



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**LÍVIA DE MATOS SANTOS**

**INOVAÇÃO SUSTENTÁVEL: UTILIZAÇÃO DE  
COPRODUTO DE CACAU COMO FONTE ALTERNATIVA  
NO DESENVOLVIMENTO DE UMA BEBIDA FERMENTADA**

**UFBA**

**SALVADOR**

**2023**



**LÍVIA DE MATOS SANTOS**

**INOVAÇÃO SUSTENTÁVEL: UTILIZAÇÃO DE  
COPRODUTO DE CACAU COMO FONTE ALTERNATIVA  
NO DESENVOLVIMENTO DE UMA BEBIDA FERMENTADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos (PGAl) da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Camila Duarte Ferreira Ribeiro

*Orientadora*

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mariana Nougalli Roselino

*Coorientadora*

SALVADOR

2023

Dados internacionais de catalogação-na-publicação  
(SIBI/UFBA/Biblioteca Universitária Reitor Macedo Costa)

Santos, Lívia de Matos.

Inovação sustentável: utilização de coproduto de cacau como fonte alternativa no desenvolvimento de uma bebida fermentada / Lívia de Matos Santos. - 2023.

115 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Camila Duarte Ferreira Ribeiro.

Coorientador: Prof. Dr. Mariana Nougalli Roselino.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2023.

1. Alimentos funcionais. 2. Tecnologia de alimentos. 3. Biotecnologia. 4. Cacau. 5. Cacau - Indústria. 6. Bebidas fermentadas. 7. Fermentação. 8. Theobroma. I. Ribeiro, Camila Duarte Ferreira. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD - 663.92

CDU - 663.9



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS



## TERMO DE APROVAÇÃO

LÍVIA DE MATOS SANTOS

### INOVAÇÃO SUSTENTÁVEL: UTILIZAÇÃO DE COPRODUTO DE CACAÚ COMO FONTE ALTERNATIVA NO DESENVOLVIMENTO DE UMA BEBIDA FERMENTADA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 18 de dezembro de 2023.

#### BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente  
 CAMILA DUARTE FERREIRA RIBEIRO  
Data: 18/12/2023 11:02:25-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Dr<sup>a</sup>. CAMILA DUARTE FERREIRA RIBEIRO (ORIENTADORA)**  
Universidade Federal da Bahia (UFBA, BA)

Documento assinado digitalmente  
 DEBORAH MUROWANIECKI OTERO  
Data: 18/12/2023 18:39:49-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Dr<sup>a</sup>. DEBORAH MUROWANIECKI OTERO (EXAMINADORA)**  
Universidade Federal da Bahia (UFBA, BA)

Documento assinado digitalmente  
 RICARDO BIZOGNE SOUTO  
Data: 18/12/2023 12:27:53-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Dr. RICARDO BIZOGNE SOUTO (EXAMINADOR)**  
Universidade Federal da Bahia (UFBA, BA)

**Dedico este trabalho,**

*A Deus, aos meus pais, a toda minha família, amigos e as  
pessoas que fizeram parte dessa caminhada.*

## **Meus agradecimentos,**

*Primeiramente a Deus, por estar comigo em todo o momento dessa caminhada. Aos meus melhores, meus pais! Sem vocês nada eu seria.*

*A Tauan, muito obrigada por ter enfrentado essa caminhada comigo!*

*Aos meus sogros, minhas tias, irmão, cunhadas, sobrinhos e primos, por todo incentivo necessário para permanecer firme. A Mari e seus familiares pela doação do tegumento.*

*Aos meus amigos que por muitas vezes me fiz ausente. Aos novos amigos feitos em toda trajetória do mestrado, Wil, Kath e Luís desde a disciplina de sensorial, a Jana, Suelen, Elis, Jéssica, Jefferson e, Francine, que o LEMA me proporcionou. A Thiago, que me auxiliou no início do meu experimento de forma voluntária. Aos demais colegas do LEMA, que deixaram as dificuldades mais leves e os dias mais engraçados. Aos colegas feitos no decorrer desses dois anos do mestrado e na vivência dos laboratórios, em especial a Gabriel, aos colegas da nutrição que sempre estiveram dispostos a me ajudar nas dificuldades enfrentadas e a Ingrid Leal, por toda atenção.*

*Wil, Caio, Dan e Gil, obrigada por terem aberto a porta da casa de vocês na minha mudança para Salvador.*

*As minhas orientadoras, professora Mariana, que desde o meu primeiro e-mail de contato foi atenciosa e ajudou a conduzir o meu trabalho, muito obrigada prô Mari! Professora Camila, que desde a primeira reunião me auxiliou na resolução das lacunas encontradas, por toda atenção dada, ensinamentos compartilhados, paciência e dedicação ao meu trabalho, muito obrigada, prô Camila!*

*Aos servidores da faculdade de Farmácia e da escola de nutrição da UFBA, que foram me auxiliando em cada passo necessário, Dona Mira, Seu Rosalvo, Jéssica, Leonardo, Neilson, Seu Luís, Tamires e a todos que de alguma forma contribuíram para o meu trabalho.*

*Aos professores, em especial a professora Carol, que ajudaram no meu crescimento pessoal e profissional e a Universidade Federal da Bahia, por proporcionar a concretização do meu desejo de realizar o mestrado.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida (nº do processo: 88887.664101/2022-00).*

*“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo”*

*(Nelson Mandela)*

## RESUMO

O cacau apresenta significativa importância global e cerca de 80% desse fruto não é diretamente consumido, sendo composto pelos coprodutos gerados durante o seu processamento e que muitas vezes são descartados. No entanto, esses compostos apresentam atributos nutricionais de grande relevância. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo contribuir para a valorização dos coprodutos do cacau pelo campo prospectivo e pelo desenvolvimento de uma bebida fermentada. Para isso, realizou-se inicialmente um estudo prospectivo em bases científicas (*Web of Science, Scopus, Medline/Pubmed*) e tecnológicas (*Espacenet* e Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI) e o uso do cacau e seus coprodutos foi investigado por meio dos termos de busca "*Cocoa\* OR Theobroma cacao AND by-product\**" e "*Cocoa\* OR Theobroma cacao AND by-product\* AND A23G*" and "*Cocoa\* OR Theobroma cacao AND by-product\**", respectivamente. Foram analisados 144 artigos e 73 documentos de patentes. A pesquisa abrangeu as áreas agrícolas e biológicas, com 68% das publicações e na análise de coocorrência destacaram-se os estudos sobre a composição biofuncional destes coprodutos. O documento de patente mais antigo sobre o tema é de 1913, com um crescimento significativo (27 depósitos) após 2020. As cascas, 54%, e o tegumento, 41%, foram os coprodutos mais estudados na busca científica. Já na busca tecnológica, no *Espacenet* as cascas e o tegumento atingiram 68% e 31%, enquanto no INPI foram registrados valores de 9% e 26%, respectivamente. O Brasil (24,4 %) e a Itália (19,3 %) lideram as publicações científicas sobre o tema, enquanto os Estados Unidos (29 %) e o Japão (21 %) lideram em documentos de patentes no *Espacenet*. O estudo sugere possibilidades tecnológicas notáveis para o futuro. Ao se analisar as lacunas encontradas e o potencial funcional do cacau e de seus coprodutos, uma bebida fermentada tipo kombucha com casca de amêndoa do cacau (CAC) foi desenvolvida. Seu comportamento fermentativo ao longo de 24 horas em diferentes concentrações (0,7%, 1,5% e 2,3%) foi analisado. Graduação alcoólica, atividade antioxidante, estrutura das culturas simbióticas e características físico-químicas durante 12 dias de armazenamento a  $2,7 \pm 0,06$  °C foram investigadas. Os resultados obtidos para as formulações demonstraram ausência de teor alcoólico, presença de atividade antioxidante, com destaque para a amostra com maior teor de CAC, além de estruturas densas nas culturas simbióticas. O pH variou de  $3,58 \pm 0,01$  a  $3,61 \pm 0,02$ , sólidos solúveis (°Brix) de  $7,03 \pm 0,06$  a  $7,13 \pm 0,06$  e acidez titulável (g de ácido acético/100 mL)  $0,29 \pm 0,00$  a  $0,31 \pm 0,01$ . Foi evidenciada uma influência significativa do teor da CAC no aumento da luminosidade de  $90,25 \pm 0,01$  a  $92,45 \pm 0,06$  e na tonalidade avermelhada, de  $2,01 \pm 0,01$  a  $1,53 \pm 0,07$ , além de uma variação nos teores de compostos fenólicos totais (mg EAG/mL) de  $2,33 \pm 0,00$  a  $1,73 \pm 0,00$ . Quanto ao perfil sensorial, a aceitabilidade geral foi de 6,1 a 6,4 e atitude de compra de 2,98 a 3,20. O sequenciamento genético de alto rendimento revelou gêneros bacterianos *Komagataeibacter*, *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* e de leveduras *Brettanomyces*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*. Diante dos resultados, a incorporação da maior concentração de CAC (2,3%) no desenvolvimento de uma bebida fermentada apresentou grande potencial, contribuindo para o avanço do conhecimento científico e tecnológico dos coprodutos originados da indústria do cacau e suas potenciais aplicações na indústria de alimentos.

**Palavras-chave:** *Theobroma cacao*, Fermentação, Sustentabilidade, Sequenciamento genético de alto rendimento, Prospecção científica, Prospecção tecnológica.

## ABSTRACT

The cocoa bean holds significant global importance, with approximately 80% of this fruit not directly consumed but consisting of by-products generated during processing, often discarded. However, these compounds possess nutritionally relevant attributes. Thus, this study aimed to contribute to the valorization of cocoa by-products through a prospective field analysis and the development of a fermented beverage. Initially, a prospective study was conducted using scientific (Web of Science, Scopus, Medline/Pubmed) and technological (Espacenet and National Institute of Industrial Property – INPI) databases. The search terms "Cocoa\* OR *Theobroma cacao* AND by-product\*" and "Cocoa\* OR *Theobroma cacao* AND by-product\* AND A23G" and "Cocoa\* OR *Theobroma cacao* AND by-product\*" were employed. A total of 144 articles and 73 patent documents were analyzed. The research covered agricultural and biological areas, with 68% of publications, and co-occurrence analysis highlighted studies on the biofunctional composition of these by-products. The oldest patent document on the topic dates back to 1913, with a significant growth (27 deposits) observed after 2020. Shells (54%) and husks (41%) were the most studied by-products in the scientific search. In the technological search, Espacenet showed shells and husks at 68% and 31%, while INPI recorded values of 9% and 26%, respectively. Brazil (24.4%) and Italy (19.3%) led scientific publications, while the United States (29%) and Japan (21%) led patent documents on Espacenet. The study suggests notable technological possibilities for the future. Considering identified gaps and the functional potential of cocoa and its by-products, a fermented beverage similar to kombucha was developed using cocoa almond husk (CAC). Its fermentative behavior over 24 hours at different concentrations (0.7%, 1.5%, and 2.3%) was analyzed. Alcohol content, antioxidant activity, symbiotic culture structure, and physicochemical characteristics during 12 days of storage at  $2.7 \pm 0.06$  °C were investigated. Formulation results indicated no alcohol content, presence of antioxidant activity (particularly in the highest CAC content sample), and dense structures in symbiotic cultures. pH ranged from  $3.58 \pm 0.01$  to  $3.61 \pm 0.02$ , soluble solids (°Brix) from  $7.03 \pm 0.06$  to  $7.13 \pm 0.06$ , and titratable acidity (g acetic acid/100 mL) from  $0.29 \pm 0.00$  to  $0.31 \pm 0.01$ . The CAC content significantly influenced an increase in luminosity from  $90.25 \pm 0.01$  to  $92.45 \pm 0.06$  and a shift towards a reddish hue from  $2.01 \pm 0.01$  to  $1.53 \pm 0.07$ , along with variations in total phenolic compounds (mg GAE/mL) from  $2.33 \pm 0.00$  to  $1.73 \pm 0.00$ . Regarding sensory profile, overall acceptability ranged from 6.1 to 6.4, and purchase intent from 2.98 to 3.20. High-throughput genetic sequencing revealed bacterial genera *Komagataeibacter*, *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, and yeast genera *Brettanomyces*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*. In conclusion, incorporating the highest CAC concentration (2.3%) in fermented beverage development demonstrated significant potential, contributing to the scientific and technological advancement of cocoa industry by-products and their potential applications in the food industry.

**Keywords:** *Theobroma cacao*, Fermentation, Sustainability, High-yield genetic sequencing, Scientific prospecting, Technological prospecting.

## SUMÁRIO

<b><i>CAPÍTULO I – Inovação sustentável: utilização de coproduto de cacau como fonte alternativa no desenvolvimento de novos produtos</i></b> .....	<b>12</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>17</b>
3.1 Cacau: histórico, características gerais e nutricionais.....	17
3.1.1 Coprodutos de cacau e suas aplicações na indústria de alimentos.....	19
3.2 Bebidas fermentadas.....	23
3.2.1 Estudos sobre kombucha e bebidas tipo kombucha.....	24
3.2.2 Potencial tecnológico de bebidas tipo kombucha .....	29
3.3 Aspectos regulatórios de novas bebidas.....	30
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>33</b>
<b><i>CAPÍTULO II – Manuscrito: Multidimensional strategies for sustainable management of cocoa by-products</i></b> .....	<b>37</b>
<b><i>CAPÍTULO III – Manuscrito: Inovação sustentável a partir do uso da biotecnologia: Utilização de coproduto de cacau (Theobroma cacao) no desenvolvimento e caracterização de uma bebida fermentada tipo kombucha</i></b> .....	<b>81</b>

## ***Capítulo I***

---

***Inovação sustentável: Utilização de coproduto de cacau como fonte alternativa no desenvolvimento de novos produtos***

## 1 INTRODUÇÃO

O cacau (*Theobroma cacao* L.), é uma árvore cuja espécie faz parte da família Malvaceae, e sua origem remota das Américas Central e do Sul. Amante da sombra, pode atingir até 10 metros de altura e os primeiros frutos começam a surgir a partir do terceiro ano de plantio. Os frutos são tipo baga e são encontrados nos troncos e galhos, atingindo até 25 cm de diâmetro. Cada fruto pode apresentar de 20 a 40 amêndoas e está por sua vez, são utilizadas como ingrediente base na produção do chocolate (Vásquez *et al.*, 2019).

O cultivo de cacau é predominantemente manual, sem um histórico de ampla mecanização. As exportações de amêndoas de cacau, tanto inteiras quanto quebradas, cruas ou torradas, totalizaram US\$ 8,6 bilhões em 2017, projetando-se um crescimento no mercado global de amêndoas de cacau estimado em 7,3% de 2019 a 2025, atingindo a marca de US\$ 16,32 bilhões. O setor de chocolate, que absorveu 43% da produção de cacau em 2017, teve um valor de mercado de varejo de US\$ 106,19 bilhões, com projeções de crescimento para US\$ 189,89 bilhões até 2026 (Voora; Bermúdez; Larrea, 2019).

O Brasil ocupa a sétima posição global na produção de cacau, totalizando 265 mil toneladas. Entre as regiões com produção de cacau no Brasil, a região Nordeste abrange 69,7% da área nacional destinada a essa cultura, e a região Norte lidera a produção nacional, contribuindo com 53,2%. A Bahia é o principal estado produtor de cacau no Nordeste, abrangendo uma área de 403 mil hectares e produzindo 111,4 mil toneladas. No entanto, a partir de 1990, observou-se um declínio acentuado, tanto na produção (-62,1%) quanto na área cultivada (-24,7%), devido a fatores diversos, como a doença causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa*, conhecida popularmente como Vassoura de Bruxa.

A cadeia produtiva do cacau é considerada uma das mais importantes do mundo, e está relacionada principalmente ao cultivo englobado de base familiar. Diversas etapas são essenciais para a produção e comercialização deste fruto, como a logística de transportar, comercializar, fabricar e distribuir e essa cadeia de processamento e beneficiamento, está sem modificações por aproximadamente 150 anos. As etapas de beneficiamento do cacau englobam a colheita, a quebra, a fermentação, a torrefação, o descascamento e a moagem, sendo que no decorrer desses processos são gerados coprodutos de grande significância (Vásquez *et al.*, 2019).

Estes coprodutos são a vagem, a casca da amêndoa, a polpa ou mucilagem e sibirina e todos eles juntos, podem chegar até 80% do peso seco do fruto. Os coprodutos apresentam pouca valorização comercial em relação aos derivados nibs, manteiga e líquido (Vásquez *et al.*, 2019). Os coprodutos alimentares abrangem uma extensa variedade de produtos, tais como cascas,

sementes, caules, raízes, resíduos de polpa, bagaço e cascas. Embora possuam valor nutricional significativo, esses coprodutos ainda são descartados pelas indústrias (Gómez-García *et al.*, 2021).

A reflexão sobre a classificação dos coprodutos de cacau é crucial diante do contexto em que muitos desses produtos, desenvolvidos durante o processamento do fruto, são frequentemente descartados em aterros sanitários, sem valorização comercial.

Nos últimos anos, tanto a mídia quanto o meio acadêmico têm enfatizado a busca por hábitos mais saudáveis e sustentáveis em âmbito global. A alimentação tem sido um dos principais alvos nessa mudança devido ao impacto direto na saúde dos consumidores. Nesse sentido, o mercado de bebidas vegetais no Brasil registrou um crescimento de 51,5% em 2018, destacando o uso predominante de matérias-primas como aveia, arroz, coco e amêndoas. Nesse esteio, a fermentação tem o potencial de criar produtos inovadores e aprimorar a qualidade nutricional de alimentos vegetais, devido a capacidade de quebrar moléculas complexas em componentes menores e mais facilmente digeríveis, gerando metabólitos que ampliam o valor nutricional e alteram características como aroma, sabor e textura, tornando esses produtos mais atrativos e aceitáveis ao público (Araújo Filho *et al.*, 2023).

Visando a capacidade de processos fermentativos em aprimorar bebidas à base de vegetais e o crescimento nesse setor, a produção de bebidas fermentadas são alternativas viáveis para a reincorporação desses coprodutos ao setor alimentício. Nesse sentido, a kombucha tem se destacado por ser uma bebida fermentada de chá verde ou preto, derivada da planta *Camellia sinensis*, adoçada e fermentada por uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras, conhecida como SCOBY (Leonarski *et al.*, 2022).

Já as bebidas tipo kombucha apresentam como principal diferença o fato de que o substrato base para infusão não é derivado da *C. sinensis*. Ambas geram uma bebida refrescante, com um sabor agridoce e levemente gaseificada. O crescente interesse na bebida tem estimulado a investigação de novas matérias-primas para sua produção. Além dos chás verdes ou preto tradicionais, outras variedades de infusões, assim como frutas, ervas, leite e uma variedade de materiais agroindustriais, incluindo coprodutos das indústrias frutícolas, têm sido utilizados nesse processo fermentativo. Essa ampla gama de ingredientes alternativos possibilita uma diversificação significativa de sabores e de características benéficas como alta atividade antioxidante (Leonarski *et al.*, 2022). Assim, Yuliana *et al.* (2023) utilizaram o mel de cacau como substrato alternativo no desenvolvimento de uma bebida funcional tipo kombucha e verificaram que após seis dias de fermentação a bebida apresentou alta atividade antioxidante

com uma variação de  $66,23 \pm 0,69$  a  $70,14 \pm 1,15$  % de inibição de DPPH e entre  $41,68 \pm 0,97$  e  $43,49 \pm 0,52$ % de ABTS.

Do mesmo modo, além de estudos científicos na área, compreender a respeito do cacau e de seus coprodutos no escopo da patente também é uma ferramenta importante para o desenvolvimento de novas tecnologias. Atualmente esse conhecimento é fundamental para ampliar a capacidade de antecipação e estimular a organização de sistemas de inovação no ambiente acadêmico (Otero *et al.*, 2022).

Portanto, considerando o potencial funcional dos coprodutos de cacau e as questões ambientais, econômicas, sociais, científicas e tecnológicas atreladas ao desenvolvimento de novos produtos alimentícios com essas matrizes, torna-se salutar a valorização desses coprodutos seja por meio de estudos prospectivos científicos e tecnológicos, seja pelo desenvolvimento de uma bebida fermentada.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- Analisar os coprodutos do cacau pelo campo prospectivo e pelo desenvolvimento de uma bebida fermentada.

### 2.2 Objetivos específicos

- Pesquisar nos artigos científicos e os documentos de patente as aplicações atuais e potenciais dos coprodutos de cacau na indústria de alimentos, bem como as regiões, evolução anual e autores e/ou detentores relacionados a essa temática;
- Utilizar a casca da amêndoa de cacau (CAC), como matéria-prima na produção de uma bebida tipo kombucha e caracterizá-la quanto a graduação alcoólica, atividade antioxidante, estrutura das culturas simbióticas de bactérias e leveduras a partir da microscopia eletrônica de varredura, como também, características físico-químicas (pH, sólidos solúveis, acidez titulável, cor e compostos fenólicos totais) ao longo de um armazenamento refrigerado por 12 dias;
- Identificar os principais microrganismos presentes na bebida fermentada utilizando coprodutos de cacau, através do sequenciamento genético de alto rendimento;
- Analisar sensorialmente a bebida com melhores características após o teste físico-químico.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Cacau: histórico, características gerais e nutricionais

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é um dos produtos agroindustriais mais importantes do mundo, pois a sua produção engloba aproximadamente seis milhões de agricultores, o que o torna relevante para o sustento do setor. No biênio 2018-2019, sua produção atingiu a marca de quase cinco milhões de toneladas. O aumento na sua produção no decorrer dos anos está sendo impulsionado pela expansão das terras que o cultivam, através de ecossistemas naturais e em multiculturas (Tosto *et al.*, 2023).

O conhecimento das características sensoriais do cacau está atrelado às civilizações asteca e maias, onde, historicamente se observou relatos no consumo de uma bebida produzida com a utilização das amêndoas de cacau, o *xocoatl*, por volta de 400 aC. Todavia, sua grande propagação só ocorreu no ano de 1519, devido à civilização asteca apresentar os grãos de cacau para Hernando Cortéz, explorador espanhol da época (Vásquez *et al.*, 2019).

A composição intrínseca das amêndoas de cacau é caracterizada por um conjunto de parâmetros fundamentais, cujos valores variam dentro de faixas específicas. Essas amêndoas, em sua análise, apresentam uma faixa de umidade que se situa entre 6,0% e 10,3%, indicando uma presença relativamente modesta de água em sua estrutura. O pH, um indicador crítico de acidez, oscila entre 4,4 e 5,9, refletindo uma acidez moderada a ligeiramente ácida. A análise também revela uma considerável porcentagem de gorduras, variando de 41,0% a 48,7%, indicando a riqueza lipídica dessas amêndoas. Paralelamente, a concentração de proteína é substancial, com valores oscilando entre 13,8% e 16,0%, conferindo um perfil proteico notável. Além disso, a presença de compostos fenólicos totais, variando de 3,0% a 7,9%, demonstra a potencialidade antioxidante inerente às amêndoas de cacau. Enquanto isso, a detecção de cafeína, com valores entre 0,04% e 0,26%, e teobromina, variando de 0,8% a 1,5%, destaca a presença de metilxantinas, que podem influenciar tanto as propriedades sensoriais quanto funcionais dessas amêndoas. Essa análise detalhada e abrangente da composição das amêndoas de cacau desvela uma matriz complexa de constituintes que contribuem significativamente para a sua importância tanto na indústria alimentícia quanto em pesquisas relacionadas à saúde e ao processamento de alimentos (Hashimoto *et al.*, 2018).

A planta conta com um sistema endofitótico, e para atender às suas necessidades botânicas seus plantios são bastante encontrados em regiões tropicais. O sistema de produção agroflorestal cabruca, onde a produção do fruto é realizada à sombra de árvores

nativas de forma natural é um sistema que além de ser bem tolerado é uma alternativa sustentável para garantia da biodiversidade das regiões produtoras (**figura 1**).

**Figura 1** - Plantio de cacau no formato cabruca



*Fonte: autoria própria.*

Os grãos de cacau passam por diversas etapas até chegarem ao produto final como o chocolate, a manteiga ou o líquido, e essas etapas englobam, a colheita, fermentação, torra, descascagem e moagem e em algumas dessas etapas específicas são gerados coprodutos (**figura 2**) (Vásquez *et al.*, 2019).

**Figura 2** - Fluxograma do processamento do cacau e respectivas etapas de desenvolvimento dos seus coprodutos



*Fonte: autoria própria.*

O cacau e seus derivados apresentam fama ao redor do mundo e atendem as expectativas de seus consumidores. Produtos desenvolvidos com o cacau, a exemplo de bebidas, apresentam cores, aromas e sabores que agradam pessoas de diversas idades. Isso se deve muitas vezes às suas características sensoriais e prático preparo. Nas prateleiras de mercados se pode encontrar variedades de produtos, à base de leite ou água, prontas para o consumo ou não, que utilizem o cacau. Muitos desses produtos são compostos de altos teores de açúcares. Entretanto, a indústria já visa uma crescente busca por produtos alternativos que busquem atender às diversas demandas da sociedade, como produtos isentos de lactose e sem adição de açúcares (Vásquez *et al.*, 2019).

Atualmente a necessidade de aplicações práticas e inovadoras utilizando os coprodutos de cacau tem crescido, pois estes, além de não possuírem valor agregado (são resíduos da produção), ainda possuem um alto valor nutricional, podendo ser explorados com vistas a aumentar o valor agregado, além de favorecer a sustentabilidade nas indústrias cacaeiras. Estes coprodutos apresentam elevadas quantidades de compostos orgânicos como fibras, minerais e ações antioxidantes, justificando a importância de sua valorização (Campos-vega *et al.*, 2018).

### **3.1.1 Coprodutos de cacau e suas aplicações na indústria de alimentos**

A expressão "coprodutos alimentares" está progressivamente ganhando destaque com a finalidade de indicar que os resíduos alimentares constituem matérias-primas finais passíveis de serem empregadas no desenvolvimento de novos produtos com valor agregado. Historicamente, esses coprodutos têm sido predominantemente canalizados como ração animal ou para processos de compostagem. Recentemente, porém, um escopo crescente tem sido direcionado para a avaliação de seu potencial como alternativas energéticas, abrangendo a geração de biogás, bioetanol ou biohidrogênio. Esses coprodutos, apresentam um considerável potencial para integração na alimentação humana, especialmente aqueles enriquecidos com vitaminas, minerais, fibras, óleos e compostos bioativos. Nos últimos anos, uma vasta gama de pesquisas tem ilustrado a natureza promissora desses coprodutos enquanto fontes de compostos de elevado teor com propriedades antioxidantes, antimicrobianas e nutricionais (Reguengo *et al.*, 2022).

Entre os coprodutos de maiores quantidades geradas pelas indústrias de alimentos, estão os de cacau. Nos últimos anos, houve um aumento no consumo dos derivados do cacau (nibs, líquido e manteiga, os quais apresentam valorização comercial estabelecida). Todavia, o setor de produção não acompanhou os avanços tecnológicos desenvolvidos. Com o aumento da

demanda internacional, um alerta em diversos setores de produção, desde a agregação de valor como de questões socioambientais, foi disparado. Nos dias atuais, há um crescente interesse na utilização de coprodutos de cacau, sobretudo na casca da amêndoa, devido ao fato de não ter valor agregado e seu potencial nutricional e de aplicações (Vásquez *et al.*, 2019). Entre os coprodutos de cacau, estão a casca ou também conhecida como vagem de cacau e apresenta três camadas distintas, epicarpo, mesocarpo e endocarpo, seu peso pode variar de 200g a 1kg. O endocarpo é a película macia e esbranquiçada que envolve as sementes de cacau, o mesocarpo, apresenta rigidez e o compromisso de manter os grãos no lugar mesmo com movimentos mais ríspidos e grosseiros, já o epicarpo, é a camada externa levemente macia e sua coloração dependerá da variedade de cacau a ser analisada (**figura 3**). Apresentam em suas composições altas quantidades de cinzas, hemicelulose, minerais e proteínas (Campos-vega *et al.*, 2018).

**Figura 3** - Representação das camadas existente na vagem do cacau



*Fonte: autoria própria.*

A polpa ou mucilagem (**figura 4A**) é a massa que envolve os grãos de cacau ainda no fruto. No momento da colheita e quebra, essa mucilagem em contato com os microrganismos como a *Saccharomyces cerevisiae* e enzimas como amilases, responsáveis pela fermentação do cacau, liberam um líquido conhecido como mel ou suor de cacau (**figura 4B**). O litro do mel de cacau de acordo com uma busca *online* no buscador google (<https://www.google.com>) em novembro de 2023, é vendido a 83,00 reais. Esse líquido é composto de açúcares,

minerais e pectina e os produtos gerados a partir dele possuem grande aceitabilidade por parte dos consumidores, como bebidas e geleias. Para cada tonelada de sementes de cacau úmidas, são gerados aproximadamente de 100 a 150 litros de mel (Vásquez *et al.*, 2019).

**Figura 4** - Polpa ou mucilagem de cacau (A), Mel de cacau (B)



*Fonte: autoria própria.*

Observa-se uma clara inclinação para o aumento do consumo de alimentos e bebidas à base de cacau, especialmente em virtude do crescimento notório de consumidores desse setor. Um dos derivados de cacau com potencial aplicação na indústria alimentícia é o mel de cacau. Essa solução límpida, exibe atributos químicos e sensoriais que se equiparam aqueles da matriz original da polpa, sendo regionalmente designada como "mel de cacau", "sudorese de cacau" e "exsudado". A nomenclatura "mel de cacau" se origina das propriedades macroscópicas e do perfil gustativo desta solução, cujas características sensoriais assemelham-se às do mel de abelha, incluindo o paladar adocicado, embora este não seja de natureza apícola (Guirlanda *et al.*, 2021).

É importante destacar que ao longo dos anos, tanto a mucilagem, importante para a produção do mel de cacau, quanto o próprio mel, têm demonstrado um valor de mercado significativo, respaldado por evidências científicas, publicações especializadas e aplicações culinárias como geleias e *drinks*, conforme abordado por Guirlanda *et al.* (2021), que levantaram questionamentos sobre a valorização do mel de cacau.

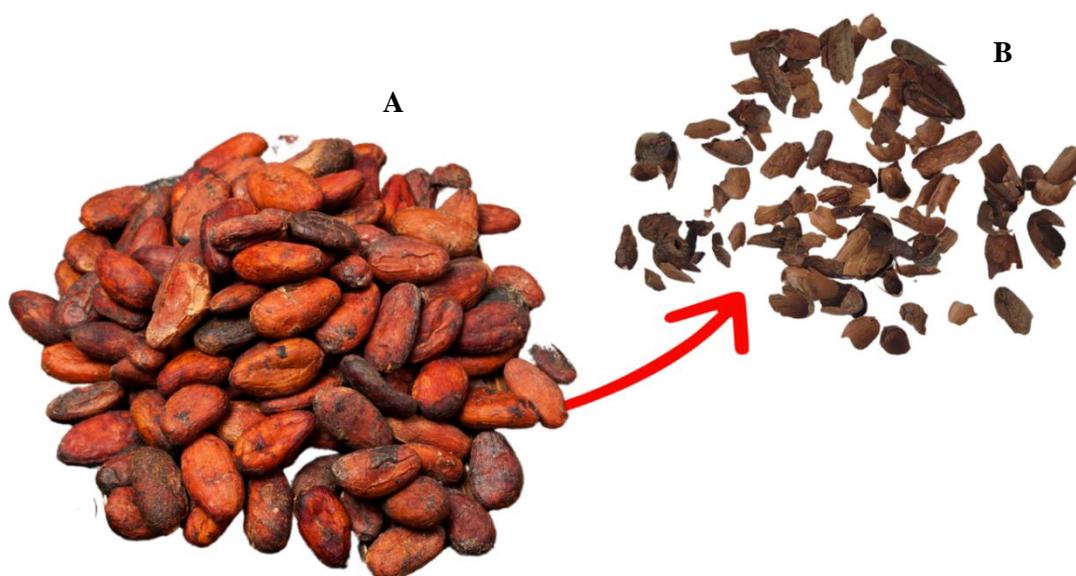
O poder aquisitivo dos consumidores, aliado ao crescente anseio por novos produtos, cria um cenário estratégico para o mel de cacau, caracterizado por seu apelo regional, benefícios

nutricionais e atributos sensoriais singulares. Além disso, a promoção do mel de cacau em feiras regionais, a experiência sensorial proporcionada por visitas às fazendas de cacau, e sua incorporação em receitas caseiras e *gourmet* representam abordagens emergentes para introduzir o mel como um suco natural tanto no mercado nacional quanto internacional (Guirlanda *et al.*, 2021),

Na perspectiva do desenvolvimento de produtos, Yuliana *et al.* (2023), desenvolveram uma bebida funcional tipo kombucha utilizando o mel de cacau como substrato base para a bebida, apresentando após seis dias de fermentação uma alta atividade antioxidante ( $70,14\% \pm 1,15\%$  DDPH e  $43,49\% \pm 0,52\%$  ABTS). Já o estudo de Soares e Oliveira (2022) abordou sobre a qualidade sensorial apresentada pelo mel, indicando que seu aroma apresenta alta aceitabilidade em comparação a outras bebidas, além de sua aplicação em diversas preparações como refrigerantes e geleias. Sendo assim, a transição do mel de cacau de coproduto para um item com valor agregado, retratado como derivado de cacau, representa não apenas uma evolução em termos conceituais, mas sim, um reconhecimento do papel essencial que este produto apresenta, contribuindo para a agregação de valor do fruto e para a economia.

