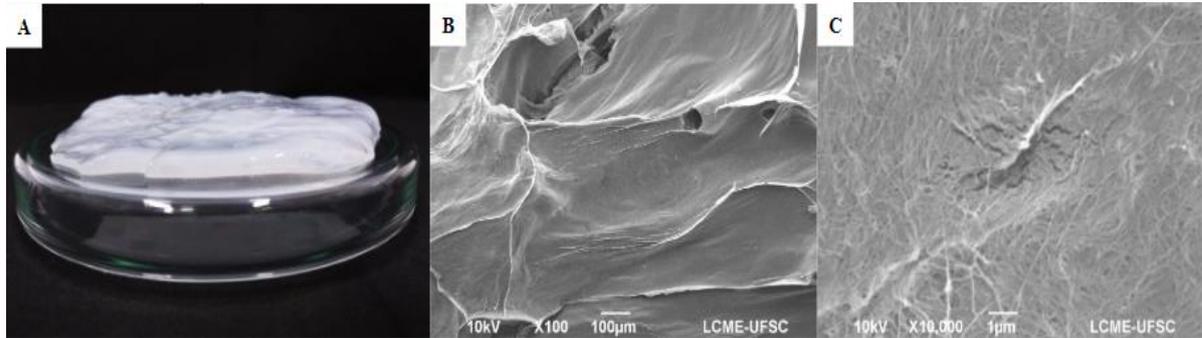
Figura 11 – A) SCOBY produzida ao fim da fermentação; B) a mesma SCOBY após purificação



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

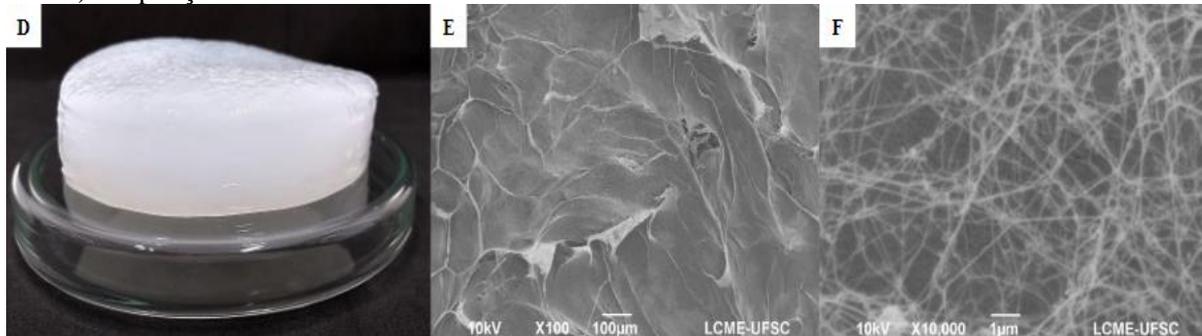
Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das membranas produzidas após 21 dias de fermentação foram preparadas em amostras de todos os experimentos realizados. Como identificado por Chakravortya et al. (2016), as bactérias presentes no kombucha são produtoras de celulose. As morfologias da celulose bacteriana mostradas nas Figuras 12, 13, 14 e 15, observa-se que as fibrilas estão emaranhadas, resultando em uma estrutura reticulada e densa. Certos pontos do biofilme das kombuchas fermentadas a partir do extrato de acerola existem, sendo possível visualizar fibrilas superficiais menos compactadas.

Figura 12 – A) Biofilme do chá. B) Ampliação em 100 vezes do biofilme do chá. C) Ampliação em 10.000 vezes do biofilme do chá



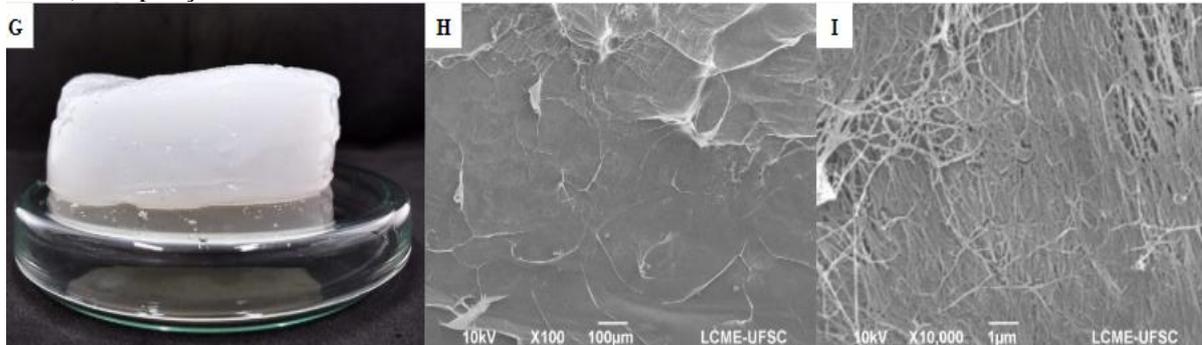
Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Figura 13 – D) Biofilme da kombucha 2%. E) Ampliação em 100 vezes do biofilme da kombucha 2%. F) Ampliação em 10.000 vezes do biofilme da kombucha 2%



