

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ISABELA MARIA MACEDO SIMON SOLA

OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO DE ERVA MATE ADICIONADA DE PITANGA
PRETA (*Eugenia uniflora* L.) COM MICRORGANISMOS DA KOMBUCHA

PONTA GROSSA

2023

ISABELA MARIA MACEDO SIMON SOLA

OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO DE ERVA MATE ADICIONADA DE PITANGA
PRETA (*Eugenia uniflora* L.) COM MICRORGANISMOS DA KOMBUCHA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pertencente ao Setor de Engenharias, Ciências Agrárias e de Tecnologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Aline Alberti.

PONTA GROSSA

2023

S684

Sola, Isabela Maria Macedo Simon

Otimização da fermentação de erva mate adicionada de pitanga preta (*E ugenia uniflora* L.) com microrganismos da kombucha / Isabela Maria Macedo Simon Sola. Ponta Grossa, 2023.
79 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Área de Concentração: Ciências e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Aline Alberti.

1. *Ilex paraguariensis*. 2. Compostos bioativos. 3. Atividade antioxidante. 4. Cinética de fermentação. I. Alberti, Aline. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ciências e Tecnologia de Alimentos. III.T.

CDD: 664

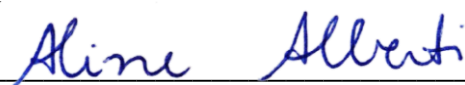
TERMO DE APROVAÇÃO

ISABELA MARIA MACEDO SIMON SOLA

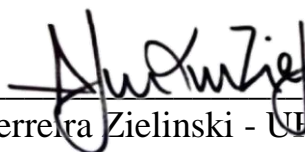
“Otimização da fermentação de erva mate adicionada de pitanga preta (*Eugenia uniflora* L.) com microrganismos da kombucha”.

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do grau de Mestre(a) no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

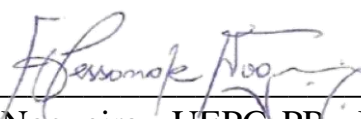
Orientador(a): Prof^a. Dra. Aline Alberti



Prof^a. Dra. Aline Alberti - UEPG-PR - Presidente



Prof. Dr. Acácio Antonio Ferreira Zielinski - UFSC-SC - Membro Titular



Prof. Dr. Alessandro Nogueira - UEPG-PR - Membro Titular

Ponta Grossa, 01 de fevereiro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida que Ele me concedeu e por ter me mantido no caminho certo durante este projeto de pesquisa, me dando saúde e forças para chegar até o final.

Agradeço aos meus pais, Ana Isabel Macedo Simon Sola e Francisco Xavier Simon Sola, por me apoiarem a ir atrás do meu sonho e por todo o esforço investido na minha educação. As minhas irmãs, Ana Gabriela Macedo Simon Sola e Maria Beatriz Macedo Simon Sola pelo incentivo durante toda a graduação e para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço ao meu namorado, Diego Antônio da Rocha que sempre esteve ao meu lado, apesar da distância, durante o meu percurso acadêmico.

Agradeço a Prof.^a Dra. Aline Alberti por me orientar e acreditar no meu potencial e sempre estar ao meu lado indicando a direção correta em que o trabalho deveria seguir. Sou grata pela confiança depositada em mim e ao acolhimento no Grupo de Trabalho Sobre Maçã pelo Prof. Dr. Alessandro Nogueira e Prof.^a Dra. Aline Alberti. Obrigada por me manter motivada durante todo o processo.

Agradeço a todos meus colegas que fizeram parte dessa pesquisa, em especial a Amanda Marcondes que foi fundamental para realização desse trabalho e as mestras Thaís Estéfane Fischer e Graziela Nunes por todos os ensinamentos.

Por último, quero agradecer a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro concedido, à Universidade Estadual de Ponta Grossa e o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela infraestrutura, e a todo o seu corpo docente.

Muito obrigada.

RESUMO

A kombucha é uma bebida fermentada por uma simbiose de espécies de leveduras e bactérias. O aumento no interesse pela bebida tem sido observado em função de sua capacidade desintoxicante e antioxidante. A busca por novos substratos faz com que a erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e a pitanga preta (*Eugenia uniflora*) possuam grande potencial para serem aplicadas como matéria prima na elaboração da kombucha. As folhas da erva mate e os frutos da pitanga preta, apresentam na sua composição elevados teores de compostos bioativos. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a cinética de fermentação da kombucha, obtida a partir de infusão de folhas de erva mate, adicionadas de polpa de pitanga preta, a fim de obter uma bebida com maiores teores de compostos bioativos, como o ácido glucurônico (produzido na fermentação) e maior atividade antioxidante. A otimização da fermentação identificou a melhor temperatura (25 °C), concentração de erva mate (11,5 g/L) e açúcar (130,0 g/L) do mosto, para obter maiores teores de fenóis totais, flavonoides, ácido glucurônico, ácido ascórbico e maior atividade antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP). Previamente à adição ao mosto de fermentação, a polpa de pitanga preta foi avaliada. A polpa possui $0,83 \pm 0,05$ g/L de vitamina C e alta concentração de compostos fenólicos; bem como atividade antioxidante e atividade antiglicêmica. Sendo assim, os frutos possuem alto potencial para serem utilizados em novos produtos e associado à procura por alimentos com sabores exóticos e nativos. Além disso, a pitanga preta pode ser uma alternativa para saborização da kombucha de erva mate. Através do estudo da cinética das fermentações foi possível visualizar que a fermentação promoveu o aumento da atividade antioxidante na bebida, e a adição de pitanga agregou compostos fenólicos, onde as antocianinas foram preservadas durante o processo de fermentação por 15 dias. Seguindo os parâmetros legais para produção de kombucha, o tempo ideal de fermentação para a infusão de erva mate foi de 10 dias e para o fermentado adicionado de pitanga preta foi de 7 dias. O suco de pitanga preta agregou compostos bioativos diferentes aos encontrados na erva mate, promovendo o aumento da atividade anti-glicêmica. Desta forma, a erva mate associada aos frutos da pitangueira preta é um bom substrato para fermentação, podendo ser utilizado na elaboração de bebidas com microrganismos da kombucha.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*. Compostos bioativos. Atividade antioxidante. Cinética de fermentação.

ABSTRACT

Kombucha is a beverage fermented by a symbiosis between yeast and bacteria species. The increase in interest for the beverage has been observed due to its detoxifying and antioxidant capacity. The search for new substrates means that yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) and black pitanga (*Eugenia uniflora*) have great potential to be used as raw material in the preparation of kombucha. The leaves of the yerba mate and the fruits of the black pitanga have high levels of bioactive compounds in their composition. Therefore, this work aims to evaluate the fermentation kinetics of kombucha, obtained from the infusion of mate leaves, added with black pitanga pulp, in order to obtain a beverage with higher levels of bioactive compounds, such as acid glucuronic acid (produced in fermentation) and higher antioxidant activity. Fermentation optimization identified the best temperature (25 °C), yerba mate concentration (11.5 g/L) and sugar (130.0 g/L) of the must, to obtain higher levels of total phenols, flavonoids, glucuronic acid, ascorbic acid and higher antioxidant activity (DPPH, ABTS, FRAP). Before addition to the fermentation must, the black pitanga pulp was evaluated. The pulp has 0.83 ± 0.05 g/L of vitamin C and a high concentration of phenolic compounds; as well as antioxidant activity and antiglycemic activity. Therefore, fruits have a high potential to be used in new products and are associated with the demand for foods with exotic and native flavors. In addition, black pitanga can be an alternative for flavoring yerba mate kombucha. Through the study of fermentation kinetics, it was possible to visualize that fermentation promoted an increase in antioxidant activity in the beverage, and the addition of black pitanga added phenolic compounds, where anthocyanins were preserved during the fermentation process for 15 days. Following the legal parameters for kombucha production, the ideal fermentation time for the yerba mate infusion was 10 days and for the fermented product with black pitanga was 7 days. Black pitanga juice added different bioactive compounds from those found in yerba mate, promoting an increase in anti-glycemic activity. In this way, yerba mate associated with the fruits of the black pitanga is a good substrate for fermentation and can be used in the preparation of beverages with kombucha microorganisms.

Keywords: *Ilex paraguariensis* St. Hil. Bioactive compounds. Antioxidant activity. Fermentation kinetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frequência de pesquisa do termo “Kombucha” de janeiro de 2015 a julho de 2022.....	15
Figura 2. Publicação de artigos contendo o termo "Kombucha" na base de dados Scopus de 2015 a 2022	16
Figura 3. Fluxograma geral do processamento de kombucha.	18
Figura 4. Principais vias metabólicas de fermentação da kombucha.	19
Figura 5. Diagrama dos parâmetros de cor.....	31
Figura 6. Fluxograma do processo de preparo da 1º fermentação das kombuchas.	47
Figura 7. Representação dos fermentadores.	49
Figura 8. Superfície de resposta e gráficos de contorno mostrando os efeitos das variáveis independentes no ponto ótimo de otimização simultâneo.....	59
Figura 9. Efeito das variáveis tempo e substratos no crescimento de bactérias e leveduras. .	61
Figura 10. Efeito das variáveis tempo e substratos no pH e na concentração de ácidos orgânicos.	63
Figura 11. Efeito das variáveis tempo e substratos na concentração de compostos fenólicos totais e flavonoides totais.	64
Figura 12. Efeito das variáveis tempo e substratos na atividade antioxidantes nos fermentados.	65

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1. Pitangueira localizada na cidade de Itaberá-SP.	25
Fotografia 2. Pitangas colhidas na cidade de Itaberá-SP.	26
Fotografia 3. Estádios de maturação da pitanga preta.	26
Fotografia 4. Extrato antociânico de pitanga preta.....	35
Fotografia 5. Extrato de carotenoides da pitanga preta.	36
Fotografia 6. Polpa, sementes e suco obtido através da pitanga preta.....	38
Fotografia 7. Corte transversal do fruto.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos presentes na Erva mate (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil.) e no Chá preto (<i>Camellia sinensis</i>).	24
Tabela 2. Composição mineral e nutricional das pitangas encontrados no sul do Brasil.....	27
Tabela 3. Valores reais e codificados (entre parênteses) da concentração de erva mate, açúcar e temperatura de fermentação para obtenção das kombuchas a partir do planejamento Box Behnken.	48
Tabela 4. pH e ácidos orgânicos das infusões base (M) nas diferentes concentrações e nas amostras de kombucha (KM).....	54
Tabela 5. Compostos fenólicos totais (TPC), Flavonoides totais (TFC) e atividade antioxidante das infusões bases (M) nas diferentes concentrações e nas amostras de kombucha (KM).....	55
Tabela 6. Efeitos das variáveis independentes (concentração erva mate, de açúcar e temperatura) sobre a concentração de compostos fenólicos totais (TPC), flavonoides totais (TFC), atividade antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP), ácido glucurônico e ácido ascórbico.	57
Tabela 7. Valores preditos e experimentais das variáveis obtidas no ponto ótimo	60

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
OBJETIVOS	13
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1 HISTÓRICO.....	14
1.2 FERMENTAÇÃO DA KOMBUCHA.....	16
1.3 MICRORGANISMOS DA KOMBUCHA	19
1.4 BENEFÍCIOS E RISCOS DO CONSUMO DE KOMBUCHA.....	20
1.5 INSUMOS PARA FERMENTAÇÃO DA KOMBUCHA	22
1.5.1 <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	22
1.5.2 <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hill	22
1.5.3 Pitanga, <i>Eugenia uniflora</i> L.	24
1.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO DA POLPA DE PITANGA PRETA, <i>Eugenia</i>	
 <i>uniflora</i> L.....	29
2.1 INTRODUÇÃO.....	29
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.2.1 Materiais	30
2.2.2 Métodos	31
2.2.2.1 Análises físicas	31
2.2.2.2 Análise cromatográfica de açúcares e ácidos orgânicos	31
2.2.2.3 Extração da polpa de Pitanga preta para análises de compostos fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante.	32
2.2.2.4 Compostos fenólicos totais (TPC).....	32
2.2.2.5 Flavonoides totais (TFC).....	33
2.2.2.6 Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	33
2.2.2.7 Teor de antocianinas totais (AT) por pH diferencial.....	34
2.2.2.8 Teor de antocianinas monoméricas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. .	35
2.2.2.9 Carotenoides	35
2.2.2.11 Análises estatísticas	37
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
2.3.1 Análises Físicas	37
2.3.2 Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante	40

2.4	CONCLUSÃO.....	43
-----	----------------	----

CAPÍTULO 3 - OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO DE ERVA MATE

ADICIONADA DE PITANGA PRETA COM MICRORGANISMOS DA KOMBUCHA.....44

3	INTRODUÇÃO.....	44
3.1	MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1.1	Materiais	45
3.1.2	Métodos	46
3.1.2.1	Preparo das kombuchas	46
3.1.2.2	Planejamento experimental.....	47
3.1.2.3	Cinética de fermentação.....	48
3.1.3	Análises	49
3.1.3.1	Análises físico-químicas.....	49
3.1.3.2	Compostos fenólicos totais (TPC).....	49
3.1.3.3	Flavonoides totais (TFC).....	50
3.1.3.4	Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	50
3.1.3.5	Contagem de bactérias totais e leveduras.....	51
3.1.3.7	Ácidos orgânicos	52
3.1.3.9	Análises Estatísticas	52
3.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.2.1	Planejamento Experimental.....	53
3.2.2	Otimização.....	56
3.2.3	Cinética de fermentação	60
3.3	CONCLUSÃO.....	66

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
----------------------------------	-----------

REFERÊNCIAS	69
--------------------------	-----------

INTRODUÇÃO

Há uma tendência dos consumidores procurarem por produtos saudáveis, que promovam o bem-estar, com características sensoriais agradáveis e que incluam conveniência ao consumo. As bebidas funcionais se destacam nestes quesitos, pois fornecem, em sua grande maioria, praticidade no preparo, benefícios adicionais aos da alimentação, além de atuar na redução de riscos de doenças.

A kombucha, bebida milenar de origem asiática, caracterizada como um produto gaseificado e ligeiramente doce e ácido, é obtida da fermentação de chá preto ou verde (*Camellia sinensis*), por uma colônia simbiótica de diferentes espécies de leveduras e bactérias. Nesse meio, se desenvolve uma película celulósica, denominada SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*), onde também estão os microrganismos responsáveis pela fermentação da bebida. A formulação do produto é variada, devido às diferentes condições de fermentação a que pode ser submetida, além da colônia fermentadora apresentar diversa composição microbiológica. O produto final é caracterizado por uma grande diversidade de constituintes, sendo a sua funcionalidade atribuída, em especial, aos compostos fenólicos oriundos dos chás e ao ácido glucurônico. Os compostos fenólicos estão relacionados diretamente a atividade antioxidante da bebida, atuando na inibição de radicais livres no organismo. Já o ácido glucurônico demonstra potencial importante nos processos metabólicos de detoxificação no corpo humano, além de poder atuar como um precursor da biossíntese do ácido ascórbico durante a fermentação.

Novos substratos podem ser utilizados para a produção de kombucha, a fim de agregar compostos de interesses e sabores diferentes e inovadores. A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) possui grande importância socioeconômica e cultural na região sul-brasileira, além de ser caracterizada por compostos bioativos e propriedades semelhantes às dos chás *Camellia sinensis*, e por possuir menor custo. Assim, a erva-mate pode ser uma alternativa viável para ser fermentada com os microrganismos da kombucha. Além disso, há pouca variedade de produtos com erva-mate disponíveis no mercado, logo, a aplicação industrial desta matéria-prima poderá contribuir para a sua valorização e ampliação de seu mercado.

Paralelamente, a pitanga (*Eugenia uniflora L.*) é consumida principalmente *in natura*, porém, possui um grande potencial para seu aproveitamento industrial para o preparo de polpas, sucos e para adição em bebidas, sorvetes, geleias e licores. Com alto teor de vitamina A, carotenoides, taninos e flavonoides, possui gosto doce e ácido que possuem potencial para agregar a kombucha um toque de brasilidade.

Desta forma, a kombucha pode agregar os efeitos benéficos da infusão de erva mate e da polpa de pitanga, com os compostos formados durante a fermentação, como a produção de ácidos orgânicos e a presença de microrganismos que podem ser potencialmente probióticos. Com isso, o presente trabalho tem como objetivo otimizar as condições de preparo da kombucha a partir da erva mate adicionada de polpa de pitanga preta, visando encontrar os melhores parâmetros a fim de maximizar o teor de compostos bioativos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Otimizar as condições de elaboração da kombucha de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) adicionada de polpa de pitanga preta (*Eugenia uniflora* L.) visando maiores teores de compostos bioativos na bebida.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Caracterizar* a polpa de pitanga preta (*Eugenia uniflora* L.);
- *Caracterizar* quimicamente as amostras de kombuchas desenvolvidas;
- *Otimizar* o processo de elaboração da kombucha com base na temperatura de fermentação, concentração de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e de sacarose a fim de se obter uma bebida com maior teor de compostos bioativos;
- *Avaliar* a cinética de fermentação da infusão de erva mate com os microrganismos da kombucha;
- *Avaliar* a cinética de fermentação da infusão de erva mate adicionada de polpa de pitanga preta com microrganismos da kombucha.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo serão abordados temas relacionados ao histórico, as fermentações e microrganismos presentes na kombucha, os ingredientes para preparo da bebida, as propriedades bioativas e os benefícios e riscos da ingestão da bebida final. Por fim, serão detalhadas as características da erva mate e da pitanga preta, assim como seu potencial tecnológico.

1.1 HISTÓRICO

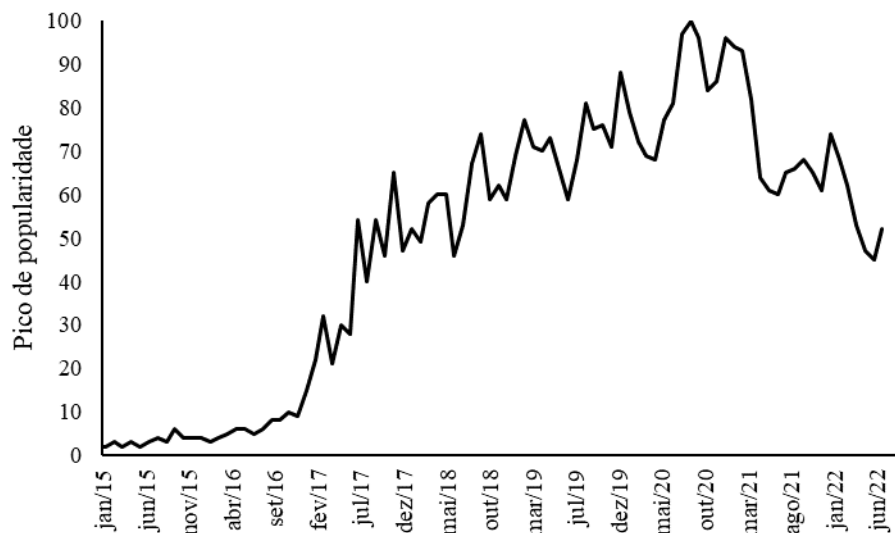
A kombucha é uma bebida milenar de característica refrescante, ligeiramente doce e ácida obtida a partir da fermentação do chá das folhas da *Camellia sinensis* (SUN *et al.*, 2015). Estima-se que sua origem se deu na China, há 220 anos a.C., sendo designada como uma espécie de bebida milagrosa, que promovia propriedades desintoxicantes e energizantes. Chegando ao Japão em meados de 414 d.C., através de médicos que indicavam a bebida para a alta sociedade como remédio para problemas digestivos. Com a expansão comercial marítima, a bebida se espalhou pela Ásia e Europa, adentrando na Rússia e Alemanha no século XX. Na década de 1950, a kombucha surgiu na França e foi difundida no norte da África, através da colonização. A Segunda Guerra Mundial trouxe certa popularidade da bebida, mas a escassez dos insumos para a produção da kombucha, principalmente do açúcar e do chá, dificultou o acesso do fermentado pela população europeia. Foi na década de 1960 que a bebida teve seu ápice de popularidade, onde cientistas suíços identificaram que consumir a bebida fermentada era tão benéfico quanto ingerir iogurte (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000; HARTMANN *et al.*, 2000).

No século XXI, a kombucha atingiu uma parcela da geração preocupada com o bem-estar, que buscam alimentos minimamente processados, com características funcionais, de alto valor nutritivo e que tragam benefícios para a saúde. Dessa forma, chamou a atenção de novos pesquisadores e consumidores devido às suas propriedades (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018). Através da plataforma Google Trends (2022), é possível avaliar o crescente interesse pelo termo “Kombucha” em um intervalo de 7 anos (2015 a 2022) (Figura 1). O dado quantitativo descrito como Interesse ao longo do tempo é obtido em função do interesse de pesquisa relativo ao ponto mais alto no gráfico, em espaço e tempo predeterminado. O valor 100 representa o maior pico de popularidade de um termo, logo, o valor de 50 significa que o termo de pesquisa teve 50% da popularidade, assim sucessivamente. Através da Figura 1, nota-se que houve um crescimento progressivo na busca do termo, apresentando números mais

elevados de pesquisa a partir de janeiro de 2017, atingindo seu pico máximo em setembro de 2020. No Brasil o maior volume de pesquisa é realizado por pessoas situadas nos estados de Santa Catarina, seguido por Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso e Rondônia.

Utilizando a mesma plataforma é possível localizar as principais pesquisas relacionadas com o termo kombucha, obtendo as seguintes sentenças chaves: “kombucha benefícios”; “SCOBY de kombucha”; “como tomar kombucha?”; “como fazer kombucha?”. Expandindo a pesquisa a nível mundial obtemos as seguintes pesquisas correlacionadas: “Kombucha Tea”; “Kombucha benefits; SCOBY”; “Kombucha SCOBY”; “What is Kombucha?”. Essa informação mostra o interesse da população mundial em saber mais sobre as peculiaridades da bebida, além de demonstrar o interesse sobre alimentos funcionais.

Figura 1. Frequência de pesquisa do termo “Kombucha” de janeiro de 2015 a julho de 2022.



Nota: valores obtidos em pico de popularidade em função do interesse de pesquisa relativo ao ponto mais alto no gráfico. Fonte: GOOGLE TRENDS, 2022. Elaborado pela autora.

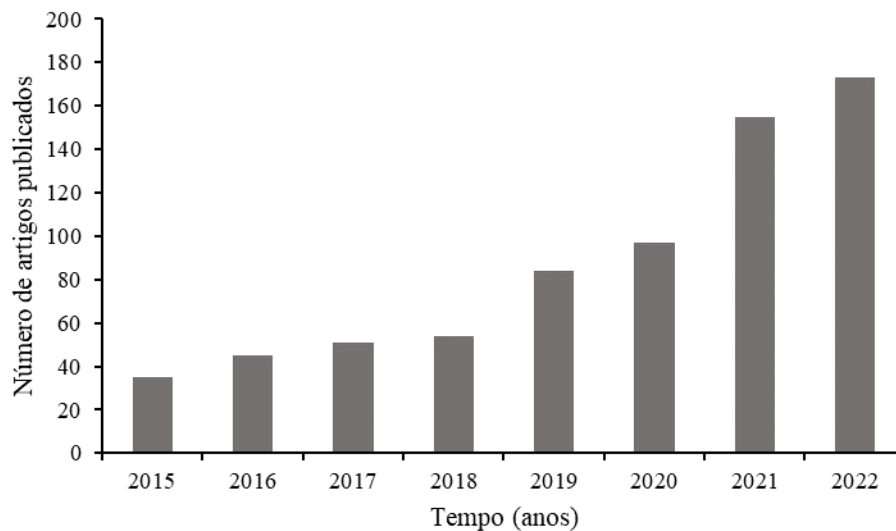
O crescimento do interesse no termo “Kombucha” no ano de 2020 pode estar correlacionado com a pandemia do COVID-19. No mês de julho foram verificadas mudanças no padrão alimentar da população asiática, ocorrendo o aumento de consumo de alimentos produzidos em casa e a redução de compra de produtos *delivery* (GALALI, 2021). Os produtos saudáveis e que contribuem na prevenção de doenças, podem ter se destacado no mercado, ocasionado o aumento das buscas sobre os benefícios da bebida e de seu preparo.