O tegumento, CAC, testa ou também conhecido como fibra de cacau (**figura 5**), representa até 20% do grão e está entre um dos principais coprodutos do processamento do cacau. São gerados por ano aproximadamente 700 mil toneladas de tegumento, sendo muitas vezes descartado como lixo (Pagliari *et al.*, 2022).

**Figura 5** - Amêndoas (A) e tegumento da amêndoa de cacau (B)



*Fonte: autoria própria.*

Apresenta capacidade antioxidante alto teor de compostos fenólicos e também de teobromina, cafeína e teofilina. As indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica também têm demonstrado interesse por ele, devido à sua capacidade nutricional já avançada descrita nos estudos (Pagliari *et al.*, 2022).

Souza *et al.* (2022) avaliaram o impacto do uso da CAC em pó em substituição da farinha de trigo no desenvolvimento de bolos de chocolate e observaram que em formulações com até 75% de substituição, apresentaram boa aceitação sensorial. No estudo do potencial do pó da CAC como fibra alimentar através da mistura com outras farinhas, foi observado um elevado teor de fibras como também boa aceitação sensorial (Handojo; Triharyogi; Indarto, 2019). Ao avaliar o desenvolvimento de biscoitos utilizando a farinha da CAC, soja e banana verde, Barros *et al.* (2020), identificaram um produto com potencial funcional devido ao alto teor de proteínas, fibras alimentares, compostos fenólicos e atividade antioxidante, como também, boa aceitação sensorial. Na avaliação da bioacessibilidade de polifenóis e metilxantinas após digestão *in vitro* em bebidas aromatizadas como cápsulas e saquinhos de chá contendo pó de CAC, foi identificado resultados positivos na utilização do pó como fonte válida de compostos bioativos no desenvolvimento de novas bebidas, assim como aceitabilidade sensorial em todas as formulações testadas (Cantele *et al.*, 2020).

Em um cenário global caracterizado pela iminente escassez de recursos naturais e pelo aumento expressivo das taxas de doenças crônicas associadas a padrões alimentares inadequados, a demanda por produtos alimentícios que sejam simultaneamente biologicamente ativos e ambientalmente responsáveis está em ascensão entre os consumidores. Nesse contexto, os coprodutos provenientes da agroindústria têm despertado considerável interesse por parte da comunidade científica, uma vez que representam uma fonte acessível, economicamente viável e sustentável de uma ampla variedade de compostos bioativos (Reguengo *et al.*, 2022).

### **3.2 Bebidas fermentadas**

O processo de fermentação consiste na biotransformação de uma matriz alimentar, pela ação de microrganismos, sejam eles fungos ou bactérias, utilizando os carboidratos presente nessas matrizes para se multiplicarem, produzindo metabólitos que por muitas vezes garantem benefícios à saúde humana. Esse processo é determinado e controlado pela comunidade microbiana através de parâmetros físicos como pH e temperaturas específicas de seus interesses. É um processo econômico e ecológico para o alcance de moléculas orgânicas

específicas como ácidos orgânicos do que as metodologias tradicionais e sintéticas. Por consequência, diversas pesquisas nesse setor estão sendo desenvolvidas, a fim de esclarecer e desenvolver o aumento significativo de produtos ou processos otimizados fermentáveis (Rastogi *et al.*, 2022).

A fermentação apresenta-se como a segunda técnica mais antiga de preservação de alimentos. Constitui-se de cinco principais vantagens: fonte de microrganismos benéficos à saúde, sua ação resulta em alimentos ou bebidas de fácil digestão, amplia a disponibilidade de nutrientes, melhora aspectos biológicos como o humor e garante efeitos protetores da saúde, como a melhora no desempenho cardiovascular (Sun *et al.*, 2022).

Com os avanços na área da microbiologia muitas questões foram elucidadas, como o entendimento dos processos fermentativos incluindo as boas condições para os seus desenvolvimentos ou suas inibições. Só se é possível hoje termos um processo de fermentação industrial seguro e com produção em grande escala de alimentos e bebidas e melhores técnicas de esterilização através desses conhecimentos. Na etapa de fermentação de plantas, leguminosas ou até mesmo de produtos lácteos, comunidades de bactérias do ácido lático se sobrepõe, como por exemplo os gêneros de *Lactobacillus*. Durante a fermentação alcoólica, se sobressaem as leveduras. Entre as leveduras de maior interesse industrial se tem a *Saccharomyces cerevisiae*. Na fermentação do ácido acético, podem-se apresentar em destaque bactérias dos gêneros *Acetobacter* ou *Gluconobacter* (Rastogi *et al.*, 2022).

Os produtos fermentados apresentam interferência positiva na microbiota intestinal, desempenhando um papel importante na manutenção da saúde e do bem-estar, auxiliando no sistema imunológico, combatendo o envelhecimento precoce e doenças infecciosas (Rastogi *et al.*, 2022). A produção de novas bebidas fermentadas funcionais tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, principalmente com o uso de novos substratos. Soares *et al.* (2021), abordaram em seu estudo que bebidas fermentadas utilizando a cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY) independente dos substratos utilizados, demonstraram aumento de características benéficas que podem compreender desde a atividade antioxidante à atividade antimicrobiana após o processo fermentativo.

### **3.2.1 Estudos sobre Kombucha e bebidas tipo kombucha**

Tradicionalmente obtida a partir do processo fermentativo do chá adoçado da *Camellia sinensis*, a kombucha é uma bebida levemente ácida, adocicada e de boa aceitação sensorial. É importante ressaltar que no desenvolvimento de bebidas fermentadas utilizando substratos

alternativos à *C. sinensis*, a nomenclatura correta a ser utilizada é produto análogo à kombucha ou tipo kombucha. Essa bebida tornou-se bastante popular devido às propriedades benéficas que sua composição apresenta, sendo rica em flavonoides, catequinas e taninos, além dos efeitos terapêuticos comumente relatados como retardo do envelhecimento, elevada atividade antioxidante e antidiabética. Sua produção se deve ao processo fermentativo ocorrido devido à ação de uma cultura simbiótica de leveduras e bactérias acéticas como os gêneros *Gluconobacter*, tradicionalmente conhecida como SCOBY. A SCOBY é uma película ou filme celulósico formado pela ação dos microrganismos presentes (bactérias acéticas e leveduras). Nos últimos anos, houve uma ampliação no mercado produtor e consumidor, tornando a kombucha um dos produtos de maior crescimento industrial no tocante a bebidas com potenciais probióticos. Tanto o chá quanto o filme de celulose desenvolvido estão sendo investigados como opções promissoras para aplicações no desenvolvimento de novas bebidas, apresentando objetivo de aumentar efeitos terapêuticos e aperfeiçoamento da qualidade sensorial (Soares *et al.*, 2021; Leonarski *et al.*, 2021).

Em 2020, o mercado global de alimentos e bebidas probióticas movimentou US\$ 2,5 bilhões e representa um dos segmentos de maior crescimento na indústria de alimentos. Diversos trabalhos acadêmicos buscam elucidar os efeitos terapêuticos através de modelos experimentais. Todavia, evidências científicas em humanos ainda precisam de melhores esclarecimentos. Com uma taxa de crescimento anual de consumo podendo chegar a 25%, estima-se um crescimento moderado na América Latina, com relevante destaque no Brasil, Venezuela e Argentina (Soares *et al.*, 2021). A kombucha tem se tornado a bebida que mais cresce no mercado de produtos funcionais, estando entre as bebidas de baixo teor alcoólico com maior popularidade ao redor do mundo (Kapp; Sumner, 2019).

A produção da kombucha requer técnicas simples de preparo. Como primeira etapa, é necessário o preparo do chá das folhas da *C. sinensis* (verde, preto ou oolong) por um período de 5 a 10 minutos, e então são removidos por meio de filtragem as folhas ou substratos utilizados. Em seguida, acrescenta-se 50 a 150g de açúcar por litro, necessário para ser usado como substratos pelos microrganismos na solução ainda quente para a devida dissolução. Após o completo resfriamento, adiciona-se a SCOBY, juntamente com 100 a 200 mL de líquido resultante de fermentações anteriores de kombucha, conhecido como líquido *starter*. Esse líquido auxiliará na obtenção do pH necessário para o início de uma fermentação mais segura, pois inibirá o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes. A mistura é encaminhada para a primeira fermentação coberta com um pano, papel ou toalhas limpas e

estéreis a uma temperatura ambiente entre 18–30°C de 7 a 10 dias (figura 06) (Bishop *et al.*, 2022).

Diversos fatores apresentam influência direta na etapa de fermentação da kombucha, entre esses fatores podemos citar o pH, que apresenta influência no processo inicial da fermentação e seu valor não deve ser abaixo de três. Cita-se também a temperatura, onde o perfil microbiano presente nessas bebidas apresenta faixas de temperaturas ótimas para o seu desenvolvimento, sendo a variação ideal na produção da kombucha de 22 a 30°C. A quantidade de oxigênio presente na amostra apresenta-se também relevantes impactos na composição microbiana destes fermentados. No que se refere à mudança no perfil nutricional ou bioativo, os substratos utilizados na bebida apresentam grande destaque. Além dos derivados da *C. sinensis*, outros substratos vegetais ou até mesmo de origem animal podem ser utilizados, como frutas, cascas, sementes e leites. O teor de gás carbônico dissolvido na amostra evidencia a ação dos microrganismos presentes nestes substratos. Além disso, aspectos como tempo de fermentação e as condições higiênico-sanitárias da água e das etapas de produção, são de ampla importância no que se refere à segurança microbiológica da bebida (Bishop *et al.*, 2022).

Durante a etapa fermentativa, os alimentos passam por diversas alterações químicas e como resultados dessas alterações temos produtos com melhoria das suas propriedades nutricionais e impactos positivos à saúde. O aumento das moléculas bioativas e das propriedades antioxidantes em diversas matrizes alimentares como cereais e frutas, comumente são relatadas na literatura (Melini *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse no desenvolvimento de estudos que buscam elucidar a utilização de substratos alternativos à *C. sinensis* no contexto da produção de bebidas tipo kombucha. Essa tendência reflete uma busca por diversificação de sabores e perfis nutricionais, bem como uma preocupação com a sustentabilidade e a disponibilidade limitada de alimentos para a produção em larga escala. Assim, o **quadro 1** apresenta alguns estudos encontrados na literatura sobre o desenvolvimento de bebidas tipo kombucha.

**Quadro 1** - Estudos de bebidas fermentadas tipo kombucha.

<b>Coproducto utilizado</b>	<b>Análises realizadas</b>	<b>Principais resultados</b>	<b>Referência</b>
Polpa residual de acerola em (1, 3 e 5% m/v)	Consumo de açúcares, pH, teor de fenólicos totais, etanol, ácido acético. Além disso, foram caracterizadas as estruturas físico-	Todas as amostras mostraram preferência à glicose, pH inicial variou entre 3,24 e 3,27 (1%, 3%, e 5%, respectivamente). As amostras de 3% e 5% aumentaram os compostos fenólicos totais atingindo 947,6 mg GAE/L e 1309,0 mg GAE/L após 15	Leonarsk <i>et al.</i> , 2021.

	químicas e morfológicas da celulose bacteriana.	dias. O etanol permaneceu constante, 9,5 g/L. A produção máxima de ácido acético (16,3 g/L) e celulose bacteriana (4,0 g/L) ocorreu com 5% de coproduto, devido ao aumento dos polifenóis e vitamina C na acerola, afetando o ácido acético.	
Extratos aquosos de <i>Ilex guayusa</i> e <i>Vernon anthura patens</i> , folhas e cascas de cacau	Toxicidade oral aguda utilizando <i>teste in vivo</i> em ratos experimentais.	Após a administração de 2.000 mg/kg de peso corporal, não houve evidência de toxicidade adversa, mortalidade ou alterações significativas no peso corporal, consumo de alimentos e água, nem achados histopatológicos relevantes em órgãos principais. Conclui-se que a bebida funcional é de baixa toxicidade, conforme o Sistema de Classificação Globalmente Harmonizado.	Paladines-Santacruz <i>et al.</i> , 2021.
Folhas de Oliveira Moraiolo ( <i>Olea europaea</i> L.) 100, 50 e 25%	Conteúdo total de polifenóis, atividade antioxidante e o perfil sensorial.	A solução com maior concentração de folha de Oliveira apresentou altos níveis de polifenóis e atividade antioxidante. A amostra com 100% de <i>Olea europaea</i> , impactou o sabor, conferindo um amargor que se harmonizou bem com o aroma do chá na kombucha recém-formulada.	Lazzaroli <i>et al.</i> , 2023.
Espinheiro da Anatólia e Folhas de urtiga	Examinar o conteúdo total de fenólicos e flavonóides, atividades antioxidantes e antimicrobianas.	Ao longo do armazenamento, a kombucha controle (chá preto) apresentou um conteúdo fenólico total e atividade antioxidante (80,48% a 90,36% pelo método ABTS e 65,60% a 70,76% pelo método DPPH) mais elevado que outras amostras. A kombucha de folhas de urtiga exibiu maiores teores de flavonoides totais, acidez total e cinzas, além de demonstrar um efeito antimicrobiano superior.	Kilic;Sengun <i>et al.</i> , 2023.
Suco de maqui ( <i>Aristotelia chilensis</i> (Mol.) Stuntz)	Efeito metabólico de culturas iniciadoras obtidas em diferentes tempos de fermentação, explorando a estabilidade da antocianina com diferentes concentrações de sacarose e fermentado em diferentes tempos.	A fermentação com sacarose (10%) e o consórcio com 7 dias de idade, promoveu a melhor liberação e acúmulo de compostos fenólicos.	Rocha-Guzmán <i>et al.</i> , 2023.

A diversificação dos ingredientes base da kombucha pode atender a uma ampla variedade de preferências e restrições dietéticas. Além disso, a exploração de diferentes infusões como

base também poderia refletir a crescente conscientização sobre a sustentabilidade. Com o intuito de identificar a presença de bebidas similares à kombucha no mercado, um levantamento *online* foi conduzido em setembro de 2023 com os seguintes termos de busca: bebida tipo kombucha, bebida similar a kombucha e bebida fermentada, nos seguintes *websites*: Amazon (<https://www.amazon.com.br>), Hiper Ideal (<https://www.hiperideal.com.br>), Magazine Luiza (<https://www.magazineluiza.com.br>) e Pão de Açúcar (<https://www.paodeacucar.com/>), além do mecanismo de busca do Google (<https://www.google.com>). Não foram identificadas bebidas análogas à kombucha. Contudo, observou-se a presença predominante de kombuchas convencionais de diversas marcas e dimensões comerciais, as quais apresentam uma variedade de bases de saborização, abrangendo uva, manga, guaraná, tangerina, bem como outras modificações.

Os custos de produção de bebidas fermentadas, como kombuchas ou similares, abrangem uma variedade de fatores que devem ser cuidadosamente considerados para assegurar eficiência econômica e qualidade do produto final. Estes custos podem ser divididos em despesas fixas e custos variáveis, representando, respectivamente, aproximadamente 40% e 60% das despesas totais. As despesas fixas englobam por exemplo investimentos em maquinários como fogões e liquidificadores. Esses elementos fixos são cruciais para a infraestrutura da produção e, conseqüentemente, influenciam diretamente a capacidade produtiva e a eficiência operacional da empresa. Por outro lado, os custos variáveis compreendem uma gama diversificada de despesas, como os insumos. No contexto específico de bebidas fermentadas, como kombuchas ou similares, a qualidade dos ingredientes desempenha um papel fundamental. Ingredientes de alta qualidade não apenas contribuem para a excelência sensorial do produto, mas também afetam diretamente a viabilidade do processo fermentativo. Os substratos utilizados no processo de fermentação, como chás e açúcares, são componentes-chave na elaboração de kombuchas. A escolha criteriosa desses ingredientes é imperativa para garantir características organolépticas desejadas e, ao mesmo tempo, manter a eficiência da fermentação (Mohammadshirazi; Kalhor, 2016). Em janeiro de 2024, ao realizar uma pesquisa no Google (<https://www.google.com>) foi possível verificar os custos dos ingredientes para a produção de 1L de uma bebida análoga à kombucha, utilizando a casca da amêndoa de cacau como substrato primário para a infusão, além do açúcar, água e kombucha tradicional, sendo esta última empregada como fonte dos microrganismos essenciais para a fermentação (Tabela 1). Vale ressaltar que nesta avaliação específica, não foram considerados os custos associados a materiais e utensílios necessários para o processo produtivo.

**Tabela 1** - Custos dos ingredientes para elaboração de uma bebida tipo kombucha.

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Valor R\$</b>
Casca da amêndoa de cacau	23g	3,12
Açúcar cristal	80g	0,40
Kombucha comercial	65mL	2,60
Água Mineral	1L	3,50
Total	--	9,62

*Fonte: autoria própria.*

No que diz respeito à seleção de ingredientes, o mercado oferece uma ampla variedade de opções, e a escolha dos melhores depende das características específicas desejadas para o produto final. Avaliações criteriosas das propriedades organolépticas, potencial nutricional e custos associados são essenciais para otimizar a relação custo-benefício na produção de bebidas fermentadas. Portanto, a análise detalhada dos custos de produção, considerando a composição dos ingredientes, a qualidade dos substratos e a gestão eficiente das despesas fixas e variáveis, é essencial para o sucesso econômico e a qualidade final de bebidas como kombuchas (Mohammadshirazi; Kalhor, 2016).

### 3.2.2 Potencial tecnológico de bebidas tipo kombucha

A busca de documentos de patentes é uma etapa crítica no processo de desenvolvimento de novos produtos, ajudando a garantir que sua invenção seja única, legalmente viável, oferecendo *insights* valiosos sobre o cenário competitivo e as oportunidades de mercado (Silva *et al.*, 2023). Dessa forma, com o objetivo de verificar produtos semelhantes à kombucha em invenções patenteadas, realizou-se uma pesquisa *online* em setembro de 2023, utilizando os seguintes termos de busca no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) e na base de dados do escritório Europeu de patentes (Espacenet): "*fermented drink*", "*fermented drink AND cocoa*", "*fermented drink AND by-product*", "*fermented AND cocoa*", "*fermented drink AND theobroma cacao*", os resultados da busca estão expressos no quadro 2.

**Quadro 2** - Documentos de patente sobre bebidas fermentadas.

<b>Número do documento da patente</b>	<b>IPC</b>	<b>Bebidas fermentadas tipo kombucha</b>
CA2197481A1	A23F3/16 A23F5/24 A23L2/00	Processo de preparação de uma bebida fermentada em que se prepara um extrato aquoso a partir de 0,5-2% de chá ou

	A23F3/10	café, adiciona açúcar e se realiza uma fermentação, com pelo menos uma cepa de levedura e uma cepa bacteriana.
CN103989230A	A23L2/38 A23L2/84 A23L33/00 A23L2/38 A23L2/84 A23L33/00	A bebida é preparada com verbena fresca, inula japônica e cevada, embrulhados em folium cannabis e fermentados com levedura por 35-60 dias à temperatura de 25- 35°C, obtendo-se a bebida fermentada.
BR1020190281529	A23L2/38; A23L2/02; A23L33/105; A23G1/56; A23L33/135	Trata-se da produção de uma bebida fermentada não láctea com extrato de polpa de cacau, água fermentada de grãos de kefir (probióticos) e extrato de Aloe vera barbadensis para criar um alimento funcional com benefícios à saúde.
BR1020170031985	C12C12/00; A23G 1/42	Incorporação da enzima poligalacturonase na polpa de cacau como coadjuvante na fabricação de bebida fermentada.
BR1120150024386	A23L 7/00; A23K10/00; A23K20/189; C12N 9/24; C12C 5/00	Trata-se de um método para fazer uma bebida fermentada, que envolve a mistura de uma pasta, mosto ou subproduto de milho ou uma combinação deles com uma enzima xilanase, que é um polipeptídeo.

IPC: Código de Classificação Internacional

O estudo da CAC se diferencia dos apresentados na tabela acima em alguns aspectos. Inicialmente, o substrato que fundamenta o estudo, é a CAC, um coproduto derivado do processamento do cacau, cuja relevância não se destaca apenas no Brasil, mas também no mundo, empregando-a no desenvolvimento de uma bebida fermentada. Outro aspecto, refere-se ao período de fermentação estabelecido em 24 horas, sinalizando a eficácia do processo fermentativo da bebida, composta por uma cultura simbiótica de bactérias do gênero *Komagataeibacter*, *Acetobacter* e *Gluconacetobacter* e leveduras dos gêneros *Brettanomyces* e *Zygosaccharomyces*, revelando assim, um enfoque inovador, não apenas ampliando o escopo do conhecimento científico, mas também destacando sugestões tecnológicas de relevância significativa para este coproduto.

### 3.3 Aspectos regulatórios de novas bebidas

A legislação vigente no Brasil referente às bebidas categoriza-se em dois segmentos distintos: aquelas relacionadas ao vinho e seus coprodutos derivados da uva, e aquelas pertinentes às demais variedades de bebidas. Este sistema normativo visa estabelecer diretrizes específicas para a produção, rotulagem, distribuição e consumo dessas categorias, refletindo a diversidade e complexidade do setor de bebidas no país (Brasil, 2024). É importante destacar,

que para kombucha, desde 2019, a Instrução Normativa Nº 41 está em vigor no Brasil, estabelecendo o padrão de identidade e qualidade em todo o território nacional.

Contudo, ao desenvolver novas bebidas, há implicações em considerações substanciais no que se refere aos aspectos regulatórios, visando assegurar a conformidade com as normas e regulamentações pertinentes. Dentre os principais aspectos regulatórios a serem avaliados, destaca-se a lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, regulamentada pelo Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que trata sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, além de autorizar a criação da Comissão Intersetorial de Bebidas e dá outras providências. A resolução Nº 23, de 15 de março de 2000 estabelece diretrizes para o Manual de Procedimentos Básicos referente ao registro e à dispensa da obrigatoriedade de registro de produtos correlatos à área de alimentos. Essas medidas visam assegurar a conformidade com as normas e regulamentações específicas na área de alimentos, promovendo a segurança alimentar e a qualidade dos produtos (Brasil, 2024).

Salienta-se a importância de consultar os sites da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do Ministério da Agricultura e demais órgãos reguladores a fim de obter informações atualizadas e específicas sobre a legislação brasileira vigente no que concerne à produção e comercialização de bebidas.

## 4 CONCLUSÃO

O cacau é reconhecido como um produto agroindustrial de significativa relevância, com uma produção e consumo global substanciais. Os coprodutos do cacau, notadamente a casca da amêndoa, apresenta propriedades nutricionais promissoras que favorecem uma gama diversificada de aplicações. A prática milenar e impactante da fermentação de alimentos e bebidas, facilitada pela ação de microrganismos, oferece vantagens marcantes, tanto no contexto da sustentabilidade quanto da saúde. A fermentação, ao transformar a matriz alimentar, aprimora características sensoriais singulares, melhora a digestibilidade e intensifica a biodisponibilidade de nutrientes. O enaltecimento dos coprodutos alimentares por meio do processo de fermentação, além de ampliar a gama de alimentos e bebidas disponíveis, apresenta-se como uma oportunidade para impulsionar o desempenho econômico de produtores e empresas, proporcionando um incremento adicional ao valor de seus produtos comercializados. Nesse sentido, promover iniciativas de pesquisas dedicadas ao desenvolvimento de produtos fermentados seguros e de elevada qualidade deve ser fomentado de forma colaborativa por atores do setor acadêmico, industrial e governamental. Fomentar o consumo de coprodutos, não apenas pode conter benefícios substanciais para a saúde e o estilo de vida das pessoas, mas também contribui para a redução de impactos ambientais e minimização do desperdício de alimentos, alinhando-se a uma abordagem responsável para o consumo alimentar.

## REFERÊNCIAS

- ARAUJO FILHO, A. A. L., SOUSA, P. H. M. DE, VIEIRA, I. G. P., et al. Kombucha and kefir fermentation dynamics on cashew nut beverage (*Anacardium occidentale* L.). **International Journal of Gastronomy and Food Science**, 33, 100778. (2023). <https://doi.org/10.1016/J.IJGFS.2023.100778>
- ARUN, K.B., MADHAVAN, A., SINDHU, R., et al.. Remodeling agro-industrial and food wastes into value-added bioactive and biopolymers. **Industrial Crops & Products**, 154 (Jun 2020). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112621>.
- BARROS, H. E. A., NATARELLI, C. V. L., DE CARVALHO TAVARES, I. M., et al. Nutritional Clustering of Cookies Developed with Cocoa Shell, Soy, and Green Banana Flours Using Exploratory Methods. **Food and Bioprocess Technology**, 13(9), 1566–1578. 2020. <https://doi.org/10.1007/S11947-020-02495-W/FIGURES/3>.
- BISHOP, P., PITTS, E. R., BUDNER, D., et al. Kombucha: Biochemical and microbiological impacts on the chemical and flavor profile. **Food Chemistry Advances**, 1, 100025. 2022. <https://doi.org/10.1016/J.FOCHA.2022.100025>.
- BRASIL, **Legislação de Vinhos e Bebidas — Ministério da Agricultura e Pecuária**. (n.d.). Retrieved January 22, 2024, from <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-de-produtos-origem-vegetal/bebidas>.
- BRASIL, **Lei 8.918 de 14 de julho de 1994**. (n.d.). Retrieved January 22, 2024, from [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/18918.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/18918.htm).
- BRASIL, **DECRETO Nº 6.871, DE 4 DE JUNHO DE 2009**. (n.d.). Retrieved January 22, 2024, from [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm).
- BRASIL. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 41, DE 17 DE SETEMBRO DE 2019 - DOU - Imprensa Nacional**. (n.d.). Retrieved August 18, 2023, from <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-41-de-17-de-setembro-de-2019-216803534>.
- BRASIL, **Resolução Nº 23, de 15 de março de 2000 - Ministério da Saúde** (n.d.). Retrieved January 22, 2024, from [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2000/rdc0023\\_15\\_03\\_2000.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2000/rdc0023_15_03_2000.html).
- BRAINER, M.S.C.P. Cocoa production [Electronic Version]. Caderno Setorial Etene. **2021**. from [https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/650/3/2021\\_CDS\\_149.pdf](https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/650/3/2021_CDS_149.pdf). Acesso em 12 de novembro de 2023.
- CAMPOS-VEGA, R., NETO-FIGUEROA, K., H. & OOMAH, B., D. Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. **Trends in Food Science & Technology**, 81 (November 2018). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.022>.

- CANTELE, C., ROJO-POVEDA, O., BERTOLINO, M., et al.. In Vitro Bioaccessibility and Functional Properties of Phenolic Compounds from Enriched Beverages Based on Cocoa Bean Shell. **Foods**, 2020, Vol. 9, Page 715, 9(6), 715. 2020. <https://doi.org/10.3390/FOODS9060715>.
- GÓMEZ-GARCÍA, R., CAMPOS, D. A., AGUILAR, C. N., et al. Valorisation of food agro-industrial by-products: From the past to the present and perspectives. **Journal of Environmental Management**, 299, 113571. (2021). <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2021.113571>
- GUIRLANDA, C., P., SILVA, G., G. & TAKAHASHI, J., A. . Cocoa honey: Agro-industrial waste or underutilized cocoa by-product? **Future Foods**, 4 (December 2021). <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100061>.
- DUSTAN, M., R., JOHANNES, B., MICHEL, R. **Fermented Drink**. CA2197481A1, filed February 14, 1996, and issued August 15, 1997.
- HANDOJO, L., TRIHARYOGI, H., INDARTO, A. Cocoa bean shell waste as potential raw material for dietary fiber powder. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, 8(1), 485–491. 2019. <https://doi.org/10.1007/S40093-019-0271-9/FIGURES/4>
- HASHIMOTO, J., C., LIMA, J., C., CELEGHINI, R., M., et al. Quality Control of Commercial Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.) by Near-infrared Spectroscopy. **Food analytical methods**, 11, 1510-1517. 2018. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1137-2>.
- HONG, Z. **Fermented drink**. CN103989230A, filed May 07, 2014, and issued August 20, 2014.
- KAPP, J. M., & SUMNER, W. Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. **Annals of Epidemiology**, 30, 66–70. 2019. <https://doi.org/10.1016/J.ANNEPIDEM.2018.11.001>
- KIARIE, E., G., DALSGAARD, S., ARENT, S., **Método de preparação de um produto à base de milho e método de preparação de uma composição alimentícia aditiva**. BR 11 2015 002438 6, Filled August 02, 2013, And Issued August 01, 2017.
- KILIC, G., SENGUN, I., Y. Bioactive properties of Kombucha beverages produced with Anatolian hawthorn (*Crataegus orientalis*) and nettle (*Urtica dioica*) leaves. **Food Bioscience**, 53, 102631. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102631>.
- LAZZAROLI, C., SORDINI, B., DAIDONE, L., et al. Recovery and valorization of food industry by-products through the application of *Olea europaea* L. leaves in kombucha tea manufacturing. **Food Bioscience**, 53, 102551. 2023. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2023.102551>
- LEONARSKI, E., CESCO, K., ZANELLA, E., et al. Production of kombucha-like beverage and bacterial cellulose by acerola byproduct as raw material. **LWT**, 135, 110075. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.110075>

MELINI, F., MELINI, V., LUZIATELLI, F., et al. Health-Promoting Components in Fermented Foods: An Up-to-Date Systematic Review. **Nutrients** 2019, Vol. 11, Page 1189, 11(5), 1189. 2019. <https://doi.org/10.3390/NU11051189>.

MOHAMMADSHIRAZI, A., & BAGHERI KALHOR, E. (2016). Energy and cost analyses of kombucha beverage production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 55, 668–673. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2015.11.022>.

NUNES, C., S., O., UETANABARO, A., P., T., SILVA, M., L., C. **Processo De Adição Da Enzima Poligalacturonase À Polpa De Cacau Para Utilização Como Adjunto Na Produção De Bebidas Fermentadas**. BR 10 2017 003198 5, filed February 16, 2017, and issued October 30, 2018.

OTERO, D. M., DA ROCHA LEMOS MENDES, G., DA SILVA LUCAS, A. J., et al. Exploring alternative protein sources: Evidence from patents and articles focusing on food markets. *Food Chemistry*, 394, 133486. 2022. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.133486>

PALADINES-SANTACRUZ, G., ORELLANA-MANZANO, A., SARMIENTO, G., et al. Acute oral toxicity of a novel functional drink based on *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens*, and cocoa husk. **Toxicology Reports**, 8, 747–752. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2021.03.026>.

PAGLIARI, S., CELANO, R., RASTRELLI, L., et al.. Extraction of methylxanthines by pressurized hot water extraction from cocoa shell by-product as natural source of functional ingredient. **LWT**, 170. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114115>.

RASTOGI, Y. R., THAKUR, R., THAKUR, P., et al. Food fermentation – Significance to public health and sustainability challenges of modern diet and food systems. **International Journal of Food Microbiology**, 371, 109666. 2022. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2022.109666>.

ROCHA-GUZMÁN, N. E., GONZÁLEZ-LAREDO, R. F., MORENO-JIMÉNEZ, M. R., et al. Kombucha analogs from maqui juice: Consortium age and sugar concentration effects on anthocyanin stability and its relationship with antioxidant activity and digestive enzyme inhibition. **Food Chemistry**, 421, 136158. 2023. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2023.136158>.

REGUENGO, L., M., SALGAÇO, M., K., SIVIERI, K. et al.. Agro-industrial by-products: valuable sources of bioactive compounds. **Food Research International**. (February 2022). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110871>.

SANTOS, F., L., AMORIM, G., M., SANTOS, J., S., et al. **Processo de obtenção de bebida não-láctea fermentada simbiótica a base de cacau, extrato mucilaginoso de aloe vera barbadensis e kefir e produto obtido**. BR 1020190281529, filed December 28, 2019, and issued July 06, 2021.