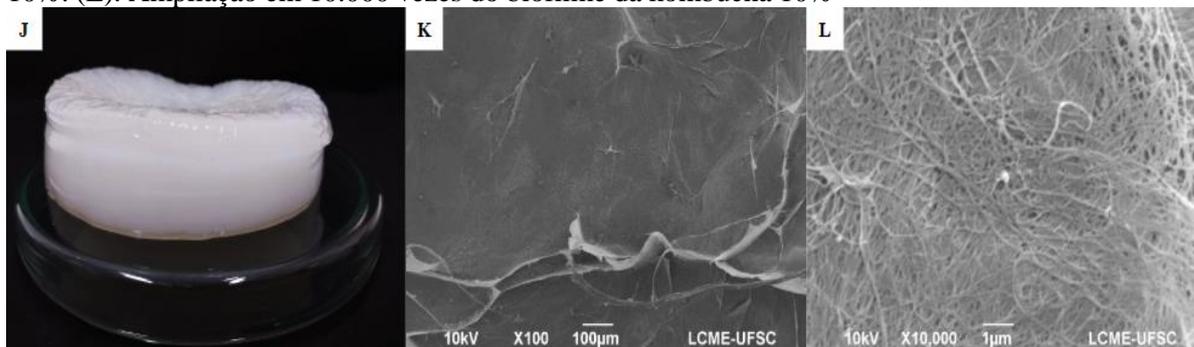
Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Figura 14 – G) Biofilme da kombucha 6%. H) Ampliação em 100 vezes do biofilme da kombucha 6%. I) Ampliação em 10.000 vezes do biofilme da kombucha 6%



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Figura 15 – (J) Biofilme da kombucha 10%. (K) Ampliação em 100 vezes do biofilme da kombucha 10%. (L). Ampliação em 10.000 vezes do biofilme da kombucha 10%



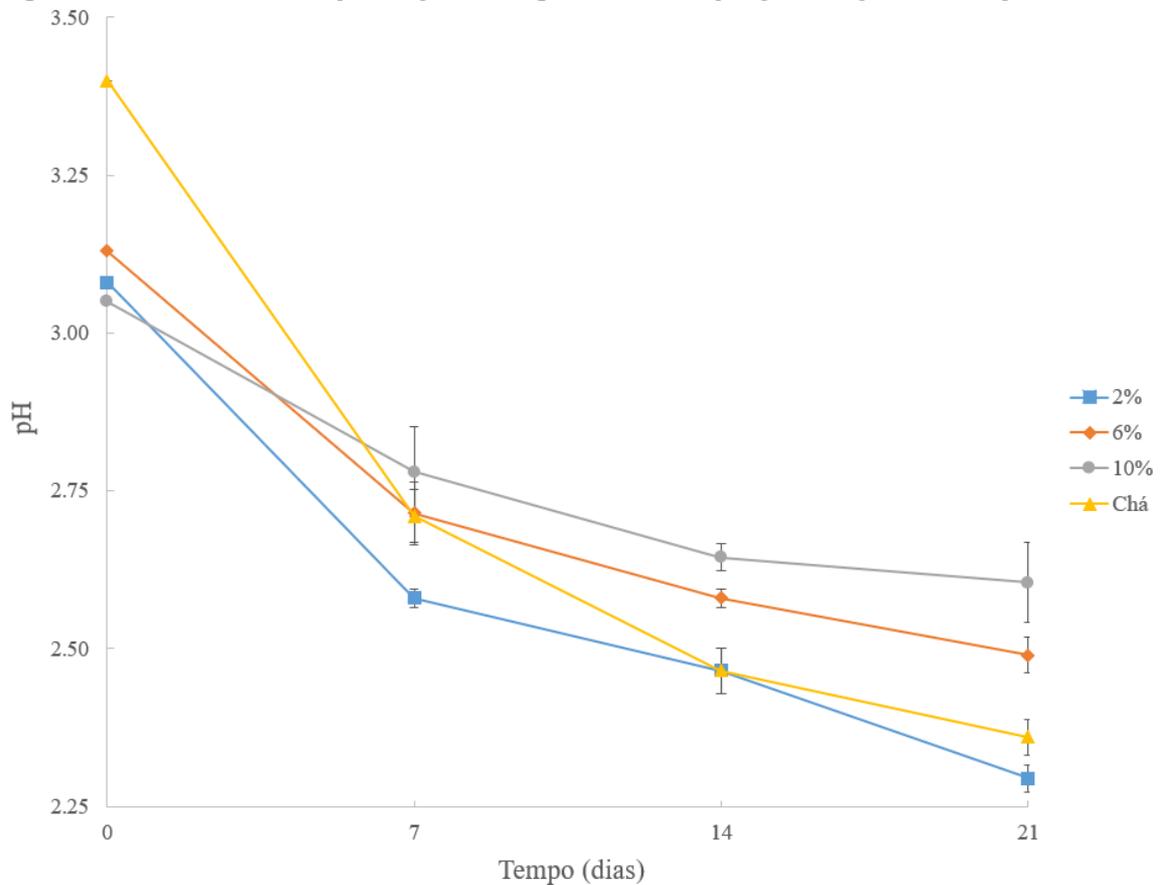
Fonte: Elaborada pela autora (2019).