A partir da evolução da pandemia Shimpo *et al.* (2021) notou que a parcela da população asiática que passou a ter uma dieta mais saudável, foram as que possuíam maior renda familiar anual. Em contrapartida foi notado que ao decorrer da pandemia os que sofreram

forte redução de renda e riqueza, em junção com o estado de *lockdown*, medo do COVID19, mudanças na frequência de exercícios, duração do sono, tabagismo e a dificuldade de abastecimento de frutas e vegetais, incentivou o consumo de alimentos não saudáveis, apresentando fortes indícios da diminuição das pesquisas sobre a bebida fermentada a partir de julho de 2021 (GALALI, 2021; SHIMPO et al., 2021; RUSSO et al., 2021).

Em contrapartida, ocorreu o aumento das publicações de artigos científicos que apresentam o termo “Kombucha” no título, resumo ou palavras-chaves, durante os anos de 2015 a 2022. A procura da população geral no ano de 2017 pode ter acarretado o aumento da popularidade da bebida entre a comunidade acadêmica, gerando interesse científico sobre a bebida fermentada e seus efeitos. Sabendo-se que a publicação de trabalhos científicos possui maior demanda de tempo para obter resultados, a procura dos consumidores pode ter refletido na produção científica e promovido o aumento do número de artigos publicados a partir de 2019 atingindo o pico máximo em 2022 (Figura 2).

Figura 2. Publicação de artigos contendo o termo "Kombucha" na base de dados Scopus de 2015 a 2022



Fonte: Realizado através da análise de dados da base Scopus com as coordenadas: TITLE-ABS-KEY (Kombucha) AND PUBYEAR > 2015 AND PUBYEAR < 2022 obtendo 694 resultados. Elaborado pela autora.

1.2 FERMENTAÇÃO DA KOMBUCHA

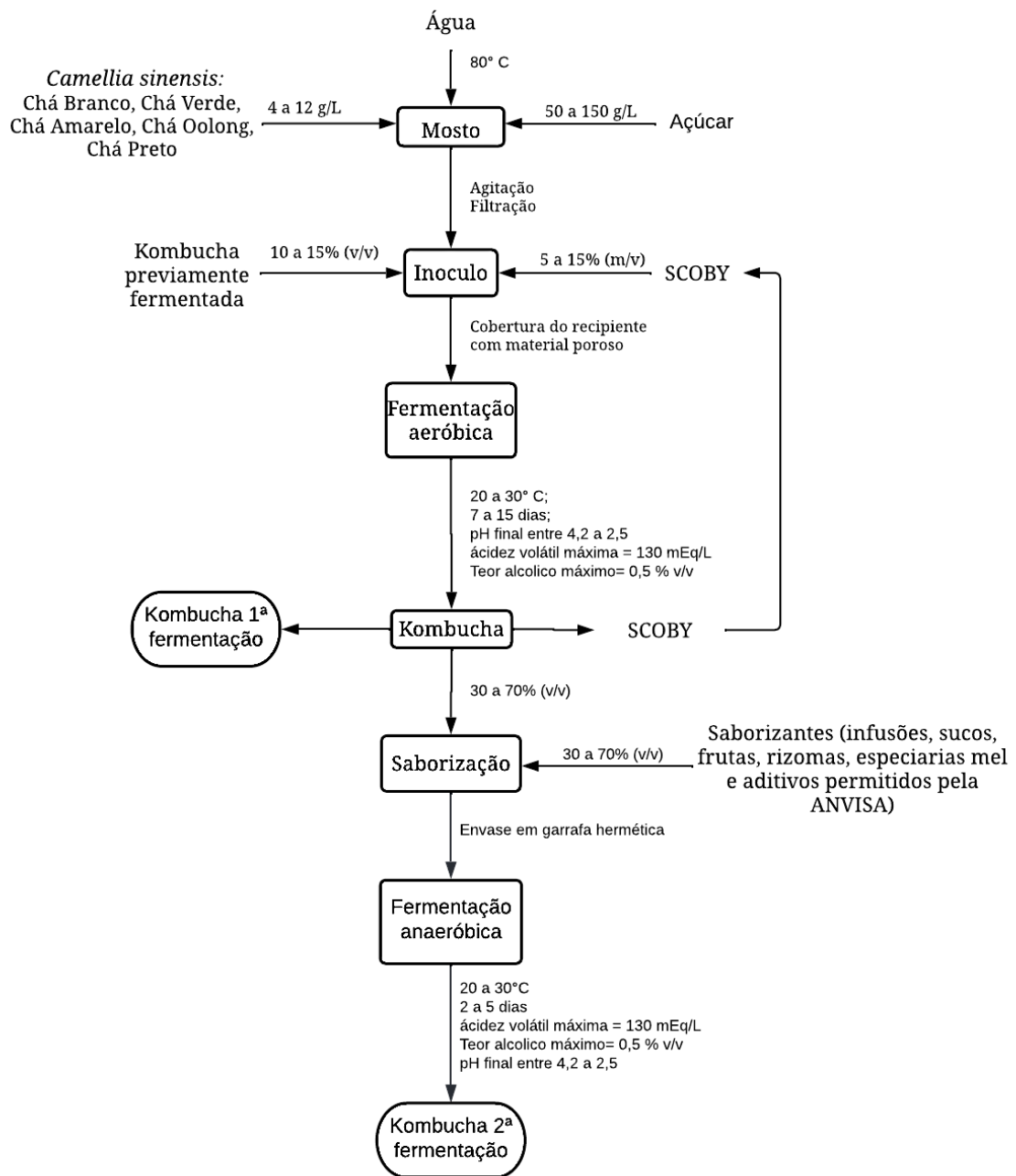
O meio de cultura para a fermentação da kombucha, é composto por duas fases: fase líquida, composta de extrato aquoso, carboidratos e alíquota do chá previamente fermentado e uma fase sólida constituída de biofilme superficial. O biofilme (*starter*) conhecido como colônia simbiótica de bactérias e leveduras (*SCOBY - Symbiotic Colony of Bacteria and Yeast*), sintetizado por microrganismos, possuindo grande capacidade de absorção de água e podendo

exercer a imobilização da cultura microbiana. A microbiota presente atua em uma simbiose de bactérias acéticas, lácticas, alcoólicas e cepas de leveduras (WATAWANA et al., 2015).

A primeira fermentação (Figura 3) ocorre de forma aeróbica, ocorrendo a troca gasosa e liberação do gás carbônico (CO₂) para a atmosfera. Durante esse processo a kombucha adquire um sabor avinagrado devido à grande produção de ácidos orgânicos. As leveduras possuem o papel de hidrolisar a sacarose (fonte de carbono mais utilizada) em glucose e frutose, através da enzima invertase. Com a diminuição do oxigênio disponível no meio (diminuição da troca gasosa com a superfície através da formação da película celulósica) as leveduras produzem etanol e estimulam o crescimento de bactérias acéticas (Figura 4). A fonte de carbono também é convertida em ácido glucurônico (JAYABALAN; MALBAŠA; SATHISHKUMAR, 2016).

O tempo e temperatura de fermentação podem contribuir para a acentuação do sabor da bebida. Em experimento realizado por Lončar *et al.* (2014) com uma amostra de mosto contendo 66,47 g/L de sacarose, 1,5 g/L de chá preto e 10% (v/v) de *SCOBY*, teve sua maior taxa de fermentação atingida entre os dias 4 e 5 de fermentação, a uma temperatura 26 ± 4 °C. Chakravorty *et al.*, (2016) identificou o aumento da presença de açúcares redutores após o 7º dia de fermentação. Essa fonte de carbono foi intensamente utilizada durante a fermentação do substrato, demonstrando uma redução de aproximadamente 27% ao final do 21º dia de fermentação. Nurikasari *et al.* (2017) constaram a influência direta do tempo de fermentação na formação do *SCOBY*, obtendo um aumento expressivo no 11º dia de fermentação. Notou-se que mesmo em fermentações longas, a massa da película de celulose tende a aumentar, uma vez que a *Komagataeibacter xylinus* é capaz de utilizar frutose como substrato para sintetizar celulose (JAYABALAN et al., 2014).

Figura 3. Fluxograma geral do processamento de kombucha.

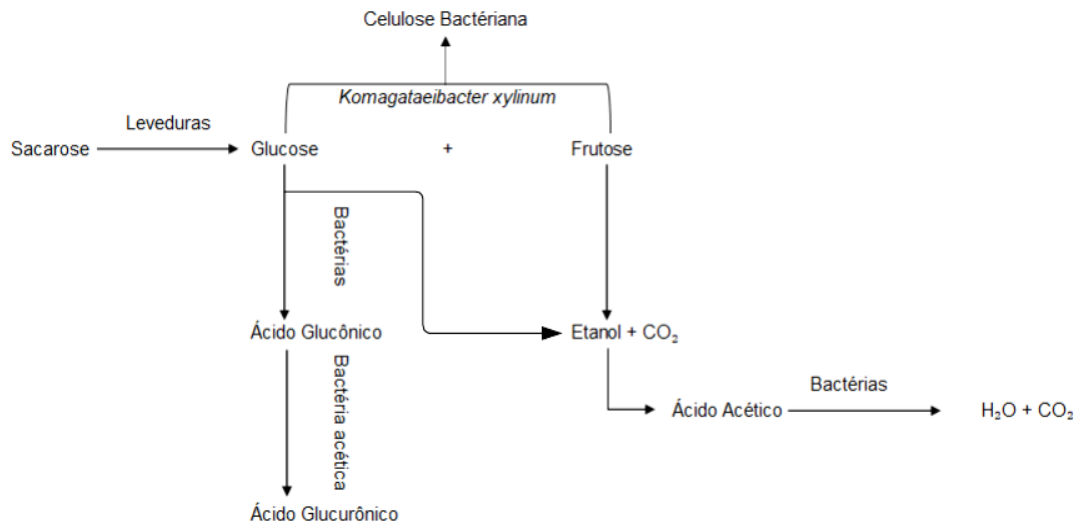


Fonte: a autora.

A segunda fermentação, acontece sob restrição de oxigênio. O meio anaeróbico favorece a produção de gás carbônico e promove a carbonatação da bebida. O teor de CO₂ está diretamente relacionado à concentração de açúcares adicionados e provenientes da sacarose ou frutose dos insumos adicionados. Nessa etapa são adicionadas frutas, rizomas, ervas e

especiarias como saborizantes (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000; DUTTA; GACHHUI, 2006; GREENWALT; STEINKRAUS; LEDFORD, 2000).

Figura 4. Principais vias metabólicas de fermentação da kombucha.



Fonte: Markov *et al.* (2003).

Costuma-se manter a bebida em ambiente refrigerado, o que promove a melhora sensorial e desacelera a fermentação. O produto final é caracterizado como uma bebida carbonatada, com aroma fermentado, refrescante e ligeiramente ácida e doce (NGUYEN *et al.*, 2015).

1.3 MICRORGANISMOS DA KOMBUCHA

A compreensão dos mecanismos de fermentação da kombucha requer um intenso estudo sobre os microrganismos presentes no meio e as interações entre eles. Espécies de leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae*, possuem sua função definida durante o processo de fermentação, mas a diversidade e complexidade da comunidade microbiana dificulta a compreensão do sistema, por exemplo, alguns microrganismos podem atuar de forma paralela durante o processo, enquanto outros atuam de forma dominante ao decorrer da fermentação (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016).

A cultura utilizada para a fermentação do produto apresenta uma diversa composição microbiológica dependendo de fatores como clima, localização geográfica, condição do ambiente e fonte do inóculo (WATAWANA *et al.*, 2015). As principais bactérias encontradas

são *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter aceti*, *Bacterium gluconicum* (LIU et al., 1996; REISS, 1994). Em experimento para caracterização microbiológica da kombucha foi possível identificar bactérias dos filos Proteobactérias, as quais apresentaram maior abundância no meio, sua presença está associada à formação da película de celulose na superfície (TORÁN-PEREG et al., 2021). Microrganismos pertencentes à família das bactérias acéticas (AAB) também são amplamente encontrados nas culturas de kombucha. São capazes de produzir ácido glucurônico e possuem alta tolerância ao etanol e ácido acético, por esse motivo vem sendo utilizada em uma ampla gama de aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica (KOSE et al., 2013).

Entre as cepas de leveduras se destacam *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Brettanomyces custersii* (JANKOVIĆ; STOJANOVIĆ, 1994; TEOH; HEARD; COX, 2004). Leveduras pertencentes ao gênero *Brettanomyces*, possuem a capacidade de produzir ácido acético e seus ésteres sob condições anaeróbicas. Já a *Zygosaccharomyces*, toleram meios com alta concentração de açúcar e ácido acético (TORÁN-PEREG et al., 2021). Nguyen *et al.*, (2015) identificou a presença de cepas de *Dekkera bruxellensis*, que possuía característica de alta adaptação em meio com pH ácido, tolerância ao etanol e maior rendimento de biomassa, comparada com as cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Além desses benefícios, a *D. bruxellensis* possui capacidade de produzir compostos orgânicos, através do consumo de compostos nitrogenados, gerando vinil fenóis e derivados etílicos, que contribuem para a formação de sabor em alimentos fermentados (BLOMQUIST et al., 2012; SCHIFFERDECKER et al., 2014).

1.4 BENEFÍCIOS E RISCOS DO CONSUMO DE KOMBUCHA

American Dietetic Association classifica os alimentos funcionais como alimentos que possuem efeito potencialmente benéficos, podendo ser enriquecidos, fortificados ou melhorados, que quando consumidos em uma dieta equilibrada atinjam níveis eficazes (HASLER; BROWN, 2009). A kombucha possui vários benefícios associados ao seu consumo, podendo exercer funções terapêuticas na melhora da digestão, alívio da artrite, possuir efeito laxativo, prevenção de infecções microbianas, combate ao estresse oxidativo, melhora dos níveis de colesterol. Porém, há poucos estudos clínicos conclusivos em animais ou humanos sobre seus benefícios e malefícios (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000; JAYABALAN et al., 2014; LONČAR et al., 2014).

A capacidade antioxidante, presente na kombucha é atribuída a presença de compostos fenólicos (AHMED; HIKAL; ABOU-TALEB, 2020a). O aumento da concentração de compostos fenólicos, como os flavonoides, foi notado em estudo realizado por Chakravorty *et al.* (2016). Segundo o autor, ao final dos 21 dias de fermentação, a quantidade relativa destes compostos obteve um aumento crescente, além da formação de outros metabólitos, como o ácido-D-cítrico-1,4-lactona. Autores sugerem que o pico máximo da atividade antioxidante da kombucha ocorreu no 7º dia de fermentação e logo após foi observado a diminuição mesma (NURIKASARI *et al.*, 2017). De forma similar, este comportamento foi observado em mosto preparado a partir da infusão de erva mate (LOPES; SANTOS; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2021).

A vitamina C é uma das vitaminas antioxidantes mais conhecidas, ela auxilia na manutenção do colágeno, na reparação de tecidos, estimula o sistema imunológico e possui ação antioxidante combatendo os radicais livres (DU TOIT; VOLSTEEDT; APOSTOLIDES, 2001). Leite fermentado utilizando os microrganismos da kombucha possuíam teores maiores de vitamina C quando comparados com o fermentado à base de *Camellia sinensis*. Estudos indicam a formação de ácido ascórbico e seu aumento contínuo durante o processo de fermentação da kombucha, possuindo influência com o meio utilizado na fermentação (BAUER-PETROVSKA; PETRUSHEVSKA-TOZI, 2000; MALBAŠA *et al.*, 2011; VITAS *et al.*, 2013).

A ação antiglicêmica, foi identificada tanto no chá preto quanto na bebida fermentada. A fermentação promoveu a elevação dessa propriedade ao final da fermentação (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016). O potencial anticancerígeno do chá fermentado pode ser atribuído à presença de compostos fenólicos e os produtos formados de sua degradação durante a fermentação (JAYABALAN *et al.*, 2014). Além disso, a bebida tem potencial de inibição contra microrganismos patogênicos gram-positivos e gram-negativos. Esse fato pode ser atrelado a concentração de ácidos orgânicos, principalmente ao ácido acético presente em maior teor (SREERAMULU; ZHU; KNOL, 2000).

Apesar dos benefícios associados ao consumo da bebida fermentada, alguns riscos também estão presentes na ingestão da kombucha, principalmente para pessoas consideradas de um grupo de risco, sendo contraindicado para grávidas, lactantes, portadores do vírus HIV e imunodeprimidos, podendo causar efeitos colaterais (JAYABALAN *et al.*, 2014; SRINIVASAN; SMOLINSKE; GREENBAUM, 1997). Um quadro de acidose intestinal e insuficiência renal, associada a ingestão da kombucha em um homem HIV positivo de 22 anos, foi detectado cerca de 15 horas após a ingestão da bebida (KOLE *et al.*, 2009). Porém, os casos

se apresentam de forma isolada em uma pequena parcela da população consumidora, não havendo evidências concretas que afirmem sua toxicidade ou associando a kombucha com o desenvolvimento de doenças (VIJAYARAGHAVAN et al., 2001).

1.5 INSUMOS PARA FERMENTAÇÃO DA KOMBUCHA

Este tópico possui o intuito de elucidar os conhecimentos sobre o substrato tradicional utilizado na fermentação da kombucha (*Camellia sinensis* L.) e comparar com as novas matérias-primas para fermentação da bebida, a erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) e os frutos de coloração preta da *Eugenia uniflora* L.

1.5.1 *Camellia sinensis* (L.) Kuntze

Inúmeras citações e lendas a respeito da história dos chás, demonstram a importância da bebida em diversas culturas, apesar de não se saber ao certo sua veracidade. Uma das lendas datadas de 2737 a.C. conta que um imperador chinês teria sido o primeiro a saborear o chá. O imperador Shen Nong propôs uma medida junto a seu povo de ferver água para beber, e um dia em meio ao processo de fervura, acidentalmente algumas folhas de plantas caíram no recipiente, por curiosidade ele bebeu o líquido e se encantou com o sabor (TREVISANATO; KIM, 2000).

O chá produzido a partir das folhas da planta *Camellia sinensis* (L.) é uma das bebidas não alcoólicas mais consumidas no mundo. Em sua composição química estão presentes proteínas, glicídios, ácido ascórbico, vitaminas do complexo B, cafeína, compostos fenólicos e taninos (JESZKA-SKOWRON; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK; FRANKOWSKI, 2018).

1.5.2 *Ilex paraguariensis* St. Hill

A erva mate, tem sua origem remetida às populações pré-colombianas, historiadores descrevem que foram os nativos guarani que ensinaram seu uso aos espanhóis durante a ocupação castelhana no Paraguai. Devido às suas propriedades naturais, a erva despertou grande admiração tanto aos povos nativos quanto aos colonizadores europeus que chegaram ao Brasil a partir do século XVI (JOYCE, 1934).

Em 1820, o Brasil já possuía importância no mercado exportador de erva mate para a Argentina, dando origem a uma disputa de mercado entre os produtores de ambos os países. Em paralelo a expansão da produção de erva mate na Argentina, houve a expansão das fronteiras agrícolas nos estados brasileiros onde essa erva era tradicionalmente cultivada, Rio

Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul (FERREIRA et al., 2019; JOYCE, 1934). Entre os anos 1870 e 1890 as atividades desenvolvidas no estado do Paraná eram movidas pela indústria do mate, monopolizando capital e trabalho, se tornando o principal produto de exportação. O ciclo do mate foi tão importante que possibilitou a emancipação política do estado (FILIP et al., 2001).

A planta é caracterizada com uma árvore perenifólia de 10 a 15 m de altura, sendo que em cultivo sua altura pode variar de 3 a 5 m, com tronco reto e de coloração acinzentada e bastante curto. Os ramos são cilíndricos, também cinzentos. As folhas são alternadas, simples, de 5 a 10 cm de comprimento e 3 a 5 cm de largura, com formato obovado com vértices arredondados (FERREIRA et al., 2019). Para obtenção do chá mate, as folhas são colhidas, transportadas, sapecadas, secas, trituradas e submetidas a torrefação. A região sul do Paraná apresenta maior produção, sendo comandada pelos municípios de União da Vitória, Irati, Guarapuava, Ponta Grossa e Pato Branco, que chegam a representar aproximadamente 90% do Valor Bruto da Produção da Erva Mate no estado. Apesar de ser majoritariamente utilizado em uma única forma de consumo (chimarrão e tererê), a erva possui grande potencial para outros usos alternativos, devido a sua composição química, destacando-se os compostos fenólicos e ácidos cafeicos (FERREIRA et al., 2019).

A bebida extraída da infusão da erva mate é uma das que mais apresentam níveis significativos de compostos fenólicos de interesse, como flavonoides, ácidos fenólicos e taninos. A *I. paraguariensis* apresenta maior atividade antioxidante do que outras espécies do mesmo gênero, tal atividade é preservada no chimarrão e no tererê (MESQUITA et al., 2021; SANTETTI et al., 2021). Os benefícios são atribuídos a essa infusão, tendo ação antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e vasodilatadora (FILIP et al., 2001). Destacando seu uso como bebida estimulante, as atividades biológicas da erva mate estão associadas à presença de metilxantinas, sendo a cafeína o composto encontrado em maior quantidade na planta (ALIKARIDIS, 1987; KAWAKAMI; KOBAYASHI, 1991). O sabor característico da bebida possibilita a utilização da erva mate como matéria prima para produtos inovadores.

Através do Tabela 1 podemos analisar as diferentes concentrações dos compostos obtidos na infusão de erva mate e no chá preto.

Tabela 1. Compostos presentes na Erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e no Chá preto (*Camellia sinensis*).

Composto	Erva mate (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil.)	Chá preto (<i>Camellia sinensis</i>)
Fenóis totais (mg AG/100 mL)	9,95 - 92,50 ^{1 2 3 4 5 6}	70,00 - 250,00 ^{1 2 3 7 12}
Flavonoides totais (mg CTE/100 mL)	17,06 - 88,00 ^{1 7}	14,10 - 53,00 ^{7 12}
Ácido caféico (µg/100 mL)	0,6 - 23,1 ^{4 8}	69,00 - 1060,00 ^{13 14}
Ácido clorogênico (µg/100 mL)	269,0 - 3301,0 ^{8 9 10}	522,00 - 18620,00 ^{7 13 14}
Ácido gálico (µg/100 mL)	nd - 14,5 ^{8 9}	5917,00 - 28811,00 ^{12 13 14}
Catequina (mg/100 mL)	nd - 66,7 ^{7 11}	3,17 - 101,80 ^{7 13}
Epicatequina (mg/100 mL)	Nd	2,17 - 25,24 ^{7 13 14 15}
Epigalocatequina galato (mg/100 mL)	Nd	7,49 - 34,62 ¹³
Cafeína (mg/L)	19,51 - 599,2 ^{8 9 10}	854,00 - 1088,14 ^{12 13 15 16}
Teobromina (mg/100 mL)	0,24 - 14,40 ^{8 9 10}	21,54 - 106,00 ^{13 15 16}

Fonte: ¹BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, (2007); ²HO et al., (2010); ³CARLONI et al., (2013) ⁴MATEOS et al., (2018); ⁵PAGLIOSA et al., (2010); ⁶SANTETTI et al., (2021); ⁷ZIELINSKI et al., (2014); ⁸RIACHI et al., (2018); ⁹MESQUITA et al., (2021); ¹⁰ZIELINSKI et al., (2020); ¹¹SANTOS et al., (2018); ¹²ZHOU et al., (2019); ¹³JESZKA-SKOWRON ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK; FRANKOWSKI (2018); ¹⁴VU, ALVAREZ (2021); ¹⁵YI et al., (2015); ¹⁶ZHOU et al., (2019). Nota: nd = Não detectado.