SILVA, A.C.V., RAMOS, G.L.P.A., FERREIRA, P.S., et al. Technological prospection of aquafaba: a study of patent applications and trends in the food market. **Food Science and Technology**, v. 43, n. e114422, 2023. <https://doi.org/10.1590/fst.114422>.

SOARES, M. G., DE LIMA, M., & REOLON SCHMIDT, V. C. Technological aspect of kombucha, its applications and the symbiotic culture (SCOBY), and extraction of compounds of interest: A literature review. **Trends in Food Science & Technology**, 110, 539–550. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.02.017>

SOARES, T. F., & OLIVEIRA, M. B. P. P. Cocoa By-Products: Characterization of Bioactive Compounds and Beneficial Health Effects. **Molecules** 2022, Vol. 27, Page 1625, 27(5), 1625. (2022). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27051625>

SOUZA, F. N., SOARES, R. V., S., LEOPOLDINA, L., C., M., et al. Impact of using cocoa beans shell powder as a substitute for wheat flour on some of chocolate cake properties. **Food Chemistry**, 381, 132215. 2022. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.132215> .

SUN, W., SHAHRAJABIAN, M. H., & LIN, M. Research Progress of Fermented Functional Foods and Protein Factory-Microbial Fermentation Technology. **Fermentation**, Vol. 8, Page 688, 8(12), 688. 2022. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION8120688>

TOSTO, A., MORALES, A., RAHN, E., et al. Simulating cocoa production: A review of modelling approaches and gaps. **Agricultural Systems**, 206, 103614. 2023. <https://doi.org/10.1016/J.AGSY.2023.103614>.

VÁSQUEZ, Z.S., NETO CARVALHO, D.P., PEREIRA, G.V.M., et al. Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. **Waste Management**, 90 (may of 2019) 72-83. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.04.030>.

VOORA, V., BERMÚDEZ, S., LARREA, C. Global Market Report: Cocoa. **International Institute for Sustainable Development (IISD)**, 2019. Disponível em: <https://www.iisd.org/publications/report/global-market-report-cocoa>. Acesso em 12 de novembro de 2023.

YULIANA, N., NURAINY, F., SARI, G. W. et al. Total microbe, physicochemical property, and antioxidative activity during fermentation of cocoa honey into kombucha functional drink. **Applied Food Research**, 3(1), 100297. (2023). <https://doi.org/10.1016/J.AFRES.2023.100297>

## ***Capítulo II***

---

***Multidimensional strategies for sustainable management of cocoa by-products***

## Multidimensional strategies for sustainable management of cocoa by-products

Lívia de Matos Santos<sup>a</sup>, Camila Duarte Ferreira Ribeiro<sup>\*a,b</sup>, Janaína de Carvalho Alves<sup>c</sup>,  
Vanessa de Lima Silva<sup>b</sup>, Isadora Santana Araújo da Silva<sup>a</sup>, Isabelle Palma Patrício  
Santos<sup>b</sup>, Mariana Nougalli Roselino<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Pharmacy, Federal University of Bahia, Campus Ondina, Salvador Bahia 40170-290, Brazil

<sup>b</sup> Nutrition School, Federal University of Bahia, Basílio da Gama Street, Rua Basilio da Gama-w/n-Campus Canela, Salvador, Bahia 40110-907, Brazil

<sup>c</sup> Graduate Program in Biotechnology - Northeast Network of Biotechnology (RENORBIO), Federal University of Bahia, Reitor Miguel Calmon Avenue-w/n-Campus Canela, Salvador, Bahia 40110-100, Brazil

<i>Periódico a ser submetido (1<sup>a</sup> submissão):</i>	<i>Food reviews International e ISSN 1525-6103 online</i>
<i>Maior percentil (Scopus):</i>	<i>96% Food Science</i>
<i>Periódico a ser submetido (2<sup>a</sup> submissão):</i>	<i>Waste Management e ISSN 0956-053x</i>
<i>Maior percentil (Scopus):</i>	<i>90% Waste Management and Disposal</i>

\*Corresponding author: Camila Duarte Ferreira Ribeiro. Basílio da Gama Street, without number, Canela, CEP: 40.110.907, Salvador-BA., Brazil. E-mail: [camiladuartef@ufba.br](mailto:camiladuartef@ufba.br)

**Abstract:** This review presents multidimensional scientific and patentometric analyses of the use of cocoa by-products. We searched the Web of Science, Scopus, and Medline/Pubmed databases using "Cocoa\* OR *Theobroma cacao* AND by-product\*." A total of 144 scientific articles were analyzed. Agricultural and biological sciences constituted the primary area of publication (68%). Co-occurrence analysis of provided information about the focus on bioactive or biofunctional compositions in the by-product science field. For the technological search, Espacenet and the National Institute of Industrial Property (INPI) databases were consulted, using the terms "Cocoa\* OR *Theobroma cacao* AND by-product\* AND A23G" and "Cocoa\* OR *Theobroma cacao* AND by-product\*." A total of 73 patent documents were analyzed. The earliest patent document addressing this subject was dated 1913, significant growth in patent filings was observed after 2020. The study of cocoa by-products suggests a potential for sector growth and these findings suggest exciting future ecological and technological possibilities.

**Keywords:** technological prospection; scientific prospection; sustainability; *Theobroma cacao*.

## 1. Introduction

Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is a berry fruit native to South America that grows on the trunk and branches of the cocoa tree from the Malvaceae family. The fruit can attain lengths of up to 25 cm, while the tree itself can reach heights of up to 10 m (Vásquez et al., 2019). In 2019, global cocoa production averaged 5.6 million tons, with the Ivory Coast ranking as the largest producer. In the processing of cocoa, beans are utilized to produce chocolate and various cocoa derivatives, including liquor, powder, butter, and cocoa paste. These products are in high demand globally, with annual growth rates of approximately 3.6% in North America and 1.7% in the European Union. However, cocoa processing generates by-products, notably the cocoa pod shell and tegument, categorized as residual biomass, constituting up to 80% of the fruit's dry weight (Vásquez et al., 2019).

These by-products contain bioactive compounds such as pigments, polyphenols, fibers, proteins, lipids, and carbohydrates, which exhibit noteworthy biological properties, including antioxidant, anti-inflammatory, and anticarcinogenic activities. Moreover, they find application in various sectors like water treatment and energy. The increasing scientific exploration of these residues' health benefits offers the potential to reduce food waste, garnering societal interest. Monitoring and raising awareness about the importance of reducing waste, ensuring food security, and mitigating environmental impacts are critical in reducing food waste in processing industries (Arun et al., 2020).

Global food waste surpasses 1.3 billion tons and is projected to reach an average of 2.6 billion tons by 2025, resulting in an economic loss of 400 billion dollars. These concerning statistics emphasize the urgent necessity of establishing sustainable and environmentally compatible methodologies for industrial by-product applications to maximize their potential utilization (Kumar et al., 2022).

Cocoa by-products, including the shell and husk, are primarily generated in the field during initial processing and can constitute up to 80% of the fruit's weight. The large-scale production of cocoa waste biomass poses a significant environmental concern for cocoa-producing and processing nations. The political and social instability in some major cocoa-producing countries, along with fluctuations in the value of the US dollar, directly influences cocoa prices, leading to price volatility, reduced investments, and increased tax burdens. Implementing effective management of residual biomass could enhance the financial situations of both producers and industries through innovative technologies. In 2017, the value of cocoa industry shells and other by-products increased by approximately USD 244 million, indicating growing utilization of these by-products by industries worldwide (Vásquez et al., 2019).

Understanding cocoa by-products within the scope of scientific studies and patents are important for guiding efforts to develop new technologies. This knowledge is fundamental to expanding the ability to anticipate and stimulate the organization of innovative systems in the academic environment. The primary objective of this study was to study cocoa by-products through multidimensional scientific and patentometric analyses.

## 2. Methods

In this review, cocoa by-products are defined as products from cocoa fruits that do not have well-established commercialization, such as pods, tegument, oil, leaves, and honey, compared to derivatives such as liquor, and cocoa butter, which are highly commercialized products in the food and cosmetic industries.

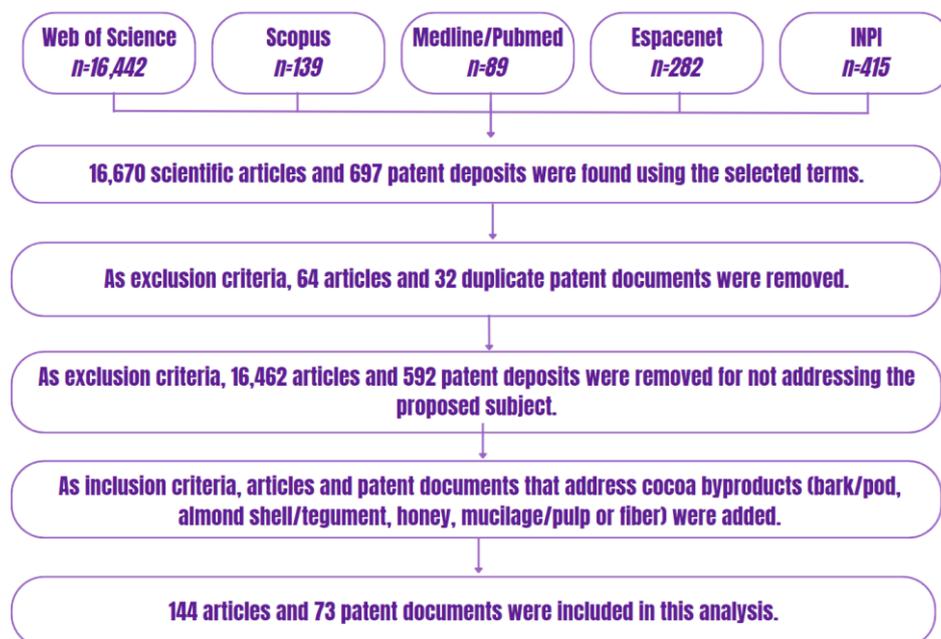
The work was divided between scientific and technological analyses due to the text structures of scientific articles and patents being differentiated as tools for disseminating different types of knowledge (Otero et al., 2022). Data were collected from scientific articles and patent documents in March 2023 using the Web of Science, Scopus, Medline/Pubmed databases, and the Espacenet and National Institute of Industrial Property (INPI) technological databases, respectively, with the following combination of terms "Cocoa\* OR *Theobroma cacao* AND by-product\*"; "Cocoa\* OR *Theobroma cacao* AND by-product\* AND A23G",

To ensure the fidelity of the data to evaluate the panorama of cocoa by-product usage, the documents were analyzed and selected or excluded based on eligibility criteria. Articles and patent documents dealing with cocoa by-products (cocoa pods, cocoa bean shells, cocoa honey, mucilage, and cocoa pulp) were included in the study.

The results and discussion are divided into three parts: 1) scientific analysis: application areas and most reported by-products, co-occurrence analysis, and countries; 2) patent analysis: application areas and most reported by-products, International Patent Classification (IPC) codes, holders, and countries; and 3) analysis of scientific and patentometric prospecting: annual evolution of articles and patent documents. Tables and figures (Excel, Microsoft 365; PowerPoint, Microsoft 365; VISME-<https://www.visme.co>; VOSviewer version 1.6.18; and CANVA, (<https://www.canva.com>) were used to present the results of this study. The term “patent document” includes both submitted and granted patents.

### 3. Results and Discussion

After applying the eligibility criteria, 144 articles and 73 patent documents were included in this study (Figure 1).

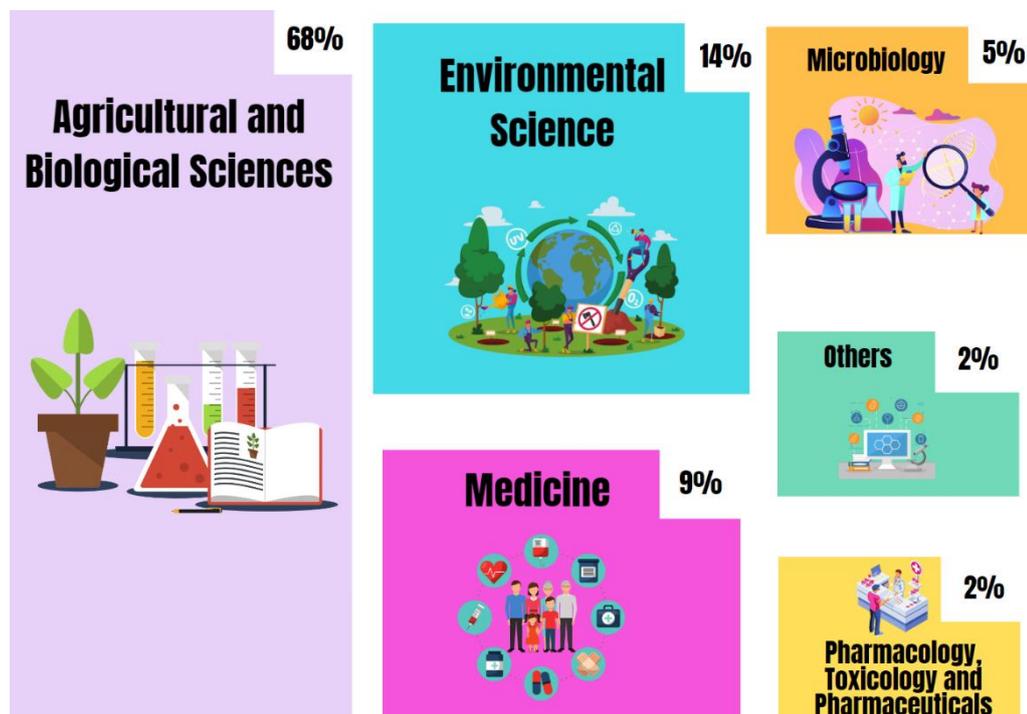


**Figure 1.** Methodological flowchart.

### 3.1 Scientific analysis

#### 3.1.1 Application Areas and most commonly reported by-products

The current relevance of cocoa by-products is manifested by the diversity of their applications, as illustrated in Figure 2. The field of Agricultural and Biological Sciences led with 68% of the publications, followed by Environmental Sciences (14%), Medicine (9%), Microbiology (5%), and Pharmaceuticals (2%), while 2% were distributed among other areas.



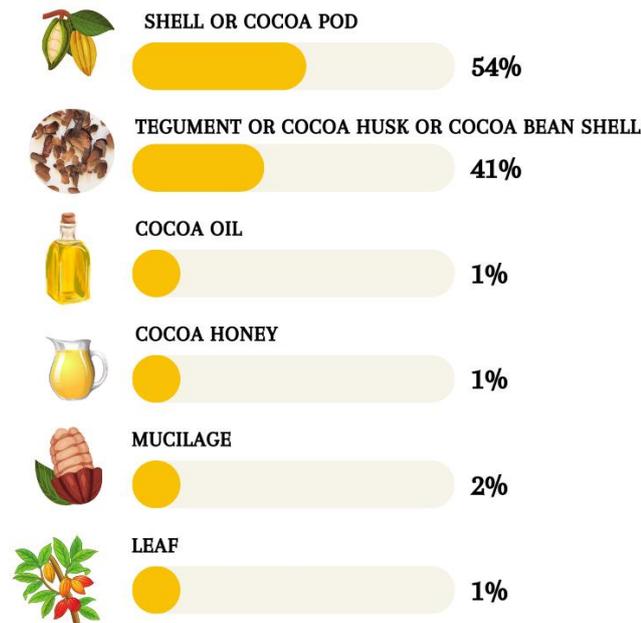
**Figure 2.** Application areas of cocoa by-products from Web of Science, Scopus, and Medline/PubMed databases.

The quest to evaluate cocoa products and identify their nutritional composition has been a subject of study over the years. Azizah et al. (1999) sought to verify the antioxidant properties of cocoa shells. In this study, we defend the conscious consumption of foods of natural origin with high nutritional value that are safe for consumption. However, the authors also highlight the need to research these products' nutritional composition and antioxidant activities. Verifying the strong antioxidant activity of the

cocoa shells and nibs was possible. When using methanol as a solvent to evaluate antioxidant activity, it was possible to determine an activity above 0.8/10  $\mu\text{L}$  extract for both.

Hidalgo et al. (2019) sought to elucidate the improvements in cardiovascular risk when cocoa pods and teguments were used to counter an obesity-inducing diet in rats. The authors emphasized the high fiber content, carbohydrates, protein, and flavonoids in the by-products, which can modulate obesity and lipid disorders. After five weeks of treatment, the authors identified a reduction of up to 39% in body weight, a 27% reduction in systolic blood pressure, a 55% reduction in triglycerides, and a 24% reduction in total cholesterol.

Recorded cocoa production in 2020/2021 exceeded 5 million tons of cocoa beans. These surprising data clarify the amount of waste the cocoa processing industries generate. Cocoa pod husks represent 80% of this waste and can reach up to 76% of their dry weight. Cocoa shell was the most frequently mentioned product (54%), followed by the tegument (41%). Interest in this by-product has increased commercially and industrially through scientific investigations and patent filings. Its composition includes ash, cellulose, hemicellulose, lignin, pectin, protein, and minerals such as calcium and potassium (Vandenberghe et al., 2022) (Figure 3).



**Figure 3.** Most reported by-products in Scopus, Web of Science, and Medline/PubMed scientific databases.

The cocoa shell is the outer part of the fruit, characterized by its rough texture, oval shape, and noticeable thickness. Due to its diversity, variations in color can be observed, ranging from light yellow to shades of purple. Furthermore, its intrinsic properties confer upon it a protective function against environmental agents, pests, and potential damage during the harvesting process. It represents a significant proportion, even up to 80% of the total fruit weight, making its disposal a challenging and relevant issue. Of additional importance is its richness in constituents such as lignin, non-starch polysaccharides, terpenoids, flavonoids, and free amino acids, such as glutamine and lysine. Commonly used in soil fertilization due to its substantial mineral content, there is also a growing interest in researching its potential applications in various other fields, including the food industry, the pharmaceutical sector, and the cosmetics industry (Vásquez et al., 2019).

On the other hand the tegument represents a by-product rich in bioactive compounds, gaining recognition and application in the food processing industry. Its composition includes carbohydrates, proteins, and low lipid content, as well as compounds such as theobromine, methylxanthines, dietary fibers, and phenolic compounds (Souza et al., 2022). In order to provide a comprehensive overview of the subject, Table 1 summarizes rigorously selected key articles related to cocoa husk and tegument from renowned databases such as Web of Science, Scopus, and Medline/Pubmed, arranged by their scientific and technological relevance.

**Table 1.** Main articles found with cocoa shell and tegument in Web of Science, Scopus, and Medline/Pubmed articles databases.

<i>Title</i>	<i>By-product reported</i>	<i>Purpose</i>	<i>Nutritional and functional aspects</i>	<i>References</i>
The potential of imidazole as a new solvent in the pretreatment of agro-industrial lignocellulosic biomass	Shell	Extraction of biomolecules	Lignocellulosic biomass	(Valladares-diestra et al., 2023)

<i>Title</i>	<i>By-product reported</i>	<i>Purpose</i>	<i>Nutritional and functional aspects</i>	<i>References</i>
Chemical characterization and <i>in vitro</i> digestibility of Amazonian seeds and agro-industrial by-products with potential for animal feed	Tegument	Determined chemical characteristics and <i>in vitro</i> digestibility for animal feed	Chemical composition (fiber, calcium, phosphorus, etc.)	(Yoplac et al., 2022)
Elephant grass silage with the addition of regional by-products	Tegument	To study the effects of cocoa husk addition in elephant grass silage	Chemical and nutritional composition, digestibility	(Figueiredo et al., 2022)
Effect of feeding cocoa bean by-products ( <i>Theobroma cacao</i> L) on productive performance in improved creole chickens	Tegument	To determine the effect of including cocoa by-products in the diet of Creole chickens	Nutritional quality	(Leiva et al., 2022)
Extraction of methylxanthines by pressurized hot water extraction from cocoa shell by-products as a natural source of functional ingredients	Tegument	Theobromine and caffeine extraction	Theobromine and caffeine quantification, antioxidant activity	(Pagliari et al., 2022)
Effect of extraction solvents on phenolic compounds of <i>Theobroma cacao</i> L. By-products using ultrasound-assisted extraction	Tegument	Extraction of phenolic compounds	Polyphenol content, antioxidant activity	(Jamaluddin et al., 2022)
UHPLC-MS characterization and antioxidant and nutritional analysis of cocoa waste flours from the Peruvian Amazon	Tegument	Characterize the antioxidant properties and nutritional value of cocoa by-product flour	Chemical and nutritional composition and antioxidant potential	(Vargas-arana et al., 2022)
Cocoa by-products: characterization of bioactive compounds and beneficial health effects	Tegument	To study the properties and possible applications of cocoa by-products	Chemical and nutritional composition, biofunctional potential	(Soares et al., 2022)

<i>Title</i>	<i>By-product reported</i>	<i>Purpose</i>	<i>Nutritional and functional aspects</i>	<i>References</i>
Process intensification technologies for the recovery of valuable compounds from cocoa by-products	Shell and tegument	Evaluate successful polyphenol extraction processes from a literature review.	Polyphenol extraction	(Mariattiet al., 2021)
Inclusion of cocoa by-products in the diet of dairy sheep: effect on the fatty acid profile of ruminal content and the composition of milk and cheese	Tegument	To evaluate the effect of cocoa husks in the feeding of dairy sheep	Chemical and nutritional composition	(Campione et al., 2021)
Antioxidant effect of cocoa by-products and cherry polyphenol extracts: a comparative study	Tegument	Investigation of the protective effects of cocoa husk extract against oxidative stress	Antioxidant activity	(Felice et al., 2020)
Effects of cocoa by-products and a modest weight loss intervention on the concentration of serum triglycerides in overweight subjects: proof of concept	Tegument	Evaluate the effect of by-products on the diet of overweight patients	Bioactive compounds	(León-Flores et al., 2020)
An approach to value cocoa bean by-products based on subcritical water extraction and spray drying using different carriers	Tegument	Establish an efficient and sustainable technological procedure for the valorization of food by-products.	Stability evaluation of phenolics and polyphenols using maltodextrin (MD) and whey protein (WP) as carriers in the spray-drying process	(Jokic et al., 2020)
LC-MS and spectrophotometric approaches for evaluation of bioactive compounds from Peru: cocoa by-products for commercial applications	Tegument	Qualitatively determine phytochemical composition using HPLC-MS	Phenolic and flavan-3-ol content and antioxidant capacity	(Cádiz-gurrea et al., 2020)
Structural characterization of pectin obtained from cacao pod husks. Comparison of conventional and	Shell	Characterization of pectin	Pectin	(Munõz-almagro et al., 2019)

<i>Title</i>	<i>By-product reported</i>	<i>Purpose</i>	<i>Nutritional and functional aspects</i>	<i>References</i>
subcritical water extraction				
Effects of particle size and extraction methods on cocoa bean shell functional beverages	Tegument	Evaluate the effects of particle size, extraction methods of bioactive compounds, and consumer acceptance of a functional beverage	Methylxanthine and polyphenolic content, antioxidant, and anti-diabetic properties	(Rojo-poveda et al., 2019)
Obesity and cardiovascular risk improvement using cocoa by-products in a diet-induced obesity murine model	Tegument	Characterize cocoa by-products and analyze their effects on cardiovascular risk	Chemical and nutritional composition, biofunctional potential	(Hidalgo et al., 2019)
Cocoa Shell: a by-product with great potential for wide applications	Tegument	Valorization of cocoa shell bioactive compounds and possible applications	Bioactive compounds (theobromine, caffeine, flavonoids...)	(Panak balentić et al., 2018)
Quality control of Amazonian cocoa ( <i>Theobroma cacao</i> L.) by-products and microencapsulated extract by thermal analysis	Tegument	Evaluation of the thermal profile of by-product extracts (and of its microparticles) obtained by spray drying to preserve its biological activity	Polyphenol content and antioxidant activity	(Alves et al., 2018)
Integrated, green-based processes using supercritical CO <sub>2</sub> and pressurized ethanol applied to recover antioxidant compounds from cocoa ( <i>Theobroma cacao</i> ) bean hulls	Tegument	Selectively recover antioxidant compounds from the by-product	Total phenolic content and antioxidant activity	(Mazzutti et al., 2018)
Cacao pod husks as a source of low-methoxyl, highly acetylated pectins able to gel in acidic media	Shell	Evaluation of optimal conditions for pectins extraction	Pectin	(Vrismann et al., 2017)
Cocoa pod husks, a new source of hydrolase enzymes for preparation of cross-	Shell	Cross-linked enzymatic aggregate repair	protein source	(Yusof et al., 2016)

<i>Title</i>	<i>By-product reported</i>	<i>Purpose</i>	<i>Nutritional and functional aspects</i>	<i>References</i>
linked enzyme aggregate				
Linear programming formulation of a dairy drink made of cocoa, coffee, and orange by-products	Tegument	Develop enriched dairy beverages using industrial by-products	Polyphenol content, antioxidant activity	(Quijano-aviles et al., 2016)
Optimized preparation and characterization of CLEA-lipase from cocoa pods	Shell	Hydrolytic activity	Across-linked enzymatic greek	(KhanahmadI et al., 2015)
Improving the nutritional quality of cocoa pods ( <i>Theobroma cacao</i> ) through chemical and biological treatments for ruminant feeding: <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> evaluation	Tegument	Improving the nutritional quality of cocoa husk for ruminant feed	Nutritional composition and nutrient digestibility	(Laconi et al., 2015)
Chemical, technological, and <i>in vitro</i> antioxidant properties of cocoa ( <i>Theobroma cacao</i> L.) by-products	Shell and tegument	Dandend the chemical, technological, and antioxidant properties	Food and antioxidant activity	(Martinez et al., 2012)

<i>Title</i>	<i>By-product reported</i>	<i>Purpose</i>	<i>Nutritional and functional aspects</i>	<i>References</i>
Intake, total digestibility, microbial protein production, and the nitrogen balance in ruminant diets based on agricultural and agro-industrial by-products	Tegument	To evaluate the effects of including by-products in the diet of animals	Digestibility of nutrients	(Azevêdo et al., 2011)
Bioactive compounds and antioxidant activity of cocoa hulls ( <i>Theobroma cacao</i> L.) from different origins	Tegument	Characterize the bioactive compound contents of by-products from different geographical origins	Polyphenols and hydrocolloids	(Bruna et al., 2009)
Antioxidant capacity of methanolic and water extracts prepared from food-processing by-products	Tegument	To evaluate the antioxidant capacity, with the purpose of use as a food preservative agent	Antioxidant activity and free radical scavenging activity	(Amin et al., 2006)
Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from <i>Theobroma cacao</i> hulls extracted with supercritical CO <sub>2</sub>	Tegument	Extract phenolic fractions from the by-product using supercritical CO <sub>2</sub>	Antioxidant activity	(Arlorio et al., 2005)
Chemical evaluation of cocoa by-products	Tegument	Chemical evaluation to investigate the use of by-products in animal feed	Chemical composition (mineral content, theobromine, ...)	(Abiola et al., 1991)
Tannin levels and their degree of polymerization and specific activity in some agro-industrial by-products	Tegument	Tannin determination for incorporation into animal feed	Tannins (total phenols, condensed tannins, and protein precipitating capacity)	(Makkar et al., 1990)

As shown in Table 1, the studies mentioned fall within the realms of biological and agricultural sciences, aligning with what was illustrated in Figure 2. It was identified that 51.8% of the studies were centered around assessing the nutritional potential of cocoa by-products, specifically investigating their antioxidant activity.

A study conducted by Souza et al. (2022) assessed the feasibility of using a flour derived from cocoa shells and almonds as a substitute for wheat flour in the preparation of chocolate cakes. The results indicated that it is possible to replace up to 75% of wheat flour with cocoa shell flour without compromising the product's acceptability.

By employing cocoa bean shells and teguments ground differentially in the development of a functional beverage, Rojo-Poveda et al. (2019) evaluated the antidiabetic activity of this beverage, demonstrating promising potential in inhibiting a key enzyme in glucose metabolism. However, the beverage's acceptability was impacted by its taste, possibly due to the presence of methylxanthines and polyphenols.

Lastly, Mariatti et al. (2021) explored technologies for extracting nutritional compounds from cocoa by-products, unveiling a composition rich in proteins, lipids, dietary fibers, and polyphenols. These compounds hold promising applications, particularly in the functional food and beverage industry, which is currently a growing market valued at over 1.28 billion dollars.

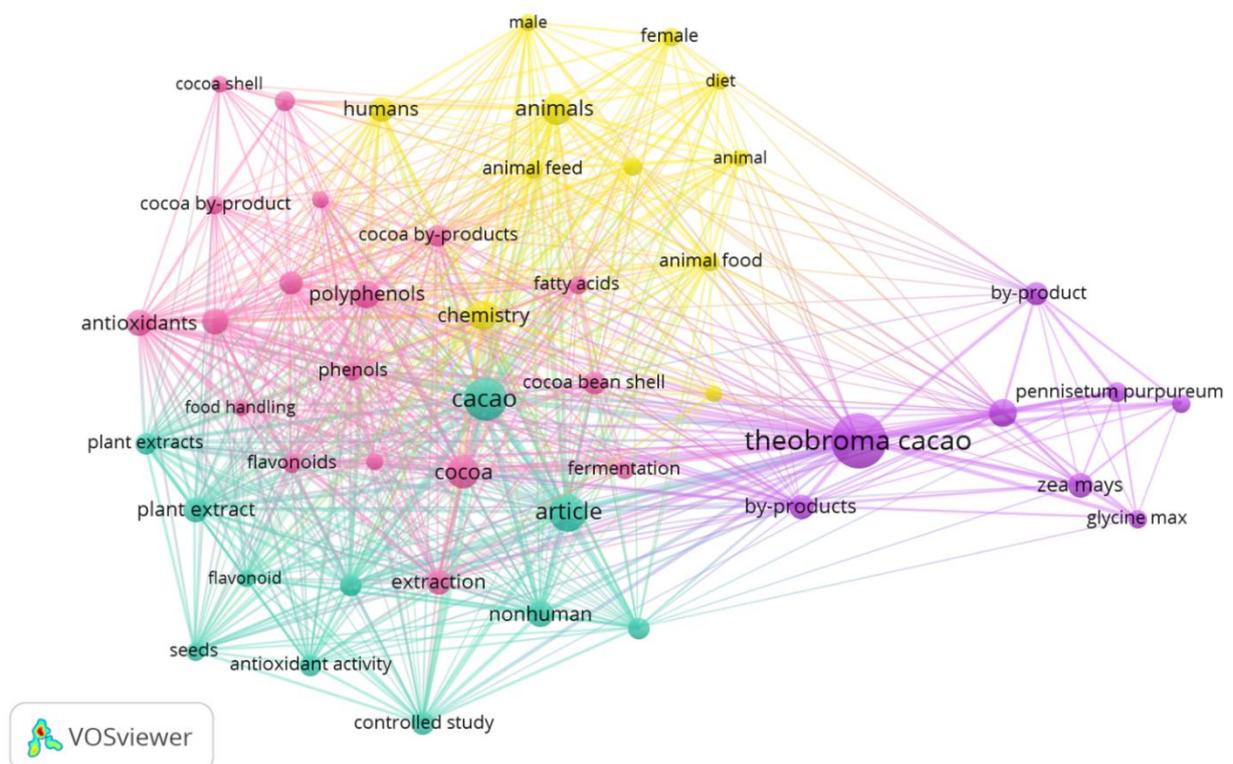
The possible applications of cocoa bean husks/teguments were analyzed in a review by Balentic et al. (2018). They discussed potential applications of this by-product in different areas, with emphasis on the food area, where the development of extracts containing total phenols (14 mg/g), theobromine (10 mg/g), caffeine (4.21 mg/g) and catechin (1.02 mg/g) can be used in various food matrices, such as snacks.

Over the years, several studies have demonstrated the incorporation of dietary fiber as a new ingredient into various food matrices, thereby improving their properties. In addition to the numerous health benefits, fiber eases satiety, making it a promising product for reducing portions, especially in animal foods. Several by-products, such as cocoa pod shells, have excellent levels of dietary fiber and can be used as food ingredients. They are also rich in minerals such as potassium, magnesium, phosphorus,

and calcium, have a high soluble pectin content, and are sources of hydrolase enzymes. Studies on dietary fiber's techno-functional properties have recently demonstrated its ability to retain water and its potential as a substitute for emulsifiers (Delgado-ospina et al., 2021).

### 3.1.2 Co-occurrence analysis

This analysis concentrated on the relationships between keywords in the investigated articles (Figure 4). The co-occurrence matrices form rows and columns, and their intersection represents a co-occurrence. This analysis aims to verify the bibliographic potential of scientific articles or research literature, which has become increasingly studied in recent years (Zhou et al., 2022). This analysis has become an effective statistical method for analyzing the associations among many variables, aiding in understanding scientific patterns and trends.