De acordo com Goh *et al.* (2012b), a estrutura dos biofilmes podem variar dependendo das cepas utilizadas, tempo de fermentação e compostos químicos presentes no meio de fermentação; por isso, futuros ensaios de caracterização precisam ser realizados para melhor identificar a estrutura do biofilme formado, como definição de densidade, porosidade, comprimento das fibras e outros dados relevantes podem ser realizados com o objetivo de definir aplicações para o biofilme produzido.

4.2 EVOLUÇÃO DA ACIDEZ AO LONGO DA FERMENTAÇÃO

A formação de ácidos foi seguida apenas pela medida do pH, que diminuiu no decorrer dos dias em todas as kombuchas, o que leva à conclusão de que ácidos orgânicos foram biossintetizados, de acordo com o esperado. Durante o processo de fermentação, as bactérias e as leveduras metabolizam a sacarose em vários ácidos orgânicos, como o ácido acético e o ácido glucurônico, e o resultado esperado é que o pH diminua com o tempo de fermentação. No Figura 16, observa-se que houve redução de pH, em todas as amostras, sendo mais significativa na kombucha de chá verde. Isso pode ser devido à menor produção de celulose observada que será discutida posteriormente, o que pode ter permitido que as bactérias ácido-acéticas tivessem maior acesso ao oxigênio na superfície do líquido, sintetizando uma quantidade maior de ácidos principalmente nos primeiros 7 dias de fermentação, em que se observa uma queda mais pronunciada. Em contrapartida, nas kombuchas à base de acerola a espessa camada de celulose produzida pode ter dificultado a difusão de oxigênio no meio, inibindo o crescimento de bactérias aeróbicas responsáveis pela formação de ácidos orgânicos.

Figura 16 – Gráfico da variação do pH ao longo da fermentação para as quatro condições avaliadas



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

De forma geral, a kombucha de chá verde apresentou redução de 3,40 para 2,36 após 21 dias, enquanto a amostra produzida com 2% de acerola reduziu de 3,08 para 2,30. Estudos realizados com kombuchas fermentadas tradicionalmente em chá verde ou preto, foram obtidos resultados como em Ayed, Abid e Hamdi (2017), que apresentou redução no pH de 3,95 para 2,9 em 12 dias de fermentação. No estudo de Filippis *et al.* (2018), o pH decresceu de 3,5 para 2,5 em 6 dias. Amarasinghe, Weerasinghe e Waisundara (2018) asseveraram que a fermentação iniciou com o pH 5,3 e no fim apresentou um pH no valor de 4,4. Reiss (1994) produziu kombucha utilizando diferentes açúcares e a média de variação do pH foi de 6,1 para 4,8. Já no estudo de Chakravortya *et al.* (2016) o pH caiu de 5,03 para 2,28 em 7 dias de fermentação.

4.3 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

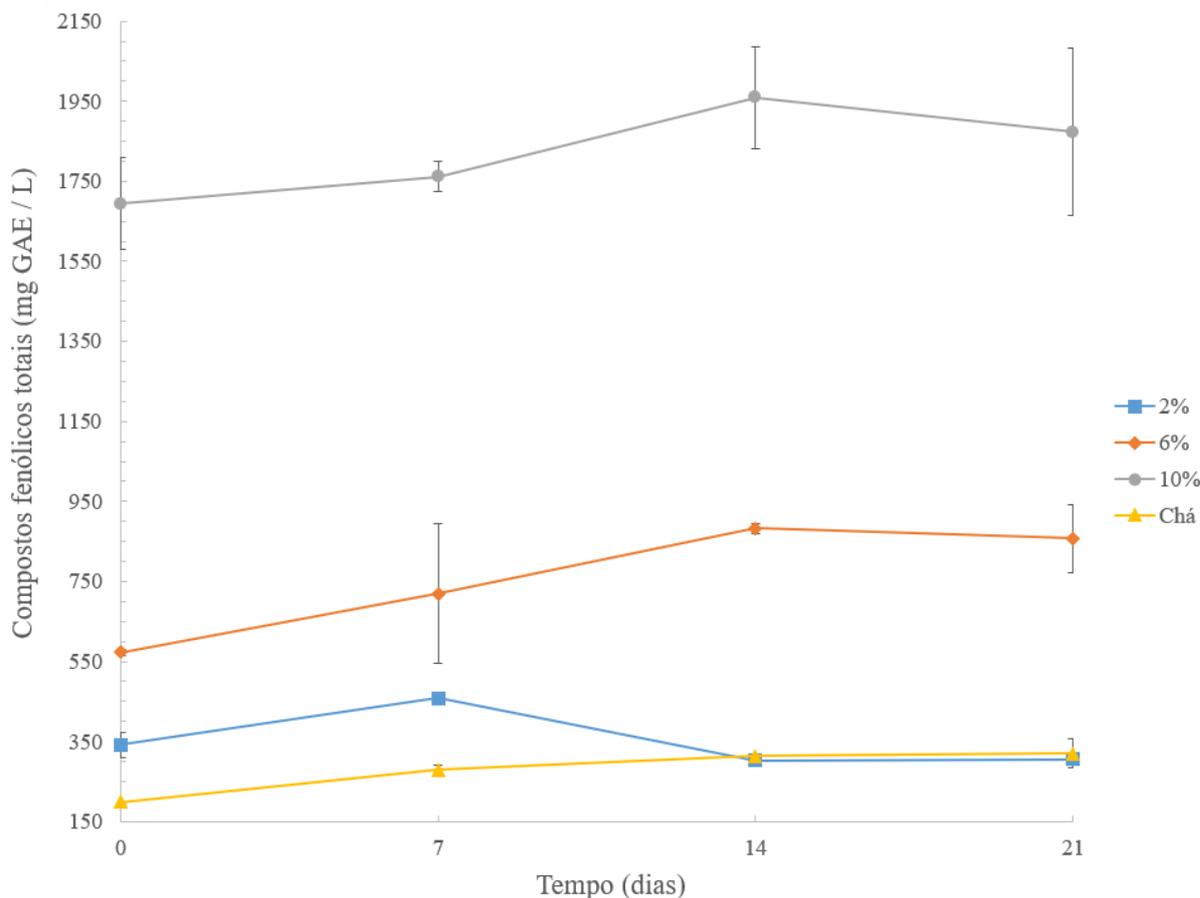
A kombucha ganha destaque pela propriedade antioxidante, devido à presença de compostos fenólicos na composição química da bebida. Esses compostos eliminam radicais livres e ativos de oxigênio, atribuindo à bebida características que contribuem para a melhoria da saúde. A estabilidade das catequinas, um dos compostos fenólicos presentes no chá verde, depende do pH. Estas substâncias são muito instáveis em solução alcalina, mas estáveis em soluções ácidas (JAYABALAN; MARIMUTHU; SWAMINATHAN, 2007). Com base nos dados mostrados no Figura 17, todos os sistemas seguiram o comportamento esperado, ou seja, a concentração fenólica total cresceu com o passar dos dias de fermentação. Os maiores aumentos foram observados para o kombucha preparado com 6% de resíduo de acerola, de 572 para 857 mg/L, correspondendo a um aumento de 50% do teor inicial, e para a kombucha preparada à base de chá verde, cuja concentração de CFT passou de 198 para 320 mg/L ao final da fermentação, ou seja, um aumento de 62%.