A concentração de fenóis totais no chá preto é maior do que a encontrada na erva mate, em relação aos flavonoides totais a erva mate se destaca apresentando valores entre 17,06 a 88,00 mg CTE/100 mL. Quanto aos ácidos orgânicos, o chá preto apresenta maiores teores para ácido caféico, clorogênico e gálico. A catequina, epicatequina e epigalocatequina galato, são constituintes do chá preto, não sendo detectados na maioria das vezes na erva mate. A concentração de cafeína e a teobromina presente no chá preto é aproximadamente 1,81e 7,36 vezes, respectivamente, maior que na erva mate. As diferenças encontradas nas mesmas espécies podem estar correlacionadas com os diferentes métodos de extrações, solventes utilizados por cada autor.

1.5.3 Pitanga, *Eugenia uniflora* L.

A origem da palavra “pitanga” vem do termo “pyrang” que em tupi-guarani significa “vermelho” com a junção da palavra “yba” que quer dizer “fruto”, formando assim “yba pyrang”, podendo significar também “fruta de pele tenra ou fina”. A expressão “chorar lágrimas de sangue”, de origem portuguesa, foi adaptada para “chorar as pitangas”, fazendo alusão a cor do fruto (EMBRAPA FLORESTAS, 2015).

A pitanga é uma fruta tropical encontrada na América do Sul, pertencente à família *Myrtaceae*. O arbusto (Fotografia 1) possui altura de 2 a 4 metros, com copa arredondada, as folhas jovens possuem a característica de serem verde-amarronzadas. As flores são hermafroditas, com cálice, 4 sépalas, de cor branco/creme (BEZERRA; LIRA; SILVA, 2018).

Fotografia 1. Pitangueira localizada na cidade de Itaberá-SP.



Fonte: a autora.

Seus frutos (Fotografia 2), são carnosos, do tipo baga globosa, com 7 a 10 sulcos, marcados longitudinalmente, possui diâmetro entre 1,5 a 5 cm, comumente com uma semente grande ou 2 a 3 pequenas (BEZERRA; LIRA; SILVA, 2018). Os frutos apresentam em média 69% de polpa e 31% de semente (FILHO et al., 2008; ROMAGNOLO, SOUZA, 2006). A pitangueira possui produção anual média de 20,8 kg/planta, com época de colheita entre março/abril e agosto/outubro. O processo de maturação começa com o fruto apresentando coloração verde, passando para o amarelo, alaranjado, vermelho, algumas variedades podem atingir a coloração vermelho-escuro, se aproximando da cor preta (Fotografia 3), sendo possível observar uma grande diversidade genética entre as cultivares de pitanga, que manifestam diferenças principalmente na cor do fruto quando maduro (ROMAGNOLO, SOUZA, 2006). Cada fruto apresenta em média, quando maduro, peso de 3,0 a 4,5 g, com concentração aproximada de sólidos solúveis totais de 9 °Brix, 2,2% de acidez (BEZERRA et al., 2002).

Características do solo e condições ambientais possuem influência direta na composição fitoquímica dos frutos. O clima quente, por exemplo, tende a gerar maior perda dos compostos, influenciando diretamente na composição de carotenoides e compostos fenólicos (BAGETTI et al., 2011; ROBARDS; ANTOLOVICH, 1997; SANTOS; SILVA; ALVES, 2006). A principal manifestação genética se dá através das cores das pitangas quando maduras, esse

processo de amadurecimento altera não somente a cor, mas também seus constituintes fitoquímicos (FIDELIS et al., 2022; BEZERRA *et al.*, 2018)

Fotografia 2. Pitangas colhidas na cidade de Itaberá-SP.



Fonte: a autora.

Fotografia 3. Estádios de maturação da pitanga preta.



Fonte: a autora.

A composição mineral e nutricional, média dos frutos, encontrados no Sul do Brasil, são apresentados na Tabela 2. De acordo com a Embrapa Florestas (2015), a pitanga apresenta baixo teor energético, é fonte de cobre, potássio, zinco, magnésio, cálcio, manganês e fibras alimentares.

Tabela 2. Composição mineral e nutricional das pitangas encontrados no sul do Brasil.

Componentes	Teores	VDR	%
Valor Energético total (kcal/100 g)	42,16	2000 kcal	2
Carboidratos totais (g/100 g)	10,1	300 g	3
Lipídeos (g/100 g)	0,34	65 g	1
Fibras alimentares (g/100 g)	3,5	25 g	14
Ferro (mg/100 g)	0,33	14 mg	2
Zinco (mg/100 g)	1,08	11 mg	10
Manganês (mg/100 g)	4,47	3 mg	149
Fósforo (mg/100 g)	17,14	700 mg	2
Sódio (mg/100 g)	22,06	2000 mg	1
Magnésio (mg/100 g)	70,44	420 mg	17
Potássio (mg/100 g)	130,13	3500 mg	4
Cálcio (mg/100 g)	170,41	1000 mg	17

Nota: 100 g de polpa = 32,5 frutos, considerando peso médio de 4 g por fruto e 70% de polpa. VDR = Valor diário de referência. Fonte: EMBRAPA FLORESTAS, 2015; BRASIL, 2020.

De acordo com os valores diários de referência (BRASIL, 2020), 100 g de polpa de pitanga preta (cerca de 32,5 frutos), correspondem a 10% de ingestão de ferro, 149% da ingestão de manganês, 17% de magnésio, 17% cálcio e 14% das fibras. A composição química do fruto é caracterizada pela presença de taninos, flavonoides, monoterpenos, sesquiterpenos, vitamina A, vitamina C e carotenoides, sendo o licopeno o principal pigmento carotenoide encontrado (FILHO et al., 2008; BEZERRA, LIRA JUNIOR, SILVA JUNIOR, 2018).

O fruto da pitangueira, que apresenta sabor intenso doce e ácido, é vulnerável quando maduro. Atritos e choques mecânicos podem fazer com que a polpa seja exposta a contaminantes externos, como sujidades e microrganismos deteriorantes. Após a colheita, em temperatura ambiente, os frutos tendem a suportar no máximo 24 horas. Sendo assim, o mercado da fruta em sua forma natural se resume a feiras livres e venda direta ao consumidor em barracas à beira de rodovias, por exemplo. Uma forma de contornar a vida de prateleira curta da pitanga, é a industrialização, sendo apresentada em forma de polpa congelada ou como ingrediente para elaboração de outros produtos, como geleias, *blends* de sucos, como aditivos em bebidas lácteas, refrescos e néctares (FILHO et al., 2008; BEZERRA, LIRA JUNIOR, SILVA JUNIOR, 2018).

No Brasil, o Nordeste tem sido uma das únicas regiões a explorar de forma comercial a pitanga, para aproveitamento fitoterápico na forma de óleos essenciais, na indústria cosmética e alimentícia. Acredita-se que as outras regiões do país também possam cultivar e valorizar a produção de produtos, alimentando o mercado interno e externo, com frutas nativas e exóticas, desde modo vislumbra-se o crescimento dos setores de produtos industrializados com a pitanga. (BEZERRA; LIRA JUNIOR; SILVA JUNIOR, 2018).

1.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A procura por alimentos saudáveis faz com que a kombucha seja um assunto em alta. Para o desenvolvimento de kombucha a partir de novos substratos, suas condições de fermentações devem ser estudadas. Com base nas informações sobre a erva mate e sobre a pitanga preta, é possível visualizar o pouco aproveitamento dessas matérias primas na indústria de alimentos. A erva mate possui composição química semelhante a *Camellia sinensis*, possuindo assim potencial pouco explorado para produção de kombucha. A fermentação da erva mate agregará valor à infusão, trazendo opção de outra bebida além das tradicionalmente consumidas (chimarrão e tererê). A kombucha é apresentada no mercado em sua forma saborizada, as frutas são uma forma de agregar sabor, cor e compostos bioativos à bebida. A pitanga preta possui altos teores de compostos fenólicos, carotenoides e vitaminas, além de ser uma fruta nativa com sabor exótico pouco explorada no país, sua difusão pelos estados é dificultada, pois o fruto *in natura* possui baixa vida de prateleira, sendo assim, a industrialização poderá contribuir para o aumento do *shelf life*.

CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO DA POLPA DE PITANGA PRETA, *Eugenia uniflora* L.

RESUMO

Os frutos da pitangueira são pouco explorados na indústria de alimentos, sendo sua distribuição restrita ao comércio local e feiras livres. As pitangas apresentam gosto doce e ácido e possuem grande variedade quanto à coloração da polpa. Sendo assim, o presente estudo tem o objetivo de analisar a composição física e química dos frutos de coloração preta afim de se avaliar sua aptidão industrial. A *Eugenia uniflora* apresentou alto rendimento de polpa, 81,5%. É rica em vitamina C, $0,83 \pm 0,05$ g/L, e possui concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante e atividade anti-glicêmica superior a outras espécies do mesmo gênero e a frutas comerciais. Sendo assim, os frutos possuem alto potencial para serem utilizados em novos produtos como sucos, *smoothies*, fermentados, para adição de compostos de interesse trazendo apelo de saudabilidade e valorizando um produto brasileiro.

Palavras-chave: Antocianinas. Carotenoides. Compostos bioativos. Atividade antioxidante.

2.1 INTRODUÇÃO

A pitangueira é um arbusto nativo da América do Sul, possuindo uma grande adaptação ao clima brasileiro, podendo ser cultivada em quase todo o território nacional (BEZERRA; SILVA, 2000). Embora não possuam dados oficiais sobre seu cultivo e comercialização, pressupõe-se que o Brasil seja o maior produtor da fruta a nível mundial. A maior área de plantio está localizada no estado de Pernambuco, onde cerca de 300 ha são cultivados. A Bahia também possui destaque na produção, com aproximadamente 52 ha (SILVEIRA, 1997). O rastreamento do volume de produção possui uma via difícil de ser quantificada, uma vez que a maior parte do volume produzido é destinado a feiras do produtor ou seguem diretamente para as pequenas fábricas, que produzem polpas congeladas, sucos e sorvetes (FILHO et al., 2008; BEZERRA; LIRA; SILVA, 2018).

A pitanga possui frutos comestíveis, com gosto ácido e doce. Observa-se que a existência de uma grande variedade genética, manifestado principalmente pela cor do fruto, que quando maduro pode apresentar variações da cor laranja atingindo o tom vermelho escuro tendendo ao preto. A fruta é tida como uma fonte de vitamina A possuindo concentrações significativas de nitrogênio, potássio, cálcio, fósforo, magnésio e enxofre e apresenta compostos bioativos (ROMAGNOLO; SOUZA, 2006; BEZERRA; LIRA; SILVA, 2018; EMBRAPA FLORESTAS, 2015).

O fruto quando maduro apresenta grande vulnerabilidade, choques mecânicos e atritos podem fazer com que a polpa seja exposta, ficando suscetível a fermentação. Esse fato somado

com a falta de estudos que demonstrem a aptidão do fruto para ser armazenado em câmaras frias, faz com que o mercado da fruta *in natura* seja restrito ao comércio local e ofertado de forma sazonal. Desse modo, a industrialização é uma forma de aumentar o *shelf life* do produto e ofertar apresentações diversas da fruta, uma vez que existe uma demanda do mercado interno e externo a produtos com frutos nativos e exóticos (BEZERRA; LIRA; SILVA, 2018). O estudo tem como objetivo caracterizar as pitangas pretas para visualizar suas características físicas, seus compostos bioativos e atividade antioxidante a fim de avaliar sua aptidão industrial em produtos com apelo a saudabilidade.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Materiais

As pitangas pretas foram colhidas manualmente nas coordenadas 23° 52 '03.8 ``S 49° 08' 49.9 ``W em Itaberá, São Paulo. A espécie *Eugenia uniflora* L. foi identificada através do Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Ponta Grossa-PR) possuindo exsicata com o código HU-22693 e o fruto se apresenta tombado na carpoteca. Os frutos que apresentaram o estágio de maturação adequado, baseado em sua coloração vermelha intensa tendendo ao preto, foram selecionados, em seguida foi realizado a toaleta para a retirada do pedúnculo. As frutas foram sanitizadas com hipoclorito de sódio 200 mg/L, por 15 min e enxaguadas em água potável. As pitangas foram despulpadas em despulpadeira de frutas (BRAESI, DES-60, Brasil), com abertura de tela de 1,0 mm para obtenção da polpa e separação das sementes. A polpa foi envasada e armazenada a -18 °C até o momento das análises.

Os reagentes de Folin-Ciocalteu, Trolox (6 -hidroxi - 2,5,7,8 -tetrametilcromano - 2-ácido carboxílico), DPPH (2,2- difenil-2-picrilhidrazil), ABTS (2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazolil - 6- ácido sulfônico) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Metanol, ácido acético e acetonitrila utilizados possuíam grau HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), e os demais reagentes usados nos experimentos foram de grau analítico.

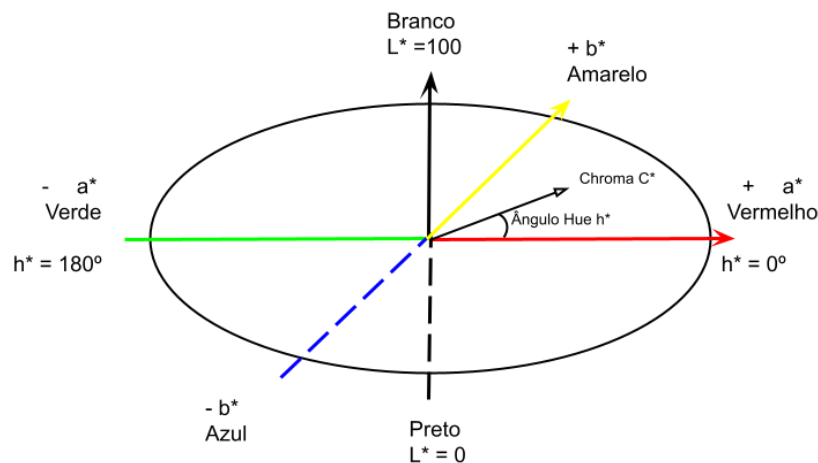
2.2.2 Métodos

2.2.2.1 Análises físicas

O tamanho dos frutos foi determinado através das medidas da altura e do maior diâmetro horizontal. O peso foi determinado através da média de pesagem de 10 frutos. O rendimento de polpa foi obtido através da pesagem das porções de polpa e semente separadas manualmente.

A cor das amostras foi analisada em colorímetro digital (Konica Minolta, CM 5, Japão), obtendo os parâmetros de luminosidade (L^*), as coordenadas cartesianas das cores (figura 5) vermelho/verde (a^*) e amarelo/azul (b^*), os quais foram utilizados para calcular os valores de Chroma ($C^* = \sqrt{a^2+b^2}$) e ângulo hue ($h^* = \arctg b^*/a^*$). A concentração de sólidos solúveis foi medida através de refratômetro ABBE (AR1000S, Megabrix, Brasil) e expressa em °Brix. O pH foi medido a 20 °C após calibração em pH 4,0 e 7,0 (Tec -3 MP, Tecnal, São Paulo, Brasil).

Figura 5. Diagrama dos parâmetros de cor.



Fonte: KIKUTI *et al.*, 2004.

2.2.2.2 Análise cromatográfica de açúcares e ácidos orgânicos

O extrato foi preparado com 5 g de amostra homogeneizado com 10 mL de água destilada, permanecendo sob agitação a 40 °C por 30 min (Incubadora Refrigerada, MA832, Marconi, Brasil), em seguida centrifugado a 2224 g por 10 min (MPW-351, MPW MED. INSTRUMENTS, 600W, Varsóvia, Polônia), o sobrenadante foi armazenado. O sólido foi recuperado e homogeneizado com 10 mL de água destilada, agitado novamente a 40 °C por 30 min e centrifugado. O extrato final se deu pela junção dos sobrenadantes.

A quantificação de açúcares (glucose, frutose e sacarose) seguiu a metodologia proposta por Santos *et al.*, (2018), sendo determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC 2695 Alliance, Waters, EUA). O extrato foi filtrado em filtro seringa (0,22 µm de nylon) antes das análises. O sistema de HPLC (bomba quaternária, desgaseificador e autoinjeter) acoplado a um detector de índice de refração Waters RI 2414 (Milford MA, EUA) foi utilizado. A quantificação ocorreu em um sistema de eluição isocrático com uma solução aquosa de ácido sulfúrico 0,005 M em fluxo de 0,5 mL/min. A coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) foi mantida a 30 °C e a detecção das amostras ocorreu por comparação dos tempos de retenção dos padrões de referência (sacarose: $y = 7,71E^{06}x + 83246$, $R^2 = 0,986$; glucose: $y = 9,35E^{06}x - 37747$, $R^2 = 0,992$; frutose: $y = 9,14E^{06}x + -75598$, $R^2 = 0,993$).

A quantificação dos ácidos orgânicos foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC 2695 Alliance, Waters, EUA). O extrato foi filtrado em filtro seringa (0,22 µm de nylon) antes das análises. O sistema de HPLC acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos PDA 2998 (Waters, Milford, MA, EUA). A quantificação ocorreu em um sistema de eluição isocrático com uma solução aquosa de ácido sulfúrico 0,005 M em fluxo de 0,5 mL/min. A coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) foi mantida a 30 °C e a detecção das amostras ocorreu por comparação dos tempos de retenção dos padrões de referência (ácido cítrico: $y = 1,26E^{07}x - 197658$, $R^2 = 0,979$; ácido ascórbico: $y = 6,26E^{07}x - 1,7E^{06}$, $R^2 = 0,997$).

2.2.2.3 Extração da polpa de Pitanga preta para análises de compostos fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante.

Para a extração, 5 g de amostra foram homogeneizados em 50 mL de metanol P.A, centrifugado a 2224 g por 10 min, o sobrenadante foi armazenado. O sólido foi recuperado e homogeneizado mais 50 mL de metanol e novamente centrifugado. Os extratos foram misturados e rotaevaporados (TE-211, TECNAL, Piracicaba, SP, Brasil) a 45 °C para remoção do solvente.

2.2.2.4 Compostos fenólicos totais (TPC)

O teor de compostos fenólicos totais foi avaliado pelo método de Singleton e Rossi (1965). 50 µL de amostra foi adicionada de reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 N (250 µL) e de 4,2 mL de água. Após três minutos foi adicionado Na₂CO₃ 1 N (500 µL) permanecendo no escuro por uma hora e realizada a leitura em microplaca (espectrofotômetro de microplacas

Epoch, Synergy-BioTek, Winooski, VT, EUA) no comprimento de onda de 765 nm. Para quantificação foi necessário a utilização de curva padrão, utilizando como padrão ácido gálico ($y = 6,16E^{-04}x - 6,26E^{-04}$; $R^2 = 0,996$).

2.2.2.5 Flavonoides totais (TFC)

A concentração dos flavonoides totais foi quantificada segundo Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999). 250 μ L de amostra foram adicionados em 2 mL de água sofrendo agitação seguida de repouso por 5 min. Em seguida, foi adicionado NaOH 1 mol/L (800 μ L) e transferido 300 μ L para microplaca. A leitura em microplaca foi realizada no comprimento de onda de 510 nm. Para quantificação, as absorbâncias foram comparadas à uma curva de calibração utilizando a catequina (CAT) como padrão ($y = 2,82E^{-03}x - 4,11E^{-03}$; $R^2 = 0,991$).

2.2.2.6 Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

DPPH

A atividade de captura dos radicais livres foi determinada pelo método DPPH de acordo com o método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). 50 μ L de amostra foi adicionado a 1,9 mL de uma solução de DPPH depois deixada em repouso no escuro por 30 min. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 517 nm em microplaca. A curva padrão foi construída com o padrão Trolox (TE) ($y = 0,0662*x + 0,207$; $R^2 = 0,988$).

ABTS

O método ABTS foi realizado de acordo com Re *et al.* (1999). Após 16 horas do preparo da mistura das soluções estoque de ABTS 7 mmol/L e de $K_2S_2O_8$ 2,45 mmol/L, 4 ml foram adicionados em um balão volumétrico de 200 mL e diluída em água a fim de se obter uma leitura de absorbância $\geq 0,700$ em microplaca no comprimento de onda de 734 nm. 20 μ L de amostra foram adicionados ao reagente ABTS (280 μ L) e deixados reagir por 30 min no escuro. Ao final da reação foi realizada a leitura em microplaca a um comprimento de onda de 734 nm. A curva padrão foi construída com o padrão Trolox ($y = 0,244*x + -0,0799$; $R^2 = 0,987$).

FRAP

A metodologia proposta por Benzie e Strain (1996) foi utilizada para determinar o poder antioxidante da redução do ferro. Foram adicionados 10 μL de amostra e 290 μL do reagente FRAP, em poços de microplaca, depois deixada em repouso no escuro por 30 min. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplaca em 593 nm e os dados obtidos foram comparados com a curva de calibração descrita pela concentração de Trolox ($\mu\text{mol TE/g}$) ($y=1,19\text{E}^{-03}x + 5,47\text{E}^{-03}$; $R^2= 0,999$).

2.2.2.7 Teor de antocianinas totais (AT) por pH diferencial.

O extrato antociânico (Imagem 6) foi preparado a partir de 5 g de amostra homogeneizada com 30 mL de uma solução de etanol 95% e HCl 1 N em uma proporção de 85:15 (v/v), a mistura permaneceu em repouso por 12 horas, em frasco âmbar, em ambiente sem incidência de luz, o extrato foi centrifugado a 2224 g por 15 min o sobrenadante foi recolhido e sólido lavado e completado para 50 mL em balão volumétrico.

As antocianinas foram quantificadas seguindo metodologia proposta por Giusti e Wrolstad (2001). 290 μL de solução de cloreto de potássio 0,025 M (pH 1) foram adicionados a 10 μL de amostra, em microplaca, em seguida, a leitura se deu no comprimento de onda de 510 nm e 700 nm em leitor de microplaca (Epoch Microplate Spectrophotometer, Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, USA). O mesmo procedimento foi realizado para a solução tampão de acetato de acetato de sódio 0,4 M (pH 4,5), 290 μL desta solução foram adicionados em 10 μL de amostra. O AT foi calculado e expresso em cianidina-3-glicosídeo (C3G), conforme a Equação 1.

$$\text{mg/L} = [(ABS_{510} - ABS_{700})]_{\text{pH}_1} - [ABS_{510} - ABS_{700}]_{\text{pH}_{4,5}} \times \text{MM} \times \text{D} \times 1000 / (\epsilon \times \text{L})$$

(1)

Onde:

ABS_{510} = Absorbância lida no comprimento de onda de 510 nm;

ABS_{700} = Absorbância lida no comprimento de onda de 700 nm;

MM = massa molecular da cianidina-3-glicosídeo (449,2 g/mol);

D = fator de diluição da amostra x fator de diluição da análise;

ϵ = Absortividade molar (26900)

L = caminho óptico (1 cm)

Fotografia 4. Extrato antociânico de pitanga preta.