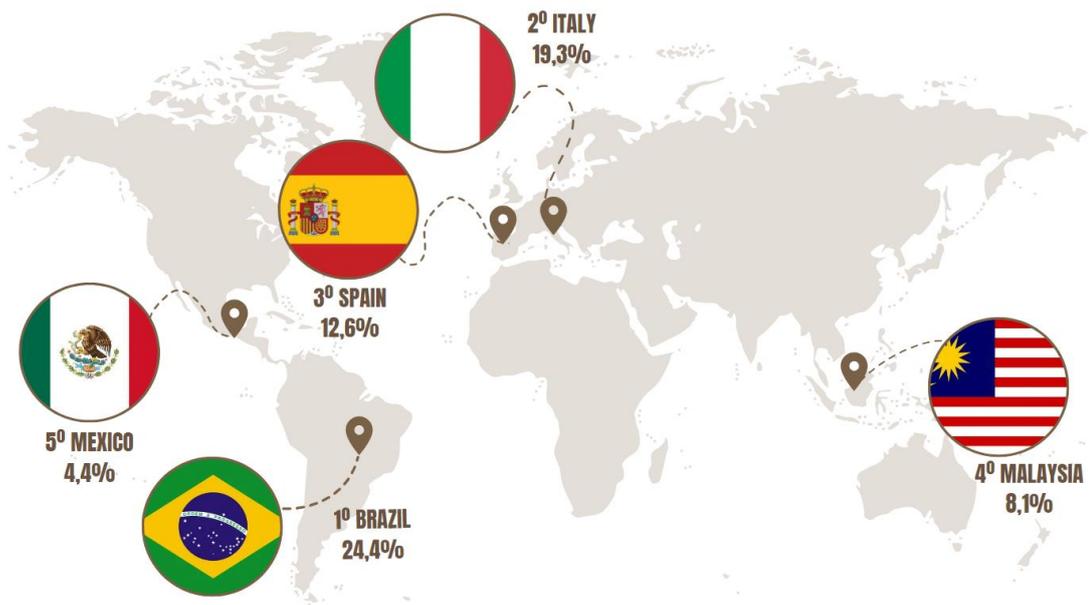
**Figure 4.** Analysis of co-occurrence of keywords in articles that address cocoa by-products.

The similarities identified in this analysis were subdivided into four clusters, the first (pink), the second (yellow), the third (green), and the fourth (lilac) (Figure 4). In the first, the terms with the greatest similarity were antioxidants, polyphenols, flavonoids, fatty acids, food handling, and fermentation. The second category included animals, animal feed, diet, and chemistry. The third evaluated cocoa, antioxidant activity, plant extracts, flavonoids, seeds, and a controlled study. In the fourth, *Theobroma cacao* and by-product had the highest occurrence.

The data revealed is of great importance in understanding the trends in studies on the main aspects of cocoa by-products, showing that the main contents addressed in the analyzed articles were nutritional, biofunctional, chemical composition, food industry, food handling, agrarian sector, development of feeds and products for the agricultural sector, highlighting the scientific name of the fruit on which this study is based, demonstrating how the data evidenced in this analysis are connected, further strengthening them.

### *3.1.3 Country of Origin*

Brazil was the most frequently reported country, followed by Italy, Spain, Malaysia, and Mexico. Ruguengo et al. (2022) highlighted similar findings in countries that most addressed the valuable components of industrial by-products in publications, including Brazil, Spain, and Italy (Figure 5).



**Figure 5.** Territorial distribution of the five countries most discussed using cocoa by-products in Scopus, Web of Science, and Medline/PubMed scientific databases.

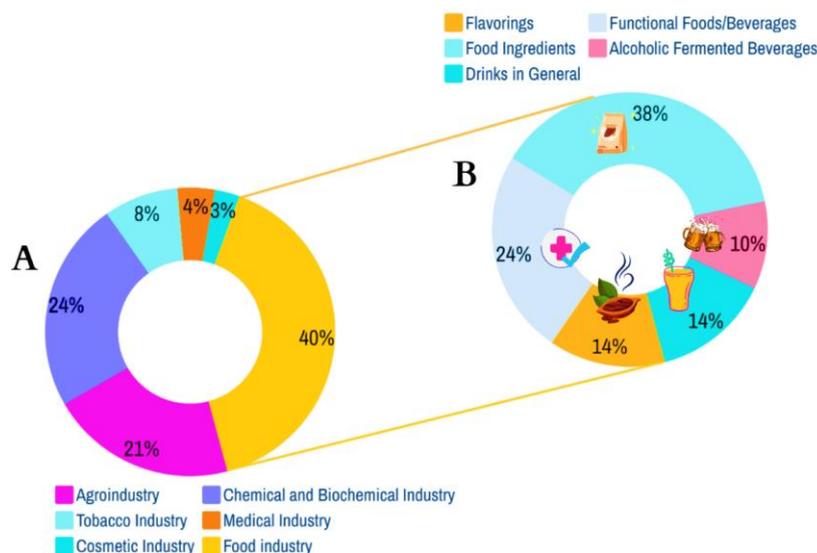
This is possibly owing to Brazil being one of the seven main cocoa-producing countries, with its production being well established, with good industrialization capacity and diversity in factories for its derivatives, such as chocolate (Guirlanda et al., 2021).

Furthermore, the Executive Committee of the Cocoa Farming Plan (Ceplac), an institution linked to the Ministry of Agriculture, is an international authority in promoting cocoa cultivation in Brazil. For over 60 years, Ceplac has encouraged urban and economic development in southern Bahia and other states with units such as Pará, Amazonas, Rondônia, and Espírito Santo. Over the years, many projects have been developed by Ceplac. This has driven advances in the production and consumption of cocoa in the country and the development of research in the area (Brasil, 2023).

### *3.2 Patentometric analysis*

### 3.2.1 Application Areas and most reported by-products

The food industry reported the most patent deposits (40%), followed by the chemical and biochemical industries (24%) (figure 6A). Within the food industry, the main approach to using these products is the development of food ingredients (38%) (Figure 6B), followed by functional foods and beverages (24%).



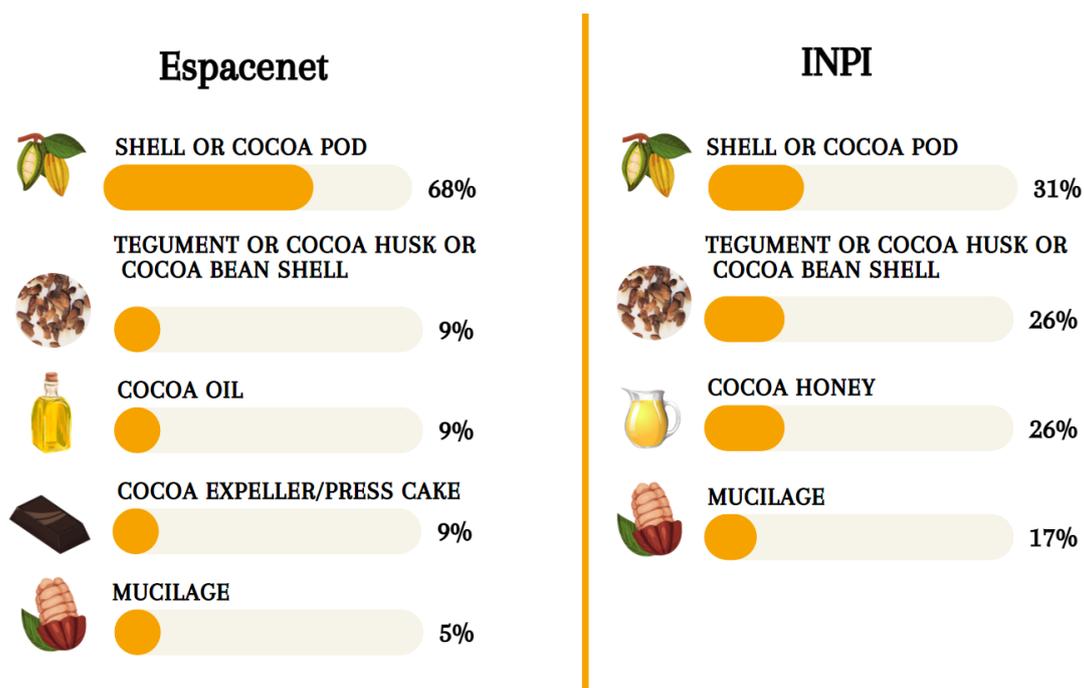
**Figure 6.** Distribution of application areas (A) and focus on food industry (B) patent documents regarding the use of cocoa by-products found in the Espacenet and INPI databases.

The composition of the cocoa bean shell has inspired the development of scientific articles. It has aroused interest in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries, mainly owing to its biological properties and because it is a natural and low-cost ingredient. Valuing this by-product, in addition to guaranteeing economic benefits through developing new products, generates environmental benefits. Thus, it reduces waste streams, which are often inappropriate and cause damage to the soil (Pagliari et al., 2022).

A highlight in the development of cocoa by-product food ingredients is the 2010 patent document US2010285186A1, which describes a manufacturing process for sugar-containing desired levels of phytochemicals by incorporating by-products such as cocoa

husk/tegument. The 1931 patent document GB341000A aimed to develop an economical process for extracting fats and alkaloids from cocoa by-products to improve commercial viability. Regarding developing products with functional applications, the 2009 patent document ES2329862A1 described a prebiotic product with high concentrations of soluble fibers by applying fast and sustainable techniques, using water as a pressurizing fluid to raise fiber levels effectively.

In recent years, industrial and scientific technology sectors have been betting on developing new technologies that take advantage of the nutritional potential of cocoa by-products. Thus, they seek to meet consumer demands and mitigate the environmental impacts of the inappropriate disposal of these products (Mariatti et al., 2021). For effective planning and technological development, clarifying the panorama of by-product use is necessary. The shell, also known as the cocoa pod, is the most highlighted by-product of Espacenet. An INPI search verified that tegument and honey were well represented in 26% of reports (Figure 7).



**Figure 7.** Most reported by-products.

The classification of cocoa by-products is of utmost importance given the scenario in which many of these by-products, resulting from fruit processing, are frequently discarded in landfills without receiving proper commercial valorization. Therefore, it is crucial to emphasize that over time, both the pulp, essential for cocoa honey production, and the honey itself, have demonstrated significant market value, supported by scientific research and specialized publications, as well as culinary applications. A search on the Google search engine in Brazil (<https://www.google.com/>) shows that the price of a liter of cocoa honey in December 2023 reached R\$83.00. Therefore, the transformation of cocoa honey from a by-product to an item with added commercial value, such as nibs and cocoa butter, designated as cocoa derivatives, represents recognition of the fundamental role these products play in the commercial appreciation of cocoa.

Agricultural by-products, such as the tegument, have been gaining importance, mainly due to the decline of natural resources and serious environmental problems that arise over time. Its production is estimated to be always significant considering the global production of cocoa, where the weight of this by-product represents 12%–20% of the cocoa seed (Okiyama et al., 2017). It is important to understand the technologies that involve the use of these compounds. Listed in order of relevance, Table 2 summarizes some of the main patent documents mentioning cocoa husk and seed coats in the Espacenet and INPI databases.

**Table 2.** Main patent documents mentioning cocoa shell and tegument in the Espacenet and INPI databases.

<i>Title</i>	<i>By-product reported</i>	<i>Purpose</i>	<i>Nutritional and functional composition</i>	<i>Year</i>	<i>Application number</i>
<b><i>Espacenet</i></b>					
Functional food production process	Tegument	Production of a functional food	Proteins, polysaccharides, antioxidants, and low in caffeine	2018	US20192309 57A1
Sugar and their food product manufacturing processes	Shell	Sugar manufacturing process	Phytochemicals	2008	US20102851 86A1
Procedure for obtaining a prebiotic product with a high content of soluble fiber said product, and its applications	Tegument	Development of a prebiotic product	High soluble fiber content	2008	ES2329862 A1
Material having increased cholesterol level suppressive activity and decreased HDL-cholesterol level suppressive activity and health foods/beverages containing the same	Tegument	HDL-cholesterol suppressing material	Hemicellulose	1992	JPH0698718 A
The recovery process of valuable products from cocoa by-products	Tegument	Recovery of fats and alkaloids	Fats and alkaloids	1929	GB341000A
Treatment of by-products from the cocoa and chocolate industries	Tegument	Recovery of fats and alkaloids	Fats and alkaloids	1927	US1855026 A
<b><i>INPI</i></b>					
Nutraceutical composition comprising limonene and cocoa fiber dry extract for treating obesity	Tegument	Development of nutraceutical composition	Limonene and Dry Fiber Extract	2021	BR 11 2022 024639 0 A2
Cocoa almond skin nano cellulose processes and production	Tegument	Nanocellulose extraction	Nanocellulose	2020	BR 10 2020 003432 4 A2
Ellagic acid production from cocoa hulls	Shell	Ellagic acid extraction	Ellagic acid	2018	BR 10 2018 075867 5 A2
Production of citric	Shell	Citric acid extraction	Citric acid	2018	BR 10 2018 075866 7 A2

<i>Title</i>	<i>By-product reported</i>	<i>Purpose</i>	<i>Nutritional and functional composition</i>	<i>Year</i>	<i>Application number</i>
acid from cocoa hulls					
Method of production of hemicellulosichydrolyzate from cocoa fruit peels	Shell	Production of hemicellulosic hydrolyzate	Hemicellulosic	2017	BR 10 2017 005942 1 A2
Process for manufacturing a composition enriched with theobromine and a composition enriched with polyphenol from cocoa hulls, and a composition enriched with polyphenol	Shell	Enriched compost manufacturing	Theobromine and Polyphenol	2006	PI 0601933-1 A2
The manufacturing process of glucosyltransferase inhibitors from cocoa seed husks.	Tegument	Manufacture of inhibitors	Glycosyltransferase	1999	PI 9913231-1 B1

Source: Own authorship (2023).

A relationship between the patent documents presented here and the application areas regarding food ingredients and functional foods or beverages can be observed. Most patent documents describe the recovery or development of ingredients or food products rich in nutritional compounds or with beneficial effects on health.

Technologies with beneficial effects on health can also be observed, such as the development of foods with high protein content, polysaccharides, antioxidants, and low caffeine content (US2019230957A1). Regarding the development of nutritionally enriched compounds, a Brazilian patent document (PI 0601933-1 A2) described the composition of nutritional compounds from the cocoa husk/tegument. It is also possible to identify the use of these compounds in technological applications with health effects, such as the development of materials that suppress cholesterol levels (JPH0698718A). These data present great caution in the technology sector because, in addition to the use

of these by-products in the food industry, there are concerns about the use of the constituents of these products regarding their beneficial health effects.

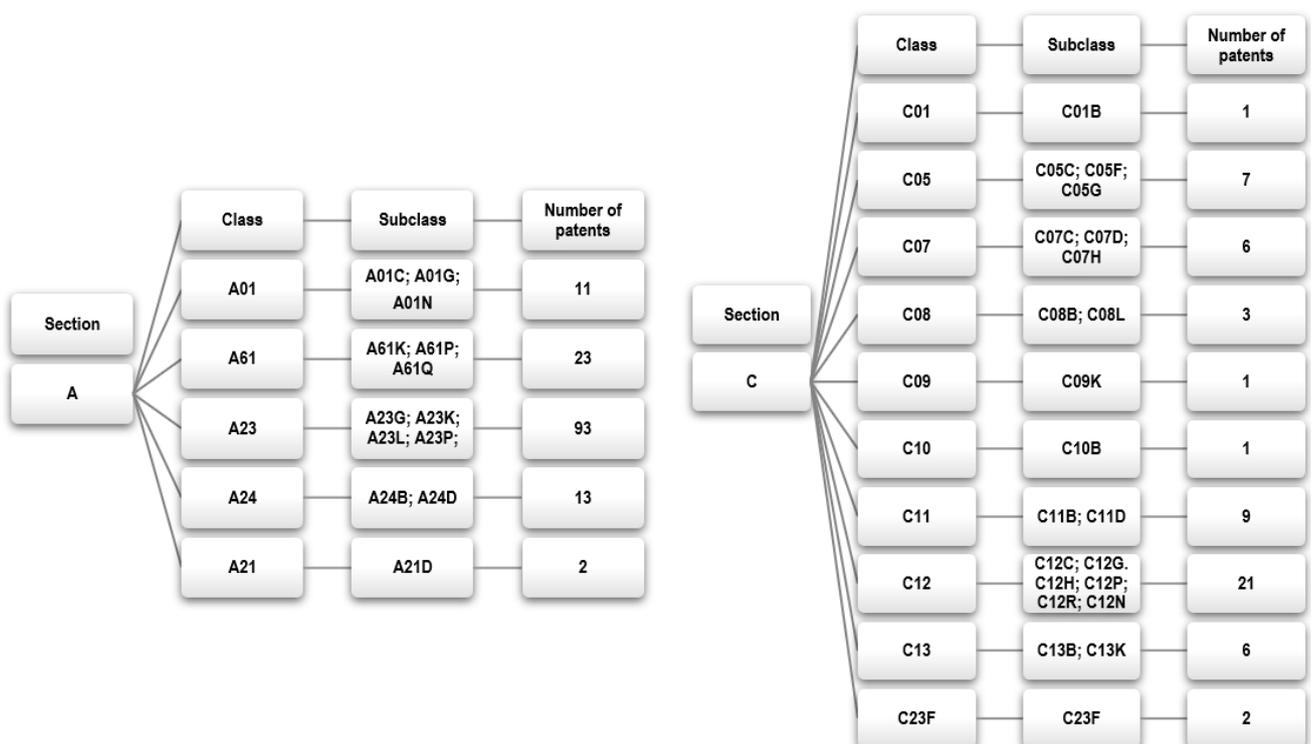
The cocoa tegument is one of the main by-products of the cocoa and chocolate industries. Unlike other by-products, it is exported with cocoa beans and discarded at processing sites. Although not part of chocolate formulations, it has sensory and nutritional properties similar to cocoa, including catechin polyphenols, epicatechins, and procyanidins (Rojo-poveda et al., 2020b). These similarities have increased its use by companies and the academic community to elucidate its applications and potential further.

Increasingly, technological and scientific research has intensified to verify the potential of cocoa husk/tegument as a food additive or a vitamin supplement owing to its high nutritional content and low cost (Okiyama et al., 2017). Over the years, remodeling the food chain through sustainable and efficient approaches has become necessary. Thus, understanding and valuing food by-products through their use and adding value has become increasingly necessary. With the increasing demand for food, these products are increasingly being investigated, mainly due to their nutritional diversity ready to be exploited. In addition, the by-products have a low risk of toxicity and are highly accepted by consumers (Rebollo-hernanz et al., 2021).

### 3.2.2 *International Patent Classification (IPC) codes*

Patent filings qualify in terms of usefulness, novelty, and obviousness. The actions of experts are necessary to achieve such qualifications. Patent institutions correlate applications using a standard hierarchy. The most widely used classification is the IPC, a standardized taxonomy organized into levels. In this type of classification, the highest level is the section, followed by the class and subclass, and subclasses, groups, and subgroups (Oryehun et al., 2021).

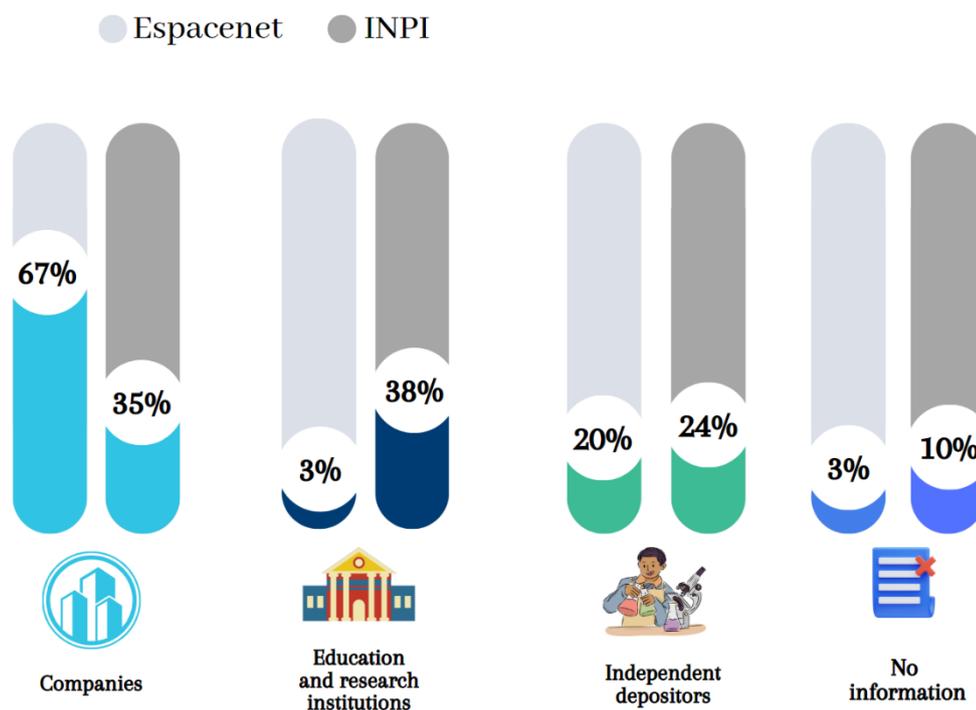
Collecting data from the technical analysis made it possible to determine the most reported codes among the patent filings. Section A is the most frequently reported among the codes and addresses human needs, including agriculture, food products, tobacco, personal or domestic items, and health. Class A23, which addresses food or foodstuffs and their treatments, and the subclasses A23G, A23K, A23L, and A23P, had the highest percentages. The A23G subclass deals with cocoa, its products, and its derivatives. The most reported subsequent sections were C, chemical, and metallurgical, followed by B, processing operations. The results obtained from the analysis of the IPC codes in relation to cocoa by-products corroborate the findings of the analysis of the application areas (Figure 8).



**Figure 8.** Profile of the most-used IPC codes in patent documents on using cocoa by-products found in the Espacenet and INPI databases.

### 3.2.3 Holders

On Espacenet, it is possible to identify that companies led the deposits with 67%, followed by independent depositors (20%) and education and research institutes (3%) (Figure 9). In contrast, educational institutes, research institutes, and companies showed greater ownership of patent documents deposited in the INPI (38% and 35%, respectively).



**Figure 9.** Holders of patent documents on the use of cocoa by-products found in the Espacenet and INPI databases.

Upon review of the patent documents of the education and research institutes found at the INPI, it was noticed that the State University of Santa Cruz, located in the city of Ilhéus in the southern region of Bahia, and the National Service of Industrial Learning/Bahia stood out with three patent deposits each, and the University Federal da Bahia, with two patent documents. Among these approaches is the development of products from compounds present or extracted from cocoa by-products

(BR1020200256300A2), the production of beverages (BR1020190084740A2), and powders developed from the use of these by-products (BR102019008531A2).

Of the companies that deposited patent documents in Brazil using cocoa by-products, 92% were foreign, such as the American Intercontinental Great Brands LLC (2), which focuses on manufacturing and supplying food products. Its patent documents focus on developing food products using cocoa by-products in their compositions (BR1120230015189A2; PI0906115-0B1). Kraft Foods R & D, INC, is one of the world's largest companies in the field of food products, with documents of American (1) and German (2) origin, technologies developed in processes for grinding the seed husk of cocoa (PI 0602300-2A2), and the development of enriched products through the composition of by-products (PI0601933-1A2; PI 0904395-0A2).

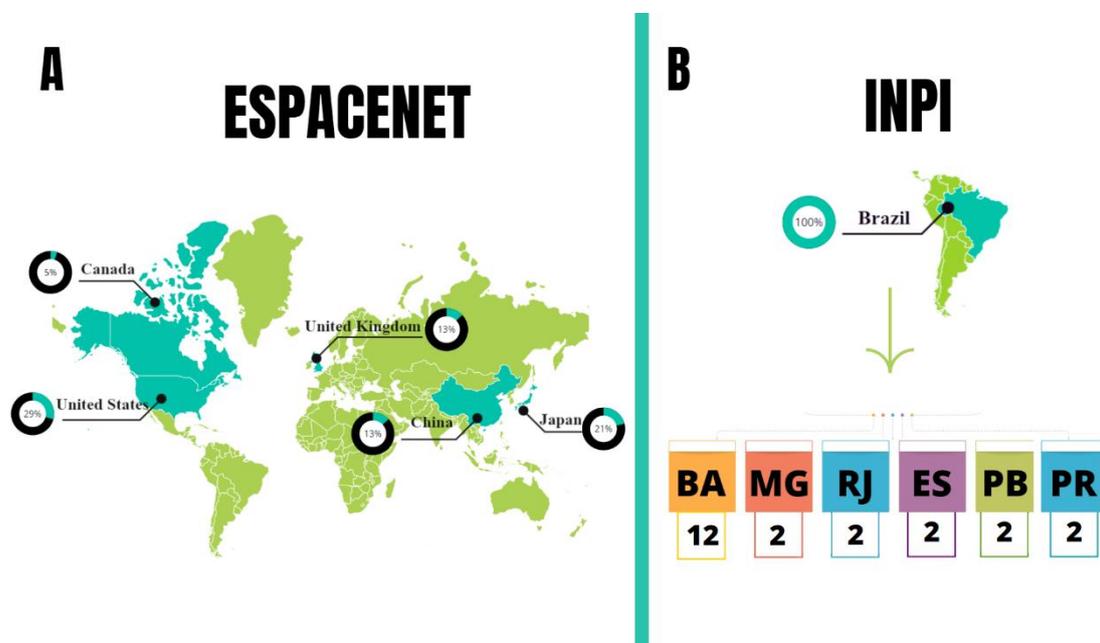
In the business sector, one of the considerations for starting a business is the existence of a potential market. In addition, issues that can contribute to an increase in the number of organizations operating in each sector are the amount of scientific production, patent activity in the area, the presence of venture capital companies with an interest in the sector, and human capital, that is, the availability of people with the right skills and motivation (Van wilgenburg et al., 2019). In this study, the companies described in the Espacenet database confirmed these data.

Although the results of the present study demonstrated that academic institutions filed most patents with the INPI, some obstacles were evident. Interest in cocoa beans has become an obstacle to popularizing technologies with these alternative matrices. Furthermore, the complexities and costs of the patent system may discourage some researchers from seeking intellectual property protection; limited funding may be a sticking point, and bridging the gap between basic research and commercial applications is a constant challenge (Dunn and Kennedy, 2019).

Cocoa and chocolate trade transactions were recorded and estimated at USD 46.61 billion in 2021, forecasted to grow by 2029 to USD 67.88 billion. The COVID-19 pandemic has hurt the expected demand in the sector. However, the market has shown progressive growth following the consolidated global trajectory of chocolate confections. A significant increase in the share of global mills has led to the consumption of cocoa-derived ingredients (Fortune Business Insights, 2022).

### 3.2.4 Origin Country

A search carried out in Espacenet found that the United States was the most prominent country (29%), followed by Japan (21%). Regarding the data obtained from the national database INPI, all documents analyzed that addressed the use of cocoa by-products were from Brazilian deposits. These data were predicted because the institution is responsible for Brazilian technological property concessions (Figure 10).



**Figure 10.** Territorial distribution of patent documents in Espacenet and INPI databases.

BA: Bahia; MG: Minas Gerais; RJ: Rio de Janeiro; ES: Espírito Santo; PB: Paraíba; PR: Paraná. It was not possible to determine the state of origin of some INPI patent documents.

The United States of America is one of the main powers of the global agricultural system, as well as they are responsible for innovations in the agrotechnological sector. Although it presents major limitations involving environmental, demographic, and economic aspects, mainly owing to the reduction in the labor force and aging of the population, the USA protects its technologies by filing patent documents (Veeck et al., 2020). Furthermore, it had one of the highest concentrations of cocoa. However, it does not have fruit-producing regions. Therefore, it is important to develop alternatives that exploit the full potential of the by-products generated during these processes.

Brazil is the seventh largest cocoa producer worldwide, with the largest plantations in the northern and northeastern regions. Northeast Brazil has the highest cocoa export rate; in 2020, it exported an average of 44,000 tons of cocoa and its products, amounting to approximately USD 184 million. Bahia accounts for almost 100% of cocoa exports; its products amount to approximately 44,600 tons (Brainer, 2021). This state also has Brazil's most patent documents on cocoa by-products. The southern part of Bahia and the northern part of Espírito Santo are the Brazilian regions that predominate the cocoa cultivation system in a consortium with a native forest called *cabruca*. In this cultivation method, cocoa plantations, unlike other plantations, favor preserving natural resources such as springs, part of the forest, and native trees. Southern Bahia has a cocoa plantation of approximately 250,000 ha in the *cabruca* format (Rodrigues et al., 2021).

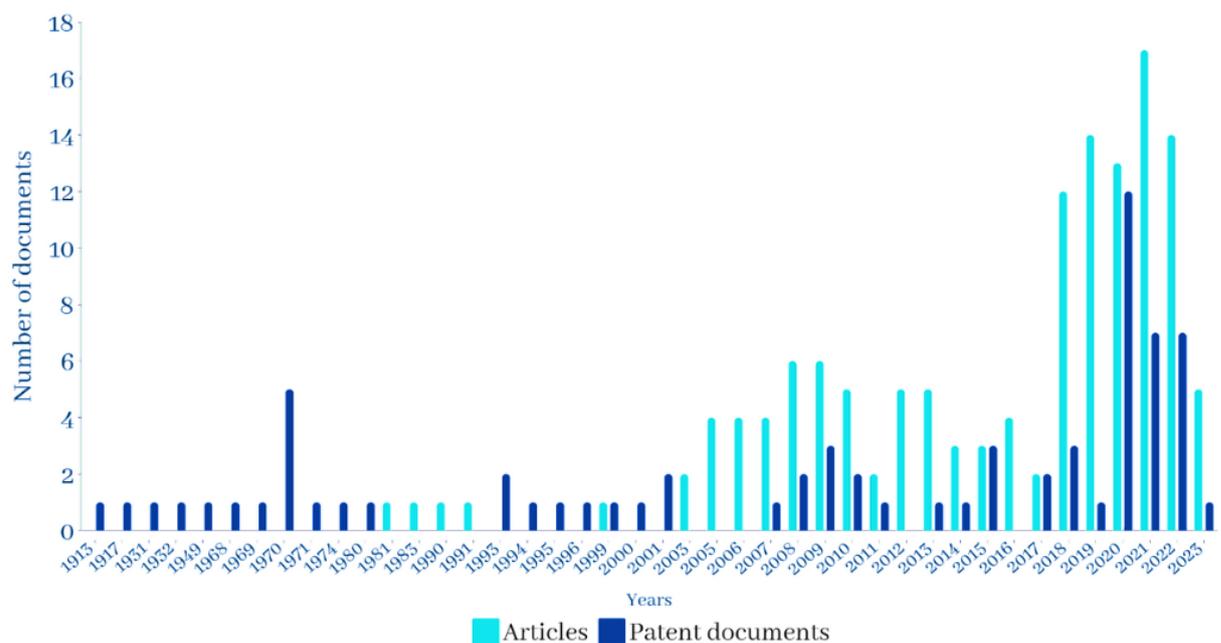
Developing new products from industrial by-products for different applications has received considerable attention in recent years. Therefore, industrialized countries seek strategic alternatives for their use and to add value to their products (Rojo-poveda et al., 2020c). The data presented here are relevant for understanding the global perception of cocoa's production and industrialization process and, consequently, its by-products.

Exports of these raw materials have reached \$47 billion worldwide (Vandenberghe et al., 2022).

## 4. Scientific and patentometric analysis

### 4.1 Annual evaluation of articles and patent documents

With the analysis performed, it was possible to identify the first scientific study using cocoa by-products, dated 1981 (composition of cocoa husk fat related to cocoa butter), by El-Saied, Mursi, and Amer. This study aimed to determine the composition of the fat in the cocoa shell in relation to cocoa butter (El-Saied; Mursi and Amer, 1981). An increase in publications can be seen from 2005 (four publications), and scientists have been improving technologies to produce cocoa products for different industries, especially the food and pharmaceutical industries (Vásquez et al., 2019). A variable growth profile was observed until 2008 (6 publications), peaking in 2021 (17 publications) (Figure 11).



**Figure 11.** Annual evaluation of publications and patent documents and the use of cocoa by-products.

When performing the technical analysis, it was possible to identify that since 1913, there have been patent documents regarding cocoa by-product uses. The application of this invention refers to an elaborate process for preparing cocoa and its by-products and obtaining improved percentages of fat (GB191308805A). However, the increase was only noticeable from 2001, with two patent documents filed, but this was not linear in all years, since in 2012 and 2016, no documents were deposited. There was a peak in patents filed in 2020 (12 patent documents filed).