De acordo com alguns estudos, como o de Chakravortya *et al.* (2016), a concentração de compostos fenólicos no chá fermentado após 21 dias aumentou 54%. Já em Özdemir e Çon (2017), observou-se um aumento no teor de compostos fenólicos totais de aproximadamente 20% na kombucha fermentada a partir de chá verde e de 10% na kombucha de chá preto e de resíduos de chá. Jayabalan *et al.* (2008) constataram que a concentração dos compostos fenólicos totais aumenta progressivamente com o tempo de fermentação da kombucha devido à segregação dos complexos fenólicos em moléculas menores.

Quando os compostos fenólicos complexos estão presentes em um ambiente ácido ou quando enzimas liberadas por bactérias e leveduras da kombucha estão presentes, ocorre a degradação desses compostos em moléculas menores, resultando em aumento no total de compostos fenólicos disponíveis (WATAWANA *et al.*, 2015). O sistema de 2% parece limitar a provável produção das enzimas já que o aumento mais significativo no teor de polifenóis ocorreu apenas nos primeiros 7 dias de fermentação, variando a concentração de 341,45 mg/L e atingindo a concentração mais alta de 458,27 mg/L no sétimo dia. Em seguida, ocorreu um decréscimo da concentração dos polifenóis, que se manteve praticamente sem alteração até o último dia da fermentação. A queda da SCOBY produzida durante a fermentação é uma possível justificativa ao amortecimento do aumento da concentração de polifenóis. O biofilme fica na superfície formando uma barreira que dificulta a entrada de oxigênio no meio, sem essa barreira, os polifenóis podem ter sofrido oxidação, levando à

redução da concentração de polifenóis. Após alguns dias um novo biofilme começa a ser formado na superfície e a concentração de compostos fenólicos estabiliza e retoma, lentamente, o aumento.

Figura 17 – Gráfico da variação concentração de compostos fenólicos ao longo da fermentação para os quatro sistemas