Fonte: a autora

2.2.2.8 Teor de antocianinas monoméricas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

As antocianinas foram quantificadas segundo metodologia proposta por Ito *et al.*, (2019). A análise foi realizada utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC 2695 Alliance, Waters, EUA) acoplado um detector de fotodiodo (PDA 2998), uma bomba quaternária e auto injetor. O extrato foi filtrado com filtro membrana (0,22 μm) e 10 μL foram injetados em coluna XTerra® MS C18 com dimensões de 4,6 \times 250 mm, 5 μm (Waters, Milford, MA, EUA). A coluna foi mantida a 20 °C com fluxo de 1,0 mL/min, seguindo o gradiente 3-22% de acetonitrila (B) no intervalo de 0 a 5 min, seguido de 22-35% de B no intervalo de 5 a 15 min e por fim recondicionamento da coluna. O solvente A utilizado foi 0,1% de ácido fórmico. As antocianinas foram quantificadas em 515 nm, seguindo curva realizada com o padrão cianidina-3-glicosídeo ($y = 25482x - 20152$; $R^2 = 0.999$).

2.2.2.9 Carotenoides

O β -caroteno e o licopeno foram quantificados de acordo com Rodriguez-Amaya, (1999). A extração foi realizada com 30 mL de acetona e 0,5 g de polpa de pitanga preta. A mistura foi homogeneizada e permaneceu sob agitação por uma hora. A amostra foi lavada com acetona e filtrada em filtro a vácuo (Biomec Brazil Pump, Eco 740, São Paulo, Brasil) com

filtro qualitativo de 0,16 mm de espessura. Em funil de separação, 25 mL de éter de petróleo foi adicionado com pequenas porções do extrato de acetona seguido de água. A fase inferior foi descartada e a amostra foi lavada com éter de petróleo para remoção completa da acetona. A solução contendo os pigmentos foi transferida para balão volumétrico com volume final de 50 mL e completada com éter de petróleo (Fotografia 5). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Mini UV 1240, Shimadzu) em 450 nm (β -caroteno) e 470 nm (licopeno). As concentrações foram calculadas conforme a Equação 2.

$$(\mu\text{g/g}) = (((\text{ABS} * \text{V} * 10^6) / (\text{E} * \text{L} * 100)) / \text{m}) \quad (2)$$

Onde:

ABS = Absorbância no comprimento de onda específico;

V = volume final dos pigmentos (mL);

E = Coeficiente de extinção (β -caroteno = 3450; Licopeno = 2592);

m = Massa de amostra (g).

L = caminho óptico (1 cm)

Fotografia 5. Extrato de carotenoides da pitanga preta.



Fonte: a autora

2.2.2.10 Atividade antiglicêmica

A atividade antiglicêmica foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Moradi-Afrapoli *et al.* (2012), através da inibição da α -glicosidase. Em microplaca, foram pipetados 10 μ L do extrato, já diluído em 5% de DMSO, com a solução de α -glicosidase (20 μ L de solução enzimática 0,5 UN/mL e 120 μ L de tampão fosfato 0,1 M pH 6,9), incubados a uma temperatura de 37 °C por 15 min. Logo após o tempo de reação, foram adicionados 20 μ L de solução de substrato (p- nitrophenyl- α -D-glucopyronoside 5 mM em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,9), incubados novamente por mais 15 min. A reação foi interrompida com a adição de 80 μ L de Na₂CO₃ 0,2 M. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 405 nm. O resultado expresso em % de inibição da enzima (Equação 4).

$$\text{Inibição (\%)} = [(\text{Abs. controle} - \text{Abs. amostra}) / \text{Abs. controle}] \times 100 \quad (4).$$

2.2.2.11 Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão. Os resultados obtidos foram avaliados através de análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Fisher LSD, a fim de avaliar as diferenças entre as amostras. As análises estatísticas foram realizadas no software STATISTICA 7.1 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

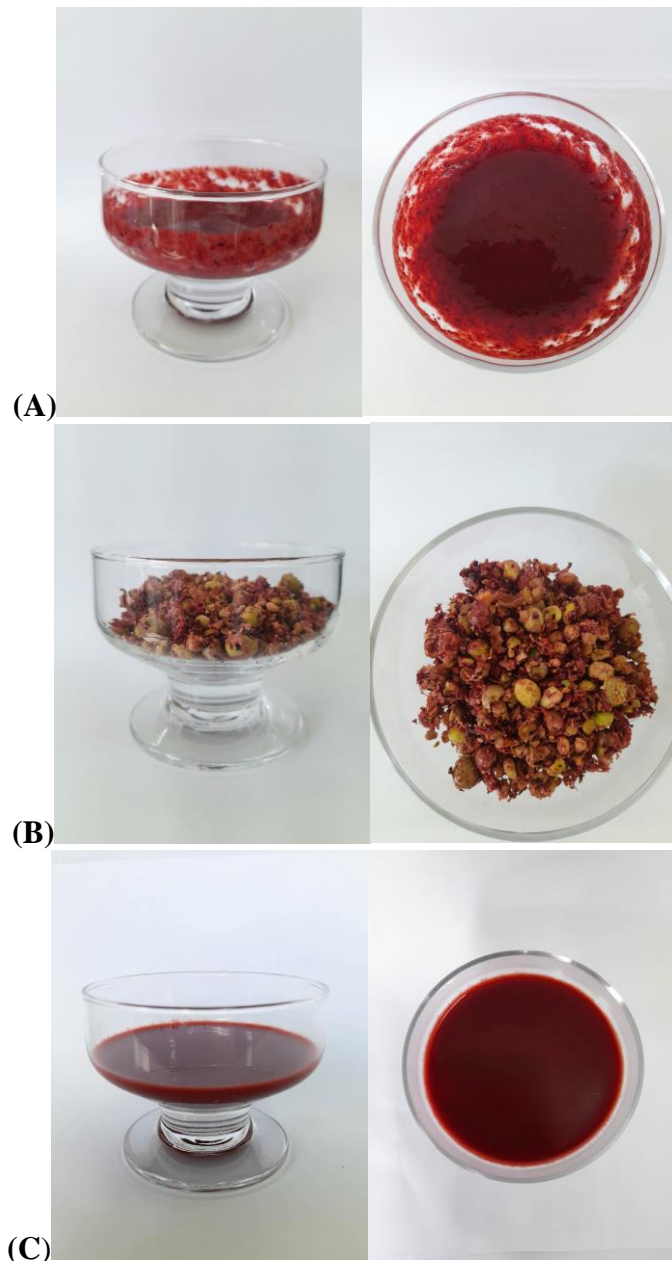
2.3.1 Análises Físicas

Os frutos apresentaram altura média de $11,1 \pm 1,5$ mm e diâmetro médio de $18,9 \pm 1,9$ mm, com peso médio de $1,80 \pm 0,28$ g. A polpa (Fotografia 6A) representou 81% do fruto, caracterizando 19% do peso do fruto em sementes (Fotografia 6B). Bezerra e Silva (2000), demonstram que os frutos apresentaram peso médio de 3,9 g e porcentagem de rendimento de polpa de aproximadamente 81,5%, valores bem próximos obtidos neste trabalho, porém essas características podem variar de acordo com a seleção, região de cultivo, solo, incidência de sol e chuva (BAGETTI *et al.*, 2011; ROBARDS; ANTOLOVICH, 1997; SANTOS; SILVA; ALVES, 2006).

A análise de cor da polpa demonstrou valores positivos para as coordenadas a* (vermelho/verde) = $0,07 \pm 0,03$, e b* = $0,02 \pm 0,01$ (amarelo/azul). O material analisado se

encontra no quadrante positivo do a^* , indicando a cor vermelha, e positivo do b^* , indicado a cor amarela. O b^* para polpa de pitanga se assemelhou com o encontrado por Zielinski *et al.* (2014a) em amostras de Uva (*Vitis* sp.). O Chroma apresentou valor de $0,07 \pm 0,02$ e o ângulo Hue, que indica a cor observável (representado de como 0° = vermelho, 90° = amarelo, 180° = verde, e 270° = azul), foi de $8,83 \pm 2,85$. Porém, como a luminosidade foi afetada pela alta concentração de sólidos presentes na amostra, $L^* = 0,07 \pm 0,02$, realizou-se a análise de cor do suco obtido após centrifugação. O suco de pitanga preta (Fotografia 6C), obteve maior valor nos parâmetros L^* , indicando que a separação dos sólidos o tornou mais límpido que a polpa.

Fotografia 6. Polpa, sementes e suco obtido através da pitanga preta.



Nota: (A) Polpa obtida após processo de despulpamento das pitangas pretas. (B) Sementes após o processo de despulpamento das pitangas pretas; (C) Suco de pitanga preta.

O valor de a^* encontrado teve a maior valor da coordenada para a pitanga, em comparação com a polpa de amora, uva e açaí, indicando uma forte tendência à coloração vermelha, nesse eixo. O mesmo ocorreu para o b^* , a pitanga apresentou maior valor da coordenada, ficando mais próxima do açaí, com coloração tendendo para o amarelo, nesse eixo. Para o Chroma, ou seja, a saturação da cor, a pitanga apresentou maior valor também, indicando uma coloração intensa. Os valores encontrados para ângulo Hue para o suco de pitanga e os observados por Zielinski *et al.* (2014a), para as amostras de amora, uva e açaí, são menores que 90° , indicando uma tendência das amostras a coloração vermelha.

A análise cromatográfica de açúcares indicou a presença de glucose na concentração de $4,00 \pm 0,04$ g/100 g e frutose $4,62 \pm 0,04$ g/100 g e não foi identificado a presença de sacarose. Corroborando com esse resultado a concentração de sólidos solúveis expressa em °Brix encontrada na polpa de pitanga foi de $9,58 \pm 0,14$. Bagetti *et al.* (2011) indicam teores de sólidos solúveis compatíveis com o obtido neste trabalho, apresentando valor de $13,8 \pm 0,2$ para amostras de pitanga com polpa de coloração roxa. Bezerra *et al.* (2014) sugerem que o teor médio de sólidos solúveis dos frutos de pitanga é de 9%. A diferença presente entre a concentração de açúcares e o °Brix se deve à quantificação de outros compostos solúveis, como os ácidos orgânicos.

O pH encontrado na amostra foi de $3,68 \pm 0,01$, valores entre $2,88 \pm 0,06$ e $3,38 \pm 0,02$; foram encontrados em pitangas de diferentes colorações, variando do laranja, vermelho ao roxo (BAGETTI *et al.*, 2011). Os ácidos orgânicos são produtos intermediários ou finais do metabolismo de carboidratos, lipídeos, proteínas, e catabolismo das plantas (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2010; VALENTÃO *et al.*, 2005). A acidez dos frutos da pitangueira está atribuída principalmente à presença de ácido cítrico. A polpa de pitanga preta apresentou concentração de $3,89 \pm 0,01$ g/kg desse composto. A fruta é rica em vitamina C com concentração de $0,83 \pm 0,05$ g/kg, valor superior ao encontrado em suco de laranja por Ancos *et al.*, (2020) com teores $0,62 \pm 0,04$ g/kg. Os ácidos orgânicos, além de influenciar as propriedades organolépticas, apresentam correlação direta com a qualidade dos frutos, estabilidade microbiana e podem exercer função importante em associação com compostos antioxidantes, quelando metais e retardando a atividade enzimática (MCCLUSKEY; HERDMAN; SKENE, 2004; RIVASSEAU *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2003).

2.3.2 Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante

A pitanga preta apresentou concentração de compostos fenólicos totais de $2211,49 \pm 137,68$ mg/kg expresso em ácido gálico. Bagetti *et al.* (2011) encontraram teores de 4630 ± 160 mg/kg para pitanga de polpa roxa, 2100 ± 30 mg/kg para pitanga de polpa vermelha e 1790 ± 50 mg/kg para pitanga de polpa laranja, os autores utilizaram como solvente metanol acidificado com ácido fórmico para extração dos compostos. Denardin *et al.* (2015) realizou a extração com etanol 95%, obtendo valores para pitanga laranja de $4574,3 \pm 150$ mg/kg, para vermelha de $4338,4 \pm 605$ mg/kg e roxa de $7998,0 \pm 547$ mg/kg. Teores maiores foram encontrados por Chaves *et al.* (2018), onde as polpas foram extraídas com metanol, rotaevaporadas, liofilizadas, obtendo resultado de 8280 ± 140 e 11400 ± 120 mg/kg para pitanga vermelha e roxa, respectivamente. Fatores extrínsecos como características do solo e condições ambientais como temperatura podem ter acarretado a menos síntese dos compostos bioativos, uma vez que a temperatura máxima média nos meses de formação dos frutos na região de Itaberá-SP foi de $32,7$ °C e nos meses de colheita foi de 31 °C. Além disso, a variação pode estar relacionada com a porção analisada da planta (fruta inteira, polpa ou casca), etapas de processamento (secagem, moagem, prensagem e liofilização) e os métodos de extração devem ser considerados na estabilidade e quantidade de compostos bioativos (FIGUEIRÔA *et al.*, 2013; LAZZAROTTO-FIGUEIRÓ *et al.*, 2021; BAGETTI *et al.*, 2011; ROBARDS; ANTOLOVICH, 1997; SANTOS; SILVA; ALVES, 2006). No entanto, a pitanga preta apresentou maior teor de compostos fenólicos totais quando comparado com amostras de polpas de amora, uva e açaí em trabalho realizado por Zielinski *et al.* (2014a).

A concentração de flavonoides totais encontrados na polpa de pitanga preta foi de $266,33 \pm 22,43$ mg CAT/kg, resultado semelhante ao obtido em amostras de pitanga de coloração vermelha em análise realizada por Onwudiwe *et al.* (2018), com teor de $280,74 \pm 2,79$ mg CAT/kg. A família das Myrtaceae é associada com a presença de flavonoides, em especial tendem a ser a classe de compostos mais ativos no gênero *Eugenia* (ONWUDIWE *et al.*, 2018; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016). Amostras de cagaita (*Eugenia dysenterica*), grumixama (*Eugenia brasiliensis*) e uvaia (*Eugenia uvalha*) possuem concentração de flavonoides totais de $133,70 \pm 7,10$; $363,60 \pm 25,2$; $203,40 \pm 3,10$ mg CAT/kg, respectivamente (STAFUSSA *et al.*, 2018).

A concentração de antocianinas totais encontrada no fruto foi de $500,55 \pm 31,37$ mg/kg expresso em cianidina-3-glicosídeo. Através da cromatografia líquida de alta eficiência foi possível identificar a concentração de $327,62 \pm 0,07$ mg/kg de cianidina-3-glicosídeo, outros

compostos antociânicos foram quantificados com base na curva padrão de cianidina-3-glicosídeo totalizando $120,78 \pm 0,11$ mg/kg. Em comparação com estudo realizado por Bagetti *et al.* (2011), foi possível identificar que a amostra se aproxima, em concentração de antocianina, a variedade de pitanga de polpa vermelha. Já a que possui coloração roxa apresentou valores mais altos, isso pode ser explicado uma vez que a antocianina é um pigmento que possui coloração tendendo ao vermelho. A maior concentração desse composto resulta em uma polpa mais “escura”, apesar da pitanga preta estudada neste trabalho apresentar epicarpo de coloração preta, a polpa possui coloração avermelhada (Fotografia 7). A pitanga é rica em antocianinas quando comparadas com amostras de amora, uva e açaí, que apresentaram em média $103,96 \pm 1,16$ a $322,35 \pm 6,16$ mg C3G/kg.

Fotografia 7. Corte transversal do fruto.



O teor de antocianinas pode ser considerado um ponto importante para estimar se uma fruta possui uma alta atividade antioxidante (HASSIMOTTO; GENOVESE; LAJOLO, 2005). Diferentes métodos para avaliar a atividade antioxidante são utilizados para diminuir os interferentes específicos de cada análise. Com método baseado no sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) foi possível quantificar $23,49 \pm 1,02$ mmol TE/kg, para a polpa de pitanga preta. Valores semelhantes foram encontrados variando de $14,00 \pm 1,00$ a $31,00 \pm 7,00$ mmol TE/kg para pitangas com diferentes cores de polpa (BAGETTI *et al.*, 2011). Em polpa de *Eugenia dysenterica* foi identificado a concentração de $13,95 \pm 0,14$ mmol TE/kg, já para *Eugenia uvalha* e *Eugenia brasiliensis* os teores variaram de $8,89 \pm 0,23$ a $1,04 \pm 0,08$ mmol TE/kg, tal resultado indica que a cultivar de *Eugenia uniflora* analisada neste trabalho

possuiu vantagem em comparação a espécies do mesmo gênero e também pode apresentar atividade antioxidante superiores a outras frutas de mesa. Para amostras de amora, foi demonstrado valor inferior ao encontrado na pitanga de coloração preta, $16,84 \pm 0,50$ mmol TE/kg, esta diferença indica que a pitanga possui uma atividade antioxidante maior que a encontrada por Chaves *et al.* (2018) em aproximadamente 28,3%.

O método de determinação da capacidade antioxidante baseado na capacidade dos compostos antioxidantes a capturarem o cátion do 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina) -6- ácido sulfônico (ABTS), vem sendo utilizada amplamente para determinação da atividade antioxidante *in vitro* de frutas como açaí, maracujá, acerola e goiaba (SUCUPIRA *et al.*, 2012). Para a amostra de pitanga preta foi determinada uma concentração de $18,54 \pm 0,49$ expresso em mmol TE/kg, teor semelhante ao encontrado por Chaves *et al.* (2018) em amostras de pitanga de polpa com coloração avermelhada. Porém, os frutos de coloração mais escura, como a pitanga de polpa roxa, apresentaram atividade antioxidante maior quantificada através deste método. A análise pelo método do poder antioxidante redutor do ferro (FRAP) obteve concentração de $30,47 \pm 1,75$ mmol TE/kg valores aproximados foram determinados para pitangas de polpa roxa, $31,00 \pm 6,00$ mmol TE/kg (BAGETTI *et al.*, 2011).

A polpa de pitanga tende a ser rica em carotenoides, principalmente o betacaroteno e licopeno (HOFFMANN-RIBANI; HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2009). A pitanga preta apresentou $104,26 \pm 15,14$ $\mu\text{g/g}$ expresso β -caroteno e $97,39 \pm 13,53$ em $\mu\text{g/g}$ expresso em licopeno. Através da extração com CO₂ super crítico Filho *et al.*, (2008) quantificou a concentração total de carotenoides com o teor de $87,88 \pm 2,52$ μg equivalente β -caroteno/g, a variação presente nos resultados pode estar relacionada a tonalidade dos frutos, de forma geral as variedades mais pigmentas, pretas, apresentam maiores concentrações de compostos bioativos, como carotenoides, compostos fenólicos e atividade antioxidantes. As de pigmentação vermelha tendem a apresentar resultados inferiores de carotenoides totais, 104 ± 1 μg equivalente β -caroteno/g (LIMA; MÉLO; LIMA, 2002) seguida pela laranja, $63,50 \pm 0,71$ $\mu\text{g/g}$ (SANTOS *et al.*, 2021).

A pitanga preta possui atividade antiglicêmica expressa em IC₅₀ de $0,42 \pm 0,07$ mg/mL, quantificada em relação a inibição da α -glicosidase. Esse se apresenta expressivo quando comparado com o fármaco de referência, onde a acarbose apresentou IC₅₀ = $14,65 \pm 3,29$ mg/mL. Sendo assim é necessária uma concentração 34x menor do extrato de pitanga preta para se ter o mesmo resultado do fármaco. Wu; Luo; Xu, (2015) encontraram concentração de inibição da α -glicosidase para o mirtilo e goji de $13,00 \pm 0,12$ mg/mL e $26,1 \pm 1,78$ mg/ml, respectivamente expresso em IC₅₀, sendo assim a pitanga possui vantagem em comparações

com essas variedades de mesa, precisando uma quantidade menor de amostra para atingir o mesmo resultado. Portanto, a pitanga é um alimento funcional de grande interesse, podendo ser adicionado em dietas dietéticas contribuindo com a manutenção da saúde.

Estes resultados demonstram um potencial para a utilização da polpa de pitanga para aplicação em novas formulações uma vez que esse produto pode agregar uma maior concentração compostos bioativos em comparação com a pitanga vermelha e laranja e as polpas de frutas convencionais e possuiu alta atividade antiglicêmica a ser explorada.

2.4 CONCLUSÃO

Os frutos de coloração preta da pitanga possuem alto rendimento de polpa e coloração avermelhada intensa. Os ácidos orgânicos de maior expressão em sua composição são o ácido cítrico, responsável pela sua acidez, e o ácido ascórbico, apresentando altos teores de vitamina C. Dentre as colorações de pitanga, a de coloração preta apresenta maiores teores de carotenoides, licopeno e β -caroteno. A pitanga preta possui alta atividade antiglicêmica através inibição da α -glicosidase, apresentado vantagem em relação ao fármaco, acarbose. Tais parâmetros avaliados indicam o potencial de utilizar a polpa de *Eugenia uniflora* para elaboração de novos produtos rico em compostos bioativos, com apelo a saudabilidade.

CAPÍTULO 3 - OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO DE ERVA MATE ADICIONADA DE PITANGA PRETA COM MICRORGANISMOS DA KOMBUCHA

RESUMO

A produção de kombucha vem crescendo ao longo do tempo motivada pelo aumento do consumo de produtos funcionais. É caracterizada como uma bebida fermentada através de uma colônia simbiótica de microrganismos, sendo o chá obtido das folhas de *Camellia sinensis* o substrato usual. Porém, há a possibilidade de promover a fermentação em novos substratos. A *Ilex paraguariensis* St. Hil. possui altos teores de compostos bioativos, mas suas formas de apresentação são restritas a chimarrão, tererê e infusão do mate torrado. Juntamente com a pitanga preta, podem ser utilizadas para produção de um novo fermentado com os microrganismos da kombucha. Desta forma, o objetivo desse trabalho é otimizar concentração de erva mate, açúcar e temperatura da fermentação da kombucha visando maior concentração de compostos bioativos. Identificar o melhor tempo de fermentação da bebida a base de erva mate e do mesmo adicionado de 30% de polpa de pitanga. A otimização simultânea sugeriu que as melhores condições de fermentação para maximizar a concentração de compostos fenólicos totais, foram de 11,5 g/L de erva mate, 130,0 g/L de açúcar e temperatura de fermentação de 25 °C. Através da cinética de fermentação foi possível visualizar que a fermentação promoveu o aumento de 1,71 vezes em média da atividade antioxidante na bebida. A adição de pitanga agregou compostos fenólicos, cerca de 8%, e as antocianinas foram preservadas durante o processo de fermentação por 15 dias. Seguindo os parâmetros legais de concentração de ácido acético para produção de kombucha, o tempo ideal de fermentação para a infusão de erva mate foi de 10 dias e para o fermentado adicionado de pitanga foi de 7 dias. A adição de suco de pitanga preta promoveu o aumento da atividade anti-glicêmica da bebida, sendo assim podendo apresentar interesse em dietas dietéticas para contribuição da manutenção da saúde.

Palavras-chave: Planejamento experimental. Metodologia de superfície de resposta. *Eugenia uniflora* L.