When comparing the scientific and technological publications from 2003 to 2014, many publications were identified concerning patent documents (50 publications, 11 patents). In 2015 and 2017, the findings were similar (three and two publications and two patent documents). In 2018, 2019, 2021, and 2022, scientific submissions more than doubled in patent documents (57 publications and 18 patent documents); however, in 2020, the data presented were similar (13 publications and 12 patents). Over the years, the number of publications (65.5%) regarding the use of cocoa by-products exceeded that of patent documents (34.4%). Patentable academic discoveries have grown (Rasmussen et al., 2006). However, several issues related to patent deposits must be addressed. The commercialization of these in academic centers and the authors and holders to which this request will be linked (Fini et al., 2010; Lawson, 2013).

The COVID-19 pandemic has resulted in an increasing number of scientific publications over a short period covering several areas of knowledge, such as medicine, sociology, physics, and the environment, and can act individually and multidisciplinary (Carvalho et al., 2020).

A decrease in patent applications by 2023 may reflect the confidentiality period required in the patenting phase. There is a confidentiality period of 18 months for patents (counted from the filing date) and a time interval for documents to be indexed in the database (Oliveira et al., 2021).

Given the results shown, it is possible to observe the potential applications of cocoa by-products in poorly investigated areas, such as medicine, cosmetics, and microbiology. Applying these alternative matrices in developing new studies and technologies will make the current cocoa production scenario more sustainable and valuable.

## **5. Conclusions and future perspectives**

This study represents a comprehensive analysis of cocoa by-products, encompassing both scientific studies and patents, with a focus on their applications in the food industry. This pioneering review in this context outlines the prospects for innovation and technological development in this emerging field. The main application areas identified through scientific and technological foresight include agricultural and biological sciences, with a particular emphasis on the food industry. The most prominent section of the IPC (International Patent Classification) code associated with these by-products was A23, related to food and its processing. Cocoa shells and husks emerge as the most frequently explored by-products in both scientific literature and patents. The co-occurrence analysis reveals notable bibliographic similarities among the investigated documents, highlighting themes related to biofunctional aspects, chemical composition, and applications in agribusiness and similar products. The nations leading in terms of scientific knowledge production in this field are Brazil and Italy, while the United States and Japan excel in generating patent documents on Espacenet. Companies are the primary

patent holders on Espacenet, while educational and research institutes dominate the landscape in INPI. The term "cocoa by-products" suggests significant growth potential in the sector, as evidenced by the consistent increase in scientific publications and patents over the years, indicating promising technological prospects.

In the context of future perspectives, it is anticipated that this field of study will expand to the development of innovative, economically viable, and sustainable food products that harness the substantial nutritional potential of cocoa by-products. This study serves as a crucial starting point for researchers and companies seeking to explore and enhance this technology across various domains, particularly in the food industry. Furthermore, promoting the development of research and technologies related to cocoa by-products is essential to foster a circular and sustainable economy, aligning with the global trend of optimizing resource utilization and reducing food waste.

### **Acknowledgments**

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES), Finance Code 001 (CAPES/Brazil, Process no. 88887.664101/2022-00).

### **Funding**

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq/Brazil, Process n. 409924/2021-0). C. D. Ferreira Ribeiro thanks CNPq/Brazil for her productive scholarship on technological development and innovative extension (Process n. 303587/2021-0).

### **Authors' contributions**

L.M.S. wrote the original draft and was responsible for methodology, formal analysis, writing, reviewing, and editing. J.C.A. contributed to writing, reviewing, and editing. V.L.S. contributed to methodology, writing, review, and editing; J.C.A., I.S.A.S., and I.P.P.S. contributed to methodology; C.D.F.R. was responsible for the conceptualization, supervision, writing of the original draft, reviewing, and editing. M.N.R. also conceptualized, supervised, reviewed, and edited the manuscript.

### **Disclosure statement**

The authors report no potential conflicts of interest.

### **ORCID:**

Lívia de Matos Santos: <https://orcid.org/0000-0003-4394-8646>

Janaína de Carvalho Alves: <https://orcid.org/0000-0001-9684-8556>

Vanessa de Lima Silva: <https://orcid.org/0000-0002-1562-1761>

Isadora Santana Araújo da Silva: <https://orcid.org/0009-0008-1020-576X>

Isabelle Palma Patrício Santos: <https://orcid.org/0009-0000-0495-2402>

Camila Duarte Ferreira Ribeiro: <https://orcid.org/0000-0003-2968-5739>

Mariana Nougalli Roselino: <https://orcid.org/0000-0002-4831-985X>

### **References**

- Abiola S.S., & Tewe O.O. (1991). Chemical evaluation of cocoa by-products. *Tropical Agriculture*, 68, 335-336.
- Alves, T.V.G., da Costa, R.S., Gomes, A.T.A., da Costa, C.E.F., Perego, P., Silva, J.O.C., Converti, A., & Costa, R.M.R. (2018). Quality control of Amazonian cocoa (*Theobroma cacao* L.) by-products and microencapsulated extract by thermal analysis. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 134, 993–1000. <https://doi.org/10.1007/s10973-018-7300-1> .

- Amin, I., & Mukhrizah, O. (2006). Antioxidant capacity of methanolic and water extracts prepared from food-processing by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 778–784. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2414> .
- Anton M. P. R., & C. I. Mateos-Aparicio. 2008. Procedure for obtaining a prebiotic product with a high content of soluble fiber, said product and its applications. ES2329862A1, filed February 22, 2008, and issued December 1, 2009.
- Arlorio, M., Coisson, J. D., Travaglia, F., Varsaldi, F., Miglio, G., Lombardi, G., & Martelli, A. (2005). Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO<sub>2</sub>. *Food Research International*, 38, 1009–1014. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.03.012> .
- Arun, K.B., Madhavan, A., Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A., Reshmy, R. & Sirohi, R. (2020). Remodeling agro-industrial and food wastes into value-added bioactive and biopolymers. *Industrial Crops & Products*, 154 (Jun 2020). 10.1016/j.indcrop.2020.112621 .
- Azevêdo J.A.G., Valadares Filho S.C., Pina D.S., Valadares R.F.D., Detmann E., Paulino M.F., Diniz L.L., & Fernandes H.J. (2011). Intake, total digestibility, microbial protein production, and the nitrogen balance in ruminant diets based on agricultural and agro-industrial byproducts. *Brazilian Archive of Veterinary Medicine and Animal Science*, 63, 114-123. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352011000100018> .
- Azizah, A., H., Ruslawati, N., M., N., & Tee, T., S. (1999). Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products). *Food Chemistry*, 64 (February 1999). 10.1016/S0308-8146(98)00121-6.
- Bradbury A., & G. Kopp. 2006. Process for manufacturing a composition enriched with theobromine and a composition enriched with polyphenol from cocoa huns and composition enriched with polyphenol. PI 0601933-1 A2, filed May 29, 2006, and issued January 09, 2007.
- Brainer, M.S.C.P. (Jan. 2021). Cocoa production [Electronic Version]. Caderno Setorial Etene. Accessed September 1, 2022 from [https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/650/3/2021\\_CDS\\_149.pdf](https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/650/3/2021_CDS_149.pdf).
- Brandstetter, B., Hofsaess, P., Pfeifer, J., Eibel, H. & Chronopoulos, D. (2009). Alimento lácteo acidificado e processo para a fabricação de um alimento lácteo acidificado. PI 0906115-0 B1, filed October 07, 2009, and issued May 31, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária (2023). Cocoa from Seed to Chocolate. [Electronic Version]. Accessed April 29, 2023 from <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/cacau>.

- Bruna, C., Eichholz, I., Rohn, S., Kroh, L.W., & Huyskens-Keil, S. (2009). Bioactive compounds and antioxidant activity of cocoa hulls (*Theobroma cacao* L.) From different origins. *Journal Of Applied Botany And Food Quality*, 83, 9-13.
- Cádiz-Gurrea, M., L., Fernández-Ochoa, Á., Leyva-Jiménez, F., J., Guerrero-Muñoz, N., Villegas-Aguilar, M., D., C., Pimentel-Moral, S., Ramos-Escudero, F. & Segura-Carretero, A. LC-MS and Spectrophotometric Approaches for Evaluation of Bioactive Compounds from Peru Cocoa By-Products for Commercial Applications. *Molecules*. (2020 Jul 11) ;25(14):3177. 10.3390/molecules25143177.
- Campos-Vega, R., Neto-Figueroa, K., H. & Oomah, B., D. (2018). Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 81 (November 2018). 10.1016/j.tifs.2018.09.022.
- Carmenza J., G.S. Restrepo, J.A. Echeverri, & G.S. Restrepo. 2018. Functional food production process. US2019230957A1, filled November 2, 2018, and issued August 1, 2019.
- Campione, A., Pauselli, M., Natalello, A., Valenti, B., Pomente, C., Avondo, M., Luciano, G., Caccamo, M., & Morbidini, L. (2021). Inclusion of cocoa by-product in the diet of dairy sheep: Effect on the fatty acid profile of ruminal content and on the composition of milk and cheese. *Animal*, 15. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100243> .
- Carvalho, T., A., Lima, T., M., Melani., V., F., Mendes, M., F., Pereira, L., P., & Marson, F., A., L. (2020). The scientific production during 2009 swine flu pandemic and 2019/2020 COVID-19 pandemic. *Pulmonology*, 26 (November-December 2020). 10.1016/j.pulmoe.2020.07.009.
- Chronopoulos, D. & Zuurbier, R. (2009). Alimento, método para a fabricação de um alimento, e, uso de cascas de cacau alcalinizadas. PI 0904395-0 A2, filled October 07, 2009, and issued November 03, 2010.
- Delgado-Ospina, J., Martuscelli, M., Grande-Tovar, C., D., Lucas-González, R., Molina-Hernandez., J., B., Viuda-Martos, M., Fernández-Lopez, J. & Pérez-Álvarez, J., A., Chaves-López, C. (2021). Cacao pod husk flour as an ingredient for reformulating frankfurters: effects on quality properties. *Foods*, (May 2021). 10.3390/foods10061243.
- Dimartino, G., Mukherjee, I. & Price, W. (2021). Produtos comestíveis. BR 11 2023 001518 9 A2, filled August 02, 2021, and issued February 14, 2023.
- Dunn, T. J., & Kennedy, M. (2019). Technology Enhanced Learning in higher education; motivations, engagement and academic achievement. *Computers and Education*, 137(April), 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.compedu.2019.04.004> .
- Edwards K. B. 1913. An Improved Process for the Preparation of Cocoa and its By-Products. GB191308805A, filled April 15, 1913, and issued September 18, 1913.

- El-Saied, H.M., Morsi, M.K., & Amer, M.M.A. (1981). Composition of cocoa shell fat as related to cocoa butter. *Zeitschrift Für Ernährungswissenschaft*, 20, 145–151. <https://doi.org/10.1007/bf02021260> .
- European Patent Register (2022). Accessed August 1, 2022, from <https://www.epo.org/>.
- Felice, F., Fabiano, A., De Leo, M., Piras, A. M., Beconcini, D., Cesare, M. M., Braca, A., Zambito, Y., & Di Stefano, R. (2020). Antioxidant Effect of Cocoa By-Product and Cherry Polyphenol Extracts: A Comparative Study. *Antioxidants*, 9. <https://doi.org/10.3390/antiox9020132>.
- Figueiredo, M. R. P., de Teixeira, A. C. B., Bittencourt, L. L., Moreira, G. R., Ribeiro, A. J., da Silva, F. S. G., dos Santos, A. L. P., & da Costa, M. L. L. (2022). Elephant grass silage with addition of regional by-products. *Acta Scientiarum - Animal Sciences*, 44. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v44i1.56616> .
- FORTUNE BUSINESS INSIGHTS (2022). Cocoa and Chocolate Market Size, Share and COVID-19 Impact Analysis, By Type (Cocoa Ingredients (Butter, Liquor, Powder) and Chocolate (Dark, Milk, White, and Filled)), By Application (Food & Beverage, Cosmetics, Pharmaceuticals, and Others), and Regional Forecast, 2022-2029. Accessed April 29, 2022 from <https://www.fortunebusinessinsights.com/amp/industry-reports/cocoa-and-chocolate-market-100075>.
- Fini, R., Lacetera, N., & S., Shane. (2010). Inside or outside the IP system? Business creation in the gym. *Research Policy*, 39(8).1060-1069. 10.1016/j.respol.2010.05.014.
- García-Díez, E., López-Oliva, M., E., Caro-Vadillo, A., Pérez-Vizcaíno, F., Pérez-Jiménez, J., Ramos, S. & Martín, M., A. Supplementation with a Cocoa–Carob Blend, Alone or in Combination with Metformin, Attenuates Diabetic Cardiomyopathy, Cardiac Oxidative Stress and Inflammation in Zucker Diabetic Rats. *Antioxidants (Basel)*. (2022 Feb 21). [10.3390/antiox11020432](https://doi.org/10.3390/antiox11020432).
- Guirlanda, C., P., Silva, G., G. & Takahashi, J., A. (2021). Cocoa honey: Agro-industrial waste or underutilized cocoa by-product? *Future Foods*, 4 (December 2021). 10.1016/j.fufo.2021.100061.
- Hidalgo, I., Ortiz, A., Sanchez-Pardo, M., Garduño-Siciliano, L., Hernández-Ortega, M., Villarreal, F., Meaney, E., Najera, N., & Ceballos, G. M. (2019). Obesity and Cardiovascular Risk Improvement Using Cacao By-Products in a Diet-Induced Obesity Murine Model. *Journal of Medicinal Food*, 22, 567–577. <https://doi.org/10.1089/jmf.2018.0210> .
- Jamaluddin, M., Ross, E. E. R., Azmi, A.F.M.N., Zubir, I., Nazir, N., Inderan, V., & Raseetha, S. (2022). Effect of Extraction Solvents on Phenolic Compounds of *Theobroma Cacao* L. By-products Using Ultrasound-Assisted Extraction. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 12, 359-364. <https://doi.org/10.18517/ijaseit.12.1.13030> .

- Jokić, S., Nastić, N., Vidović, S., Flanjak, I., Aladić, K., & Vladić, J. (2020). An Approach to Value Cocoa Bean By-Product Based on Subcritical Water Extraction and Spray Drying Using Different Carriers. *Sustainability*, 12. <https://doi.org/10.3390/su12062174> .
- Kannar D., C. B. James, & M. O'shea. 2008. Sugar and Other Food Products Manufacturing Process. US2010285186A1, filed October 2, 2008, and issued November 11, 2010.
- Khanahmadi, S., Yusof, F., Amid, A., Mahmud, S., S., & Mahat, M., K. (2015). Optimized preparation and characterization of CLEA-lipase from cocoa pod husk. *Journal of Biotechnology*, 202 (May 2015).10.1016/j.jbiotec.2014.11.015.
- Kopp, G., M., Pearson, S., M. & Shah, M., k. (2006). Processo para moer películas de semente de cacau, e, produto de película de semente de cacau.PI 0602300-2 A2, filled June 16, 2006, and issued February 21, 2007.
- Kumar, V., Sharma, N., Umesh, M., Selvaraj, M., Shehri, B., Chakraborty, P., Duhan, L., Sharma, S., Pasrija, R., Awasthi, M. K., Lakkaboyana, R., Andler, R., Bhatnagar, A. & Maitra, S., S. (2022). Emerging challenges for the agro-industrial food waste utilization: A review on food waste biorefinery. *Bioresource Technology*, 362 (October of 2022) 127-790. 10.1016/j.biortech.2022.127790 .
- Kim D.Y., H.J. Park, H.H. Park, H.S. Kim & I.B. Kwon. 1999. Manufacturing process of glucosyltransferase inhibitors from cocoa seed husk. PI 9913231-1 B1, filled October 13, 1999, and issued June 19, 2001.
- Laconi, E. B., & Jayanegara, A. (2015). Improving Nutritional Quality of Cocoa Pod (*Theobroma cacao*) through Chemical and Biological Treatments for Ruminant Feeding: In vitro and In vivo Evaluation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28, 343–350. <https://doi.org/10.5713/ajas.13.0798> .
- Lawson, C. (2013). Academic inventions outside the university: investigating patent ownership in the UK. *Industry and Innovation*, 20(5), 385–398. <https://doi.org/10.1080/13662716.2013.824191>.
- Leiva, Y., Salvador-Tasayco, E., Yoplac, I. & Zamora-Huamán, S.J. (2022). Effect of feeding cocoa bean byproducts (*Theobroma cacao* L) on productive performance in improved creole chickens. *Livestock Research for Rural Development*, 34.
- León-Flores, P., Nájera, N., Pérez, E., Pardo, B., Jimenez, F., Diaz-Chiguer, D., Villarreal, F., Hidalgo, I., Ceballos, G., & Meaney, E. (2020). Effects of Cacao By-Products and a Modest Weight Loss Intervention on the Concentration of Serum Triglycerides in Overweight Subjects: Proof of Concept. *Journal of Medicinal Food*, 23, 745–749. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0201> .
- Lessa O.A., & M. Franco. 2020. Cocoa almond skin nanocellulose processes and production. BR 10 2020 003432 4 A2, filled February 19, 2020, and issued August 31, 2021.

- Livingston J.W., & M. Luthy. 1927. Treatment of byproducts from the cocoa and chocolate industries. US1855026A, filled August 15, 1927, and issued April 19, 1932.
- Makkar, H. P. S., Singh, B., & Negi, S. S. (1990). Tannin levels and their degree of polymerisation and specific activity in some agro-industrial by-products. *Biological Wastes*, 31, 137–144. [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(90\)90167](https://doi.org/10.1016/0269-7483(90)90167) .
- Mariatti, F., Gunjevic, V., Boffa, L. & Cravotto, G. (2021). Process intensification technologies for the recovery of valuable compounds from cocoabyproducts. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. (2021 Mar); 102601. 10.1016/j.ifset.2021.102601.
- Martínez, R., Meneses, M., A., Figueroa, J., G., Pérez-Álvarez, J., A. & Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) by-products. *Food Research International*, 49 (November 2012). 10.1016/j.foodres.2012.08.005.
- Mazzutti, S., Rodrigues, L. G. G., Mezzomo, N., Venturi, V., & Ferreira, S. R. S. (2018). Integrated green-based processes using supercritical CO<sub>2</sub> and pressurized ethanol applied to recover antioxidant compounds from cocoa (*Theobroma cacao*) bean hulls. *The Journal of Supercritical Fluids*, 135, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.12.039> .
- Muñoz-Almagro, N., Valadez-Carmona, L., Mendiola, J., Ibáñez, E. & Villamiel, M. (2019). Structural characterization of pectin obtained from cacao pod husk. Comparison of conventional and subcritical water extraction. *Carbohydrate Polymers*, 217 (August 2019). 10.1016/j.carbpol.2019.04.040.
- National Institute of Industrial Property (2022). Accessed August 02, 2022 from <https://www.gov.br/inpi/pt-br>
- Nery, T., B., R., Abrantes, M., J., V., Leal, L., I. & Guirlanda, C., P. 2020. Processo de obtenção de um composto alimentar rico em fibras a partir da casca de cacau e produto alimentício produzido deste. BR 10 2020 025630 0 A2, filled December 15, 2020, and issued June 21, 2022.
- Otero, M., D., Mendes, G., R., L., Lucas, A., J., S., L., More, A., C., S. & Ribeiro, C., D., F. (2022). Exploring alternative protein sources: evidence from patents and articles focusing on food markets. *Food Chemistry*. 394 (2022 Nov 15); 133486. 10.1016/j.foodchem.2022.133486.
- Okiyama, D., C., G., Navarro, S., L., B. & Rodrigues, C., E., C. (2017). Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*. 63 (May 2017); 103-112. 10.1016/j.tifs.2017.03.007.
- Oliveira, R., S., Machado, B., A., S., Santos, V., S., Silva, E., N. & UMSZA-GUEZ, M. (2019). Bebida obtida a partir do mel do cacau e respectivo processo de fabricação

- da referida bebida. BR 10 2019 008474 0 A2, filed April 26, 2019, and issued November 03, 2020.
- Oliveira, R., S., Machado, B., A., S., UMSZA-GUEZ, M., Leal, I., L. & Silva, E., L. (2019). Mel de cacau em pó obtido a partir do mel de cacau concentrado e respectivos processos de fabricação do referido mel de cacau concentrado e mel de cacau em pó. BR 10 2019 008531 2 A2, filed April 26, 2019, and issued November 03, 2020.
- Oliveira, T. S., de Lima Silva, V., Assunção, L. S., de Jesus Freitas, T., Machado, B. A. S., Otero, D. M., Nunes, I. L., de Castro Almeida, R. C., Ribeiro, C. D. F., & Druzian, J. I. (2021). A patent data analysis in nanotechnology applied to essential oils. *Recent Patents on Nanotechnology*, 15, 1–15. /10.2174/ 1872210515666210217090541.
- Oryehun, S., T., Angel, J., Majumder, N., Gelbukh, A. & Hussain, A. Leveraging label hierarchy using transfer and multi-task learning A case study on patent classification. *Neurocomputing*. 464(2021 Nov) 421-431. 10.1016/j.neucom.2021.07.057.
- Ota T., N. Osakabe, K. Yamada, Y. Saito, & H. Hidaka. 1992. Material having cholesterol level increasing suppressive activity and hdl-cholesterol level decreasing suppressive activity and health foods/beverages containing the same. JPH0698718A, filed September 18, 1992, and issued April 12, 1994.
- Balentić, P., J., Ačkar, Đ., Jokić, S., Jozinović, A., Babić, J., Miličević, B., Šubarić, D., & Pavlović, N. (2018). Cocoa Shell: A By-Product with Great Potential for Wide Application. *Molecules*, 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23061404> .
- Pagliari, S., Celano, R., Rastrelli, L., Sacco, E., Arlati, F., Labra, M., & Campone, L. (2022). Extraction of methylxanthines by pressurized hot water extraction from cocoa shell by-product as natural source of functional ingredient. *LWT*, 170. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114115> .
- Quijano-Aviles, M.F., Franco-Agurto, G.L., Suárez-Quirumbay, K.B., Barragán-Lucas, A.D., & Manzano-Santana, P.I. (2016). Linear Programming Formulation of a Dairy Drink Made of Cocoa, Coffee and Orange By-Products. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28, 554-559. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2015-09-750> .
- Rasmussen, E., Moen, O. & Gulbrandsen, M. (2006). Initiatives to promote commercialization of university knowledge. *Technovation*. (April 2006). 10.1016/j.technovation.2004.11.005.
- Rebollo-Hernanz, M., Cañas, S., Taladrid, D., Segovia, A., Bartolomé, B., Aguilera, Y. & Martín-Cabrejas, M., A. (2021). Extraction of phenolic compounds from cocoa shell: modeling using response surface methodology and artificial neural networks. *Separation and purification technology*, 270 (September 2021). 10.1016/j.seppur.2021.118779.
- Rodrigues, A.C.G., Muller, M. W., Rodrigues, E. F.G. & Mendes, F.A.T. (2021). Cacao-based agroforestry systems in the Atlantic Forest and Amazon Biomes: An

- ecoregional analysis of land use. *Agricultural Systems*, 194 (December of 2021). 103-270. 10.1016/j.agry.2021.103270.
- Rojo-Poveda O, Barbosa-Pereira L, El Khattabi C, Youl ENH, Bertolino M, Delporte C, Pochet S &Stévigny C. (2020b). Polyphenolic and Methylxanthine Bioaccessibility of Cocoa Bean Shell Functional Biscuits: Metabolomics Approach and Intestinal Permeability through Caco-2 Cell Models. *Antioxidants (Basel)*. (2020 Nov 22) ;9(11):1164. 10.3390/antiox9111164.
- Rojo-Poveda O, Barbosa-Pereira L, Orden D, Stévigny C, Zeppa G & Bertolino M. (2020c). Physical Properties and Consumer Evaluation of Cocoa Bean Shell-Functionalized Biscuits Adapted for Diabetic Consumers by the Replacement of Sucrose with Tagatose. *Foods*. (2020 Jun 21) ;9(6):814. 10.3390/foods9060814.
- Rojo-Poveda, O., Barbosa-Pereira, L., Mateus-Reguengo, L., Bertolino, M., Stévigny, C., &Zeppa, G. (2019). Effects of Particle Size and Extraction Methods on Cocoa Bean Shell Functional Beverage. *Nutrients*, 11. <https://doi.org/10.3390/nu11040867> .
- Rojo-Poveda O, Barbosa-Pereira L, Zeppa G &Stévigny C. (2020a). Cocoa Bean Shell- A By-Product with Nutritional Properties and Biofunctional Potential. *Nutrients*. (2020 Apr 17) ;12(4):1123. 10.3390/nu12041123.
- Ruguengo, L., M., Salgaço, M., K., Sivieri, K. &Maróstica Júnior, M., R.( 2022).Agro-industrial by-products: valuable sources of bioactive compounds. *Food Research International*. (February 2022); 10.1016/j.foodres.2021.110871.
1929. Recovery process of valuable products from cocoa byproducts. GB341000A, filed October 7, 1929, and issued January 7, 1931.
- Santana N.B., & J.C.T. Dias. 2017. Method of production of hemicellulosichydrolyzate from cocoa fruits peels. BR 10 2017 005942 1 A2, filed March 13, 2017, and issued October 30, 2018.
- Siow, C., S., Wei, E., Wong, C., C., W. & Wai-Ng, C. (2022). Antioxidant and sensory evaluation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) tea formulated with cocoa bean hull of different origins. *Future Foods*, 5 (June 2022). 10.1016/j.fufo.2021.100108.
- Soares, T. F., & Oliveira, M. B. P. P. (2022). Cocoa By-Products: Characterization of Bioactive Compounds and Beneficial Health Effects. *Molecules*, 27. <https://doi.org/10.3390/molecules27051625> .
- Soccol C.R., L.P.S. Vandenberghe, & P.Z. de Oliveira. 2018. Elagic acid production from cocoa hull. BR 10 2018 075867 5 A2, filed December 13, 2018 and issued June 23, 2020.
- Soccol C.R., L.P.S. Vandenberghe, & P.Z. de Oliveira. Production of citric acid from cocoa hull. BR 10 2018 075866 7 A2, filed December 13/, 2018, and issued June 23, 2020.

- Souza, F.N.S., Vieira, S.R., Campidelli, M.L.L., Rocha, R.A.R., Rodrigues, L.M.A., Santos, P.H.S., Carneiro, J. D.S., Tavares, I.M.C.T. & Oliveira, C.P. (2022). Impact of using cocoa bean shell powder as a substitute for wheat flour on some of chocolate cake properties. *Food Chemistry*, 381 (july of 2022) 132-215. 10.1016/j.foodchem.2022.132215.
- Valerii, M.C. 2021. Nutraceutical composition comprising limonene and cocoa fiber dry extract for treating obesity. BR 11 2022 024639 0 A2, filled May 31, 2021, and issued December 27, 2022.
- Valladares-Diestra, K., K., Vandenberghe, L., P., S., Nishida, V., S. &Scolo, C., R. (2023). The potential of imidazole as a new solvent in the pretreatment of agro-industrial lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 372 (March 2023).10.1016/j.biortech.2023.128666.
- Vandenberghe, L.P.S., Diestra, K.,K., V., Bittencourt, G.A., Mello, A.F.M., Vásquez, Z.S., Oliveira, Z. P., Pereira, G. V. M. &Socol, C.R. (2022).Added-value biomolecules' production from cocoa pod husks: A review. *Bioresource Technology*, 344 (january of 2022). 126-252. 10.1016/j.biortech.2021.126252.
- Van Wilgenburg, B., van Wilgenburg, K., Paisner, K., van Deventer, S., & Rooswinkel, R. W. (2019). Mapping the European startup landscape. *Nature Biotechnology*, 37(4), 345–349. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0076-4> .
- Vargas-Arana, G., Merino-Zegarra, C., Tang, M.,ertino, M. W., &Simirgiotis, M. J. (2022). UHPLC–MS Characterization, and Antioxidant and Nutritional Analysis of Cocoa Waste Flours from the Peruvian Amazon. *Antioxidants*, 11. <https://doi.org/10.3390/antiox11030595> .
- Vásquez, Z.S., Neto Carvalho, D.P., Pereira, G.V.M., Vandenberghe, L.P.S., Oliveira, P.Z., Tiburcio, P.B., Rogez,H.L.G., Neto Góes,A. &Socol, C.R. (2019). Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste Management*, 90 (may of 2019) 72-83. 10.1016/j.wasman.2019.04.030.
- Veeck, G., V., A. & Yu, H. (2020). Challenges of agriculture and food systems issues in China and the United Sates. *Geography and sustainability*, 1 (June 2020) 109-117. 10.1016/j.geosus.2020.05.002.
- Yoplac, I., Gonas, K., Bernal, W., Vasquez, H.V., &Maicelo, J.L. (2022). Chemical characterization and in vitro digestibility of Amazonian seeds and agro-industrial byproducts with potential for animal feed. *Revista De InvestigacionesVeterinarias Del Peru*, 32. <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i3.18765> .
- Vriesmann, L., C. &Petkiewicz, C., L., O. (2017). Cacao pod as a source of low-methoxyl, highly acetylated pectins able to gel in acidic media. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101 (August 2017).10.1016/j.ijbiomac.2017.03.082.
- Yusof, F., Khanahmadi, S., Amid, A. & Mahmud, S. S. (2016). Cocoa pod husk, a new source of hydrolase enzymes for preparation of cross-linked enzyme aggregate. *Springerplus*, 5 (January 2016).10.1186/s40064-015-1621-3.

Zhou, X., Zhou, M., Huang, D., & Cui, L. (2022). A probabilistic model for co-occurrence analysis in bibliometrics. *Journal of Biomedical Informatics*, 128 (April 2022). 10.1016/j.jbi.2022.104047.

### ***Capítulo III***

---

***Manuscrito: Inovação sustentável a partir do uso da biotecnologia: Utilização de coproduto de cacau (*Theobroma cacao*) no desenvolvimento e caracterização de uma bebida fermentada tipo kombucha***

**Inovação sustentável a partir do uso da biotecnologia: Utilização de coproduto de cacau (*Theobroma cacao*) no desenvolvimento e caracterização de uma bebida fermentada tipo kombucha**

Lívia de Matos Santos<sup>a</sup>, Mariana Nougalli Roselino<sup>a</sup>, Janaína de Carvalho Alves<sup>b</sup>, Suelen Neris Almeida Viana<sup>a</sup>, Elis dos Reis Requião<sup>a</sup>, Jéssica Maria Rio Branco dos Santos Ferro<sup>a</sup>, Carolina Oliveira de Souza<sup>a</sup>, Camila Duarte Ferreira Ribeiro<sup>a, c,\*</sup>

<sup>a</sup>*Faculty of Pharmacy, Federal University of Bahia, Campus Ondina, Salvador Bahia 40170-290, Brazil*

<sup>b</sup>*Graduate Program in Biotechnology - Northeast Network of Biotechnology (RENORBIO), Federal University of Bahia, Reitor Miguel Calmon Avenue–w/n-Campus Canela, Salvador, Bahia 40110-100, Brazil*

<sup>c</sup>*Nutrition School, Federal University of Bahia, Basílio da Gama Street, Rua Basilio da Gama-w/n-Campus Canela, Salvador, Bahia 40110-907, Brazil*

<i>Periódico a ser submetido (1<sup>a</sup> submissão):</i>	<i>Food and Bioprocess Technology ISSN 1935-5130</i>
<i>Maior percentil (Scopus):</i>	<i>92%</i>
<i>Periódico a ser submetido (2<sup>a</sup> submissão):</i>	<i>Food Research Internationale ISSN 0963-9969</i>
<i>Maior percentil (Scopus):</i>	<i>95%</i>

\*Corresponding author: Camila Duarte Ferreira Ribeiro. Basílio da Gama Street, without number, Canela, CEP: 40.110.907, Salvador-BA., Brazil. E-mail: [camiladuartef@ufba.br](mailto:camiladuartef@ufba.br)

**Resumo:**

A casca da amêndoa de cacau (CAC), foi utilizada para produzir uma bebida semelhante à kombucha, em diferentes concentrações (0,7%, 1,5% e 2,3%). A bebida fermentada foi caracterizada quanto a graduação alcoólica, atividade antioxidante, estrutura das culturas simbióticas de bactérias e leveduras através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), como também, pH, sólidos solúveis, acidez titulável, parâmetros de cor e compostos fenólicos totais durante 0, 3, 6, 9 e 12 dias de armazenamento a  $2,7 \pm 0,06$  °C. Os resultados mostraram ausência no teor alcoólico, atividade antioxidante em todas as formulações analisadas, com destaque positivo para a amostra com maior concentração de CAC ( $6,52 \pm 0,96$  EC<sub>50</sub> para o ensaio de DPPH e  $22,32 \pm 0,57$  µM de Trolox/mL para o ensaio de ABTS+) e estruturas densas e interconectadas na análise de MEV das culturas simbióticas desenvolvidas durante as fermentações. Foram identificadas variações nos parâmetros analisados, a saber: pH (de  $3,58 \pm 0,01$  a  $3,61 \pm 0,02$ ), sólidos solúveis (°Brix) (de  $7,03 \pm 0,06$  a  $7,13 \pm 0,06$ ), acidez titulável (g de ácido acético/100 mL) (de  $0,29 \pm 0,00$  a  $0,31 \pm 0,01$ ). Notavelmente, no que se refere ao parâmetro de cor, foi evidenciada uma influência significativa do teor da CAC no parâmetro da luminosidade (variando de  $90,25 \pm 0,01$  a  $92,45 \pm 0,06$ ) e na tonalidade avermelhada (com variação de  $2,01 \pm 0,01$  a  $1,53 \pm 0,07$ ), além de uma variação nos teores de compostos fenólicos totais (variando de  $2,33 \pm 0,00$  a  $1,73 \pm 0,00$ ). No perfil sensorial, a média de aceitabilidade geral das amostras variou de 6,1 a 6,4 e a média de atitude de compra foi de 2,98 a 3,20. Além disso, o sequenciamento de alto rendimento revelou que os principais gêneros de bactérias eram *Komagataeibacter*, *Acetobacter* e *Gluconacetobacter*, enquanto as leveduras predominantes eram *Brettanomyces*, *Pichia* e *Zygosaccharomyces*. A CAC apresenta potencial significativo para o desenvolvimento de produtos alimentares inovadores, demonstrados no desenvolvimento da bebida fermentada, alinhados não apenas a atributos funcionais, mas também a considerações ambientais, econômicas, sociais, científicas e tecnológicas.