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

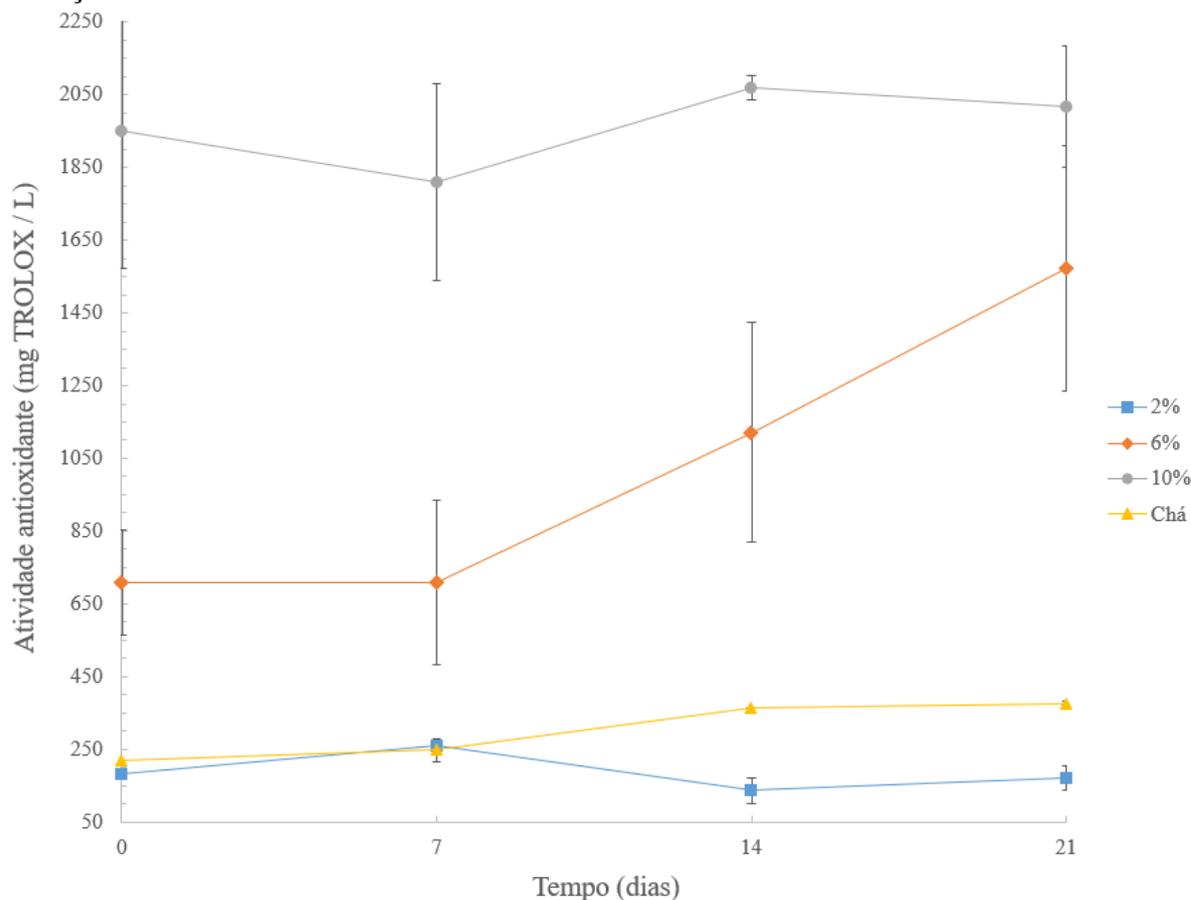
O sistema de 10% tem um comportamento similar ao sistema de 2%, apresentando uma queda da concentração de polifenóis a partir do décimo quarto dia. A mesma justificativa é aplicada nesse caso, uma vez que a SCOBY também submergiu, devido a perturbações durante a coleta das amostras.

4.4 CAPACIDADE DE SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES

A atividade antioxidante da kombucha está relacionada à presença de polifenóis e catequinas. A concentração de compostos fenólicos e a atividade de reação para eliminar o radical livre “2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) aumentam ao longo do tempo de

fermentação. Chakravortya *et al.* (2016) reportam que a atividade sequestradora de radicais DPPH aumentou 39,7% após 21 dias. Já Jayabalan *et al.* (2008) relatam que em kombucha preparado a partir de chá verde, chá preto e resíduos de chá houve um aumento de 8%, 15% e 19%, respectivamente, na capacidade de sequestro de radicais livres durante a fermentação.

Figura 18 – Gráfico variação da concentração de Trolox ao longo da fermentação para as quatro condições avaliadas



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Analisando a Figura 18, a kombucha preparada com chá e com extrato de acerola 6% apresentaram crescimento da atividade antioxidante durante todo período fermentativo, assim como previsto na literatura. Dentre eles, o resultado mais expressivo é percebido no sistema 6% com o aumento de 708 mg/L para 1573 mg/L. O sistema aumentou aproximadamente 120% a atividade antioxidante da kombucha após os 21 dias de fermentação. O crescimento apresentado acompanha o resultado encontrado na análise de compostos fenólicos totais, ou seja, tanto a concentração de polifenóis como a atividade antioxidante aumentaram durante toda a fermentação do sistema 6%.

Os sistemas 2% e 10% tiveram um comportamento diferente, apresentando um decaimento da capacidade sequestradora de radicais DPPH. Uma possibilidade é a relação com a queda da concentração de compostos fenólicos, uma vez que a atividade antioxidante da kombucha está relacionada à presença de polifenóis. Contudo, futuros estudos precisam ser realizados para determinar o fator que levou a esse comportamento, podendo ser, por exemplo, a formação de compostos inibidores durante a fermentação.

5 CONCLUSÃO

O resíduo seco de acerola verde foi utilizado para preparar extratos com três diferentes concentrações: 2%, 6% e 10%. Os extratos analisados serviram de meio para a fermentação de kombucha durante 21 dias, e foram comparados com a kombucha que foi preparada com o tradicional chá verde. As análises de variação do pH, compostos fenólicos e atividade antioxidante das kombuchas, além da produção de biofilmes, durante o período fermentativo mostraram que os extratos são uma alternativa ao chá verde para a produção dessa bebida.