3 INTRODUÇÃO

A kombucha é uma bebida milenar que possui os gostos ácido e doce em predominância (SUN; LI; CHEN, 2015). Esse produto é definido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento como “[...] bebida fermentada obtida através da respiração aeróbia e fermentação anaeróbia do mosto obtido pela infusão ou extrato de *Camellia sinensis* e açúcares por cultura simbiótica de bactérias e leveduras microbiologicamente ativas (SCOBY)” (BRASIL, 2019). Os análogos de kombuchas podem ser preparados a partir de infusões, café, frutas, sucos e leite e tendem a apresentar bons resultados (SILVA et al., 2021).

A erva mate possui compostos bioativos que se assemelham aos encontrados nos chás verde e preto e apresenta maior atividade antioxidante quando comparada com outras espécies do mesmo gênero. Os benefícios da infusão como ação antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória são preservados após o preparo do chimarrão, da infusão do mate tostado e do

tererê (FILIP et al., 2001). Essas três formas são as mais comumente encontradas no mercado. A produção de kombucha pode contribuir para valorização da cultura do sul do Brasil, agregando variações no mercado (FERREIRA et al., 2019; MESQUITA et al., 2021; SANTETTI et al., 2021). O sabor característico da bebida possibilita a utilização da erva mate como matéria prima para produtos inovadores, como a kombucha.

A kombucha é comumente encontrada no mercado em sua forma saborizada, podendo apresentar os mais diversos sabores. Com a tendência para frutas exóticas e nativas, a *Eugenia uniflora* L. apresenta grande potencial podendo agregar compostos bioativos, cor e sabor na bebida ao fermentado a partir da erva mate. A pitanga possui baixo teor energético, é caracterizada pela presença de taninos, flavonoides, monoterpênicos, sesquiterpenos, vitamina A, vitamina C e carotenoides, sendo o licopeno o principal pigmento carotenóide encontrado (FILHO et al., 2008; EMBRAPA FLORESTAS, 2015; BEZERRA; LIRA JUNIOR; SILVA JUNIOR, 2018).

Desse modo, este trabalho tem como objetivo otimizar a fermentação da kombucha a partir da infusão de erva mate, para se obter a melhor concentração de compostos bioativos na bebida. Avaliar a cinética de fermentação do mosto de erva mate com e sem adição de polpa de pitanga, a fim de prever o tempo ótimo de fermentação e por fim agregar ao fermentado a polpa de pitanga preta, fruta exótica rica em carotenoides e compostos antioxidantes, para se obter uma nova bebida.

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Materiais

O SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) foi adquirido em sua forma hidratada, da marca The Kombucha Hub, Laboratório White Labs, com a presença de cepas de bactérias: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumillus*, *Bacillus aerophilus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus aerophilus*, *Bacillus aryabhattai*, *Bacillus subtilis*, *Acetobacter tropicalis*, *Gluconacetobacter saccharivorans*, *Micrococcus* sp., *Gluconacetobacter rhaeticus*, *Paenibacillus taichungensis*, e leveduras: *Brettanomyces bruxellensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces* sp., conforme descrição do fabricante.

Foi utilizada as folhas de erva mate tostadas (*Ilex paraguariensis* St. Hil., Leão Alimentos e Bebidas Ltda, Fazenda Rio Grande - PR, Brasil) para a elaboração da kombucha, e como fonte de carbono, sacarose (açúcar cristal, Camil Alimentos S/A, Barra Bonita - SP, Brasil). As pitangas pretas foram colhidas nas coordenadas em Itaberá (23° 52 '03.8 ``S 49° 08'

49.9 ``W), São Paulo. A espécie *Eugenia uniflora* L. foi identificada através do Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa, (Ponta Grossa -PR) possuindo exsicatas com o código HU-22693 e o fruto se apresenta tombado na carpoteca. Os frutos que apresentaram o estágio de maturação plena foram selecionados e em seguida foi realizado a toailete para a retirada do caule. As frutas foram sanitizadas com hipoclorito de sódio 200 mg/L, por 15 min e enxaguadas em água potável. As pitangas foram despulpadas (Despulpadeira, BRAESI, DES-60, Brasil), com abertura de tela de 1,0 mm para obtenção da polpa e separação das sementes. A polpa foi armazenada a -18°C até a elaboração das bebidas.

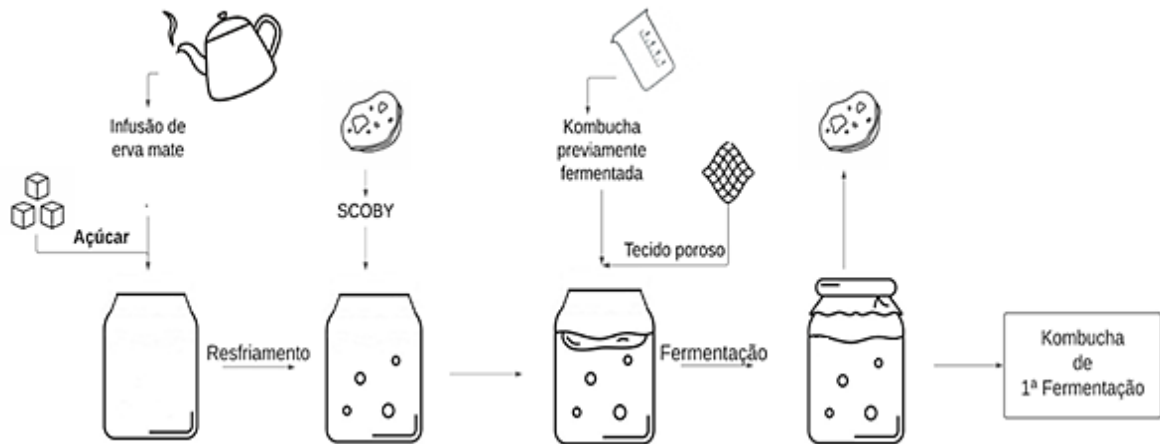
Os reagentes de Folin-Ciocalteu, Trolox (6 -hidroxi - 2,5,7,8 -tetrametilcromano - 2-ácido carboxílico), DPPH (2,2- difenil-2-picrilhidrazil), ABTS (2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazolil - 6- ácido sulfônico) e cafeína foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Metanol, ácido acético e acetonitrila utilizados, possuíam grau *High performance liquid chromatography*, e os demais reagentes tinham grau analítico.

3.1.2 Métodos

3.1.2.1 Preparo das kombuchas

As infusões de erva mate foram preparadas segundo Zielinski *et al.* (2014b). O preparo ocorreu conforme a Figura 6. Primeiramente foi adicionado a erva mate em água destilada a 80 °C em um béquer de vidro com capacidade de 2 L, permanecendo por 7 min e 30 s sob agitação magnética. Logo após, a mistura foi transferida para um fermentador de 400 mL, onde ocorreu a adição da sacarose. Após o resfriamento da mistura a 25 °C; 2,5% (m/v), em base úmida, da colônia de microrganismos fermentadores (SCOBY) e 10% (v/v) da kombucha previamente fermentada (líquido) foram adicionadas. O fermentador foi fechado com tecido poroso de poliéster e viscoso para permitir troca gasosa. Para otimização do processo, a fermentação ocorreu sob diferentes temperaturas, concentrações de erva mate e açúcar conforme descrito no item 2.2.2 Planejamento experimental. Após 12 dias de fermentação, o SCOBY foi retirado e as bebidas obtidas congeladas a -18 °C até o momento de cada análise.

Figura 6. Fluxograma do processo de preparo da 1ª fermentação das kombuchas.



Fonte: a autora.

3.1.2.2 Planejamento experimental

Com o intuito de avaliar e otimizar as condições de fermentação das kombuchas preparadas, foi utilizado o planejamento experimental Box-Behnken (1960). O efeito das variáveis independentes concentração de erva mate (g/L), X_1 , concentração de açúcar (g/L), X_2 , e da temperatura (°C), X_3 , com três níveis, foram avaliados (Tabela 3), resultando em 15 kombuchas (KM1 ao KM15). Os intervalos escolhidos de 4 a 12 g/L de erva mate, 50 a 150 g/L de açúcar e temperatura de 20 a 30°C foram determinados através dos máximos e mínimos encontrados na literatura (MIRANDA *et al.*, 2022). Esses experimentos foram realizados para analisar o padrão de resposta e estabelecer modelos para maximização do teor de compostos fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante, ácido glucurônico e ácido ascórbico.

Tabela 3. Valores reais e codificados (entre parênteses) da concentração de erva mate, açúcar e temperatura de fermentação para obtenção das kombuchas a partir do planejamento Box Behnken.

Experimento	Erva mate (g/L)	Açúcar (g/L)	Temperatura (°C)
KM 1	4 (-1)	50 (-1)	25 (0)
KM 2	12 (1)	50 (-1)	25 (0)
KM 3	4 (-1)	150 (1)	25 (0)
KM 4	12 (1)	150 (1)	25 (0)
KM 5	4 (-1)	100 (0)	20 (-1)
KM 6	12 (1)	100 (0)	20 (-1)
KM 7	4 (-1)	100 (0)	30 (1)
KM 8	12 (1)	100 (0)	30 (1)
KM 9	8 (0)	50 (-1)	20 (-1)
KM 10	8 (0)	150 (1)	20 (-1)
KM 11	8 (0)	50 (-1)	30 (1)
KM 12	8 (0)	150 (1)	30 (1)
KM 13	8 (0)	100 (0)	25 (0)
KM 14	8 (0)	100 (0)	25 (0)
KM 15	8 (0)	100 (0)	25 (0)

Assim, um modelo polinomial de segunda ordem foi utilizado para ajustar os dados experimentais. A equação polinomial de segunda ordem que foi utilizada na análise de superfície de resposta é demonstrada na Equação 5. Onde Y_n é a resposta predita, β_0 , β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes de regressão para os termos lineares, quadráticos e as interações, respectivamente, e X_i e X_j são as variáveis independentes (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2005). A significância estatística dos termos nas equações de regressão foi realizada por análise de variância (ANOVA) para cada resposta. Os termos não significativos foram excluídos do modelo inicial e os dados serão reajustados somente para os parâmetros significativos ($p \leq 0,05$). A qualidade dos ajustes foi avaliada por $P_{lack-of-fit}$, coeficiente de regressão ajustado (R^2 ajustado). Depois de obtidos os modelos matemáticos, a otimização simultânea foi obtida pelo método de Derringer e Suich (1980).

$$Y_n(X) = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (5)$$

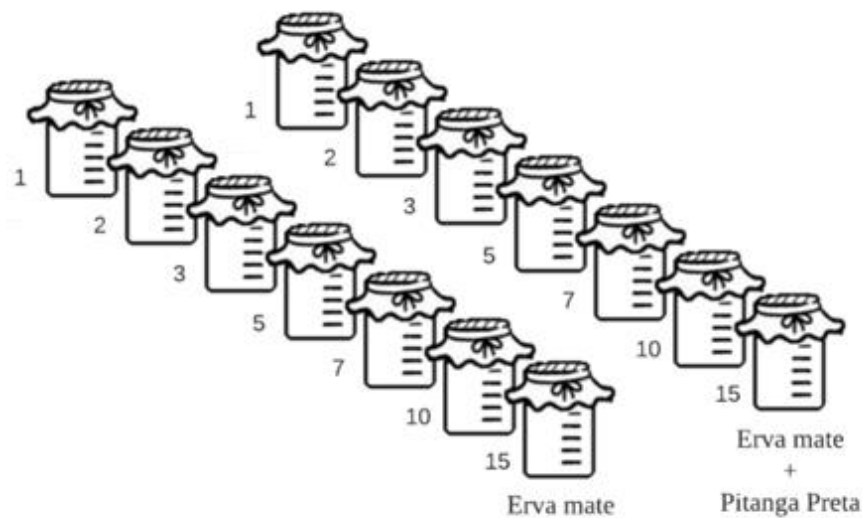
3.1.2.3 Cinética de fermentação

Para o estudo da cinética de fermentação, os parâmetros otimizados da kombucha de infusão de erva mate foram utilizados como base para a fermentação. O suco de pitanga foi preparado segundo a Instrução Normativa nº 12, de 4 de setembro de 2003, que discorre sobre

o Padrão de Identidade e Qualidade para Suco Tropical de Pitanga, tendo como padrão 60% (m/m) de polpa de pitanga e adicionado para fermentação em uma relação de 70% de infusão de erva mate e 30% suco. Foi analisada também o desenvolvimento da kombucha preparada somente com a infusão de erva mate.

Desse modo foram coletadas amostras no tempo 0 e após 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias de fermentação (Figura 7), e foram submetidas a análises. Os parâmetros avaliados na cinética foram: massa seca de SCOBY formado, pH, contagem total de bactérias e leveduras, concentração de fenóis totais, flavonoides, atividade antioxidante, ácido glucurônico, ácido ascórbico e ácido acético.

Figura 7. Representação dos fermentadores.



Fonte: a autora

3.1.3 Análises

3.1.3.1 Análises físico-químicas

A massa de SCOBY formada, em base seca, foi monitorada após secagem em estufa com temperatura 105 °C até peso constante. O pH da bebida foi medida a 20 °C após calibração em pH 4,0 e 7,0 (Tec -3 MP, Tecnal, São Paulo, Brasil).

3.1.3.2 Compostos fenólicos totais (TPC)

O teor de compostos fenólicos totais foi avaliado pelo método de Singleton e Rossi (1965). Para quantificação foi necessário a utilização de curva padrão, utilizando como padrão

a catequina. Cada amostra de kombucha diluída foi adicionada de 15 µL de reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 N (15 µL) e de 240 µL água deionizada, permanecendo por agitação por três minutos. Após o tempo decorrido foi adicionado Na₂CO₃ 1 N (30 µL) permanecendo no escuro por duas horas e realizada a leitura em microplaca no comprimento de onda de 765 nm.

3.1.3.3 Flavonoides totais (TFC)

A concentração dos flavonoides totais foi quantificada segundo Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999). As amostras de kombucha já diluídas (250 µL) foram adicionadas em 2 mL de água deionizada sofrendo agitação seguida de repouso por 5 min. Em seguida foi adicionado NaOH 1 mol/L (800 µL) e transferido 300 µL para microplaca. A leitura em microplaca foi realizada no comprimento de onda de 510 nm. Para quantificação, as absorbâncias foram comparadas à uma curva de calibração utilizando a catequina como padrão.

3.1.3.4 Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

DPPH

A atividade de captura dos radicais livres foi determinada pelo método DPPH de acordo com o método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Cada amostra de kombucha foi adicionada (100µL) a 3,9 mL de uma solução de DPPH depois deixada em repouso no escuro por 30 min. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 517 nm em microplaca. A curva padrão foi construída com o padrão Trolox.

ABTS

O método ABTS foi realizado de acordo com Re *et al.* (1999). Foi preparada uma curva padrão usando diferentes concentrações de Trolox (50, 100, 150, 200 e 250 µmol/L). Após 16 horas do preparo da mistura das soluções estoque de ABTS 7 mmol/L e estoque de K₂S₂O₈ 2,45 mmol/L, 4 ml solução foi adicionada em um balão volumétrico de 200 mL e diluída em água destilada a fim de se obter uma leitura de absorbância $\geq 0,700$ em microplaca no comprimento de onda de 734 nm. As amostras de kombucha foram diluídas e adicionadas (20 µL) ao reagente ABTS (280 µL) e deixado reagir por 30 min no escuro. Ao final da reação foi realizada a leitura em microplaca a um comprimento de onda de 734 nm.

FRAP

A metodologia proposta por Benzie e Strain (1996) foi utilizada para determinar o poder antioxidante da redução do ferro. Foram adicionados 10 µL de amostra e 290 µL do reagente FRAP, em poços de microplaca, depois deixada em repouso no escuro por 30 min. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplaca e os dados obtidos foram comparados com a curva de calibração descrita pela concentração de Trolox (µmol TE/g).

3.1.3.5 Contagem de bactérias totais e leveduras.

O Ágar Padrão para Contagem (PCA) com método de plaqueamento em superfície foi utilizado para analisar a população de bactérias presente nas amostras de kombucha, com incubação de 35 ± 1 °C por 48 ± 2 h. Para contagem de leveduras o ágar batata dextrose (BDA) acidificado com ácido tartárico 10% foi utilizado para inibir o crescimento de bactérias, sendo realizado o plaqueamento por superfície e incubado a temperatura de 23 ± 2 °C por 5 dias. Diluições seriadas foram realizadas a fim de se obter contagem final entre 25-250 unidades formadoras de colônias por mililitro de amostra (UFC/mL) conforme Método da *American Public Health Association* (APHA) (MORTON, 2001).

3.1.3.6 Nitrogênio total Kjeldahl

A análise de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl foi realizada conforme IAL (2006). Em tubos de digestão, 5 ml das amostras foram adicionadas juntamente com 6 ml de ácido sulfúrico P.A. e 6 g da mistura catalítica (sulfato de potássio anidro e sulfato de cobre anidro 10:1) e levados para o bloco até completa digestão. Aos tubos já resfriados foram adicionados NaOH 50% e destilados em destilador de nitrogênio (Marconi MA-0.36, 2007, Brasil), o vapor foi recolhido em Erlenmeyer contendo 10 ml ácido bórico 0,033 M. A titulação se deu com HCl 0,01 N até o ponto de viragem. A concentração de nitrogênio presente na amostra foi quantificada conforme a Equação 7.

$$\text{mg/L} = [(V \times N \times f \times 1,4) / V_{\text{am}}] * 10000 \quad (7)$$

Onde:

V = volume de HCl gasto na titulação;

N = normalidade do HCl;

f = fator de correção do HCl;

V_{am} = volume de amostra adicionado

3.1.3.7 Ácidos orgânicos

A quantificação dos ácidos orgânicos (glucurônico, ascórbico, lático, acético, cítrico e málico) foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC 2695 Alliance, Waters, EUA). O extrato foi filtrado em filtro seringa (0,22 µm de nylon) antes das análises. O sistema de HPLC (bomba quaternária, desgaseificador e autoinjeter) acoplado a um detector de detector de arranjo de fotodiodos PDA 2998 (Waters). A quantificação ocorreu em um sistema de eluição isocrático com uma solução aquosa de ácido sulfúrico 0,005 M em fluxo de 0,5 mL/min. A coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) foi mantida a 30 °C e a detecção das amostras ocorreu por comparação dos tempos de retenção dos padrões de referência.

3.1.3.8 Atividade antiglicêmica

A atividade antiglicêmica foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Moradi-Afrapoli *et al.* (2012), através da inibição da α-glicosidase. Em microplaca, foram pipetados 10 µL das amostras já diluídas em 5% de DMSO, com a solução de α-glicosidase (20 µL de solução enzimática 0,5 UN/mL e 120 µL de tampão fosfato 0,1M pH 6,9), incubados a uma temperatura de 37 °C por 15 min. Logo após o tempo de reação, foram adicionados 20 µL de solução de substrato (p- nitrophenyl-α-D-glucopyronoside 5 mM em tampão fosfato 0,1M, pH 6,9), incubados novamente por mais 15 min. A reação foi interrompida com a adição de 80 µL de Na₂CO₃ 0,2 M. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 405 nm. O resultado expresso em % de inibição da enzima (Equação 8).

$$\text{Inibição (\%)} = [(\text{Abs. controle} - \text{Abs. amostra}) / \text{Abs. controle}] \times 100. \quad (8)$$

3.1.3.9 Análises Estatísticas

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão. Os resultados obtidos foram avaliados através de análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Fisher LSD, a fim de avaliar as diferenças entre as amostras. O planejamento experimental Box Behnken, a

cinética de fermentação e as análises estatísticas foram realizadas no software STATISTICA 7.1 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 Planejamento Experimental

O pH das infusões apresentaram caráter tendendo ao ácido, variando de $5,90 \pm 0,06$ a $6,73 \pm 0,04$, nas diferentes concentrações de erva mate (Tabela 4). O valor mínimo encontrado nas amostras de kombuchas foi de $2,55 \pm 0,01$, para a amostra KM 7 e o valor máximo foi de $2,96 \pm 0,01$ para a amostra KM 6. Todas as kombuchas tiveram redução do pH de forma significativa em relação ao mosto, isso se deve pela formação de ácidos orgânicos durante a fermentação. A produção de ácidos orgânicos e outros metabólitos encontrados na kombuchas depende do inóculo e das condições de fermentação, portanto qualquer variação provocará alterações no produto obtido ao final da fermentação (VILLARREAL-SOTO et al., 2018).

Os teores de ácido acético encontrados nas kombuchas depois de 12 dias apresentaram diferença de média para todas as formulações preparadas, demonstrando que as concentrações de erva mate, sacarose e temperatura tiveram influência importante na bebida final. Para a kombucha preparada com erva mate, o valor máximo encontrado foi de 5 g/L (KM 6). Jayabalan; Marimuthu; Swaminathan (2007) identificaram o aumento da produção de ácido acético, em mosto de chá verde, a partir do 10º dia de fermentação, obtendo concentração de 3 g/L. Os ácidos orgânicos destacam-se pela sua atividade antimicrobiana e prevenção da contaminação da bebida por potenciais microrganismos patogênicos (WATAWANA et al., 2015). O experimento KM7 com menor pH com valor de 2,55 apresentou concentração menor ácido acético com 2,63 g/L do que na amostra KM6, com valor de 5,00 g/L de ácido acético e pH de 2,96, esse resultado pode estar relacionado com o efeito tamponante do meio. Cvetković et al. (2008) verificou mesmo comportamento em fermentado a base de chá preto, onde correlacionou efeito tamponante com a liberação de CO₂. Ao decorrer do processo fermentativo o dióxido de carbono se dissocia, produzido um ânion que reage de forma facilitada com os íons de hidrogênio, que em conjunto com os ácidos orgânicos e sais minerais evitam a alteração do pH no sistema.

O ácido glucurônico é um dos compostos bioativos de maior interesse presente na kombucha tendo em vista sua saudabilidade (KUMAR; JOSHI, 2016). A amostra KM 1 apresentou a maior concentração do composto, $554,26 \pm 63,21$ mg/L, os parâmetros de

fermentação utilizados nessa amostra foram os pontos médios, ou seja, 4 g/L de erva mate, 50 g/L de sacarose e 25°C. Jayabalan; Marimuthu; Swaminathan (2007), determinaram a concentração máxima de 230 mg/L, no fermentado a partir de chá preto, durante 12 dias de fermentação, níveis inferiores aos encontrados neste trabalho. O ácido é sintetizado a partir da glucose sendo utilizado como fonte de carbono por bactérias lácticas e acéticas, tais compostos são amplamente encontrados em bebidas funcionais. Cerca de 94% do ácido glucurônico é convertido em outros ácidos orgânicos, sendo um dos precursores da síntese do ácido ascórbico na kombucha (HA et al., 2011; STAMER, 1968; VĪNA et al., 2013).

Tabela 4. pH e ácidos orgânicos das infusões base (M) nas diferentes concentrações e nas amostras de kombucha (KM).