**Palavras-chave:** Casca de amêndoa de cacau; fermentação; novos produtos alimentícios; alimento funcional; sequenciamento genético.

**Abstract:** The cocoa almond husk (CAC) was utilized to produce a beverage resembling kombucha at different concentrations (0.7%, 1.5%, and 2.3%). The fermented beverage was characterized for alcohol content, antioxidant activity, symbiotic cultures of bacteria and yeast through scanning electron microscopy (SEM), as well as pH, soluble solids, titratable acidity, color parameters, and total phenolic compounds during 0, 3, 6, 9, and 12 days of storage at  $2.7 \pm 0.06$  °C. The results indicated an absence of alcohol content and antioxidant activity in all analyzed formulations, with a positive highlight for the sample with the highest CAC concentration ( $6.52 \pm 0.96$  EC50 for DPPH assay and  $22.32 \pm 0.57$   $\mu$ M Trolox/mL for ABTS+ assay), along with dense and interconnected structures in the SEM analysis of symbiotic cultures developed during fermentations. Variations were identified in the analyzed parameters, namely: pH (ranging from  $3.58 \pm 0.01$  to  $3.61 \pm 0.02$ ), soluble solids (°Brix) (ranging from  $7.03 \pm 0.06$  to  $7.13 \pm 0.06$ ), titratable acidity (g acetic acid/100 mL) (ranging from  $0.29 \pm 0.00$  to  $0.31 \pm 0.01$ ). Remarkably, concerning the color parameter, a significant influence of CAC content was evident in luminosity (varying from  $90.25 \pm 0.01$  to  $92.45 \pm 0.06$ ) and reddish hue (with a variation from  $2.01 \pm 0.01$  to  $1.53 \pm 0.07$ ), along with variations in total phenolic compound levels (ranging from  $2.33 \pm 0.00$  to  $1.73 \pm 0.00$ ). In the sensory profile, the mean overall acceptability of the samples ranged from 6.1 to 6.4, and the mean purchase intention ranged from 2.98 to 3.20. Additionally, high-throughput sequencing revealed that the main bacterial genera were *Komagataeibacter*, *Acetobacter*, and *Gluconacetobacter*, while predominant yeasts were *Brettanomyces*, *Pichia*, and *Zygosaccharomyces*. CAC demonstrates significant potential for the development of innovative food products, as evidenced by the fermented beverage, aligning not only with functional attributes but also with environmental, economic, social, scientific, and technological considerations.

**Keywords:** Cocoa bean shell; fermentation; novel food products; functional food; genetic sequencing.

## 1. Introdução

A árvore *Theobroma cacao* L., pertencente à família Malvaceae, é nativa das regiões da América Central e do Sul. As amêndoas extraídas dos frutos do cacau representam a matéria-prima fundamental para a produção de chocolate. O fruto se desenvolve tanto no tronco quanto nos galhos do cacaueiro, sendo botanicamente classificado como uma fruta de formato semelhante a uma baga, com dimensões que variam de 15 a 25 cm de comprimento e 8 a 13 cm de diâmetro. As principais variedades de cacau incluem Forastero, Criollo, Trinitario e Nacional. Do ponto de vista histórico, o cacau é reconhecido como um dos alimentos fermentados mais antigos do mundo, consumido juntamente com o vinho, o pão e a cerveja (Vásquez et al., 2019; Soares & Oliveira, 2022).

O cacau é um dos produtos mais consumidos no mundo, com previsão de crescimento de US\$ 67,88 bilhões até 2029, em virtude da expansão da indústria de alimentos e bebidas com a crescente popularidade dos produtos com cacau e do aumento da conscientização dos consumidores sobre os benefícios para a saúde (Fortune Business Insights, 2022). No período entre 2018 e 2019, a produção mundial totalizou cerca de 4,8 milhões de toneladas (Tosto et al., 2023). O Brasil, com uma produção de 265 mil toneladas, é classificado como o sétimo maior produtor mundial de cacau. No país, notavelmente a Bahia, apresenta destaque na região Nordeste, com 403 mil hectares de cultivo e uma produção de 111,4 mil toneladas. Previsões indicam que a produção de cacau no Brasil seguirá uma tendência de crescimento sustentado até 2024, impulsionada por iniciativas governamentais (Brainer, 2021).

O cacau é reconhecido por seus diversos efeitos benéficos para a saúde humana, incluindo propriedades neuro e cardioprotetoras, ação anti-inflamatória e potencial anticancerígeno. Estes efeitos são atribuídos principalmente aos seus compostos bioativos. A semente de cacau contém uma variedade de compostos fenólicos e metilxantinas. Em relação aos coprodutos do cacau, a casca do grão de cacau destaca-se pelo seu maior teor de proteína, variando entre 16–18 g/100 g. Os níveis de proteína nos outros coprodutos são de 0,4–6 g/100 g para polpa de cacau e 4–11 g/100 g para a vagem. A menor quantidade de fibra alimentar total é encontrada na polpa de cacau (16,75–16,89 g/100 g de peso corporal sólido). Em contraste, a casca do grão de cacau exibe um teor total de fibra entre 52 e 57 g/100 g de peso. A vagem apresenta um alto teor de cinzas, com média de 7,15 g/100 g, tendo como mineral predominante o potássio, variando entre 2,5 e 7%, e outros minerais como cálcio (0,3–0,8%), magnésio (0,02–0,06%), fósforo (0,04–0,12%), enxofre (0,02–0,05%) e silício (0,5%). Os

compostos fenólicos totais na casca do cacau podem variar consideravelmente, oscilando de 2,1 a 57 mg/g em equivalentes de ácido gálico (GAE)/g (Soares & Oliveira, 2022).

Atualmente, há um notável aumento no interesse pelos coprodutos do cacau, impulsionado por desafios enfrentados pela indústria cacaeira, como flutuações nos preços dos grãos, elevados impostos e variações na economia global. Essa atenção crescente não se restringe à viabilidade econômica dos coprodutos, mas está profundamente vinculada a uma abordagem mais ampla de sustentabilidade e inovação na indústria alimentícia. Apenas cerca de 20% do cacau é utilizado, levando a uma busca por alternativas e formas de aproveitar os coprodutos que representam cerca de 80% do fruto. Esses coprodutos muitas vezes possuem atributos nutricionais significativos, incentivando sua incorporação na produção de alimentos funcionais e suplementos. Sua versatilidade permite aplicação em diversos setores, desde alimentos e bebidas até cosméticos e produtos farmacêuticos. A CAC, representando até 20% do peso do grão, e surge como um dos principais coprodutos do processamento do fruto, com uma produção estimada em cerca de 700 mil toneladas, sendo muitas vezes descartado. Esse cenário destaca a necessidade de reavaliação e otimização da gestão dos coprodutos do cacau, não apenas para reduzir o desperdício, mas também para buscar oportunidades sustentáveis e inovadoras na indústria alimentícia (Pagliari et al., 2022; Vásquez et al., 2019).

A CAC apresenta uma composição nutricional favorável, sendo uma fonte de compostos fenólicos totais (43,15 e 2679,91 mgGAE/100g), propriedades antioxidantes (91,25 a 2309,60 mg de atividade antioxidante/100g) e fibra dietética (18-60%) (Siow et al., 2022; Vásquez et al., 2019). Dessa forma, o aproveitamento desse coproduto para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios, além de possibilitar um aumento do valor agregado ao fruto, ainda possibilita uma melhora do aporte nutricional do produto bem como fomento à economia circular e sustentabilidade.

Ao longo dos anos, o interesse pela adoção de uma dieta nutricionalmente melhor tem aumentado. Esse fenômeno tem impulsionado o desenvolvimento de pesquisas voltadas para a investigação de novos alimentos e bebidas com potenciais benefícios à saúde humana. Dentre esses produtos, destaca-se a kombucha, uma bebida tradicional produzida por meio da fermentação do chá (*Camellia sinensis*), acrescida de uma fonte de carboidrato e uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (Miranda et al., 2023). Vários efeitos benéficos têm sido atribuídos a essa bebida, incluindo atividade antioxidante (Ivanišová et al., 2020), propriedades terapêuticas no tratamento da diabetes (Aloulou et al., 2012) e melhora da função hepática (Wang et al., 2014). Consequentemente, a literatura científica tem apresentado uma série de estudos com o objetivo de investigar a utilização de substratos alternativos à *Camellia sinensis*,

como ervas, flores, sucos de frutas, leite, soja e plantas alimentícias não convencionais, visando a obtenção de novas variedades de bebidas semelhantes à kombucha, com características sensoriais, químicas e biológicas distintas (Miranda et al., 2023). Bebidas cujo substrato base para o desenvolvimento da infusão a ser fermentado não for derivado da planta *C. sinensis* são classificados como tipo kombucha ou análogos a kombucha (Leonarski et al., 2021).

Nesse sentido, a literatura científica apresenta alguns estudos que desenvolveram bebidas com potencial funcional utilizando a CAC. Paladines-Santacruz et al., (2021) analisaram a CAC juntamente com folhas de *Ilex guayusa* e laritaco (*Vernonanthura patens*) quanto à toxicidade no desenvolvimento de uma bebida funcional e foi identificado que, de acordo com o sistema de classificação globalmente harmonizado, a bebida desenvolvida apresentou baixa toxicidade (categoria 5, onde a dose letal mediana da bebida está acima de 2.000 mg / kg de peso corporal). Vasquez et al., (2019) estudaram a CAC no desenvolvimento de bebidas como o chá de cacau, que tem o perfil de sabor e as propriedades antioxidantes intrinsecamente ligadas à origem do grão e aos parâmetros de torrefação, e encontraram teores de teobromina e cafeína de 140,22 µg/mL e 5,96 mg/L, respectivamente.

Neste estudo, a CAC foi utilizada como matéria-prima para a elaboração de uma bebida similar ou, simplesmente, tipo kombucha, sendo investigado o comportamento fermentativo desse produto por 24 horas, em diferentes concentrações (0,7%, 1,5% e 2,3%).

## 2. Material e métodos

### 2.1 Materiais

Os materiais utilizados foram: álcool etílico P.A. (Synth, Brasil), Folin-Ciocalteu (Êxodo científica, Brasil), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, Alemanha); ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), persulfato de potássio (ACS Científica, Brasil), Fenolftaleína P.A.-ACS (Fmaia, Brasil) e hidróxido de sódio (Neon, Brasil). Meios de cultura: Caldo Tetracionato (Merck, Alemanha), Ágar Desoxicolato de Xilose Lisina (XLD) (Difico<sup>TM</sup>, França), Caldo Verde Brilhante (Merck, Alemanha), Ágar *Salmonella Shigella* (SS) (Isofar, Brasil), Ágar Batata Dextrose (Biolog, Brasil), Caldo Lauril Sulfato Triptose (Acumedia, Estados Unidos), Ágar Bile Vermelho Violeta Glicose (VRBG) (Himedia, Índia), Caldo Rappaport (Merck, Alemanha). A casca da amêndoa de cacau, obtida após a etapa de torrefação da amêndoa, foi adquirida da Fazenda Bela Vista (Ilhéus, Brasil), entre janeiro de 2022 e junho de 2023.

## 2.2 Obtenção da cultura simbiótica e preparo do inóculo

Como cultura simbiótica inicial empregada na fermentação, utilizou-se uma kombucha tradicional cultivada no laboratório de estudos em microbiologia de alimentos (LEMA) da Universidade Federal da Bahia (Brasil). O preparo do inóculo foi por meio do chá verde industrial da marca Maratá® com as proporções descritas de acordo com o fabricante (um sachê para 130 mL de água fervente, deixado sob infusão por três minutos). Após o tempo determinado, o inóculo foi coado em condições estéreis e adicionados 35g/L de açúcar. Depois de esfriar até 35°C, foram adicionados 10% de líquido start e 5% de SCOBY (cultura simbiótica de bactérias e leveduras), todos desenvolvidos a partir de fermentações anteriores e levados para fermentação por 10 dias consecutivos a 35°C.

## 2.3 Obtenção da CAC, realização de testes preliminares e obtenção das formulações

Os grãos de cacau foram torrados a uma temperatura de 180°C por 15 min e após resfriados, foram quebrados e descascados. As cascas foram então separadas e armazenadas em embalagens de 2 Kg e seladas, sendo armazenadas sob temperatura de 25°C. Para o processo de esterilização, a CAC, foi colocada em envelopes auto selantes da marca Vitalpack e levadas para esterilização úmida a 121°C por 15 min. Após essa etapa, as cascas foram acondicionadas em recipientes de vidro estéreis com tampa.

Testes preliminares foram realizados para identificação das melhores porcentagens de CAC, açúcar, líquido start e cultura simbiótica de bactérias e leveduras, baseadas em adaptações descritas por Diez-Ozaeta et al., (2022) e Miranda et al., (2023). As formulações foram avaliadas quanto ao pH, acidez titulável, sólidos solúveis e viabilidade de leveduras e bactérias acéticas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Parâmetros físico-químicos e microbiológicos das formulações da bebida fermentada tipo kombucha com CAC nos testes preliminares.

Formulações	Tegumento (%)	Start (%)	Scooby (%)	pH	Acidez Titulável*	Sólidos Solúveis**	Leveduras ***	Bactérias Acéticas***
<b>1</b>	<b>2,3</b>	<b>6,5</b>	<b>10</b>	<b>4,35</b>	<b>0,30</b>	<b>8,00</b>	<b>4,29</b>	<b>5,40</b>
2	1,9	10	10	4,31	0,30	7,60	4,18	5,30
3	1,9	7,7	15	4,11	0,30	7,75	4,23	5,31
<b>4</b>	<b>0,7</b>	<b>6,5</b>	<b>10</b>	<b>3,90</b>	<b>0,25</b>	<b>7,85</b>	<b>4,31</b>	<b>5,17</b>
5	1,1	3	10	4,04	0,25	7,50	3,66	5,19
6	1,1	5,3	5	4,02	0,30	7,80	3,89	5,61
7	1,9	3	10	4,4	0,25	8,05	4,36	5,42
8	1,9	5,3	5	4,51	0,20	8,00	4,14	5,28

9	1,1	10	10	4,08	0,30	7,55	3,80	5,28
<b>10</b>	<b>1,5</b>	<b>6,5</b>	<b>10</b>	<b>4,43</b>	<b>0,25</b>	<b>7,80</b>	<b>3,76</b>	<b>4,90</b>
11	1,1	7,7	15	4,11	0,30	6,60	3,57	5,37
12	1,5	4,2	15	4,17	0,35	7,80	3,49	5,10

\*Acidez titulável expressa em mg de ácido acético/100mL; \*\*Sólidos solúveis expressos em °Brix; \*\*\*Viabilidade de leveduras e bactérias acética expressa em UFC/mL.

Com base dos resultados obtidos ( $\text{pH} = 4,22 \pm 0,29$ , acidez =  $0,26 \pm 0,03$  mg de ácido acético/100mL, sólidos solúveis =  $7,88 \pm 0,10$  expressos em °Brix, viabilidade de leveduras =  $4,15 \pm 0,23$  log UFC/mL e bactérias acéticas =  $5,12 \pm 0,18$  log UFC/mL), foram selecionadas as formulações com 0,7%; com 1,5% (Figura 1) e com 2,3% de CAC, fermentadas por um período de 24h a 25°C pois, foram as formulações que apresentaram valores mínimos, intermediários e máximos de CAC, respectivamente.



**Figura 1.** Imagem ilustrativa da formulação (10 A – 1,5% de CAC) nos testes preliminares.

Dessa forma, as infusões foram desenvolvidas em concentrações de 0,7% (F1), 1,5% (F2) e 2,3% (F3) (% p/v) de CAC, com duração de 10 min. Logo depois, foram filtradas e levadas para repouso até a redução da temperatura (35°C), para posterior adição de 8% (p/v) de açúcar cristal, 6,5% de líquido start e 10% de SCOBY (Figura 2).



**Figura 2.** Representação esquemática do preparo da bebida tipo kombucha. Fonte: autoria própria.

## 2.4 Caracterização da bebida tipo kombucha

### 2.4.1 Graduação alcoólica

Para determinação da graduação alcoólica, foi utilizada a metodologia descrita pelo manual de métodos físico-químicos para análise de alimentos (IAL, 2008). Foram destilados 100 mL da bebida tipo kombucha utilizando um evaporador rotativo (Quimis, modelo Q344B2, Brasil), 65 mL do destilado obtido foram levados para leitura da densidade em balança hidrostática eletrônica (Gibertini Elettronica<sup>TM</sup>, modelo Super Alcomat, Itália) e a partir da densidade relativa obtida foi avaliada a graduação alcoólica em % v/v a 20 °C.

### 2.4.2 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante das amostras foi avaliada utilizando os métodos de captura do radical livre DPPH e do radical ABTS. A capacidade antioxidante das amostras avaliada por meio da análise do radical livre DPPH, foi realizada conforme descrito por Arlorio et al., (2008) com modificações. Uma solução controle com álcool etílico a 50% e água destilada foi preparada e sua absorvância medida. Em seguida, uma solução de DPPH foi preparada dissolvendo 2,4 mg do composto em 100 mL de álcool etílico e armazenada no escuro. Volumes das amostras foram diluídos em álcool etílico, coletados (100µL) dessa solução e combinados com 3,9 mL de DPPH. A absorvância foi medida a 515 nm em um espectrofotômetro (Bel Engineering, modelo UV-M51, Itália) e os resultados foram expressos em EC<sub>50</sub> (mL da bebida tipo kombucha/g de DPPH).

A determinação da atividade antioxidante por meio da avaliação do efeito de neutralização dos radicais livres gerados pelo ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS+) foi realizada de acordo com Rebollo-Hernanz et al., (2021), com modificações. Inicialmente, uma solução de ABTS foi preparada combinando-se uma solução de ABTS com persulfato de potássio, e essa mistura foi mantida no escuro por 16h. Volumes das amostras foram diluídos em álcool etílico, foram coletados 30µl e adicionados à 3,0 mL da solução de ABTS. A absorbância foi medida a 734 nm em um espectrofotômetro (Bel Engineering, modelo UV-M51, Itália) e os resultados foram expressos em µM de Trolox por mL da bebida tipo kombucha.

### *2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das culturas simbióticas de bactérias e leveduras desenvolvidas durante as fermentações*

A microscopia foi gentilmente realizada no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica do Instituto de Física (LAMUME) – UFBA. As amostras foram congeladas por 24 h e liofilizadas (liofilizador Liotop, modelo L108) por 48h para posterior análise. Foram observadas em um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, modelo JSM6610LV, Japão) equipado com dispersão de energia de raios X, operando com uma resolução de 3 nm no modo de vácuo de alta resolução e de 4 nm no modo de vácuo de baixa resolução. Inicialmente, as amostras foram aderidas a um porta amostras de alumínio com diâmetro de 10 mm, utilizando uma fita de carbono adesiva de dupla face. Em seguida, foi realizada a deposição de uma fina camada de ouro através do método de pulverização (Metalizador Denton Vacuum, modelo Desk V, Estados Unidos) com um tempo de metalização de 600s. Após a metalização, as amostras foram observadas com uma tensão de aceleração (kV) de 5, uma distância de trabalho (WD) de 10mm e uma velocidade de varredura (SS) de 45 mV s<sup>-1</sup>, com um aumento variando de 230 a 6000x.

### *2.6 Avaliação da estabilidade da bebida tipo kombucha durante o armazenamento refrigerado*

As 3 formulações da bebida tipo kombucha foram avaliadas nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 dias a 2,7 ± 0,06°C, quanto aos parâmetros pH, sólidos solúveis, acidez titulável, parâmetros de cor e compostos fenólicos totais.

#### *2.6.1 pH, sólidos solúveis e acidez titulável*

O pH foi analisado usando um medidor de pH (Tecnal, modelo TEC-7, Brasil) previamente calibrado. Para realização das análises, 30 mL da bebida foram coletados e os resultados apresentados foram obtidos só após a estabilização dos valores apresentados pelo equipamento. Os teores de sólidos solúveis totais das bebidas tipo kombucha foram analisados com um refratômetro analógico portátil (Atago, modelo Master BR, Brasil) e expressos em °Brix. Para isso, 1 mL da amostra foi coletada e adicionada no visor do aparelho previamente calibrado com água destilada. Para a determinação da acidez titulável, foram diluídas 5 mL de amostra em 50 mL de água destilada e homogeneizadas, com posterior adição de 2 gotas de solução de fenolftaleína. Em seguida, a titulação foi realizada com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N. A acidez total titulável das bebidas tipo kombucha foi determinada e expressa em g de ácido acético/100 mL (AOAC, 2007).

### 2.6.2 *Parâmetros de cor*

Foi utilizado um colorímetro (Konica Minolta, modelo Chroma meter CR-5, Japão) com iluminante D-65, observador padrão de 10° e abertura de 26 mm. A coloração das amostras foi avaliada utilizando parâmetros CIELab, cujo sistema é fundamentado em coordenadas cartesianas que se sustenta pela observação de que uma cor não pode simultaneamente manifestar características de vermelho, verde, azul, assim como de amarelo, devido à oposição entre elas. L\* é utilizada como uma estimativa da luminosidade, característica que permite cada tonalidade ser comparada a uma graduação de cinza, situada entre o extremo preto (0) e o branco (100).; a\* assume valores positivos para matizes avermelhadas (+60), contrariamente à valores negativos que se associam às tonalidades esverdeadas (-60); b\* apresenta valores positivos para matizes amarelados (+60) e valores negativos para as nuances azuladas (-60). A variável C\* denota o Croma, o qual adquire o valor de zero no ponto central de uma representação esférica de cores, resultado da equação  $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ , variando de 0 a 60 e o ângulo  $h_{ab}^{\circ}$  é o caráter angular que representa o matiz cromático  $[(\text{arco tangente } (b^*/ a^*))]$  variando de 0 a 360 graus (Ferreira et al., 2016).

### 2.6.3 *Compostos fenólicos totais (CFT)*

O teor de compostos fenólicos totais, foi determinado por meio do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu adaptado de Rebollo-Hernanz et al., (2021). Uma alíquota de 50 µL da bebida tipo kombucha, mais 450µL de água destilada, foram colocadas sob reação com 2,5 mL de Folin a 10%, e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5% e foram levados ao banho maria a 50°C por 5 minutos. Após, a quebra da reação foi feita em banho de gelo e a absorbância foi lida em

um comprimento de onda de 760 nm. Foi utilizado um espectrofotômetro (Bel Engineering<sup>®</sup>, modelo UV-M51, Itália). Os resultados obtidos foram expressos em mg EAG/mL da bebida tipo kombucha.

## 2.7 *Análise sensorial*

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos vinculado à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), com Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) n° 65165722.8.0000.8035. A análise de segurança microbiológica foi realizada para os microrganismos *E. coli*, *Samonella* e *Enterobacteriaceae* de acordo com a Instrução Normativa n° 161 de 2022, sendo observados resultados negativos para os parâmetros analisados. Para a participação dos avaliadores, foi solicitada a assinatura prévia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O grupo de avaliadores foi composto por 110 indivíduos não treinados, incluindo alunos, professores, visitantes e funcionários da UFBA. As análises foram realizadas em bancadas individuais no Laboratório de Análise Sensorial da Faculdade de Farmácia da UFBA, com iluminação de luz branca. As amostras da bebida fermentada foram apresentadas a uma temperatura de 4°C em copos descartáveis com capacidade de 50 mL, em um volume aproximado de 30 mL. As amostras foram codificadas com números aleatórios de três dígitos. Durante os intervalos entre as avaliações de diferentes amostras, os participantes tinham disponíveis biscoitos de água e sal e água mineral em temperatura ambiente para a limpeza do paladar.

### 2.7.1 *Perfil do consumidor, Teste de aceitação e atitude de compra*

Os participantes do estudo receberam um questionário onde foram avaliadas a faixa etária, o grau de escolaridade, a ocupação atual, o conhecimento sobre bebidas fermentadas, a frequência de consumo e a razão pelo qual faz uso dessas bebidas. Posteriormente, procederam à avaliação das bebidas fermentadas através da utilização de uma escala hedônica de nove pontos, que variou de 1 (desgostei extremamente) a 9 (gostei extremamente), onde avaliou-se os parâmetros cor, odor, sabor e aceitabilidade. Também foi aplicado o teste de atitude de compra, onde foi apresentada uma escala, que variou de 1 (certamente não compraria) a 5 (certamente compraria). O Índice de Aceitabilidade (IA) foi então determinado utilizando a equação a seguir:  $IA = (X / N) * 100$ , onde X representa a média das pontuações e N a maior pontuação (Sales et al., 2023).

## 2.8 *Perfil microbiológico da bebida fermentada*

A formulação que obteve os melhores resultados durante a avaliação da estabilidade sob refrigeração foi avaliada quanto ao perfil microbiológico. Este foi determinado pela tecnologia de sequenciamento de alto rendimento pela empresa *Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil*. A identificação bacteriana foi conduzida mediante o emprego do sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. Foi utilizado um protocolo próprio para a preparação das bibliotecas. A amplificação foi realizada com a utilização de *primers* específicos para a região V3-V4 do gene rRNA 16S, sendo o primer 341F com sequência (CCTACGGGRSGCAGCAG) e o primer 806R com sequência (GGACTACHVGGGTWTCTAAT). Já a identificação dos fungos foi conduzida mediante o emprego do sequenciamento de alto desempenho da região ITS1. O procedimento de preparação das bibliotecas também seguiu um protocolo próprio. A amplificação foi realizada com a utilização de *primers* específicos para a região ITS1, sendo o primer ITS1 (GAACCGCGGARGGATCA, e o primer 9ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC).

As bibliotecas obtidas foram submetidas a sequenciamento por meio do sistema *MiSeq Sequencing System* (Illumina Inc., EUA). Em casos de *sequenciamento paired-end*, os kits V3 com 600 ciclos ou V2 com 500 ciclos foram empregados, enquanto em sequenciamentos *single-end*, o kit V2 com 300 ciclos foi utilizado. As sequências resultantes foram submetidas à análise por meio do pipeline Sentinel.

## 2.9 Estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata ( $\pm$  desvio-padrão). As médias foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) com o software XLSTAT® versão 2023.1.5. Os softwares GraphPad Prism versão 8.0.2 e o CANVA (www.canva.com) foram utilizados para gerar as figuras.

## 3. Resultados e discussão

### 3.1 Caracterização da bebida tipo kombucha

#### 3.1.1 Graduação alcoólica

Em diversas nações, existem regulamentações legais que estabelecem limites para o teor alcoólico permitido em diferentes categorias de bebidas. A determinação precisa do teor alcoólico desempenha um papel fundamental na garantia de que as bebidas estejam em conformidade com tais limites, evitando assim potenciais riscos à saúde dos consumidores, especialmente grupos populacionais sensíveis como crianças e gestantes.

A densidade das amostras foi medida como 1,00 a 20°C para as amostras F1, F2 e F3. Esses valores de densidade indicam 0,0 % v/v de álcool, o que corresponde a ausência de teor alcoólico. Resultados semelhantes foram observados em outros trabalhos, como o realizado por Lazzaroli et al., (2023), que desenvolveram uma bebida fermentada tipo kombucha utilizando folhas de oliveiras (*Olea europaea* L.) e não detectaram graduação alcoólica nas quatro formulações avaliadas. Da mesma forma, Andreson et al., (2022), em seu estudo sobre as características dos perfis químicos de kombuchas comerciais, constataram que em uma das amostras analisadas V1 (kombucha original) não havia teor alcoólico.

No mercado brasileiro, é possível encontrar diferentes versões de kombucha não alcoólicas (menos de 0,5% em volume de álcool) e as versões alcoólicas (porcentagens entre 0,6% e 8,0% em volume de álcool), de acordo com o preconizado pela IN n°41 (Brasil, 2019). No entanto, esses valores podem variar de acordo com o país. Disponibilidade de bebidas fermentadas sem álcool pode atender às necessidades e desejos de um público diversificado, proporcionando opções saudáveis, seguras e socialmente inclusivas (Coelho et al., 2020).

### 3.1.2 Atividade antioxidante

O estresse oxidativo é um processo prejudicial ao organismo, causado pela ação de radicais livres formados tanto internamente como por fatores externos, como o tabagismo, radiação ionizante e substâncias químicas estranhas ao corpo. Esse processo resulta em danos aos componentes celulares essenciais, como proteínas, enzimas e ácidos nucleicos, comprometendo sua função adequada. No entanto, a introdução de antioxidantes naturais na dieta ou por meio de suplementos pode reduzir significativamente o risco de dano oxidativo (Svarc-Gajicet al., 2023).

Numerosos extratos de plantas possuem uma notável capacidade antioxidante, principalmente devido à presença de compostos fenólicos. Neste estudo, foram observados valores de EC<sub>50</sub> expressos em mL/g DPPH de 14,00 ± 0,42, 8,41 ± 0,60 e 6,52 ± 0,96 para as formulações F1, F2 e F3, respectivamente. Para o ensaio de ABTS<sup>+</sup>, foram encontrados valores de 18,65 ± 4,9, 21,55 ± 0,81 e 22,32 ± 0,57 em µM de Trolox/mL da bebida para as formulações F1, F2 e F3, respectivamente.

Pode-se perceber que todas as formulações das bebidas fermentadas exibiram alguma atividade antioxidante. Essa constatação possivelmente encontra justificativa na influência das características nutricionais intrínsecas ao cacau e a seus coprodutos. Isso reforça a importância de investigações adicionais sobre o potencial uso de coprodutos de cacau em produtos alimentícios.

Ao utilizar folhas de oliveiras no desenvolvimento de uma bebida tipo kombucha, Lazzaroli et al., (2023), relataram em seu estudo, que todas as formulações testadas apresentaram resultados positivos ( $3,5 \pm 0,3$ ,  $2,4 \pm 0,1$ ,  $3,4 \pm 0,3$  e  $3,3 \pm 0,0$   $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox /mL) quanto à alta atividade sequestradora de radicais para o ensaio de DPPH.

No estudo da atividade de eliminação do radical ABTS<sup>+</sup> de fermentado tipo kombucha utilizando espinheiro da Anatólia (*Crataegus orientalis*), a amostra KH4 (10g de espinheiro de Anatólia e 100g de mel), apresentou 97,72% de atividade antioxidante (Kilic & Sengun, 2023).

Em uma bebida fermentada tipo kombucha utilizando suco de maqui, foram encontrados valores de  $766,92 \pm 48,95$   $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox para a análise de eliminação do radical ABTS<sup>+</sup> (Rocha-Guzmán et al., 2023).

Nesse contexto, observa-se que essas pesquisas ao empregarem substratos distintos da *C. sinensis*, em uma abordagem abrangente e multifacetada embora não manifestem todas as mesmas grandezas, o que dificulta a comparação, elas demonstram resultados promissores no que tange à atividade antioxidante no avanço do desenvolvimento das bebidas fermentadas do tipo kombucha.