Comparando os resultados das análises para as kombuchas fermentadas no meio de extratos de acerola, o sistema com concentração de 6% apresentou resultados interessantes, como a segunda maior queda de pH, de 3,13 para 2,49, apontando a formação de ácidos que caracterizam a bebida tradicional. Gerou o aumento de aproximadamente 50% da concentração de compostos fenólicos e resultou em pouco mais de 120% na atividade antioxidante, constituindo-se como o sistema com o melhor comportamento durante a fermentação, quando comparado a outras duas diferentes concentrações. Além disso, o biofilme produzido ao final dos 21 dias de fermentação teve a maior espessura, resultando em 770 mg em peso seco.

Apesar da fermentação da kombucha em meio ao extrato de acerola 6% ter apresentado uma evolução mais significativa e constante de queda de pH, com os melhores percentuais de aumento da concentração de polifenóis e maior atividade antioxidante, em termos de concentração, é preciso perceber que o extrato de 10% ainda mantém as maiores concentrações finais de compostos fenólicos e de atividade antioxidante, o que é explicado pelo fato de que esse sistema iniciou a fermentação já com concentrações mais altas do que os outros extratos.

As análises da kombucha fermentada em chá verde apresentaram os resultados esperados, a atividade oxidante e a concentração de compostos fenólicos totais aumentaram, enquanto o pH diminuiu durante a fermentação, inclusive este é o único resultado que se destaca melhor que outros sistemas fermentativos. Os melhores resultados foram alcançados com o extrato de acerola, principalmente quando a produção de biofilme foi avaliada, sendo que a massa seca de biofilme produzida ao final da fermentação com chá verde foi a menor de todos os sistemas, resultando em aproximadamente 250 mg.

Constatou-se que o extrato de resíduos de acerola pode ser uma alternativa interessante para a produção de celulose, pois a formação da SCOBY nos sistemas com extrato de acerola excedeu as expectativas. Dessa forma, a realização de um estudo visando à caracterização do biofilme seria de grande valia, visto que se poderia atribuir uso ao biofilme, agregando ainda mais valor ao produto biossintetizado a partir dos resíduos.

Deve-se salientar, por fim, que realizar uma avaliação quantitativa por meio de cromatografia líquida para discriminar os compostos, como ácidos e vitaminas formados durante a fermentação em meio ao extrato de acerola, acrescentaria muito a trabalhos futuros.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A produção de biofilme nos sistemas com extrato de acerola excedeu as expectativas. Dessa forma, a realização de um estudo visando à caracterização do biofilme seria de grande valia, já que seria possível atribuir uso do biofilme, agregando ainda mais valor ao produto biossintetizado a partir de resíduo da indústria.

Uma avaliação quantitativa por meio de cromatografia líquida a fim de discriminar os compostos, tais como ácidos e vitaminas formados durante a fermentação em meio ao extrato de acerola, acrescentaria muito a trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS

- AMARASINGHE, H.; WEERAKKODY, N. S.; WAISUNDARA, V. Y. Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during extended periods of fermentation. **Food Sci Nutr.**, p. 1-7, 2018.
- AYED, L.; ABID, S. B.; HAMDI, M. Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. **Ann Microbiol**, v. 67, p. 111-121, 2017.
- AYED, L; HAMDI, M. Manufacture of a beverage from cactus pear juice using Btea fungus fermentation. **Ann Microbiol**, v. 65, p. 2293-2299, 2015.
- BELLOSO-MORALES, G.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H. Manufacture of a beverage from cheese whey using a “tea fungus” fermentation. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 45, n. 1-2, p. 5-11, 2003.
- BENASSI, M. de T.; TONZAR, A. C.; MORIYA, S.; FERNANDES, J. G. Produtos de acerola: estudo da estabilidade de vitamina C. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 92-94, jan./abr. 2003.
- BERESA, C.; COSTA, G. N. S. CABEZUDO, I.; SILVA-JAMES, N. K. da; TELES, A. S. C.; CRUZ, A. P. G.; MELLINGER-SILVA, C.; TONON, R. V.; CABRAL, L. M. C.; FREITAS, S. P. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. **Waste Management**, v. 68, p. 581-594, 2017.
- BLANC, P. J. Characterization of the tea fungus metabolites. **Biothenology Letters**, v. 18, n. 2, p.139-142, febr. 1996.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- CAETANO, A. C. da S.; ARAÚJO, C. R. de. Evaluation of antioxidant activity of agro-industrial waste of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) fruit extracts. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 31, n. 3, p. 769-775, jul./set. 2011.
- CÂNDIDO, T. L. N.; SILVA, M. R.; AGOSTINI-COSTAC, T. S. Bioactive compounds and antioxidant capacity of buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) from the Cerrado and Amazon biomes. **Food Chemistry**, v. 177, p. 313-319, 2015.
- CARMO, J. S. do; NAZARENO, L. S. Q.; RUFINO, M. do S. M. Characterization of the acerola industrial residues and prospection of their potential application as antioxidant dietary fiber source. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 38, suppl. 1, p. 236-241, dec. 2018.
- CHAKRAVORTYA, S.; BHATTACHARYA, S.; CHATZINOTAS, A.; CHAKRABORTY, W.; BHATTACHARYA, D.; GACHHUI, R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, 63-72, 2016.

CHAWLA, P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 47, n. 2, p. 107-124, p. 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 antioxidante activities of Kombucha. **Food Chemistry**, v. 98, p. 502-507, 2006.