Amostras	pH	Ácido Glucurônico (mg/L)	Ácido Ascórbico (mg/L)	Ácido Acético (g/L)
M 4g/L	6,73 ^b ± 0,04	<LOD	<LOD	<LOD
M 8g/L	6,92 ^a ± 0,06	<LOD	<LOD	<LOD
M 12g/L	5,90 ^c ± 0,06	<LOD	<LOD	<LOD
KM1	2,69 ^{hi} ± 0,01	554,26 ^a ± 63,21	330,66 ^{ef} ± 3,13	2,12 ^m ± 0,02
KM2	2,94 ^{de} ± 0,01	458,64 ^{bcd} ± 67,81	307,96 ^{gh} ± 1,25	4,25 ^c ± 0,01
KM3	2,56 ^k ± 0,03	325,69 ^{hi} ± 28,64	428,25 ^{abc} ± 15,17	2,22 ^l ± 0,01
KM4	2,84 ^f ± 0,02	354,96 ^{ghi} ± 50,38	440,71 ^{ab} ± 13,08	4,75 ^b ± 0,07
KM5	2,81 ^f ± 0,01	378,02 ^{fgh} ± 21,48	328,26 ^{efg} ± 8,88	3,52 ^e ± 0,03
KM6	2,96 ^d ± 0,01	379,44 ^{fgh} ± 42,41	344,59 ^{de} ± 15,84	5,00 ^a ± 0,04
KM7	2,55 ^k ± 0,01	379,33 ^{fgh} ± 52,83	313,57 ^{fgh} ± 0,66	2,63 ⁱ ± 0,01
KM8	2,70 ^h ± 0,01	432,01 ^{cdef} ± 19,82	336,77 ^e ± 0,49	4,21 ^c ± 0,05
KM9	2,91 ^e ± 0,01	405,98 ^{efg} ± 57,52	295,29 ^h ± 1,02	3,94 ^d ± 0,05
KM10	2,76 ^g ± 0,01	305,70 ⁱ ± 6,60	359,24 ^d ± 5,57	3,18 ^g ± 0,04
KM11	2,81 ^f ± 0,01	524,30 ^{ab} ± 40,22	309,67 ^{fgh} ± 0,84	2,63 ^j ± 0,01
KM12	2,63 ^j ± 0,01	355,44 ^{ghi} ± 26,70	423,57 ^{bc} ± 40,28	2,73 ⁱ ± 0,01
KM13	2,63 ^j ± 0,01	480,22 ^{bc} ± 18,77	441,20 ^{ab} ± 3,02	2,28 ^k ± 0,01
KM14	2,65 ^{ij} ± 0,01	478,97 ^{bcd} ± 25,81	447,36 ^a ± 3,3	3,09 ^h ± 0,02
KM15	2,69 ^{hi} ± 0,01	413,31 ^{defg} ± 3,24	415,58 ^c ± 1,29	3,46 ^f ± 0,01

Nota: Resultados expressos com a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras com $p < 0,05$. <LOD = concentração menor que o limite de detecção.

As concentrações de vitamina C variaram de 447,36 a 307,96 mg/L. Os maiores teores foram encontrados nas amostras KM 3, KM 4, KM 13, KM 14 e KM 15. O parâmetro comum entre esses experimentos foi a temperatura utilizada na fermentação, 25 °C.

Tabela 5. Compostos fenólicos totais (TPC), Flavonoides totais (TFC) e atividade antioxidante das infusões bases (M) nas diferentes concentrações e nas amostras de kombucha (KM).

Amostras	TPC (mg AG/L)	TFC (mg CAT/L)	DPPH (μ mol TE/L)	ABTS (μ mol TE/L)	FRAP (μ mol TE/L)
M 4g/L	328,94 ^g ± 29,04	130,65 ⁱ ± 2,58	1867,18 ^g ± 31,74	707,78 ^l ± 5,02	1499,22 ^j ± 59,12
M 8g/L	524,23 ^e ± 32,47	208,00 ^h ± 5,44	3100,40 ^d ± 330,93	1352,33 ⁱ ± 101,34	2530,87 ^g ± 106,73
M 12g/L	840,79 ^c ± 26,67	433,13 ^b ± 25,42	7459,72 ^a ± 723,65	3206,03 ^d ± 104,04	4470,14 ^c ± 159,71
KM1	348,37 ^g ± 18,98	106,13 ^j ± 3,00	1590,95 ^g ± 103,27	685,10 ^l ± 4,58	1993,61 ^h ± 56,35
KM2	997,72 ^b ± 70,7	505,11 ^a ± 21,67	5425,13 ^b ± 261,70	3354,78 ^b ± 22,21	4370,98 ^c ± 259,1
KM3	345,66 ^g ± 30,37	88,40 ^{jk} ± 2,10	1741,58 ^g ± 103,14	966,42 ^j ± 78,05	1864,06 ^{hi} ± 105,27
KM4	1157,35 ^a ± 57,16	496,83 ^a ± 31,45	5589,30 ^b ± 412,93	3391,18 ^b ± 10,00	5561,46 ^a ± 219,35
KM5	288,84 ^g ± 16,23	72,79 ^k ± 2,59	1719,2 ^g ± 148,03	905,04 ^k ± 49,44	1511,12 ^j ± 112,61
KM6	1030,73 ^b ± 89,21	392,58 ^c ± 31,08	5328,13 ^b ± 359,80	3291,32 ^c ± 78,49	4345,77 ^c ± 412,59
KM7	437,65 ^f ± 26,51	96,97 ^j ± 2,43	1564,08 ^g ± 105,30	677,40 ^l ± 3,23	1692,21 ^{ij} ± 109,95
KM8	1154,64 ^a ± 29,79	486,19 ^a ± 48,10	4787,50 ^c ± 468,34	3607,82 ^a ± 10,93	5266,78 ^b ± 414,31
KM9	713,63 ^d ± 43,15	259,06 ^e ± 12,96	2992,39 ^{de} ± 189,78	1686,23 ^e ± 8,24	3333,95 ^f ± 206,14
KM10	756,92 ^d ± 35,07	225,02 ^{gh} ± 6,62	2645,41 ^{ef} ± 87,18	1538,52 ^{gh} ± 43,30	3490,81 ^f ± 103,8
KM11	982,84 ^b ± 76,57	289,68 ^d ± 9,39	2844,08 ^{def} ± 92,02	1603,01 ^f ± 72,48	3969,8 ^d ± 138,33
KM12	729,86 ^d ± 31,92	234,95 ^{fg} ± 11,07	2741,67 ^{def} ± 228,10	1594,17 ^{fg} ± 48,41	3381,57 ^f ± 151,58
KM13	878,13 ^c ± 74,75	263,55 ^e ± 17,49	3037,16 ^{de} ± 277,69	1602,49 ^f ± 23,16	3537,59 ^{ef} ± 112,68
KM14	709,3 ^d ± 61,39	268,04 ^e ± 8,97	2537,39 ^f ± 237,78	1603,01 ^f ± 27,04	4046,83 ^d ± 206,64
KM15	822,93 ^c ± 73,14	251,73 ^{ef} ± 6,57	2909,56 ^{def} ± 277,19	1500,04 ^h ± 28,65	3791,23 ^{de} ± 145,13

Nota: Resultados expressos com a média ± desvio padrão. AG: ácido gálico; CAT: catequina; TE: equivalentes de Trolox; DPPH: método de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; ABTS: método de captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolona) -6-sulfônico. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras com $p < 0,05$.

A variação na concentração final de vitamina C está correlacionada com diferentes substratos e condições de fermentação, Miranda *et al.* (2022) indicam que fermentados a partir da *Camellia sinensis* apresentam maiores teores desse composto. Além disso, uma correlação

positiva entre os valores de atividade antioxidante e a quantidade de vitamina C presente no meio foi observada em estudo realizado por Malbaša *et al.* (2011).

A maior concentração de erva mate proporcionou maiores teores de compostos fenólicos totais no mosto (Tabela 5). Nos fermentados KM 8 e KM 4, foram encontrados teores 1,4 vezes maior que na infusão com 12 g/L. O mesmo comportamento ocorreu para flavonoides totais, os fermentados com maior teor de erva mate, apresentaram valores 1,2 vezes maior que o mosto. Um aumento da concentração de compostos bioativos durante a fermentação pode ocorrer através da liberação de enzimas, pela microbiota presente no meio, ou ainda pela decomposição de polifenóis complexos em moléculas mais simples (JAFARI *et al.*, 2020).

Os diferentes métodos para avaliar a atividade antioxidante das amostras possuem a finalidade de diminuir os erros analíticos, uma vez que cada método possui determinados interferentes. Para a análise de DPPH, os menores índices foram encontrados nas amostras com menor concentração de erva mate e não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a infusão base, de forma análoga o maior teor de compostos foi encontrado na infusão base de 12 g/L, seguida pelos fermentados com mesma concentração de erva mate. A análise de atividade antioxidante pelo FRAP, também indicou maiores teores de compostos antioxidantes nas amostras que possuíam maior concentração de erva mate. Para método de sequestro do radical ABTS, a maior atividade foi encontrada no fermentado KM8. Pode-se concluir que o principal fator que influencia na atividade antioxidante na bebida é a concentração de erva mate adicionada no mosto.

3.2.2 Otimização

Os modelos para compostos fenólicos totais, flavonoides, DPPH, ABTS, FRAP, ácido glucurônico e ácido ascórbico propostos na análise de regressão múltipla foram significativos ($p < 0,05$) e não apresentaram falta de ajuste significativo ($P_{lack-of-fit} > 0,05$) (Tabela 6). Por outro lado, os resultados para ácido acético apresentaram falta de ajuste e não puderam ser descritos utilizando o modelo.

Para compostos fenólicos totais, flavonoides totais e FRAP o coeficiente de regressão linear apresentou correlação positiva na variável concentração de erva mate (X_1). Para DPPH e ABTS, os coeficientes de regressão linear e quadrático também foram positivos em X_1 . O resultado prova que o teor de compostos bioativos presentes na kombucha provém da infusão adicionada para fermentação.

Para o ácido glucurônico somente o coeficiente de regressão linear em concentração de açúcar (X_2) foi significativo, mostrando correlação negativa, visto que a alta concentração de sacarose pode promover o estresse osmótico e assim suprimir o crescimento microbiano. Nguyen *et al.* (2015) sugerem que a produção de ácido glucurônico diminuiu quando a concentração de sacarose aumentou de 12,5 g/L para 17,5g/L.

Tabela 6. Efeitos das variáveis independentes (concentração erva mate, de açúcar e temperatura) sobre a concentração de compostos fenólicos totais (TPC), flavonoides totais (TFC), atividade antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP), ácido glucurônico e ácido ascórbico.

(continua)

Variáveis respostas	Fatores	Coef. De regressão	Erro padrão	t-valor	p-valor	-95% de confiança	+95% de confiança
TPC (mgAG/L)	Constante	756,97	24,58	30,80	<0,001	703,88	810,07
	X_1	364,99	33,65	10,84	<0,001	292,28	437,69
	R ² ajustado	0,893					
	$P_{lack-of-fit}$	0,523					
TFC (mgCAT/L)	Constante	269,13	8,42	31,94	<0,001	250,93	287,33
	X_1	189,55	11,54	16,43	<0,001	164,63	214,48
	R ² ajustado	0,950					
	$P_{lack-of-fit}$	0,055					
DPPH (μ molTE/L)	Constante	2815,38	83,62	33,67	<0,001	2633,18	2997,57
	X_1	1814,28	78,22	23,19	<0,001	1643,85	1984,70
	X_1^2	652,85	114,50	5,70	<0,001	403,37	902,33
	R ² ajustado	0,979					1
	$P_{lack-of-fit}$	0,728					
ABTS (μ molTE/L)	Constante	1889,64	41,37	38,42	<0,001	1499,49	1679,79
	X_1	1301,39	38,70	33,62	<0,001	1217,06	1385,72
	X_1^2	520,24	56,65	9,18	<0,001	396,802	643,68
	R ² ajustado	0,988					
	$P_{lack-of-fit}$	0,222					

Tabela 6. Efeitos das variáveis independentes (concentração erva mate, de açúcar e temperatura) sobre a concentração de compostos fenólicos totais (TPC), flavonoides totais (TFC), atividade antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP), ácido glucurônico e ácido ascórbico.

(conclusão)

Variáveis respostas	Fatores	Coef. De regressão	Erro padrão	t-valor	p-valor	-95% de confiança	+95% de confiança
FRAP ($\mu\text{molTE/L}$)	Constante	3477,18	105,56	32,94	<0,001	3249,13	3705,23
	X ₁	1560,50	144,54	10,79	<0,001	1248,23	1872,77
	R ² ajustado	0,892					
	P _{lack-of-fit}	0,287					
Ácido glucurônico (mg/L)	Constante	415,08	11,92	34,80	<0,001	389,32	440,85
	X ₂	-75,17	16,33	-4,60	<0,001	-110,45	-39,89
	R ² ajustado	0,590					
	P _{lack-of-fit}	0,459					
Ácido ascórbico (mg/L)	Constante	421,89	10,79	39,08	<0,001	398,13	445,64
	X ₁ ²	-35,38	11,66	-3,03	0,011	-61,04	-9,72
	X ₂	51,02	7,94	6,42	<0,001	33,54	68,50
	X ₃ ²	-65,33	11,65	-5,60	<0,001	-90,99	-39,67
	R ² ajustado	0,845					
	P _{lack-of-fit}	0,385					

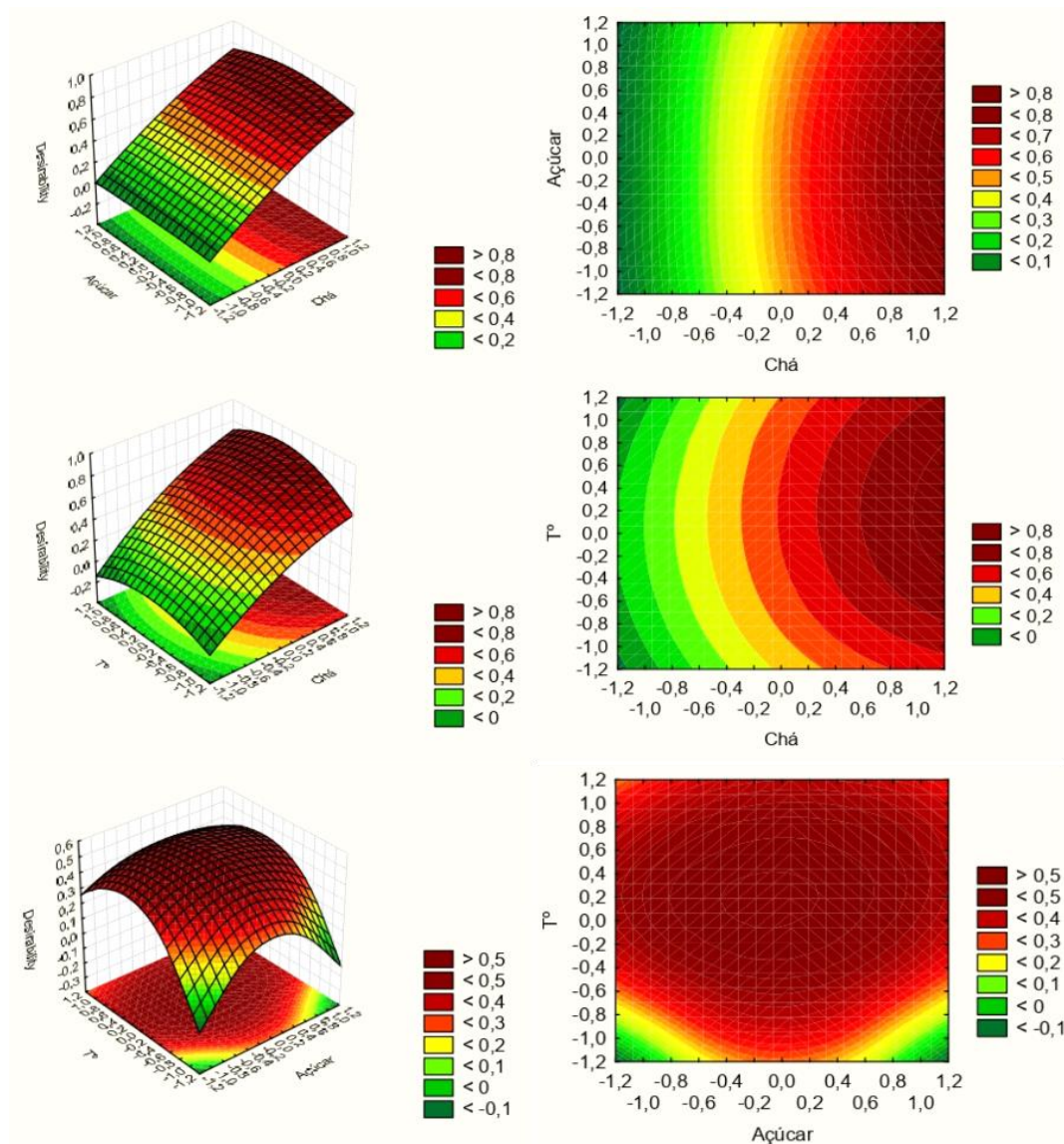
Nota: AG: ácido gálico; CAT: catequina; TE: equivalentes de Trolox; DPPH: método de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; ABTS: método de captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina) -6-sulfônico.

Já para o ácido ascórbico, os parâmetros avaliados X₁² (erva mate) e X₃² (temperatura) tiveram correlação negativa. A maior concentração de erva mate adicionada na bebida promoveu a maior concentração de compostos fenólicos, os quais podem desempenhar atividades antimicrobianas e antifúngicas, podendo reduzir a ação do inóculo e assim diminuindo a síntese de vitamina C no fermentado (MARTINS-RAMOS; BORTOLUZZI; MANTOVANI, 2010). A temperatura de fermentação pode acelerar o processo de degradação do ácido ascórbico. Em análise de estabilidade de ácido ascórbico realizado por Spínola *et al.* (2013), sugere que o armazenamento de amostras que contenham ácido ascórbico não é eficiente a temperatura ambiente (23 °C), mesmo em sistemas ácidos e protegidos da luz, temperatura superior foi empregada na fermentação da kombucha. O ácido ascórbico é

sintetizado a partir da glucose a partir de microrganismos, logo, a maior concentração de sacarose apresenta maior disponibilidade glucose no meio (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2005).

Desse modo foi possível prever o ponto ótimo simultâneo de todas as variáveis (Figura 8). As concentrações determinadas visam a maior produção de compostos bioativos quantificados através das análises de fenóis totais, flavonoides, DPPH, ABTS, FRAP e as concentrações de ácido glucurônico e ácido ascórbico. Para produção de kombucha fermentada a partir do mosto de erva mate as melhores condições em que atingem o objetivo pré-estabelecido são 11,5 g/L de erva mate, 130,0 g/L de açúcar e a temperatura de fermentação de 25 °C.

Figura 8. Superfície de resposta e gráficos de contorno mostrando os efeitos das variáveis independentes no ponto ótimo de otimização simultâneo.



Os valores preditos juntamente com os experimentais estão dispostos na Tabela 7. As concentrações experimentais de compostos fenólicos totais e FRAP se encontram bem próximos aos valores preditos. Porém, para flavonoides totais, DPPH, ABTS, ácido glucurônico, acético e ascórbico o modelo utilizado não apresentou predição satisfatória. Portanto conclui-se que, para fins preditivos, apenas os modelos para compostos fenólicos totais e FRAP podem ser considerados.

Tabela 7. Valores preditos e experimentais das variáveis obtidas no ponto ótimo

Variável resposta	Valores			
	Predito	-95% de confiança	+95% de confiança	Experimental
TPC (mg AG/L)	1054,65	961,79	1147,51	1016,66 ± 133,64
TFC (mg CAT/L)	453,61	427,95	479,27	376,21 ± 12,24
DPPH (µmol TE/L)	4952,31	4701,45	5203,16	3352,20 ± 517,67
ABTS (µmol TE/L)	3090,22	2950,93	3229,52	1780,80 ± 23,55
FRAP (µmol TE/L)	4872,96	4465,22	5280,71	4841,57 ± 352,67
Ácido Glucurônico (mg/L)	445,83	402,37	489,30	630,13 ± 2,07
Ácido Ascórbico (mg/L)	389,98	363,25	416,72	334,41 ± 11,72

Nota: AG: ácido gálico; CAT: catequina; TE: equivalentes de Trolox; DPPH: método de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; ABTS: método de captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina) -6-sulfônico.

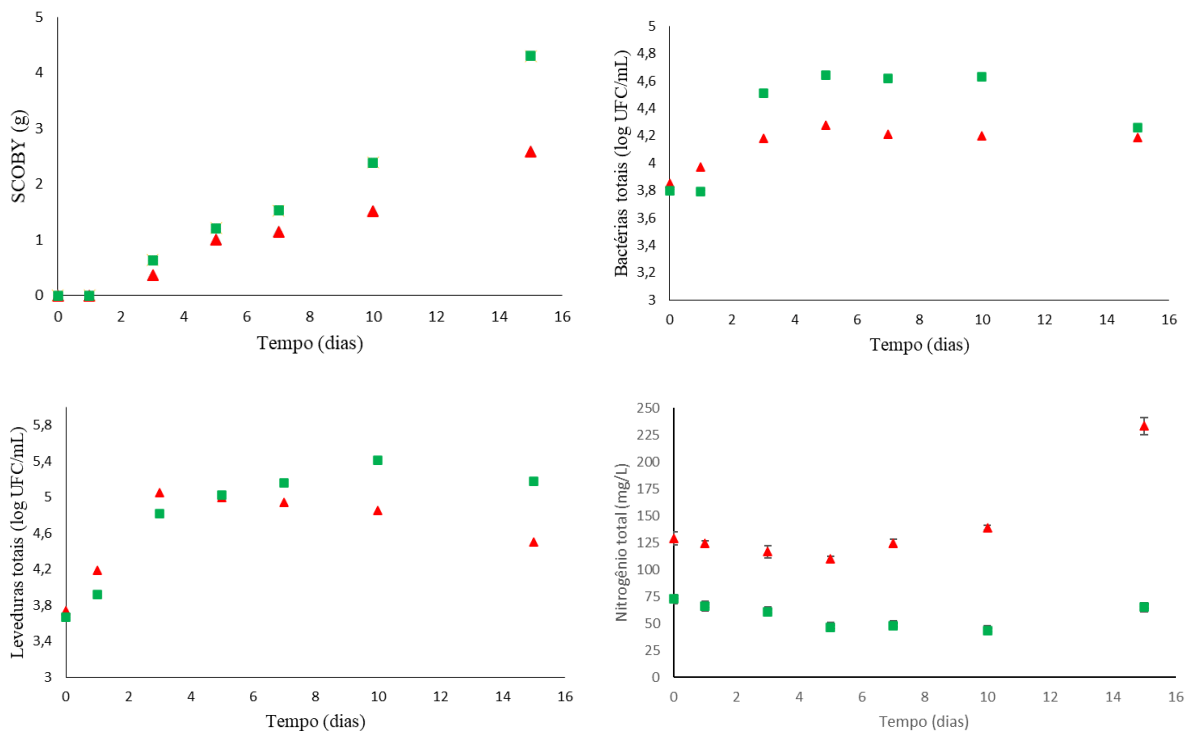
3.2.3 Cinética de fermentação

Foram avaliados o comportamento dos microrganismos presentes na kombucha quanto aos substratos de erva mate e ao adicionado de polpa de pitanga. O primeiro indício da fermentação é a formação do SCOBY na superfície do líquido. No início da fermentação o substrato será utilizado para a multiplicação das células, logo após começará a síntese da celulose bacteriana, onde somente os microrganismos presentes da interface líquido-ar são capazes de manter a produção da celulose (ESA; TASIRIN; RAHMAN, 2014; VILLARREAL-SOTO et al., 2018). A película foi visível a olho nu a partir do 3º dia de fermentação nos dois experimentos. O SCOBY tende a ter sua massa aumentada durante toda a fermentação, porém a maior massa foi encontrada no fermentado apenas a base de erva mate, sendo mais expressiva essa diferença, no 10º e 15º dia. A tendência é que o seu desenvolvimento só diminua caso as bactérias fiquem aprisionadas sob o biofilme e não haja oxigênio dissolvido suficiente para

manter o processo de síntese (ESA; TASIRIN; RAHMAN, 2014; TORÁN-PEREG et al., 2021).