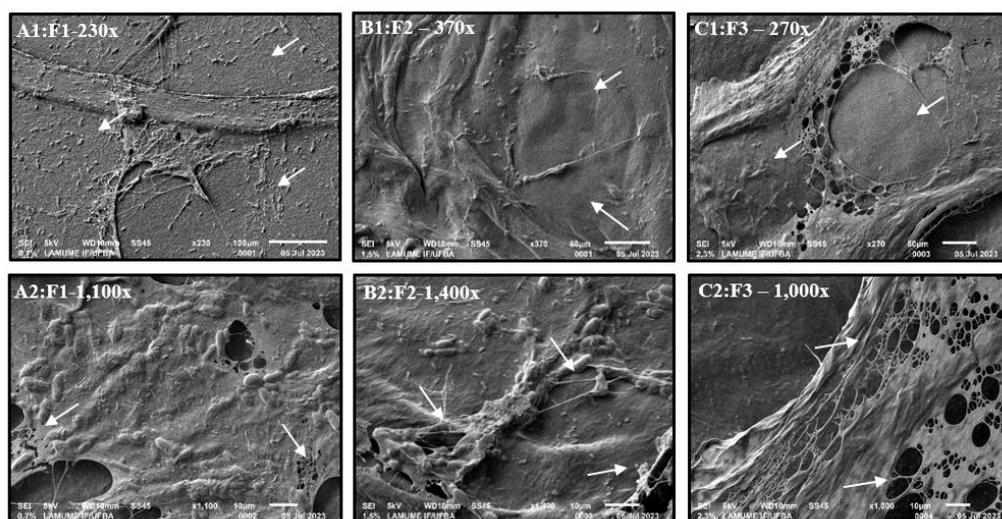
A fermentação também tem se mostrado um processo eficiente para melhorar a atividade antioxidante devido à bioconversão de fenóis conjugados em fenóis livres. Portanto, as transformações microbianas dos polifenóis presentes na *C. sinensis*, ou em outros materiais, liberam compostos que resultam em uma maior atividade antioxidante. A pesquisa contínua nessa área é fundamental para ampliar o conhecimento sobre os efeitos antioxidantes da kombucha e de suas variedades e suas aplicações no desenvolvimento de produtos alimentícios com benefícios à saúde (Morales, 2020).

Além de proporcionar uma variedade de experiências gustativas aos consumidores, essa diversificação também pode trazer benefícios significativos para a saúde. O aumento da concentração de compostos antioxidantes nas composições dessas bebidas contribui para a proteção das células contra danos oxidativos. Assim, a exploração de diferentes substratos na produção de bebidas fermentadas representa uma tendência promissora na indústria alimentícia, que pode atender tanto aos paladares exigentes quanto às demandas por produtos mais saudáveis e sustentáveis (Leonarski et al., 2021).

### 3.1.3 Microscopia eletrônica de varredura das culturas simbióticas de bactérias e leveduras desenvolvidas durante as fermentações

Entre as técnicas de microscopia atualmente disponíveis, as de microscopia eletrônica de varredura (MEV), são notáveis devido à sua capacidade singular de examinar espécies em escala nanométrica. A MEV é uma técnica avançada que utiliza um feixe de elétrons para explorar a superfície de amostras com alta resolução, fornecendo informações detalhadas sobre a topografia, morfologia e composição química da superfície (Sun et al., 2023).

A utilização da MEV desempenhou um papel crucial na análise da morfologia e estrutura das culturas simbióticas (SCOBY), fornecendo informações visuais fundamentais com detalhes precisos e de alta resolução (Figura 3).



**Figura 3.** Imagens da microscopia eletrônica de varredura das SCOBY formadas durante o processo fermentativo das bebidas formuladas com casca de amêndoa de cacau com diferentes teores (F1: 0,7%; F2: 1,5% e F3: 2,3%), com ampliações de 230x, 270x, 370x, 1000x, 1100x e 1,400x.

Avaliou-se a morfologia das membranas em estudo, sendo constatada a partir das imagens de MEV observadas na figura 3, que as áreas que estiveram em contato com o ar apresentaram uma superfície densa e lisa (figura 3 A1:F1; B1:F2 e C1:F3). Ainda na figura 3 é possível verificar relações interfibrilares entre as estruturas desenvolvidas pelos microrganismos presentes na fermentação da bebida tipo kombucha (A2:F1; B2:F2 e C2:F3). As fibrilas de celulose produzidas pelos microrganismos apresentam uma rede 3D porosa organizada de forma aleatória e ultrafina, aumentando a resistência, causando assim, uma superfície lisa (Avcioglu et al., 2021).

A estrutura mais densa foi observada em C2:F3, a qual é derivada da formulação com maior concentração de CAC (2,3%). Esses resultados revelam a influência do coproduto de cacau na estrutura e porosidade das membranas, proporcionando contribuições significativas para o desenvolvimento de novos materiais com propriedades específicas e aplicações relevantes na área de alimentos e biotecnologia. No desenvolvimento de uma bebida fermentada

tipo kombucha utilizando coproduto de acerola, a formulação com maior concentração de coproduto (5%), foi observada também uma estrutura mais densa nas culturas simbióticas (Leonarski et al., 2021).

A presença de microrganismos como *Komagataeibacter xylinus*, produtor de celulose, desempenha um papel crucial na produção das culturas simbióticas em bebidas fermentadas tipo kombucha. A celulose bacteriana (CB) é reconhecida por sua capacidade de proteger as bactérias contra os raios ultravioleta (UV), criar um ambiente rico em oxigênio, oferecer maior capacidade de absorção e proteger contra condições ambientais adversas, como baixa umidade, pH extremo e microrganismos patogênicos. Apesar de sua semelhança estrutural com a celulose vegetal, a celulose bacteriana não exige procedimentos adicionais de tratamento antes de ser utilizada. Além das características mencionadas anteriormente, a CB exibe uma nanoestrutura microfibrilar, apresentando alta resistência mecânica, elevada elasticidade, estabilidade térmica, notável capacidade de absorção de líquidos, excelente afinidade biológica, biodegradabilidade, alta cristalinidade e um elevado grau de polimerização. Esses atributos são extremamente relevantes para sua aplicação na indústria (Avcioglu et al., 2021).

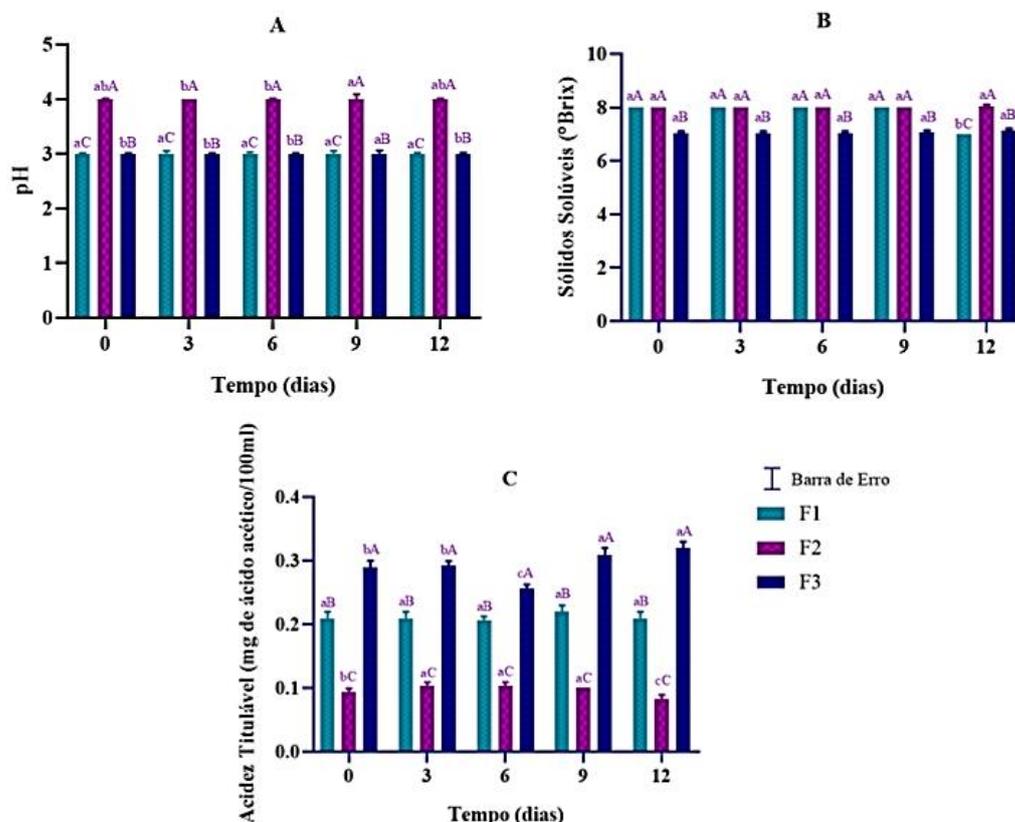
### 3.2 Avaliação da estabilidade da bebida fermentada tipo kombucha durante o armazenamento refrigerado

#### 3.2.1 pH, sólidos solúveis e acidez titulável

A presença dos ácidos orgânicos como o ácido acético e o ácido glucônico, gerados durante a fermentação de bebidas pode ter influência na atividade biológica dos microrganismos envolvidos, tornando o pH um parâmetro ambiental de extrema importância. É bem estabelecido que o pH influencia a taxa de crescimento dos microrganismos fermentadores, e pode causar modificações estruturais nos fitoquímicos presentes, o que, por sua vez, pode afetar a atividade antioxidante dessa bebida (Bishop et al., 2022).

A figura 4A mostra que os valores de pH das três amostras variaram de  $3,26 \pm 0,01$  a  $4,16 \pm 0,09$ . A formulação F1 não apresentou diferença ao longo de seu armazenamento ( $p > 0,05$ ). Além disso, apresentou o menor valor de pH desde o T0 ( $3,26 \pm 0,01$ ) em relação às demais formulações ( $p < 0,05$ ). A formulação F2 teve valor de pH menor apenas nos tempos T3 ( $4,00 \pm 0,00$ ) e T6 ( $4 \pm 0,01$ ) diferindo estatisticamente do T9 ( $4,16 \pm 0,09$ ). A amostra F3 apresentou valor de pH maior apenas no tempo 9 ( $3,74 \pm 0,06$ ) ( $p < 0,05$ ). É importante ressaltar,

que ao analisar o aumento do pH entre os tratamentos ao longo do armazenamento, nos mesmos intervalos de tempo, identifica-se uma diferença estatística significativa entre as amostras.



**Figura 4.** pH (A), sólidos solúveis (B) e acidez titulável (C) da bebida fermentada tipo kombucha com casca de amêndoa de cacau com diferentes teores (F1: 0,7%; F2: 1,5% e F3: 2,3%), durante 12 dias sob armazenamento refrigerado ( $2,7 \pm 0,06^{\circ}\text{C}$ ).

Nota: valores médios com letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no mesmo tratamento ao longo do tempo. Valores médios com letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) dentro do mesmo tempo para tratamentos diferentes.

Choo et al., (2018) em seu estudo sob a estabilidade de armazenamento de uma bebida fermentada com pitaya vermelha, identificou uma variação de pH de  $3,13 \pm 0,01$  a  $3,46 \pm 0,01$  durante oito semanas sob refrigeração a  $4^{\circ}\text{C}$ , diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) apenas da semana 0 para a semana 2, com posterior constância até a semana 8. Dados similares em relação aos valores de pH foram encontrados no estudo sobre as características químicas, microbianas e sensoriais de kombuchas comerciais determinadas por Andreson et al., (2022), onde foi identificada uma variação de pH de  $2,8 \pm 0,3$  a  $3,7 \pm 0,3$  nas amostras analisadas. Observa-se que os dados de pH relatados acima nas bebidas fermentadas são similares aos encontrados nas formulações F1 e F3 no tempo T9 da bebida tipo kombucha utilizando CAC durante seu período de armazenamento refrigerado.

Os sólidos solúveis presentes em bebidas açucaradas são compostos principalmente por açúcares e ácidos orgânicos, os quais são quantificados em termos de sólidos solúveis e expressos em °Brix (Miranda et al., 2023). Na bebida fermentada tipo kombucha com CAC foi identificada uma variação de  $8 \pm 0,00$  a  $7,03 \pm 0,05$  °Brix (figura 4B). Observou-se que apenas a formulação F1 no T12 ( $7,00 \pm 0,00$ ) diferiu para menos dos demais tempos ( $p < 0,05$ ). Ao analisar as diferenças estatísticas entre as três formulações ao longo do armazenamento, observa-se que apenas a formulação F3 diferiu para menos das demais em todos os tempos analisados ( $p < 0,05$ ). Isso pode ser atribuído ao maior teor de CAC nessa formulação (2,3%). A pouca variação no teor de sólidos solúveis da bebida fermentada durante o armazenamento pode ser atribuída a uma temperatura eficaz ( $2,7 \pm 0,06^\circ\text{C}$ ) utilizada.

Ao avaliarem a estabilidade de armazenamento a 4 e  $25^\circ\text{C}$  de uma bebida fermentada de pitaya vermelha durante oito semanas, Choo et al., (2018) identificaram que o valor de °Brix era estável a  $4^\circ\text{C}$  ( $28,6 \pm 0,11$  a  $28,6 \pm 0,15$ ) e apresentava uma diminuição gradual a  $25^\circ\text{C}$  ( $28,7 \pm 0,12$  a  $25,1 \pm 0,12$ ). Embora esse estudo tenha apresentado valores numericamente superiores em relação ao estudo abordado aqui, uma similaridade notável reside no comportamento constante mantido ao longo de todo o período de armazenamento refrigerado a  $4^\circ\text{C}$  em relação ao parâmetro °Brix.

Na acidez titulável (figura 4C), a formulação F2 apresentou o menor valor ( $0,09 \pm 0,00$  a  $0,10 \pm 0,00$  mg de ácido acético/100mL) ao longo de todo o armazenamento, diferindo estatisticamente no T0 ( $0,09 \pm 0,00$ ), como também, no T12 ( $0,08 \pm 0,00$ ) ( $p < 0,05$ ). A amostra F3 foi a que apresentou a maior acidez ( $p < 0,05$ ) em todos os tempos do armazenamento ( $0,29 \pm 0,01$  a  $0,30 \pm 0,00$  mg de ácido acético/100mL). Os valores encontrados nos T9 ( $0,31 \pm 0,01$ ) e T12 ( $0,30 \pm 0,00$ ) da F3, eram semelhantes ao teor de 0,35 mg de ácido acético/100mL presente em uma das amostras comerciais de kombucha (H1- substratos de chá branco), avaliadas por Andreson et al., (2022).

O pH, os sólidos solúveis e a acidez titulável desempenham papéis cruciais na estabilidade microbiológica, sensorial e química das bebidas fermentadas. O controle desses parâmetros é fundamental para garantir a qualidade e a segurança dessas bebidas, além de proporcionar características sensoriais desejáveis aos consumidores (Bichop et al., 2022).

Os resultados desta pesquisa revelam que a incorporação de CAC nas formulações de uma bebida fermentada do tipo kombucha conferiu impactos favoráveis quanto à faixa segura de valores de pH característica desse gênero de bebidas. A densidade de sólidos solúveis (°Brix) demonstrou um padrão estável ao longo do período de armazenamento e, no âmbito da acidez,

a formulação que incorporou a mais alta proporção de CAC revelou os níveis substanciais de acidez.

### 3.2.2 Parâmetros de cor

A análise de cor desempenha um papel de suma importância na indústria alimentícia, tendo em vista que as características sensoriais, incluindo a aparência cromática dos alimentos, desempenham um papel de relevância na atração e aceitação do consumidor. A estabilidade da cor é especialmente crítica nesse contexto, considerando que alimentos processados frequentemente possuem longos prazos de validade (Ribeiro et al., 2022). A tabela 2, apresenta a determinação dos parâmetros de cor analisados nas bebidas durante seu armazenamento utilizando a escala CIElab.

**Tabela 2.** Parâmetros de cor das bebidas fermentadas tipo kombucha com CAC com diferentes teores (F1: 0,7%; F2: 1,5% e F3: 2,3%), durante 12 dias sob armazenamento refrigerado ( $2,7 \pm 0,06^\circ\text{C}$ ).

Parâmetros	Amostra	T0	T3	T6	T9	T12
L*	F1	96,10 $\pm$ 0,01 <sup>eA</sup>	96,75 $\pm$ 0,00 <sup>eA</sup>	96,24 $\pm$ 0,01 <sup>dA</sup>	98,47 $\pm$ 0,01 <sup>aA</sup>	98,26 $\pm$ 0,04 <sup>bA</sup>
	F2	91,95 $\pm$ 0,01 <sup>dB</sup>	92,55 $\pm$ 0,01 <sup>cB</sup>	91,93 $\pm$ 0,00 <sup>dB</sup>	94,12 $\pm$ 0,01 <sup>aB</sup>	93,73 $\pm$ 0,05 <sup>bB</sup>
	F3	90,25 $\pm$ 0,01 <sup>cC</sup>	90,92 $\pm$ 0,01 <sup>cC</sup>	90,48 $\pm$ 0,00 <sup>dC</sup>	92,76 $\pm$ 0,00 <sup>aC</sup>	92,45 $\pm$ 0,06 <sup>bC</sup>
a*	F1	-0,54 $\pm$ 0,01 <sup>aC</sup>	-0,61 $\pm$ 0,00 <sup>bC</sup>	-0,57 $\pm$ 0,01 <sup>abC</sup>	-0,78 $\pm$ 0,00 <sup>cC</sup>	-0,61 $\pm$ 0,05 <sup>bC</sup>
	F2	1,15 $\pm$ 0,01 <sup>aB</sup>	1,12 $\pm$ 0,01 <sup>aB</sup>	1,12 $\pm$ 0,00 <sup>aB</sup>	0,95 $\pm$ 0,01 <sup>bB</sup>	1,19 $\pm$ 0,07 <sup>aB</sup>
	F3	2,01 $\pm$ 0,01 <sup>aA</sup>	1,73 $\pm$ 0,01 <sup>bA</sup>	1,63 $\pm$ 0,00 <sup>cA</sup>	1,39 $\pm$ 0,01 <sup>eA</sup>	1,53 $\pm$ 0,07 <sup>dA</sup>
b*	F1	14,33 $\pm$ 0,00 <sup>aC</sup>	13,77 $\pm$ 0,01 <sup>bC</sup>	13,55 $\pm$ 0,02 <sup>cC</sup>	13,55 $\pm$ 0,02 <sup>cC</sup>	13,23 $\pm$ 0,06 <sup>dC</sup>
	F2	24,84 $\pm$ 0,01 <sup>aB</sup>	24,70 $\pm$ 0,01 <sup>bB</sup>	24,49 $\pm$ 0,00 <sup>cB</sup>	24,57 $\pm$ 0,02 <sup>cB</sup>	24,21 $\pm$ 0,10 <sup>dB</sup>
	F3	31,50 $\pm$ 0,01 <sup>aA</sup>	30,98 $\pm$ 0,01 <sup>bA</sup>	30,41 $\pm$ 0,02 <sup>dA</sup>	30,51 $\pm$ 0,01 <sup>cA</sup>	29,45 $\pm$ 0,08 <sup>eA</sup>
C*	F1	14,33 $\pm$ 0,01 <sup>aC</sup>	13,78 $\pm$ 0,01 <sup>bC</sup>	13,57 $\pm$ 0,01 <sup>cC</sup>	13,57 $\pm$ 0,02 <sup>cC</sup>	13,24 $\pm$ 0,06 <sup>dC</sup>
	F2	24,87 $\pm$ 0,01 <sup>aB</sup>	24,72 $\pm$ 0,01 <sup>bB</sup>	24,51 $\pm$ 0,00 <sup>cB</sup>	24,58 $\pm$ 0,01 <sup>cB</sup>	24,24 $\pm$ 0,11 <sup>dB</sup>
	F3	31,57 $\pm$ 0,01 <sup>aA</sup>	31,03 $\pm$ 0,01 <sup>bA</sup>	30,44 $\pm$ 0,01 <sup>dA</sup>	30,54 $\pm$ 0,01 <sup>cA</sup>	29,49 $\pm$ 0,08 <sup>eA</sup>
h <sub>ab</sub> <sup>o</sup>	F1	92,16 $\pm$ 0,02 <sup>aA</sup>	92,55 $\pm$ 0,00 <sup>bA</sup>	92,41 $\pm$ 0,03 <sup>bA</sup>	93,29 $\pm$ 0,01 <sup>aA</sup>	92,65 $\pm$ 0,20 <sup>bA</sup>
	F2	87,33 $\pm$ 0,01 <sup>bcB</sup>	87,40 $\pm$ 0,02 <sup>bB</sup>	87,36 $\pm$ 0,00 <sup>bcB</sup>	87,77 $\pm$ 0,02 <sup>aB</sup>	87,19 $\pm$ 0,16 <sup>cB</sup>
	F3	86,34 $\pm$ 0,01 <sup>dC</sup>	86,79 $\pm$ 0,01 <sup>cC</sup>	86,94 $\pm$ 0,00 <sup>bC</sup>	87,37 $\pm$ 0,03 <sup>aC</sup>	87,01 $\pm$ 0,013 <sup>bB</sup>

Valores médios com letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no mesmo tratamento ao longo do tempo. Valores médios com letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) dentro do mesmo tempo para tratamentos diferentes.

Os resultados obtidos de  $L^*$  variaram entre  $90,25 \pm 0,01$  a  $98,47 \pm 0,01$  indicando uma diferença ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos, nos mesmos períodos de tempo ao longo do armazenamento. A amostra F1 ( $96,10 \pm 0,01$  a  $98,47 \pm 0,01$ ) foi a mais clara em comparação com a amostra F3 ( $90,25 \pm 0,01$  a  $92,45 \pm 0,06$ ) ( $p < 0,05$ ). A intensidade da coloração observada em F3 é justificada pela presença predominante de CAC.

Os valores de  $a^*$  e  $b^*$  variaram de  $-0,54 \pm 0,01$  a  $2,01 \pm 0,01$  e  $13,23 \pm 0,06$  a  $31,50 \pm 0,01$ , respectivamente, entre os tratamentos no mesmo tempo, e aumentaram ( $p < 0,05$ ) ao longo de 12 dias de armazenamento. Foi possível detectar que a formulação F3 apresentou uma tonalidade vermelha ( $1,39 \pm 0,01$  a  $2,01 \pm 0,01$ ), justificada pela maior concentração de CAC. Já em relação ao parâmetro  $b^*$ , foi possível reconhecer que todas as amostras ao longo do armazenamento mostraram uma tonalidade amarelada, possivelmente justificado pela presença dos compostos fenólicos nas amostras.

Em relação aos valores de  $C^*$  e  $h_{ab}^{\circ}$  foram encontradas variações de  $13,24 \pm 0,06$  a  $31,57 \pm 0,01$  e  $86,34 \pm 0,01$  a  $93,29 \pm 0,01$ , respectivamente para as amostras F1, F2 e F3. A amostra F3, apresentou maior saturação ( $29,49 \pm 0,08$  a  $31,57 \pm 0,01$ ) entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ) e menor tonalidade ( $86,34 \pm 0,01$  a  $87,37 \pm 0,03$ ), diferindo ( $p < 0,05$ ) do tempo 0 ao tempo 9 durante o armazenamento.

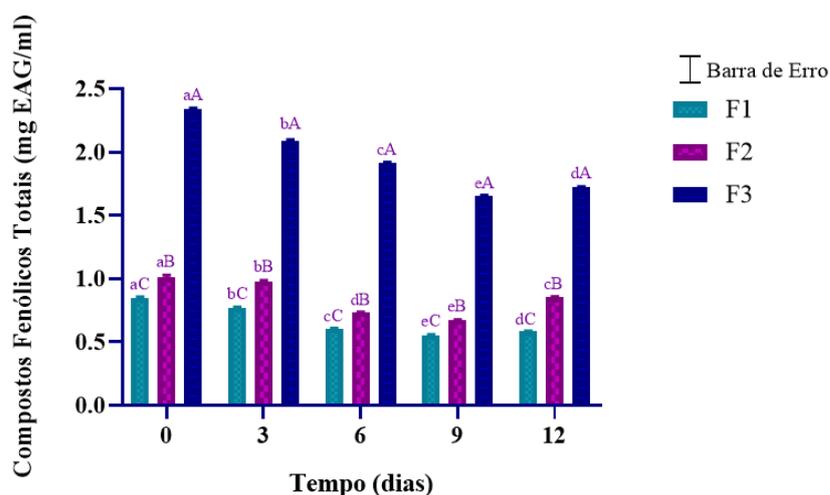
Ao analisar o potencial probiótico de uma bebida fermentada tipo kombucha utilizando flor de ervilha borboleta (*Clitoria ternatea* L.) com a adição de *Lactiplantibacillus plantarum*, durante vinte e oito dias de armazenamento refrigerado a  $4^{\circ}\text{C}$ , Majid et al. (2023), detectaram que após 21 dias, os valores de  $L^*$  e  $a^*$  da PBK6 (amostra com adição de  $10^6$  UFC/mL) apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), enquanto o valor de  $b^*$  apresentou diferença significativa aos 14 dias. Esses resultados indicam variações na cor ao longo do período de armazenamento e apresentam-se em consonância com os achados do estudo da bebida fermentada com CAC, já que também foram observadas alterações nos parâmetros colorimétricos das formulações analisadas durante o período de armazenamento.

As variações de cor observadas nos estudos podem estar associadas aos fenômenos de biotransformação de compostos fenólicos. Durante esses processos, ocorrem junções ou degradações moleculares, resultando em alterações significativas no teor de compostos fenólicos e, conseqüentemente, na modificação da cor da bebida. Essas transformações químicas podem ser influenciadas por fatores como a composição do meio de fermentação, as cepas microbianas envolvidas no processo de fermentação, as condições de pH e temperatura. O entendimento desses processos é relevante para a compreensão da qualidade e estabilidade

das bebidas, bem como para a manipulação e controle da coloração desejada no produto final (Miranda et al., 2023).

### 3.2.3 Compostos fenólicos totais (CFT)

Os CFT são metabólitos secundários produzidos pelas plantas e são caracterizados por sua capacidade antioxidante. Esses compostos desempenham um papel crucial na neutralização de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, protegendo assim os sistemas biológicos contra danos oxidativos. No contexto das bebidas fermentadas tipo kombucha, a atividade antioxidante da bebida está diretamente relacionada ao substrato utilizado durante o processo de fermentação (Bortolomedi et al., 2022). Os resultados obtidos da bebida fermentada com a CAC relativos aos compostos fenólicos totais são apresentados na Figura 5.



**Figura 5.** Compostos fenólicos totais de bebidas fermentadas com casca de amêndoa de cacau com diferentes teores (F1: 0,7%; F2: 1,5% e F3: 2,3%), durante 12 dias sob armazenamento refrigerado ( $2,7 \pm 0,06^{\circ}\text{C}$ ).

Nota: valores médios com letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no mesmo tratamento ao longo do tempo. Valores médios com letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) dentro do mesmo tempo para tratamentos diferentes.

No presente estudo observou-se diferenças ( $p < 0,05$ ) do CFT entre os tratamentos F1, F2 e F3 com variações entre  $0,55 \pm 0,00$  a  $2,33 \pm 0,00$  mg EAG/mL, tanto entre as diferentes formulações quanto durante todo o período de armazenamento. Foi observado na formulação F3 no T0 ( $2,33 \pm 0,00$ ) o maior teor de CFT ( $p < 0,05$ ), que corresponde à amostra com maior percentual de CAC (2,3%). Ao longo do armazenamento, entre os tempos T0 e T9, foi observada uma redução ( $p < 0,05$ ) dos CFT em todos os tratamentos, com um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no T12 (Figura 5). A menor redução foi constatada na formulação F3

( $2,33 \pm 0,00$  a  $1,73 \pm 0,00$  mg EAG/mL), demonstrando a maior estabilidade dos CFT durante o período de armazenamento. Em contraste, a formulação F1 apresentou a menor estabilidade durante o período analisado. Essa distinção destaca a influência das formulações na manutenção dos compostos ao longo do armazenamento.

Ao utilizarem culturas de kombuchas na produção de uma bebida fermentada láctea, Sarkaya et al., (2021) identificaram que as amostras C (fermentado 100% com leite) e G (fermentado de chá verde com leite), durante o período de armazenamento de 30 dias sob refrigeração de  $4,0 \pm 1^\circ\text{C}$ , apresentaram no 30º dia o maior valor (31 a 81,51 mg EAG/mL, respectivamente) dos CFT ( $p < 0,05$ ). Esses dados apresentam semelhanças com as conclusões deste estudo sobre a bebida contendo CAC, no qual foi observado um aumento significativo dos teores de CFT no tempo 12.

Bebidas fermentadas com SCOBY possuem um potencial antioxidante significativo. Essa capacidade antioxidante é ampliada durante o processo fermentativo, tanto em bebidas fermentadas com *C. sinensis* quanto em substratos alternativos. Formas complexadas dos compostos fenólicos presentes nessas bebidas podem ser decompostas em formas mais simples ou moléculas menores. Esse processo de decomposição é facilitado pelo ambiente ácido da fermentação e pela ação de enzimas liberadas pelas bactérias e leveduras presentes na cultura simbiótica de bebidas tipo kombucha. Como resultado, o teor CFT nas bebidas fermentadas é aumentado (Noronha et al., 2022), o que justificaria o aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em todos os tratamentos no T12 deste estudo.

### 3.3 Análise sensorial

Neste estudo, a análise sensorial foi conduzida para avaliação do perfil do consumidor, assim como, a aceitação e atitude de compra da bebida fermentada com coproduto de cacau, tendo como resultados a compreensão sobre a receptividade do produto por parte dos consumidores.

Os resultados obtidos ao analisar o perfil do consumidor (Tabela 3) constituem um pilar para compreensão dos hábitos, preferências e comportamentos do público-alvo em relação a um produto. Oferecendo uma visão detalhada e significativa sobre as características demográficas, educacionais, ocupacionais e padrões de consumo, desempenhando um papel crucial na formulação de estratégias de mercado mais eficazes e na personalização de produtos para atender às necessidades e demandas dos consumidores (Giacalone et al., 2022).

**Tabela 3.** Perfil do consumidor dos participantes.

<b>Características</b>	<b>N</b>
<b>Faixa etária</b>	
18-29	90
30-39	18
40-49	1
50-59	1
>60	0
<b>Grau de escolaridade</b>	
Fundamental ou 1º grau incompleto	0
Fundamental ou 1º grau completo	0
Médio ou 2º grau incompleto	1
Médio ou 2º grau completo	16
Ensino médio com profissionalizante completo	4
Curso técnico completo	3
Superior incompleto	63
Superior completo	8
Pós-graduação	15
Prefiro não responder	0
<b>Ocupação atual</b>	
Trabalho em tempo integral	12
Trabalho em tempo parcial	4
Não trabalho/estudo	1
Estudante de graduação	82
Estudante de pós-graduação	9
Prefiro não responder	2
<b>Conhece bebidas fermentadas não lácteas?</b>	
Sim	76
Não	34
<b>Qual a frequência de consumo caso conheça bebidas fermentadas não lácteas?</b>	
Nunca	36
Semestralmente	23
Mensalmente	10
Quinzenalmente	1
Diariamente	7
<b>Qual o motivo do consumo?</b>	
Sabor	14
Benefícios à saúde	20
Alternativas às bebidas lácteas	9
Variedade na dieta	10
Não sei	37

N= Número de respostas obtidas.

Como resultados, foi obtido que na faixa etária analisada, a maior parte dos consumidores, 81%, situava-se entre 18 e 29 anos. Em relação ao nível de instrução, 57% possuíam ensino superior incompleto, e, em termos de ocupação, 74% estavam cursando cursos de graduação. No que diz respeito ao consumo de bebidas fermentadas não lácteas, 69% dos consumidores afirmaram ter conhecimento sobre bebidas como o kombucha. Entretanto, 47% desse grupo relataram nunca consumir esse tipo de bebida com frequência. Adicionalmente,

dentro do conjunto de consumidores que estavam familiarizados com o produto, 48% não puderam descrever o propósito ou objetivo por trás do consumo dessas bebidas.

Essa lacuna pode estar relacionada a vários fatores, como disponibilidade, preço, preferências de sabor ou falta de entendimento sobre os benefícios associados a essas bebidas, como o valor funcional ou apelo saudável. Essa falta de compreensão pode ser um obstáculo para a aceitação e adoção generalizada desses produtos. Entre as medidas consideradas essenciais para melhorar o conhecimento a respeito desse tipo de produto destacam-se campanhas informativas, estabelecimento de símbolos para a pronta identificação do produto/benefício, implementação de programas educativos nas instituições de ensino e aprimoramento das informações presentes nos rótulos das embalagens (Simões & Rodrigues, 2023). Na Tabela 4 é possível identificar os valores obtidos no teste de aceitação, juntamente com o índice de aceitação.