DELVA, L.; GOODRICH-SCHNEIDER, R. Antioxidant activity and antimicrobial properties of phenolic extracts from acerola (*Malpighia emarginata* DC) fruit. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 1048-1056, 2013.

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

FREITAS, C. A. S. de; MAIA, G. A.; COSTA, J. M. C. da; FIGUEIREDO, R. W. de; SOUSA, P. H. M. de. Acerola: produção, composição, aspectos nutricionais e produtos. R. **Bras. Agrocência**, Pelotas, v. 12, n. 4, p. 395-400, out./dez. 2006a.

FREITAS, C. A. S. de; MAIA, G. A.; COSTA, J. M. C. da; FIGUEIREDO, R. W. de; RODRIGUES, M. do C. P.; SOUSA, P. H. M. de. Estabilidade do suco tropical de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) adoçado envazado pelos processos hot-fill e asséptico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 544-549, jul./set. 2006b.

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

GOH, W. N.; ROSMA, A.; KAUR, B.; FAZILAH, A.; KARIM A. A.; BHAT, R. 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, 2012a.

GOH, W. N.; ROSMA, A.; KAUR, B.; FAZILAH, A.; KARIM, A. A.; BHAT, R. Microstructure and physical properties of microbial cellulose produced during fermentation of black tea broth (Kombucha). II. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 1, p. 153-158, 2012b.

GOMES, F. P. A. **Biossintese de Celulose Bacteriana a partir de Resíduos Industriais**. Orientador: Cármen Freire. 2011. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Alimentar) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2011.

HRNJEZ, D.; VAŠTAG, Ž.; MILANOVIC, S.; VUKIC, V.; ILICIC, M.; POPOVIC, L. J.; KANURIC, K. 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, 2014.

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

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

JAYABALAN, R.; MALINI, K.; SATHISHKUMAR, M.; SWAMINATHAN, K.; YUN, S.-E. Biochemical Characteristics of Tea Fungus Produced During Kombucha Fermentation. **Food Sci. Biotechnol.**, 19, n. 3, p. 843-847, 2010.

JAYABALAN, R.; MALBAŠA, R. V.; LONČAR, E. S.; VITAS, J. S.; SATHISHKUMAR, M. A Review on Kombucha Tea – Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 538-550, 2014.

KANURIĆ, K. G.; MILANOVIĆ, S. D.; IKONIĆ, B. B.; LONČAR, E. S.; ILIĆIĆ, M. D.; VUKIĆ, V. R.; VUKIĆ, D. V. Kinetics of lactose fermentation in milk with kombucha starter. **Journal of food and drug analysis**, p. 1-6, 2018.

KAPP, J. M.; SUMNER, W. Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. **Annals of Epidemiology**, v. 30, p. 66-70, 2019.

KOMBUCHA. **Encyclopædia Britannica**, 12 dec. 2017. Disponível em: academic-eb-britannica.ez46.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/kombucha/626761. Acesso em: 7 abr. 2018.

LONČAR, E. A.; MALBAŠA, R. V.; KOLAROV, L. A. Kombucha fermentation on raw extracts of diferente cultivars of jerusalem artichoke. **APTEFF**, v. 38, p. 1-190, 2007.

LONČAR, E. S.; KANURIĆ, K. G.; MALBAŠA, R. V.; DURIĆ, M. S.; MILANOVIĆ, S. D. Kinetics of saccharose fermentation by kombucha. **Chem. Ind. Chem. Eng. Q.**, v. 20, n. 3, p. 345-352, 2014.

MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M. de; SANTOS, G. M. dos; SILVA, D. S. da; FERNANDES, A. G.; PRADO, G. M. do. Efeito do processamento sobre componentes do suco de acerola Effect of the processing on some components of acerola juice. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 130-134, jan./mar. 2007.

MALBAŠA, R.; LONČAR, E.; DJURIĆ, M. Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1039-1045, 2008.

MALBAŠA, R. V.; MILANOVIĆ, S. D.; LONČAR, E. S.; DJURIĆ, M. S.; CARIĆ, M. D.; ILIĆIĆ, M. D.; KOLAROV, L. Milk-based beverages obtained by Kombucha application. **Food Chemistry**, v. 112, p. 178-184, 2009.

MALBAŠA, R. V.; LONČAR, E. S.; VITAS, J. S.; ANADANOVIĆ, J. M. C. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1727-1731, 2011.