A fase de adaptação ao meio ocorreu nos primeiros dias de fermentação e a partir do 3º dia nota-se a fase Log. O desenvolvimento das bactérias e leveduras no mosto contendo erva mate ocorreu de forma mais facilitada, quando comparado à mistura com pitanga preta, podendo ser indício da atividade antimicrobiana do suco. A fase estacionária foi percebida no 5º dia de fermentação, onde a variação da população é mínima. O declínio da população é mais acentuado para o experimento acrescido do suco, onde o pH do dia 10 do fermentado de pitanga é inferior. Rodrigues *et al.* (2016) identificou a atividade inibitória, em extrato fenólico dos frutos laranjas da pitanga, em microrganismos patogênicos (*Bacillus cereus*; *Escherichia coli*; *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*), tal comportamento associado ao baixo pH da fruta pode promover diminuição da contaminação da bebida por microrganismos deteriorantes, porem pode acarretar na inibição da microbiota proveniente do *starter* e do SCOBY.

Figura 9. Efeito das variáveis tempo e substratos no crescimento de bactérias e leveduras.



Legenda: massa do SCOBY expresso em base seca; ■ = fermentado de erva mate; ▲ = fermentado de erva mate com 30% de pitanga preta;

A adição do suco de pitanga ao mosto fez com que os teores de nitrogênio fossem maiores quando comparado ao contendo apenas erva mate. Em ambos os casos ocorreu o

consumo ao início da fermentação, resultado semelhante ao encontrado por Treviño-Garza *et al.*, (2020). Esse comportamento pode estar associado ao consumo de nitrogênio para os metabolismos de multiplicação celular, uma vez que esse composto é assimilado propiciando o crescimento da biomassa e estimulando a atividade fermentativa (JIRANEK; HENSCHKE, 1993).

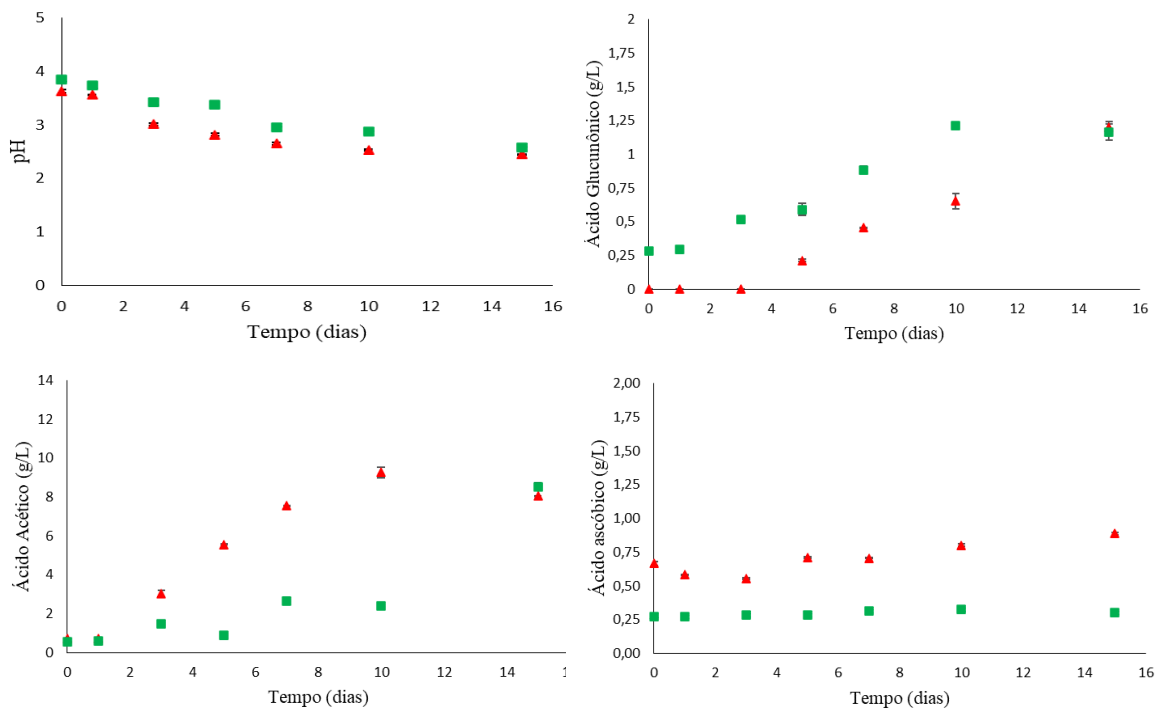
O aumento da concentração de nitrogênio ocorreu a partir do 7º dia para o fermentado de erva mate e o adicionado de suco de pitanga. Kallel *et al.* (2012) observou aumento de 40% da concentração de nitrogênio em relação há concentração inicial no 6º dia de fermentação. Ahmed, Hikal, Abou-Taleb (2020) também observaram o aumento de nitrogênio entre o 6º e 8º dia de fermentação. O aumento foi mais expressivo na kombucha contendo pitanga, sendo 2,8x maior do que na de erva mate, esse aumento dos compostos nitrogenados pode estar associado ao decaimento das colônias de leveduras a partir do 7º dia e da liberação de proteínas extracelulares que estão correlacionados ao processo de fermentação (AHMED; HIKAL; ABOU-TALEB, 2020; KALLEL *et al.*, 2012; SREERAMULU; ZHU; KNOL, 2000; TREVIÑO-GARZA *et al.*, 2020).

Um dos controles mais rápidos e importantes para se observar o desenvolvimento da fermentação é aferição do pH, pois a formação de ácidos orgânicos importantes da bebida como o acético e o glucurônico, promovem a queda do potencial hidrogeniônico. Tal diminuição também pode promover mudanças químicas capazes de influenciar na atividade antioxidante na bebida final (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018). A pitanga possui teores consideráveis de ácido cítrico em sua composição que fazem com que o fermentado com adição do suco inicie o processo fermentativo com valores menores de pH do que o encontrado no fermentado de erva mate (Figura 10). A diminuição do pH ocorre durante todo o processo fermentativo, sendo mais significativa a partir do 3º dia onde a formação de ácido acético é mais expressiva.

No 10º dia de fermentação, as bebidas à base apenas de erva mate apresentavam concentração de $2,38 \pm 0,01$ g/L de ácido acético (Figura 10), teores semelhantes aos encontrados por Cardoso *et al.* (2020) para kombuchas com mesmo tempo de fermentação e temperatura, em substratos contendo chá verde e preto. Por outro lado, a concentração encontrada no fermentado contendo pitanga possui teores mais elevados, o que pode estar relacionado com a maior concentração de nitrogênio no meio estimulando a síntese do composto. Porém, ao final da fermentação, os experimentos apresentam concentrações semelhantes, com valor de $8,07 \pm 0,01$ g/L para a amostra com adição de pitanga e $8,54 \pm 0,19$ g/L para aquela com 100% mate. Jayabalan; Marimuthu; Swaminathan (2007) identificaram teores máximos de concentração de ácido acético de 9,5 g/L, em mosto de chá verde com 15

dias de fermentação. As bactérias acéticas são mais propensas a se desenvolver em meios ácidos, onde apesar de ter pH ótimo entre 5 e 6,5, podendo crescer em pH próximos a 3 (KERSTERS et al., 2006), esse fator pode ter contribuído para que elas conseguissem se desenvolver no fermentado com pitanga, inibindo outras cepas e consumindo de forma mais acentuada a fonte de carbono e retardando a produção de ácido glucurônico. Um dos compostos bioativos de maior interesse na kombucha, o ácido glucurônico, que foi quantificado em maior quantidade no mosto de erva mate no 10º dia com $1,21 \pm 0,01$ g/L. Concentração semelhante à encontrada em mosto de *Camellia sinensis*, 1,7 g/L com mesmo tempo de fermentação, em trabalho realizado por Cardoso *et al.* (2020). A kombucha adicionada de pitanga fermentada durante 10 dias, apresentou concentração de ácido glucurônico foi $0,65 \pm 0,06$ g/kg. Porém, após 15 dias de fermentação, os teores não apresentaram diferença significativa entre as duas amostras.

Figura 10. Efeito das variáveis tempo e substratos no pH e na concentração de ácidos orgânicos.

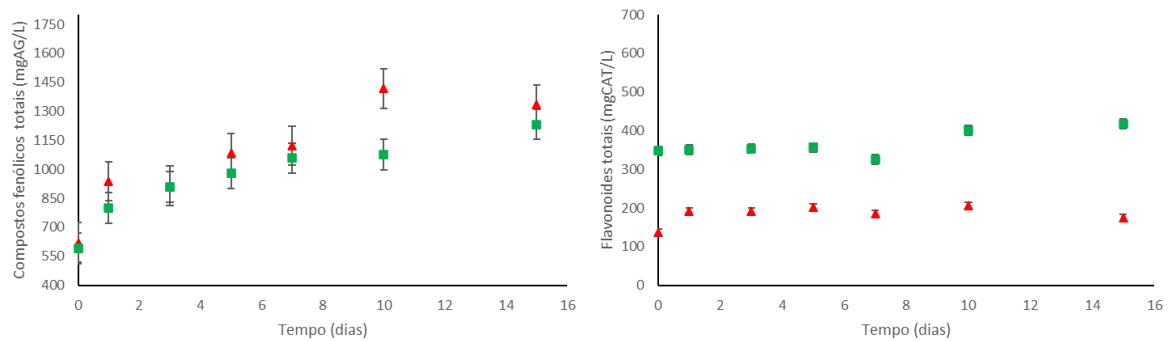


Legenda: ■ = fermentado de erva mate; ▲ = fermentado de erva mate com 30% de pitanga preta;

Os compostos fenólicos totais seguiram comportamento similar em ambos os substratos avaliados (Figura 11). A kombucha possuiu maior atividade antioxidante do que o mosto, o que pode estar relacionado a síntese de compostos de baixo peso molecular e pela liberação de enzimas produzidas pelos microrganismos durante a fermentação promovendo

transformações dos polifenóis presentes (JAYABALAN et al., 2014). Os teores encontrados na bebida de pitanga foram ligeiramente maiores aos encontrados naquela contendo somente erva mate.

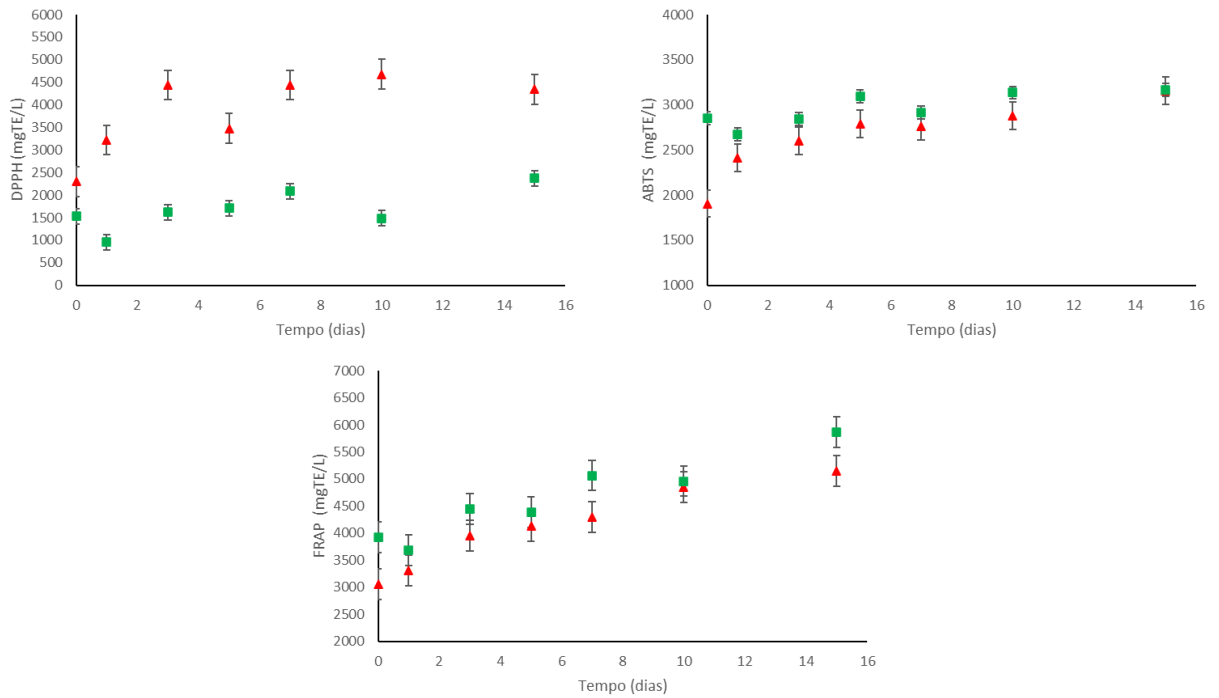
Figura 11. Efeito das variáveis tempo e substratos na concentração de compostos fenólicos totais e flavonoides totais.



Legenda: ■ = fermentado de erva mate; ▲ = fermentado de erva mate com 30% de pitanga preta;

De forma análoga ao teor de compostos fenólicos totais, a variável tempo promoveu também o aumento para os compostos flavonoides totais. No tempo zero de fermentação as concentrações foram de $137,90 \pm 7,41$ e $347,71 \pm 16,24$ mg CAT/L para as kombuchas adicionadas de pitanga e a de erva mate, respectivamente. Para o fermentado contendo apenas erva mate o teor máximo foi ao 15º dia de fermentação, $417,45 \pm 13,80$ mg CAT/L, já para o com 30% de suco de pitanga a concentração máxima foi de $206,76 \pm 12,25$ mg CAT/L no 10º dia de fermentação. Os compostos antociânicos no fermentado contendo *E. uniflora* foram preservados, apresentando concentração inicial de $7,00 \pm 0,49$ e final de $7,09 \pm 0,83$ mg/Kg expresso em cianidina-3-glicosídeo.

Figura 12. Efeito das variáveis tempo e substratos na atividade antioxidantes nos fermentados.



Legenda: ■ = fermentado de erva mate; ▲ = fermentado de erva mate com 30% de pitanga preta;

A presença de antocianinas na bebida fermentada com pitanga pode promover o aumento da atividade antioxidante quantificada pelo método de DPPH (BAGETTI et al., 2011; CELLI; PEREIRA-NETTO; BETA, 2011). Tal correlação pode explicar a maior atividade antioxidante encontrada no fermentado com pitanga em relação ao de erva mate. O pico máximo para o fermentado na pitanga ocorreu no 10º dia (Figura 12) e a fermentação promoveu o aumento da atividade. O ponto máximo para o fermentado a base de erva mate se deu no 15º dia de fermentação, porém a variação do ponto inicial (dia 0) com o final (dia 15) foi menor quando comparada ao fermentado com adição de pitanga, neste caso a pitanga agregou compostos com atividade antioxidante. Para ABTS e FRAP o comportamento foi bem semelhante para ambos os experimentos, a erva mate possuiu teores parecidos com os encontrados ao com adição de pitanga. Independentemente do método, a fermentação promoveu o aumento da atividade antioxidante na bebida.

De acordo com análise cinética apresentada e em conformidade com a Instrução Normativa Nº 41, De 17 de Setembro de 2019 que discorre sobre Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha, o tempo ótimo de fermentação em que o teor de ácido acético está em conformidade com a legislação e apresenta teores máximos para ácido glucurônico, ascórbico, compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante é de 10 dias para o

fermentado a base de erva mate e de 7 dias para o fermentado de erva mate adicionado de pitanga preta.

A kombucha de erva mate com adição de 30% de pitanga, apresentou atividade anti-glicêmica com $IC_{50} = 246,26 \pm 12,69$ mg/mL. Harisman e Puspitasari (2020) verificaram que menores teores de IC_{50} foram encontrados em amostras com menores concentrações de açúcares, em decorrência da fermentação, assim a bebida contendo suco pitanga com 7 dias de fermentação, apresentou maior concentração de ácido orgânicos, indicando a conversão dos carboidratos presente. A maior concentração testada do fermentado contendo apenas erva mate, 5200 mg/mL, atingiu 13,6% de inibição da α -glicosidase. Desse modo a adição do suco de pitanga preta promoveu um aumento nessa atividade biológica na bebida.

3.3 CONCLUSÃO

Através do planejamento experimental utilizando as variáveis concentração de erva mate, açúcar e temperatura foi possível caracterizar as amostras de kombucha submetidas a diferentes combinações dos parâmetros. A análise de regressão múltipla possibilitou a apresentação do modelo de predição para compostos fenólicos totais da bebida. Foi possível prever o ponto ótimo simultâneo de todas as variáveis, para maximização dos compostos bioativos (compostos fenólicos totais, flavonoides, DPPH, ABTS, FRAP, ácido glucurônico e ácido ascórbico) obtendo assim as melhores condições de fermentação, 11,5 g/L de erva mate, 130,0 g/L de açúcar e temperatura de fermentação de 25 °C.

Durante a cinética de fermentação a pitanga influenciou o crescimento dos microrganismos, possuindo ação inibitória sobre as bactérias, leveduras e apresentou menor rendimento de SCOBY. A produção de ácido acético foi mais expressiva no mosto contendo pitanga, no entanto, a produção de ácido glucurônico foi inferior quando comparado com o fermentado de erva mate. A adição de pitanga acarretou uma bebida com maior teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante quantificada pelo método de DPPH, as antocianinas presentes no fermentado de pitanga foram preservadas durante a fermentação. Seguindo a atual legislação brasileira e buscando maior produção de ácido glucurônico, maior concentração de ácido ascórbico, compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante os melhores tempos de fermentação para o fermentado a base de erva mate é de 10 dias e para o fermentado de erva mate adicionado de pitanga preta é de 7 dias. A bebida final de adicionada de pitanga possuiu atividade anti-glicêmica superior à encontrada no fermentado

de erva mate, sendo assim a adição do suco proporcionou uma bebida rica em compostos bioativos diferentes, que lhe conferem atividade biológicas

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os fermentados obtidos a partir da erva mate consistiram de uma nova base para elaboração de uma bebida semelhante a kombucha apresentando resultados satisfatórios. Esse processo fermentativo otimizado demonstra as melhores concentrações da erva, da fonte de carbono e da temperatura de fermentação. A junção dos compostos fenólicos provenientes da infusão com os compostos formados pela microbiota presente no meio, como ácidos orgânicos, promove uma nova apresentação ao substrato tipicamente consumido em forma de infusão (mate tostado), chimarrão ou tererê.

A adição de 30% do suco de pitanga a bebida otimizada, agrega além da maior concentração de compostos fenólicos, compostos diferentes daqueles encontrados nas folhas da erva mate, como por exemplo as antocianinas, que são mantidas durante o processo fermentativo e promoveu o aumento da atividade antiglicêmica na bebida. Os frutos da *Eugenia uniflora* são tipicamente distribuídos em comércios locais e feiras de produtores, tal aptidão para elaboração de uma bebida nova, com cor atraente, sabor exótico e tipicamente brasileiro, pode contribuir grandemente para a valorização da espécie.

REFERÊNCIAS

- AHMED, R. F.; HIKAL, M. S.; ABOU-TALEB, K. A. Biological, chemical and antioxidant activities of different types Kombucha. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 65, n. 1, p. 35–41, 2020.
- ALIAS, N; LEOW, T. C.; SHUKURI, M.; ALI, M.; NOOR, R.; RAJA, Z.; RAHMAN, A. Anti-obesity potential of selected tropical plants via pancreatic lipase inhibition. **Advances in Obesity, Weight Management & Control**, v. 6, n.4, p. 122–131, 2017.
- ALIKARIDIS, F. Natural Constituents of Ilex Species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20, p.121-144, 1987.
- BAGETTI, M.; FACCO, M. P.; PICCOLO, J.; HIRSCH, G. E.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; KOBORI, C. N.; VIZZOTTO, M.; EMANUELLI, T. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 147–154, 2011.
- BAUER-PETROVSKA, B.; PETRUSHEVSKA-TOZI, L. Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, p. 201–205, 2000.
- BELITZ, H-D; GROSCH, W; SCHIEBERLE, P. Food Chemistry, Third Edition. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 382, n. 1, p. 10–11, 2005.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**. v. 239, p. 70 – 76, 1996.
- BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; FREITAS, E. V.; SILVA JÚNIOR, J. F. Propagação de genótipos de Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) pelo método de enxertia de garfagem no topo em fenda cheia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 160–162, 2002.
- BEZERRA, J. E. F.; LIRA JÚNIOR, J. S.; SILVA JÚNIOR, J. F. *Eugenia uniflora*: pitanga. Em: CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. (ed.). Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial: plantas para o futuro: região nordeste. 51. ed. Brasília: **Ministério do Meio Ambiente: Secretaria de Biodiversidade.**, cap. 5. p. 155-166, 2018.
- BEZERRA, J.E.B.; SILVA, J.F.; LIDERMAN, I., Pitanga (*Eugenia uniflora* L.). Jaboticabal: **FUNEP**, Série Frutas Nativas, n. 1, p. 30, 2000.
- BLOMQVIST, J.; NOGUÉ, V. S.; GORWA-GRAUSLUND, M.; PASSOTH, V. Physiological requirements for growth and competitiveness of *Dekkera bruxellensis* under oxygen-limited or anaerobic conditions. **Yeast**, v. 29, n. 7, p. 265–274, 2012.
- BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**, v. 2, n. 4, p. 455–475, 1960.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 28, p. 25–30, 1995.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 12, de 4 de setembro de 2003. Estabelece Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade Gerais para Suco Tropical; os Padrões de Identidade e Qualidade dos Sucos Tropicais de Abacaxi, Acerola, Cajá, Caju, Goiaba, Graviola, Mamão, Manga, Mangaba, Maracujá e Pitanga; e os Padrões de Identidade e Qualidade dos Néctares de Abacaxi, Acerola, Cajá, Caju, Goiaba, Graviola, Mamão, Manga, Maracujá, Pêssego e Pitanga. Diário Oficial da União, Brasília, 4 set. 2003. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/instrucao-normativa-no-12-de-4-de-setembro-de-2003.pdf/view>. Acesso em: 15 set. 2022.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 41, de 17 de setembro de 2019. Estabelece o padrão de identidade e qualidade da Kombucha em todo o território nacional. Diário Oficial da União, Brasília, 17 set. 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-41-de-17-de-setembro-de-2019-216803534>. Acesso em: 30 maio. 2022.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, n. 3, p. 393–405, 2007.

CARDOSO, R. R.; NETO, R. O.; D'ALMEIDA, C. T. S.; NASCIMENTO, T. P.; PRESSETEC, C. G.; AZEVEDO, L.; MARTINOD, H. S. D.; CAMERONE, L. C.; FERREIRA, R. S. L.; BARROSA, F. A. R. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. **Food Research International**, v. 128, 2020.

CARLONI, P.; TIANO, L.; PADELLA, L.; BACCHETTI, T.; CUSTOMU, C.; KAY, A.; DAMIANI, E. Antioxidant activity of white, green and black tea obtained from the same tea cultivar. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 900–908, 2013.

CELLI, G. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; BETA, T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. **Food Research International**, v. 44, n. 8, p. 2442–2451, 2011.

CHAKRAVORTY, S.; BHATTACHARYA, S.; CHATZINOTAS, A.; CHAKRABORTY, W.; BHATTACHARYA, D.; GACHHUI, R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, p. 63–72, 2016.