**Tabela 4.** Escore médio do teste de aceitabilidade.

Amostra	Cor	Odor	Sabor	Aceitabilidade
F1	6,54± 1,55 <sup>a</sup>	5,49±2,01 <sup>a</sup>	6,39±1,84 <sup>a</sup>	6,40±1,57 <sup>a</sup>
F2	6,92±1,53 <sup>a</sup>	5,71±2,04 <sup>a</sup>	5,92±2,12 <sup>ab</sup>	6,15±1,79 <sup>a</sup>
F3	6,64± 1,89 <sup>a</sup>	5,77±2,10 <sup>a</sup>	5,72±2,25 <sup>b</sup>	6,01±1,81 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ).

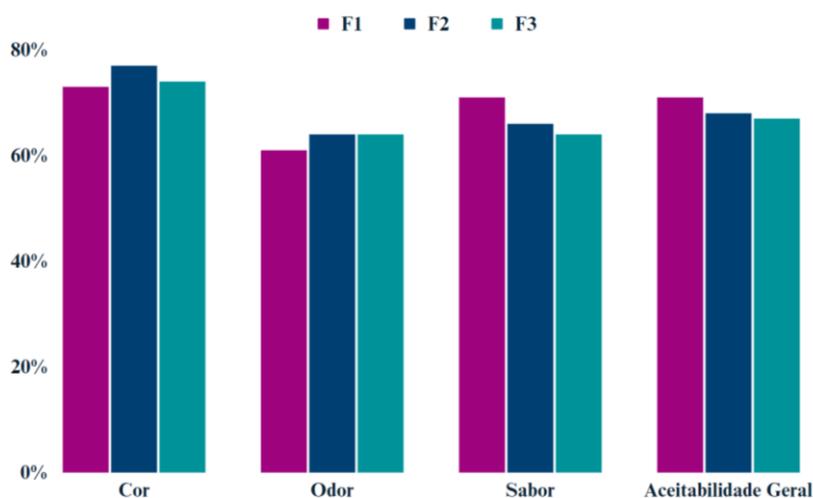


Figura 6. Índice de aceitação.

Os resultados da avaliação da aceitação da cor indicaram que todas as três amostras, F1, F2 e F3, apresentaram médias de cor que variaram de  $6,54 \pm 1,55$  a  $6,92 \pm 1,53$ , ( $p < 0,05$ ). A amostra F2 obteve 77% de índice de aceitação em relação à cor, seguida pela amostra F3 com 74%, e a amostra F1 com 73%. Isso sugere que as três amostras foram bem avaliadas em termos de sua aparência visual. Entre os comentários registrados pelos provadores, foi destacado que a cor da bebida era atraente.

Em relação ao odor, todas as três amostras, receberam pontuações semelhantes ( $p > 0,05$ ), onde as médias variaram de  $5,49 \pm 2,01$  a  $5,77 \pm 2,10$  e o índice de aceitação de 61 e 64% para as três amostras respectivamente. Foi evidenciado pelos provadores o odor forte de produto fermentado, além de notas de mel. Em investigações futuras, é viável considerar a utilização de frutas, especiarias ou ervas para a saborização da bebida como estratégia para mitigar o odor característico da fermentação. Tal abordagem tem o potencial de otimizar a aceitação sensorial por parte dos consumidores, ao conferir um caráter olfativo mais agradável ao produto em questão (Nedele et al., 2021).

Com relação ao sabor, as amostras F1 ( $6,39 \pm 1,84$ ) e F3 ( $5,72 \pm 2,25$ ) diferiram entre si ( $p < 0,05$ ). Em relação ao índice de aceitação, as amostras variaram de 71 a 64%, e, foi destacado pelos provadores que para a amostra F1 se tornar ainda mais aceitável seria necessária uma maior doçura, além de destacarem que o sabor da amostra lembrava notas de chá preto, café e caramelo. No que se refere à amostra F3, foi evidenciada a maior intensidade da amostra no sabor de cacau que lembrava levemente achocolatado, o que é justificado pelo fato da amostra ser a que apresenta maior porcentagem de CAC.

No parâmetro aceitabilidade geral, as amostras não apresentaram diferenças entre si ( $p > 0,05$ ), sendo observadas variações de  $6,01 \pm 1,81$ ,  $6,15 \pm 1,79$  e  $6,4 \pm 1,57$ , para as formulações F3, F2 e F1 respectivamente. Ao analisar o perfil volátil, microbiano e sensorial de uma bebida tipo kombucha a partir da infusão com cascaras de café do Brasil e da Nicarágua, Sales et al (2023) encontraram resultados semelhantes ao do presente estudo. Eles identificaram que a aceitação média das amostras do Brasil ficou em  $6,0 \pm 0,14$  e o índice de aceitação entre 63% e 69%. Apenas a amostra fermentada por três dias com origem Nicaraguense obteve uma média de  $7 \pm 1,5$  e um IA% de 78%. Foi destacado ainda, a inclinação dos consumidores brasileiros para bebidas mais adocicadas. Todavia, os autores enfatizaram que o desenvolvimento de produtos mais nutritivos é relevante devido às atuais recomendações de reduções no consumo de açúcares.

Francisco, José & Igor (2021) ao avaliarem o desenvolvimento de uma bebida de kombucha utilizando milho germinado e sem adição de açúcar, identificaram que as médias

obtidas para aparência, sabor, odor, cor e sensação bucal no teste de aceitação foram de  $5,2 \pm 1,6$ ,  $7,4 \pm 2,1$ ,  $5,4 \pm 2,0$ ,  $5,1 \pm 1,9$  e  $4,9 \pm 2,0$ , respectivamente. Observa-se que a bebida fermentada tipo kombucha utilizando CAC obteve médias de aceitação melhores do que a bebida desenvolvida por Francisco e colaboradores ao utilizarem milho germinado.

No teste de atitude de compra foi possível verificar que a média obtida para as três formulações variou de  $2,98 \pm 1,21$  a  $3,20 \pm 1,03$ , ( $p < 0,05$ ), o que corresponde dentro da escala as variáveis tinham dúvida se compraria a provavelmente compraria. Os dados encontrados corroboram com de Sales et al., (2023), onde as médias obtidas foram de  $2,9 \pm 1,2$  a  $3,6 \pm 1,0$ , ao desenvolverem uma bebida tipo kombucha utilizando cascaras de café do Brasil e da Nicarágua.

A consistência nos resultados entre este estudo e o de Sales et al., (2023), sugere uma tendência perceptível na atitude de compra em relação a bebidas fermentadas com substratos alternativos a *C. sinensis*. Mesmo com uma ligeira variabilidade nas classificações, é importante notar a coerência desses resultados, o que sugere uma possível tendência dentro de uma faixa específica de pontuações. Diversos fatores podem contribuir para esse padrão. Consumidores muitas vezes associam os novos sabores aos tradicionais e essa comparação pode criar uma discrepância entre as expectativas tradicionais e a experiência sensorial real, impactando a avaliação.

### 3.4 Perfil microbiológico da bebida fermentada

A composição microbiológica de bebidas fermentadas tipo kombucha pode exibir variações significativas de acordo com diversos fatores, como a cultura inicial utilizada, a localização geográfica, o clima, as espécies de leveduras e bactérias presentes e a matriz de fermentação empregada. A literatura científica tem evidenciado que as culturas iniciais empregadas na produção de kombucha podem exercer influência sobre o perfil antioxidante presente nessa bebida fermentada. Compreender a diversidade microbiana envolvida nesse processo é fundamental para otimizar a produção de bebidas tipo kombucha e maximizar os benefícios à saúde relacionados à presença de antioxidantes. Além disso, tais descobertas incentivam investigações adicionais visando à identificação e caracterização de diferentes linhagens microbianas e suas contribuições específicas, abrindo caminho para aprimoramentos na formulação e potenciais aplicações dessa bebida fermentada (Bishop et al., 2022).

A seleção da formulação F3, contendo 2,3% de CAC, foi fundamentada na avaliação das análises de caracterização e estabilidade durante o armazenamento. Os resultados obtidos indicaram manifestações positivas evidenciadas nos parâmetros de natureza físico-química,

como pH, sólidos solúveis, acidez titulável, cor e elevado destaque para a menor redução observada dos CFT durante o período de armazenamento.

As principais espécies identificadas na bebida fermentada foram *Komagataeibacter saccharivorans*, *Komagataeibacter sucrofermentans*, *Komagataeibacter rhaeticus*, *Komagataeibacter hansenii*, *Acetobacter estunensis*, *Gluconacetobacter entanii*, *Komagataeibacter xylinus* e *Brettanomyces bruxellensis*, *Pichia manshurica*, e *Brettanomyces anomalus*, como leveduras.

Resultados semelhantes foram encontrados por Leonarski et al., (2021), que desenvolveram uma bebida fermentada tipo kombucha com coproduto de acerola e as principais cepas identificadas no inóculo foram bactérias *Komagataeibacter rhaeticus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus aryabhattai*, *Bacillus flexus* e *Bacillus simplex*, bem como as leveduras *Brettanomyces bruxellensis* e *Zygosaccharomyces bisporus*.

Alguns dos microrganismos mencionados, como a espécie bacteriana *Komagataeibacter saccharivorans*, estão sendo objeto de estudo devido ao seu potencial biotecnológico em diversas áreas, conforme evidenciado por Gopu & Govindan (2018). O estudo deles destacou que o isolamento desta cepa em uvas sem valor comercial revelou um notável potencial para a produção eficiente de celulose bacteriana em um curto período. Este enfoque não apenas visa assegurar a segurança e qualidade do produto, mas também promove oportunidades significativas para inovação em produtos e processos. O potencial biotecnológico de novos microrganismos na produção de compostos de valor agregado, como a produção de celulose bacteriana, bioaromas e biosurfactantes destaca-se como uma área promissora e inovadora (Pêsoa et al., 2019).

No processo de fermentação, a utilização de bactérias do ácido acético, como *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* e *Gluconobacter oxydans*, juntamente com diversas leveduras, como *Saccharomyces* sp., *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, *Toruposis* sp., *Pichia* sp. e *Brettanomyces* sp., estabelece uma relação simbiótica altamente significativa. Essa simbiose resulta em benefícios notáveis, uma vez que as interações entre esses microrganismos atuam de forma sinérgica para inibir o crescimento e a contaminação por microrganismos deteriorantes e patogênicos indesejados. As leveduras desempenham um papel fundamental na fermentação alcoólica, convertendo açúcares em álcool e outros compostos bioquímicos importantes para o processo. Já as bactérias do ácido acético, contribuem para a produção de ácido acético, essencial na acidificação do meio e criação de condições desfavoráveis para microrganismos indesejados (Bichop et al., 2022).

#### 4. Conclusão e perspectivas futuras

A utilização da CAC em uma bebida fermentada do tipo kombucha, revelou exibir propriedades físico-químicas e microbiológicas promissoras, proporcionando uma base sólida para o desenvolvimento de bebidas. Foram evidenciados efeitos antioxidantes e presença de compostos fenólicos totais em todas as formulações analisadas, contudo, há um relevado destaque para a formulação F3, que corresponde à amostra com maior percentual de CAC (2,3%). Ao longo do armazenamento refrigerado ( $2,7 \pm 0,06^{\circ}\text{C}$ ) de 12 dias, foi a amostra que apresentou os melhores parâmetros físico-químicos, a citar, um pH (3,26 a 4,16) considerado de qualidade e seguro para consumo em bebidas fermentadas tipo kombucha, invariabilidade ao longo do armazenamento nos sólidos solúveis (7,03 a 8 °Brix), evidenciando a provável eficácia da temperatura na garantia da estabilização de possíveis reações de fermentação, valores notáveis de ácido acético (0,29 mg de ácido acético/100mL), o que pode ser justificado pelo maior teor de CAC presente na amostra, como também, melhor garantia da estabilidade no tocante aos CFT, devido à menor redução observada ao longo do tempo.

Na análise sensorial, identificou-se que os participantes eram predominantemente jovens e universitários, apresentaram conhecimento sobre bebidas fermentadas não lácteas, apesar de não consumirem regularmente. No teste de aceitação, verificou-se variações de 6,1 a 6,4, e a média do índice de aceitação para as três formulações foi de 68,6%. Atitude de compra para a bebida variou de 2,98 a 3,20 ( $p > 0,05$ ). O sequenciamento de alto rendimento indicou predominância de bactérias do gênero (*Komagataeibacter*, *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*) e leveduras (*Brettanomyces*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*).

Esta pesquisa adota uma abordagem científica de grande relevância no contexto do desenvolvimento de novos produtos, atendendo às demandas dos consumidores por alternativas alimentares que promovam o bem-estar individual e também estejam alinhadas com preocupações éticas e ambientais. Notou-se que uma das características relevantes da bebida desenvolvida, reside no tempo de produção em comparação com o tempo de produção de uma kombucha convencional, que foi de apenas 24 horas. O processo de fermentação da kombucha tradicional ocorre ao longo de um período de 10 a 15 dias. O avanço nesse segmento diversifica as escolhas disponíveis, proporcionando opções saudáveis e também contribui para a construção de uma cadeia alimentar sustentável, abordando questões como redução do impacto ambiental e uso eficiente de recursos. Como projeções para pesquisas futuras, torna-se imperativo realizar investigações mais abrangentes como análises físico-químicas em até seis meses de armazenamento, a fim de avaliar a estabilidade nutricional e oxidativa da bebida

contendo CAC, bem como, seus efeitos sobre a saúde humana. Como também análise de um controle positivo com uma kombucha tradicional, permitindo o acesso a dados comparativos entre as bebidas e seus diferenciais.

### **Agradecimentos**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES), Código Financeiro 001 (CAPES/Brasil, Processo nº 88887.664101/2022-00) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brasil, Processos nos. 409924/2021-0; 465594/2014-0) pelo apoio financeiro. C. D. Ferreira Ribeiro e C. O. de Souza agradecem ao CNPq/Brasil por suas Bolsas de Produtividade em Desenvolvimento Tecnológico e Extensão Inovadora (Processos n. 303587/2021-0 e 309955/2022-0).

### **Contribuições dos autores**

L.M.S. escreveu o rascunho original e foi responsável pela metodologia, análise formal, redação, revisão e edição. J.C.A. contribuiu com a redação, a revisão e a edição. S.N.A.V. contribuiu com a metodologia, redação, revisão e edição; E.R.R.; J.M.R.B.S.F. e C.O.S. contribuíram com a metodologia e a última também contribuiu com o financiamento; C.D.F.R. foi responsável pela conceituação, financiamento, supervisão, revisão e edição. M.N.R. também conceituou e supervisionou.

### **Declaração de divulgação**

Os autores não relatam possíveis conflitos de interesse.

### **ORCID:**

Lívia de Matos Santos: <https://orcid.org/0000-0003-4394-8646>

Janaína de Carvalho Alves: <https://orcid.org/0000-0001-9684-8556>

Suelen Neris Almeida Viana: <https://orcid.org/0000-0003-3800-1060>

Elis dos Reis Requião: <https://orcid.org/0009-0001-2734-5186>

Jéssica Maria Rio Branco dos Santos: <https://orcid.org/0000-0002-6083-2808>

Carolina Oliveira de Souza: <https://orcid.org/0000-0002-8028-5418>

Camila Duarte Ferreira Ribeiro: <https://orcid.org/0000-0003-2968-5739>

Mariana Nougalli Roselino: <https://orcid.org/0000-0002-4831-985X>

## Referências

- Acquah, J., B., Amissah, J., G., N., Affrifah, N., S., Wooster, T., J. & Danquah, A., O. (2023). Consumer perceptions of plant based beverages: The Ghanaian consumer's perspective. *Future Foods*, 7, 100229. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2023.100229>.
- Aloulou, K. Hamden, D. Elloumi, M.B. Ali, K. Hargafi, B. Jaouadi, F. Ayadi, A. Elfeki, E. Ammar Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats *BMC Complement. Med. Ther.*, 12 (2012), pp. 63-72. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-63>.
- Andreson, M., Kazantseva, J., Kuldjäär, R., Malv, E., Vaikma, H., Kaleda, A., Kütt, M. L., & Vilu, R. (2022). Characterisation of chemical, microbial and sensory profiles of commercial kombuchas. *International Journal of Food Microbiology*, 373, 109715. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2022.109715>.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis of the association of the official analytical chemists** 18.ed. Washington: AOAC, 2007. 1750p.
- Arlorio, M., Locatelli, M., Travaglia, F., Coisson, J. D., Grosso, E. Del, Minassi, A., Appendino, G., & Martelli, A. (2008). Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao*L.). *Food Chemistry*, 106(3), 967–975. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2007.07.009>.
- Avcioglu, N. H., Birben, M., & Seyis Bilkay, I. (2021). Optimization and physicochemical characterization of enhanced microbial cellulose production with a new Kombucha consortium. *Process Biochemistry*, 108, 60–68. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2021.06.005>.
- Bishop, P., Pitts, E. R., Budner, D., & Thompson-Witrick, K. A. (2022). Kombucha: Biochemical and microbiological impacts on the chemical and flavor profile. *Food Chemistry Advances*, 1, 100025. <https://doi.org/10.1016/J.FOCHA.2022.100025>.
- Bortolomedi, B. M., Paglarini, C. S., & Brod, F. C. A. (2022). Bioactive compounds in kombucha: A review of substrate effect and fermentation conditions. *Food Chemistry*, 385, 132719. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.132719>.
- Brainer, M.S.C.P. (Jan. 2021). Cocoa production [Electronic Version]. CadernoSetorialEtene. Accessed September 1, 2022 from [https://www.bnb.gov.br/s482dSPACE/bitstream/123456789/650/3/2021\\_CDS\\_149.pdf](https://www.bnb.gov.br/s482dSPACE/bitstream/123456789/650/3/2021_CDS_149.pdf).
- BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 41, DE 17 DE SETEMBRO DE 2019 - INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 41, DE 17 DE SETEMBRO DE 2019 - DOU - Imprensa Nacional. (n.d.). Retrieved August 18, 2023, from <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-41-de-17-de-setembro-de-2019-216803534>.
- BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN Nº 161, DE 1º DE JULHO DE 2022 - INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN Nº 161, DE 1º DE JULHO DE 2022 - DOU - Imprensa Nacional. (n.d.).

Retrieved December 4, 2023, from <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-161-de-1-de-julho-de-2022-413366880>

- Choo, K. Y., Kho, C., Ong, Y. Y., Thoo, Y. Y., Lim, R. L. H., Tan, C. P., & Ho, C. W. (2018). Studies on the storage stability of fermented red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) drink. *Food Science and Biotechnology*, 27(5), 1411–1417. <https://doi.org/10.1007/S10068-018-0367-4>.
- Coelho, R. M. D., Almeida, A. L. de, Amaral, R. Q. G. do, Mota, R. N. da, & Sousa, P. H. M. de. (2020). Kombucha: Review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 22, 100272. <https://doi.org/10.1016/J.IJGFS.2020.100272>.
- Diez-Ozaeta, I., & Astiazaran, O. J. (2022). Recent advances in Kombucha tea: Microbial consortium, chemical parameters, health implications and biocellulose production. *International Journal of Food Microbiology*, 377, 109783. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2022.109783>.
- Ferreira, C. D., da Conceição, E. J. L., Machado, B. A. S., Hermes, V. S., de Oliveira Rios, A., Druzian, J. I., & Nunes, I. L. (2016). Physicochemical Characterization and Oxidative Stability of Microencapsulated Crude Palm Oil by Spray Drying. *Food and Bioprocess Technology*, 9(1), 124–136. <https://doi.org/10.1007/S11947-015-1603-Z>.
- FORTUNE BUSINESS INSIGHTS (2022). Cocoa and Chocolate Market Size, Share and COVID-19 Impact Analysis, By Type (Cocoa Ingredients (Butter, Liquor, Powder) and Chocolate (Dark, Milk, White, and Filled)), By Application (Food & Beverage, Cosmetics, Pharmaceuticals, and Others), and Regional Forecast, 2022-2029. Accessed April 29, 2022 from <https://www.fortunebusinessinsights.com/amp/industry-reports/cocoa-and-chocolate-market-100075>.
- Francisco, Á. R., José, de la R. M., & Igor, H. (2021). Development of a no added sugar kombucha beverage based on germinated corn. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 24, 100355. <https://doi.org/10.1016/J.IJGFS.2021.100355>
- Gopu, G., & Govindan, S. (2018). Production of bacterial cellulose from *Komagataeibacter saccharivorans* strain BC1 isolated from rotten green grapes. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 48(9), 842–852. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1513032>
- Hennessey-Ramos, L., Murillo-Arango, W., Vasco-Correa, J., & Astudillo, I. C. P. (2021). Enzymatic Extraction and Characterization of Pectin from Cocoa Pod Husks (*Theobroma cacao* L.) Using Celluclast® 1.5 L. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 1473, 26(5), 1473. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26051473>.
- Giacalone, D., Clausen, M. P., & Jaeger, S. R. (2022). Understanding barriers to consumption of plant-based foods and beverages: insights from sensory and consumer science. *Current Opinion in Food Science*, 48, 100919. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2022.100919>
- IAL– Instituto Adolfo Lutz. (2008). Chemical and physical methods for food analysis, fourth ed. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.
- Ivanisova, K. Menhartova, M. Terentjeva, L. Harangozo, A. Kantor, M. Kacaniova. The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory Properties of kombucha tea Beverage

- (2020). *J. Food Sci. Technol.*, 57 (2020), pp. 1840-1846. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04217-3>.
- Kilic, G., Sengun, I., Y. Bioactive properties of Kombucha beverages produced with Anatolian hawthorn (*Crataegus orientalis*) and nettle (*Urtica dioica*) leaves (2023). *Food Bioscience*, 53, 102631. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102631>.
- Konica Minolta Sensing. *Entendendo o Espaço de Cor L\*a\*b\** / (2023). Retrieved July 21, 2023, from <https://sensing.konicaminolta.us/br/blog/entendendo-o-espaco-de-cor-lab/>.
- Lazzaroli, C., Sordini, B., Daidone, L., Veneziani, G., Esposito, S., Urbani, S., Selvaggini, R., Servili, M., & Taticchi, A. (2023). Recovery and valorization of food industry by-products through the application of *Olea europaea* L. leaves in kombucha tea manufacturing. *Food Bioscience*, 53, 102551. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2023.102551>
- Leonarski, E., Cesca, K., Zanella, E., Stambuk, B. U., de Oliveira, D., & Poletto, P. (2021). Production of kombucha-like beverage and bacterial cellulose by acerola byproduct as raw material. *LWT*, 135, 110075. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.110075>.
- Majid, A., A., Suroto, D., A., Utami, T., Rahayu, E., S. (2023). Probiotic potential of kombucha drink from butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.) flower with the addition of *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *Plantarum*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, p. 102776–102776, 1 jun. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102776>.
- Miranda F., J., Martins Pereira Belo, G., Silva de Lima, L., Alencar Silva, K., Matsue Uekane, T., Gonçalves Martins Gonzalez, A., Naciuk Castelo Branco, V., Souza Pitangui, N., Freitas Fernandes, F., & Ribeiro Lima, A. (2023). Arabic coffee infusion based kombucha: Characterization and biological activity during fermentation, and in vivo toxicity. *Food Chemistry*, 412, 135556. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2023.135556>.
- Morales, D. (2020). Biological activities of kombucha beverages: The need of clinical evidence. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 323–333. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.09.025>.
- Nedele, A. K., Gross, S., Rigling, M., & Zhang, Y. (2021). Reduction of green off-flavor compounds: Comparison of key odorants during fermentation of soy drink with *Lycoperdon pyriforme*. *Food Chemistry*, 334, 127591. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.127591>
- Noronha, M. C., Cardoso, R. R., dos Santos D'Almeida, C. T., Vieira do Carmo, M. A., Azevedo, L., Maltarollo, V. G., Júnior, J. I. R., Eller, M. R., Cameron, L. C., Ferreira, M. S. L., & Barros, F. A. R. de. (2022). Black tea kombucha: Physicochemical, microbiological and comprehensive phenolic profile changes during fermentation, and antimalarial activity. *Food Chemistry*, 384, 132515. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.132515>.
- Pagliari, S., Celano, R., Rastrelli, L., Sacco, E., Arlati, F., Labra, M., & Campone, L. (2022). Extraction of methylxanthines by pressurized hot water extraction from cocoa shell by-product as natural source of functional ingredient. *LWT*, 170. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114115>
- Paladines-Santacruz, G., Orellana-Manzano, A., Sarmiento, G., Piloza, G., Iñiga, E., Zaruma-Torres, F., Ortiz-Ulloa, J., Quijano-Avilés, M., Di Grumo, D., Orellana-Manzano, S., Villacrés, M. del C., Manzano, P., & Vanden Berghe, W. (2021). Acute oral toxicity of a novel functional drink based on *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens*, and cocoa husk. *Toxicology Reports*, 8, 747–752. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2021.03.026>.

- Pessôa, M. G., Vespermann, K. A. C., Paulino, B. N., Barcelos, M. C. S., Pastore, G. M., & Molina, G. (2019). Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 37(2), 319–339. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2019.01.007>
- Rebollo-Hernanz, M., Cañas, S., Taladrid, D., Segovia, Á., Bartolomé, B., Aguilera, Y., & Martín-Cabrejas, M. A. (2021). Extraction of phenolic compounds from cocoa shell: Modeling using response surface methodology and artificial neural networks. *Separation and Purification Technology*, 270, 118779. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2021.118779>.
- Ribeiro, C.D.F., Barbosa Schappo, F., da Silva Sales, I., Santos Assunção, L., Murowaniecki Otero, D., Teixeira Magalhães-Guedes, K., Aparecida Souza Machado, B., Mara Block, J., Izabel Druzian, J., & Larroza Nunes, I. (2022). Novel bioactive nanoparticles from crude palm oil and its fractions as foodstuff ingredients. *Food Chemistry*, 373, 131252. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.131252>.
- Rocha-Guzmán, N. E., González-Laredo, R. F., Moreno-Jiménez, M. R., Gallegos-Infante, J. A., Mancera-Rodríguez, J., & Rosales-Villarreal, M. C. (2023). Kombucha analogs from maqui juice: Consortium age and sugar concentration effects on anthocyanin stability and its relationship with antioxidant activity and digestive enzyme inhibition. *Food Chemistry*, 421, 136158. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2023.136158>.
- Rodríguez-Cañás, I., González-Jartín, J., M., Alfonso, A., Alvariño R., Vieytes, M., R. & Botana, L., M. (2024). Application of a multi-toxin detect method to analyze mycotoxins occurrence in plant-based beverages. *Food Chemistry*, 434, 137427. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137427>
- Sales, A. L., Cunha, S. C., Morgado, J., Cruz, A., Santos, T. F., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Fernandes, J. O., Miguel, M. A. L., & Farah, A. (2023). Volatile, Microbial, and Sensory Profiles and Consumer Acceptance of Coffee Cascara Kombuchas. *Foods*, 12(14), 2710. <https://doi.org/10.3390/FOODS12142710/S1>.
- Sánchez, M., Ferreira-Santos, P., Gomes-Dias, J. S., Botelho, C., Laca, A., & Rocha, C. M. R. (2023). Ohmic heating-based extraction of biocompounds from cocoa bean shell. *Food Bioscience*, 54, 102886. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2023.102886>
- Sarkaya, P., Akan, E., & Kinik, O. (2021). Use of kombucha culture in the production of fermented dairy beverages. *LWT*, 137, 110326. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.110326>.
- Simões, G. D., Da, R., & Rodrigues, S. (2023). Kombucha: conhecimento e consumo. *Revista Da Associação Brasileira de Nutrição - RASBRAN*, 14(1), 1–18. <https://doi.org/10.47320/RASBRAN.2023.2700>
- Siow, C. S., Chan, E. W. C., Wong, C. W., & Ng, C. W. (2022). Antioxidant and sensory evaluation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) tea formulated with cocoa bean hull of different origins. *Future Foods*, 5, 100108. <https://doi.org/10.1016/J.FUFO.2021.100108>.
- Sun, T., Li, Y., Liu, Y., Deng, B., Liao, C., & Zhu, Y. (2023). Advanced scanning electron microscopy and microanalysis: Applications to nanomaterials. *Encyclopedia of Nanomaterials*, 183–209. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822425-0.00104-4>.

- Švarc-Gajić, J., Brezo-Borjan, T., Dzedik, V., Rodrigues, F., Morais, S., & Delerue-Matos, C. (2023). ESG approach in the valorization of cocoa (*Theobroma cacao*) by-products by subcritical water: Application in the cosmetic industry. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 31, 100908. <https://doi.org/10.1016/J.SCP.2022.100908>.
- Tosto, A., Morales, A., Rahn, E., Evers, J. B., Zuidema, P. A., & Anten, N. P. R. (2023). Simulating cocoaproduction: A review of modelling approaches and gaps. *Agricultural Systems*, 206, 103614. <https://doi.org/10.1016/J.AGSY.2023.103614>.
- VÁSQUEZ, Z. S.; NETO, C., D. P.; PEREIRA, G. V. M. et al. et al. Biotechnological approaches for cocoawaste management: A review. **Waste Management**, v. 90, p. 72-83, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.04.030>.
- Wang, Y. B. Ji, W. Wu, R. Wang, Z. Yang, D. Zhang, W. Tian Hepatoprotective effects of kombucha tea: identification of functional strains and quantification of functional components J. Sci. Food Agric., 94 (2014), pp. 265-272. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6245>.

## ANEXO 1. FICHAS DA ANÁLISE SENSORIAL

**PERFIL DO CONSUMIDOR**

Provedor N° \_\_\_\_\_

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

E-mail: \_\_\_\_\_

Qual é a sua faixa etária? (Marcar apenas uma) : ( ) Entre 18 e 29 anos ( ) Entre 30 e 39 anos

( ) Entre 40 e 49 anos ( ) Entre 50 e 59 anos ( ) 60 anos ou mais

1. Qual é o seu grau de escolaridade? (Marcar apenas uma)

( ) Fundamental ou 1º grau incompleto (até 8ª série/ 9º ano incompleto)

( ) Fundamental ou 1º grau completo (8ª série/ 9º ano completo)

( ) Médio ou 2º grau incompleto (1º ao 3º ano incompleto)

( ) Médio ou 2º grau completo (3º ano completo)

( ) Ensino médio com profissionalizante completo

( ) Curso Técnico completo

( ) Superior incompleto

( ) Superior completo

( ) Pós-graduação

( ) Prefiro não responder

2. Qual é a sua ocupação atual? (Marcar apenas uma)

( ) Trabalho em tempo integral

( ) Trabalho em tempo parcial

( ) Não trabalho/não estudo

( ) Estudante de graduação

( ) Estudante de pós-graduação

( ) Prefiro não responder

3. Você conhece bebidas fermentadas não lácteas (Exemplo: kombucha, kefir de água, Tepache)? (Marcar apenas uma)

Sim ( ) Não ( )

4. Se você respondeu sim à questão anterior, com qual frequência você consome bebidas fermentadas não lácteas? (Marcar apenas uma)

( ) Nunca

( ) Semestralmente

( ) Mensalmente

( ) Quinzenalmente

( ) Diariamente

5. Se você consome bebida fermentada não láctea, por favor, nos indique qual a sua razão de consumo: (pode marcar mais de uma opção de resposta)

( ) Sabor

( ) Benefícios à Saúde

- ( ) Alternativa às Bebidas Lácteas  
 ( ) Variedade na Dieta  
 ( ) Não sei

**TESTE DE ACEITABILIDADE**

Provador N° \_\_\_\_\_

**Instruções para o teste:** Você está recebendo uma amostra codificada de bebida fermentada com coproduto de cacau. Por favor, prove a amostra codificada e atribua uma nota para a amostra em relação aos atributos avaliados, utilizando a escala ao lado.

	Cor	Odor	Sabor	Aceitabilidade geral
<b>Amostra</b>				

- 9- Gostei muitíssimo  
 8- Gostei muito  
 7- Gostei regularmente  
 6- Gostei ligeiramente  
 5- Nem gostei/ nem desgostei  
 4- Desgostei ligeiramente  
 3- Desgostei regularmente  
 2- Desgostei muito  
 1- Desgostei muitíssimo

Baseado na aceitabilidade geral do produto, marque qual a sua **ATTITUDE DE COMPRA** com relação a amostra, usando a escala abaixo:

- ( ) Certamente compraria o produto  
 ( ) Provavelmente compraria o produto  
 ( ) Tenho dúvida se compraria o produto  
 ( ) Provavelmente não compraria o produto  
 ( ) Certamente não compraria o produto

**Comentários** \_\_\_\_\_