- MARKOV, S. L.; CVETKOVIĆ, D. D.; VELIĆANSKI, A. S. The availability of a lactose medium for tea fungus culture and kombucha fermentation. **Arch. Biol. Sci.**, Belgrade, v. 64, n. 4, p. 1439-1447, 2012.
- MARSH, A. J.; O'SULLIVANA, O.; HILLB, C.; ROSSA, R. P.; COTTERA, P. D. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, v. 38, p. 171-178, 2014.
- MOHAMMADSSHIRAZI, A.; KALHOR, E. B. Energy and cost analyses of kombucha beverage production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 668-673, 2016.
- NGUYEN, K. N.; NGUYEN, P. B.; NGUYEN, H. T.; LE, P. H. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. **Food Science and Technology**, v. 64, p. 1149-1155, 2015.
- NOGUEIRA, R. J. M. C.; MORAES, J. A. P. V. de; BURITY, H. A.; SILVA JUNIOR, J. F. da. Efeito do estágio de maturação dos frutos nas características físico-químicas de acerola. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 37, n. 4, p. 463-470, abr. 2002.
- OLIVEIRA, A. C. de; VALENTIM, I. B.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; BARROS, M. P. de; MANO, C. M.; GOULART, M. O. F. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**, v. 115, p. 469-475, 2009.
- ÖZDEMİR, N.; ÇON, A. H. Kombucha and Health. **Journal of Health Science**, v. 5, p. 244-250, 2017.
- PRAKASH, A.; BASKARAN, R. Acerola, an untapped functional superfruit: a review on latest frontiers. **J Food Sci Technol**, v. 55, n. 9, p. 3373-3384, sep. 2018.
- PURE, A. E.; MOFIDI, S.; KEYGHOBADI, G. M. F.; PURE, M. E. Chemical composition of garlic fermented in red grape vinegar and kombucha. **Journal of Functional Foods**, v. 34, p. 347-355, 2017.
- RBR VIDROS. 2019. Disponível em: https://www.rbrvidros.com.br/conjunto_para_filtacao_millipore_completo_1000ml/prod-6303445. Acesso em: 25 abr. 2019.
- REISS, J. Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. **Z Lebensm Unters Forsch**, v. 198, p. 258-261, 1994.
- RESENDE, Y. R. R. S.; NOGUEIRA, J. P.; NARAIN, N. Comparison and optimization of conventional and ultrasound assisted extraction for bioactive compounds and antioxidant activity from agro-industrial acerola (*Malpighia emarginata* DC) residue. **Food Science and Technology**, v. 85, p. 158-169, 2017.

SANCHO, S. de O.; SILVA, A. R. A. da; DANTAS, A. N. de S.; MAGALHÃES, T. A.; LOPES, G. S.; RODRIGUES, S.; COSTA, J. M. C. da; FERNANDES, F. A. N.; SILVA, M. G. V. Characterization of the Industrial Residues of Seven Fruits and Prospection of Their Potential Application as Food Supplements. **Journal of Chemistry**, Article ID 264284, p. 1-9, 2015.

SANTOS, M. J. dos S. **Kombucha**: caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração. Orientador: Catarina Prista. 2016. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Gastronómicas) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2016.

SANTOS, V. O.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N. Improvements on the Stability and Vitamin Content of Acerola Juice Obtained by Ultrasonic Processing. **Foods**, v. 7, n. 68, p. 1-10, 2018.

SENGUN, I. Y.; KARABIYIKLI, S. Importance of acetic acid bacteria in food industry. **Food Control**, v. 22, Issue 5, p. 647-656, may 2011.

SIEVERS, M.; LANINI, C.; WEBER, A.; SCHULER-SCHMID, Ú.; TEUBER, M. Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation. **System. Appl. Microbiol.**, v. 18, p. 590-594, 1995.

VELIĆANSKI, A. S. V.; CVETKOVI, D. D.; MARKOV, S. L.; TUMBAS, V. T.; SAVATOVI, S. M. Antimicrobial and activity of lemon balm kombucha. **APTEFF**, v. 38, p. 1-190, 2007.

VELIĆANSKI, A.; CVETKOVIĆ, D.; MARKOV, S. Characteristics of Kombucha fermentation on medicinal herbs from Lamiaceae Family. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 18, n. 1, 2013.

VENDRAMINI, A. L. A.; TRUGO, L. C. Phenolic Compounds in Acerola Fruit (*Malpighia puniceifolia*, L.). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 15, n. 5, p. 664-668, 2004.

VILLARREAL-SOTO, S. A.; BEAUFORT, S.; BOUAJILA, J.; SOUCHARD, J.-P.; TAILLANDIER, P. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 3, 2018.

VITAS, J. S.; MALBAŠA, R. V.; GRAHOVAC, J. A.; LONČAR, E. S. The antioxidante activity of kombucha fermented milk products whith stinging nettle and nettle and winter savory. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly**, v. 19, n. 1, p. 129-139, 2013.

YAVARI, N.; ASSADI, M. N.; LARIJANI, K.; MOGHADAM, M. B. 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.

YAVARI, N.; ASSADI, M. M.; MOGHADAM, M. B.; LARIJANI, K. Optimizing Glucuronic Acid Production Using Tea Fungus on Grape Juice by Response Surface

Methodology. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 11, p. 1788-1794, 2011.

WATAWANA, M. I.; JAYAWARDENA, N.; GUNAWARDHANA, C. B.; WAISUNDARA, V. Y. Health, Wellness, and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha. **Journal of Chemistry**, article ID 591869, p. 1-11, 2015.

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

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

ZHU, C.; LI, F.; ZHOU, X.; LIN, L.; ZANG, T. Kombucha-synthesized bacterial cellulose: Preparation, characterization, and biocompatibility evaluation. **Journal of Biomedical materials research**, v. 102a, Issue 5, may 2014.

ZUBAIDAHA, E.; DEWANTARIA, F. J.; NOVITASARIA, F. R.; SRIANTAB, I.; BLANCC, P. J. Potential of snake fruit (*Salacca zalacca* (Gaerth.) Voss) for the development of a beverage through fermentation with the Kombucha consortium. **Food Science and Technology**, v. 13, p. 198-203, jan. 2018.