CHAVES, V. C.; BOFF, L.; VIZZOTTO, M.; CALVETE, E.; REGINATTO, F. H.; SIMÕES, C. M. O. Berries grown in Brazil: anthocyanin profiles and biological properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 11, p. 4331–4338, 2018.

CVETKOVIĆ, D.; MARKOV, S.; DJURIĆ, M.; SAVIĆ, D.; VELIĆANSKI, A. Specific interfacial area as a key variable in scaling-up Kombucha fermentation. **Journal of Food Engineering**, v. 8, n. 3, p. 387–392, 2008.

DE ANCOS, B.; RODRIGO, M. J.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; PILAR CANO, M.; ZACARÍAS, L. Effect of high-pressure processing applied as pretreatment on carotenoids, flavonoids and vitamin C in juice of the sweet oranges “Navel” and the red-fleshed “Cara Cara”. **Food Research International**, v. 132, 2020.

DE MIRANDA, J. F.; RUIZ, L. F.; SILVA, C. B.; UEKANE, T. M.; SILVA, K. A.; GONZALEZ, A. G. M.; FERNANDES, F. F.; LIMA, A. R. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. **Journal of Food Science**, p. 1–25, 2022.

DENARDIN, C. C.; HIRSCH, G. E.; DA ROCHA, R. F.; VIZZOTTO, M.; HENRIQUES, A. T.; MOREIRA, J. C. F.; GUMA, F. T. C. R.; EMANUELLI, T. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 387–398, 2015.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214–219, 1980.

DOS SANTOS, T. P. M.; ALBERTI, A.; JUDACEWSKI, P.; ZIELINSKI, A. A. F.; NOGUEIRA, A. Effect of sulphur dioxide concentration added at different processing stages on volatile composition of ciders. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 124, n. 3, p. 261–268, 2018.

DU TOIT, R.; VOLSTEEDT, Y.; APOSTOLIDES, Z. Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. **Toxicology**, v. 166, p.63-69, 2001.

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

DUTTA, D.; GACHHUI, R. Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 1899–1903, 2006.

EMBRAPA FLORESTAS. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Valor nutricional da pitanga. Brasília, DF, 2015.

ESA, F.; TASIRIN, S. M.; RAHMAN, N. A. Overview of bacterial cellulose production and application. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 2, p. 113–119, 2014.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, J. C.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; MARTÍNEZ-VIDAL, J. L.; FLORES, M. I. A.; FRENICH, A. G. Simple LC-MS determination of citric and malic acids in fruits and vegetables. **Chromatographia**, v. 72, n. 1–2, p. 55–62, 2010.

FERREIRA, J.; IVES, P. J.; GOMES, C.; GOULART, R. Erva 20 Sistema de produção de erva-mate. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Florestas. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2019.

FIDELIS, E. M.; SAVALL, A. S. P.; PEREIRA, F. O.; QUINES, C. B.; ÁVILA, D. S.; PINTON, S. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) as a source of bioactive compounds for health benefits: A review. **Arabian Journal of Chemistry Elsevier**, v. 15 p. 3-22, 2022.

FIGUEIRÔA, E. O.; SILVA, L. C. N.; DE MELO, C. M. L.; NEVES, J. K. A. L.; DA SILVA, N. H.; PEREIRA, V. R. A.; CORREIA, M. T. S. Evaluation of antioxidant, immunomodulatory, and cytotoxic action of fractions from *Eugenia uniflora* L. and *Eugenia malaccensis* L.: correlation with polyphenol and flavanoid content. **The Scientific World Journal**, v.2013, p.1-7, 2013.

FILHO, G. L.; DE ROSSO, V. V.; MEIRELES, M. A. A.; ROSA, P. T. V.; OLIVEIRA, A. L.; MERCADANTE, A. Z.; CABRAL, F. A. Supercritical CO₂ extraction of carotenoids from pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **Journal of Supercritical Fluids**, v. 46, n. 1, p. 33–39, 2008.

FILIP, R.; LOPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**. v.72, p.774-778, 2001.

GALALI, Y. The impact of COVID-19 confinement on the eating habits and lifestyle changes: A cross sectional study. **Food Science and Nutrition**, 9(4), 2105–2113, 2021.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, p. F1.2.1-F1.2.13, 2001.

GOOGLE TRENDS em: <<https://trends.google.com.br/trends/explore?date=2015-01-01%202022-09-26&geo=BR&q=Kombucha>> Acesso em: 26/09/2022.

GREENWALT, C. J.; STEINKRAUS, K. H.; LEDFORD, R. A. Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. **Journal of Food Protection**. v. 63, n. 7, p. 976-981, 2000.

HA, J. H.; SHAH, N.; UL-ISLAM, M.; KHAN, T.; PARK, J. K. Bacterial cellulose production from a single sugar α -linked glucuronic acid-based oligosaccharide. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 9, p. 1717–1723, 2011.

HARISMAN, E. K.; PUSPITASARI, Y. E. The kombucha from *Rhizophora mucronata* Lam. herbal tea: Characteristics and the potential as an antidiabetic. **Journal of Pharmacy &armacognosy Research**, 8(5), 410–421, 2020.

HARTMANN, A. M.; BURLESON, L. E.; HOLMES, A. K.; GEIST, C. R. Effects of chronic kombucha ingestion on open-field behaviors, longevity, appetitive behaviors, and organs in C57-BL/6 mice: a pilot study. **Nutrition**, v. 16, n. 9, p. 755–761, 2000.

HASLER, C. M.; BROWN, A. C. Position of the American dietetic association: functional foods. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 109, n. 4, p. 735–746, 2009.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 2928–2935, 2005.

HO, S. C.; WU, S. P.; LIN, S. M.; TANG, Y. L. Comparison of anti-glycation capacities of several herbal infusions with that of green tea. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 768–774, 2010.

HOFFMANN-RIBANI, R.; HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 4, p. 263–268, 2009.

IAL. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: **IMESP**, v. 1, p. 123-124, 2006.

ITO, V. C.; ZIELINSKI, A. A. F.; SPOTO, M.; NOGUEIRA, A.; LACERDA, L. G. Effects of gamma radiation on the stability and degradation kinetics of phenolic compounds and antioxidant activity during storage of (*Oryza sativa* L.) black rice flour. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, 2019.

JAFARI, R.; NAGHAVI, N. S.; KHOSRAVI-DARANI, K.; DOUDI, M.; SHAHANIPOUR, K. Kombucha microbial starter with enhanced production of antioxidant compounds and invertase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 29, 2020.

JANKOVIĆ, I.; STOJANOVIĆ, M. Microbial and chemical composition, growth, therapeutic and antimicrobial characteristics of tea fungus. **Microbiologia**, v. 31, p. 35–43, 1994.

JAYABALAN, R.; MALBAŠA, R. V.; LONČAR, E. S.; VITAS, J. S.; SATHISHKUMAR, M. A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13 p. 538-550, 2014.

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

JAYABALAN, R.; MALBAŠA, R. V.; SATHISHKUMAR, M. Kombucha. **Reference Module in Food Science**, v.3, p. 538–550, 2016.

JESZKA-SKOWRON, M.; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A.; FRANKOWSKI, R. *Cistus incanus* a promising herbal tea rich in bioactive compounds: LC–MS/MS determination of catechins, flavonols, phenolic acids and alkaloids—A comparison with *Camellia sinensis*, Rooibos and Hoan Ngoc herbal tea. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 74, p. 71–81, 2018.

JIRANEK, V.; HENSCHKE, P. A. Yeasts-metabolism of nitrogen compounds. Em: FLEET, G. H. Wine Microbiology and Biotechnology Sulfur metabolism in yeast. **CRC Press**. Chapter 4, p. 79-164 1993.

JOYCE, T. A. Use and origin of Yerba maté. **Nature**, v. 134, n. 3394, p. 760–762, 1934.

KAEWKOD, T.; BOVONSOMBUT, S.; TRAGOOLPUA, Y. Efficacy of kombucha obtained from green, oolong and black teas on inhibition of pathogenic bacteria, antioxidation, and toxicity on colorectal cancer cell line. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p.2-18, 2019.

KAWAKAMI, M.; KOBAYASHI, A. Volatile Constituents of Green Mate and Roasted Mate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 7, p. 1275–1279, 1991.

KERSTERS, K.; LISDIYANTI, P.; KOMAGATA, K.; SWINGS, J. The Family Acetobacteraceae: The Genera Acetobacter, Acidomonas, Asaia, Gluconacetobacter, Gluconobacter, and Kozakia. **The Prokaryotes**. v.5, p. 163–200, 2006.

KHOSRAVI, S.; SAFARI, M.; EMAM-DJOMEH, Z.; GOLMAKANI, M. T. Development of fermented date syrup using Kombucha starter culture. **Journal of Food Processing and Preservation**, 43(2), 2019.

KOLE, A. S.; JONES, H. D.; CHRISTENSEN, R.; GLADSTEIN, J. A case of Kombucha tea toxicity. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 24, n. 3, p. 205–207, 2009.

KOSE, R.; SUNAGAWA, N.; YOSHIDA, M.; TAJIMA, K. One-step production of nanofibrillated bacterial cellulose (NFBC) from waste glycerol using Gluconacetobacter intermedius NEDO-01. **Cellulose**, v. 20, n. 6, p. 2971–2979, 2013.

KUMAR, V.; JOSHI, V. K. Kombucha: Technology, Microbiology, Production, Composition and Therapeutic Value. **International Journal of Food and Fermentation Technology**, v. 6, n. 1, p. 13, 2016.

LAZZAROTTO-FIGUEIRÓ, J.; CAPELEZZO, A. P.; SCHINDLER, M. S. Z.; FOSSÁ, J. F. C.; ALBENY-SIMÕES, D.; ZANATTA, L.; OLIVEIRA, J. V.; DAL MAGRO, J. Antioxidant activity, antibacterial and inhibitory effect of intestinal disaccharidases of extracts obtained from *Eugenia uniflora* L. Seeds. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 2, p. 291–300, 2021.

LEWIS, D. R.; LIU, D. J. Direct measurement of lipase inhibition by orlistat using a dissolution linked in vitro assay. **Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics**, v. 1, n. 03, 2012.

LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; LIMA, D. E. S. Fenólicos e carotenoides totais em pitanga total. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 447–450, 2002.

LIU, C. H.; HSU, W. H.; LEE, F. L.; LIAO, C. C. The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. **Food Microbiology**, v. 13, p. 407–415, 1996.

LONČAR, E. S.; KANURIĆ, K. G.; MALBAŠA, R. V.; ĐURIĆ, M. S.; MILANOVIĆ, S. D. Kinetika fermentacije saharoze kombuhom. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, v. 20, n. 3, p. 345–352, 2014.

LOPES, D. R.; SANTOS, L. O.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Antioxidant and antibacterial activity of a beverage obtained by fermentation of yerba-maté (*Ilex paraguariensis*) with

symbiotic kombucha culture. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 2, 2021.

MALBAŠA, R. V.; LONČAR, E. S.; VITAS, J. S.; ČANADANOVIĆ-BRUNET, J. M. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1727–1731, 2011.

MARTINS-RAMOS, D.; BORTOLUZZI, R. L. C.; MANTOVANI, A. Plantas medicinais de um remascente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana, Urupema, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 380–397, 2010.

MATEOS, R.; BAEZA, G.; SARRIÁ, B.; BRAVO, L. Improved LC-MSn characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands: Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 241, p. 232–241, 2018.

MCCLUSKEY, J.; HERDMAN, L.; SKENE, K. R. Iron deficiency induces changes in metabolism of citrate in lateral roots and cluster roots of *Lupinus albus*. **Physiologia Plantarum**, v. 121, n. 4, p. 586–594, 2004.

MESQUITA, M.; SANTOS, E.; KASSUYA, C. A.; SALVADOR, M. J. Chimarrão, terere and mate-tea in legitimate technology modes of preparation and consume: A comparative study of chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-anxiety properties of the mostly consumed beverages of *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 279, 2021.

MORADI-AFRAPOLI, F.; ASGHARI, B.; SAEIDNIA, S.; AJANI, Y.; MIRJANI, M.; MALMIR, M.; BAZAZ, R. D.; HADJIAKHOONDI, A.; SALEHI, P.; HAMBURGER, M.; YASSA, N. *In vitro* α -glucosidase inhibitory activity of phenolic constituents from aerial parts of *Polygonum hyrcanicum*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, p. 1–6, 2012. MORTON, R.D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F. P.; K. ITO (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4th ed. **American Public Health Association**, Washington, D. C, Chapter 7, p.63-67, 2001.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Chapter 6 Exploring the response surface. Em: Data Handling em: **Science and Technology**. v. 25p. 245–312.

NGUYEN, N. K.; NGUYEN, H. T.; LE, P. H. Effects of *Lactobacillus casei* and alterations in fermentation conditions on biosynthesis of glucuronic acid by a *Dekkera bruxellensis*-*gluconacetobacter intermedius* kombucha symbiosis model system. **Food Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 356–370, 2015.

NGUYEN, N. K.; NGUYEN, P. B.; NGUYEN, H. T.; LE, P. H. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1149–1155, 2015.

NURIKASARI, M.; PUSPITASARI, Y.; PALUPI, R.; SIWI, Y.; SURYA, S.; KEDIRI, M. H. Characterization and analysis kombucha tea antioxidant activity based on long fermentation as a beverage functional. **Journal of Global Research in Public Health**, v. 2, n. 2, 2017.

ONWUDIWE, N. N.; NJOKU, O. U.; NWODO, O. F. C.; PARKER, J. E.; OGUGOFOR, M. O. Evaluation of the nutritional compositions and analgesic effects of the flavonoid fraction of *Eugenia uniflora* ripe fruit pulp. **American Journal of Ethnomedicine**, v. 5, n. 1, p. 1–8, 2018.

PAGLIOSA, C. M.; VIEIRA, M. A.; PODESTÁ, R.; MARASCHIN, M.; ZENI, A. L. B.; AMANTE, E. R.; AMBONI, R. D. M. C. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 173–178, 2010.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: An overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. 1-15, 2016.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

REISS, J. Original paper Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**. v. 198 p. 258-261, 1994.

RIACHI, L. G.; SIMAS, D. L. R.; COELHO, G. C.; MARCELLINI, P. S.; SILVA, A. J. R.; MARIA, C. A. B. Effect of light intensity and processing conditions on bioactive compounds in maté extracted from yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Food Chemistry**, v. 266, p. 317–322, 2018.

RIVASSEAU, C.; BOISSON, A. M.; MONGÉLARD, G.; COURAM, G.; BASTIEN, O.; BLIGNY, R. Rapid analysis of organic acids in plant extracts by capillary electrophoresis with indirect UV detection: Directed metabolic analyses during metal stress. **Journal of Chromatography**, v. 1129, n. 2, p. 283–290, 2006.

ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Critical Review Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids A Review. **Analyst journal**, v. 122, p. 11–34, 1997.

RODRIGUES, A. C.; ZOLA, F. G.; OLIVEIRA, B. D. A.; SACRAMENTO, N. T. B.; DA SILVA, E. R.; BERTOLDI, M. C.; TAYLOR, J. G.; PINTO, U. M. Quorum quenching and microbial control through phenolic extract of *Eugenia uniflora* fruits. **Journal of food science**, v. 81, n. 10, p. M2538–M2544, 2016.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A guide to carotenoid analysis in foods. **OMNI Research ILSI**, Washington, DC, USA. p. 1-64, 2001.

ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, p. 592–548, 2006.

RUSSO, C.; SIMEONE, M.; DEMARTINI, E.; MARESCOTTI, M. E.; GAVIGLIO, A. Psychological pressure and changes in food consumption: the effect of COVID-19 crisis. **Heliyon**, 7(4), 2021.

- SANTETTI, G. S.; DACOREGGIO, M. V.; SILVA, A. C. M.; BIDUSKI, B.; BRESSIANI, J.; ORO, T.; DE FRANCISCO, A.; GUTKOSKI, L. C.; AMBONI, R. D. M. C. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves on dough properties, antioxidant activity, and bread quality using whole wheat flour. **Journal of Food Science**, v. 86, n. 10, p. 4354–4364, 2021.
- SANTOS, A. F.; SILVA, S. M.; ALVES, R. E. Armazenamento de pitanga sob atmosfera modificada e refrigeração: I-transformações químicas em pós-colheita. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 36–41, 2006.
- SANTOS, S. C.; PEREIRA, M. O. A.; SANTOS, K. B.; FERRI, P. H. Bioactive compounds of fruit parts of three *Eugenia uniflora* biotypes in four ripening stages. **Chemistry and Biodiversity**, v. 18, n. 12, 2021.
- SCHIFFERDECKER, A. J.; DASHKO, S.; ISHCHUK, O. P.; PIŠKUR, J. The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. **Yeast**, v. 31, n. 9, p. 323–332, 2014.
- SHIMPO, M.; AKAMATSU, R.; KOJIMA, Y.; YOKOYAMA, T.; OKUHARA, T.; CHIBA, T. Factors associated with dietary change since the outbreak of covid-19 in Japan. **Nutrients**, v.13 n.6, 2021.
- SILVA, K. A. UEKANE, T. M.; MIRANDA, J. F.; RUIZ, L. F.; MOTTA, J. C. B.; SILVA, C. B.; PITANGUI, N. F.; GONZALEZ, A. G. M.; FERNANDES, F. F.; LIMA, A. R. Kombucha beverage from non-conventional edible plant infusion and green tea: Characterization, toxicity, antioxidant activities and antimicrobial properties. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 34, 2021.
- SILVEIRA, M.A. da. Experiência empresarial e perspectivas em fruticultura. Em: SÃO JOSÉ, A.R.; SOUZA, I.V.B.; MORAIS, O.M.; REBOUÇAS, T.N.H. (Eds.). **Anonáceas: produção e mercado** (pinha, graviola, atemóia, cherimólia). Vitória da Conquista, BA: DFZ-UESB, p.286-297, 1997.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.
- SPÍNOLA, V.; MENDES, B.; CÂMARA, J. S.; CASTILHO, P. C. Effect of time and temperature on vitamin C stability in horticultural extracts. UHPLC-PDA vs iodometric titration as analytical methods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 489–495, 2013.
- SREERAMULU, G.; ZHU, Y.; KNOL, W. Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2589–2594, 2000.
- SRINIVASAN, R.; SMOLINSKE, S.; GREENBAUM, D. Probable gastrointestinal toxicity of kombucha tea: is this beverage healthy or harmful? **Journal of General Internal Medicine**, v. 12, p. 643–644, 1997.
- STAFUSSA, A. P.; MACIEL, G. M.; RAMPAZZO, V.; BONA, E.; MAKARA, C. N.; DEMCZUK JUNIOR, B.; HAMINIUK, C. W. I. Bioactive compounds of 44 traditional and

exotic Brazilian fruit pulps: phenolic compounds and antioxidant activity. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 106–118, 2018.

STAMER, J. R. Fermentation of Glucuronic Acid by *Lactobacillus brevis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 16, p. 536-537, 1968.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263- 269, 2012.

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

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

TORÁN-PEREG, P.; DEL NOVAL, B.; VALENZUELA, S.; MARTINEZ, J.; PRADO, D.; PERISÉ, R.; ARBOLEYA, J. C. Microbiological and sensory characterization of kombucha SCOBY for culinary applications. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 23, p. 1-8, 2021.

TREVIÑO-GARZA, M. Z.; GUERRERO-MEDINA, A. S.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, R. A.; García-Gómez, C., Guzmán-Velasco, A.; Báez-González, J. G.; Márquez-Reyes, J. M. Production of microbial cellulose films from green tea (*Camellia sinensis*) kombucha with various carbon sources. **Coatings**, 10(11), 1–14, 2020.

TREVISANATO, S.; KIM, Y. Tea and Health. **Nutrition Reviews**, v. 58, p. 1–10, 2000. VALENTÃO, P.; LOPES, G.; VALENTE, M.; BARBOSA, P.; ANDRADE, P. B.; SILVA, B. M.; BAPTISTA, P.; SEABRA, R. M. Quantitation of nine organic acids in wild mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 9, p. 3626–3630, 2005.

VIJAYARAGHAVAN, R.; RAO, P. V. L.; BHATTACHARYA, R.; KUMAR, P. Subacute (90 days) oral toxicity studies of kombucha tea. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 13, p. 293–299, 2001.

VILLARREAL-SOTO, S. A.; BEAUFORT, S.; BOUJILA, J.; SOUCHARD, J. P.; TAILLANDIER, P. Understanding kombucha tea fermentation: A review. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 3, p. 580-588, 2018.

VĪNA, I.; LINDE, R.; PATETKO, A.; SEMJONOV, P. Glucuronic acid from fermented beverages: biochemical functions in humans and its role in health protection. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 14, n. 2, p. 217 -230, 2013.

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

VU, D. C.; ALVAREZ, S.; RUDZÍ, M.; RICHARD, T. Phenolic, carotenoid and saccharide compositions of Vietnamese *Camellia sinensis* teas and herbal teas. **Molecules**, v. 26, n. 21, p. 6496, 2021.

WANG, M.; QU, F.; SHAN, X. Q.; LIN, J. M. Development and optimization of a method for the analysis of low-molecular-mass organic acids in plants by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Journal of Chromatography**, v. 989, n. 2, p. 285–292, 2003.

WATAWANA, M. I.; JAYAWARDENA, N.; GUNAWARDHANA, C. B.; WAISUNDARA, V. Y. Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. **Journal of Chemistry**, v. 2015, p. 1-11, 2015.

WU, T.; LUO, J.; XU, B. In vitro antidiabetic effects of selected fruits and vegetables against glycosidase and aldose reductase. **Food Science & Nutrition**, n.3 v.6, p.495–505, 2015.

YI, T.; ZHU, L.; PENG, W.; HE, X.; CHEN, H.; LI, J.; YU, T.; LIANG, Z.; ZHAO, Z.; CHEN, H. Comparison of ten major constituents in seven types of processed tea using HPLC-DAD-MS followed by principal component and hierarchical cluster analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 194–201, 2015.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMIG, W. The determination of flavonoid content in mulberry. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555–559, 1999.

ZHOU, J.; WU, Y.; LONG, P.; HO, C. T.; WANG, Y.; KAN, Z.; CAO, L.; ZHANG, L.; WAN, X. LC-MS-based metabolomics reveals the chemical changes of polyphenols during high-temperature roasting of large-leaf yellow tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 19, p. 5405–5412, 2019.

ZIELINSKI, A. A. F.; ALBERTI, A.; BONA, E.; BORTOLINI, D. G.; BENVENUTTI, L.; BACH, F.; DEMIATE, I. M.; NOGUEIRA, A. A multivariate approach to differentiate yerba mate (*Ilex paraguariensis*) commercialized in the Southern Brazil on the basis of phenolics, methylxanthines and in vitro antioxidant activity. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 40, n. 3, p. 645–652, 2020.

ZIELINSKI, A. A. F.; ÁVILA, S.; ITO, V.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G.; HAMINIUK, C. W. I. The association between chromaticity, phenolics, carotenoids, and *in vitro* antioxidant activity of frozen fruit pulp in Brazil: an application of chemometrics. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 4, 2014a.

ZIELINSKI, A. A. F.; BRAGA, C. M.; DEMIATE, I. M.; BELTRAME, F. L.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Development and optimization of a HPLC-RI method for the determination of major sugars in apple juice and evaluation of the effect of the ripening stage. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 38–43, 2014b.

ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I. M.; GRANATO, D. A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**, v. 60, p. 246–254, 2014c.