

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

GRAZIELA NUNES

**APLICAÇÃO DOS TECIDOS FLORAIS DE *Handroanthus albus* (IPÊ AMARELO) E
Tropaeolum majus (CAPUCHINHA) COMO SUBSTRATO ALTERNATIVO PARA
FERMENTAÇÃO DE KOMBUCHA**

PONTA GROSSA

2023

GRAZIELA NUNES

**APLICAÇÃO DOS TECIDOS FLORAIS DE *Handroanthus albus* (IPÊ AMARELO) E
Tropaeolum majus (CAPUCHINHA) COMO SUBSTRATO ALTERNATIVO PARA
FERMENTAÇÃO DE KOMBUCHA**

Tese de Doutorado apresentada como requisito para obtenção do Título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Aline Alberti

PONTA GROSSA

2023

N972 Nunes, Graziela
Aplicação dos tecidos florais de *Handroanthus albus* (Ipê Amarelo) e *Tropaeolum majus* (Capuchinha) como substrato alternativo para fermentação de Kombucha / Graziela Nunes. Ponta Grossa, 2023.
164 f.

Tese (Doutorado 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. Atividade antioxidante. 2. Flores cosméticas. 3. Antocianinas. 4. Ácido glucurônico. 5. HPCL. I. Alberti, Aline. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ciências e Tecnologia de Alimentos. III.T.

CDD: 664


TERMO DE APROVAÇÃO

GRAZIELA NUNES


“Aplicação dos tecidos florais de *Handroanthus albus* (ipê amarelo) e *Tropaeolum majus* (capuchinha) como substrato alternativo para a fermentação da kombucha”.

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


Orientador(a): Profa. Dra. Aline Alberti - UEPG-PR - Presidente

Documento assinado digitalmente
 **ALINE ALBERTI**
Data: 20/12/2023 12:24:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Profa. Dra. Aline Alberti - UEPG-PR - Presidente

Documento assinado digitalmente
 **ANGELA CLAUDIA RODRIGUES**
Data: 21/12/2023 10:19:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Profa. Dra. Angela Claudia Rodrigues - UTFPR-PR - Membro Titular

Documento assinado digitalmente
 **LUCIANA IGARASHI MAFRA**
Data: 20/12/2023 12:33:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Luciana Igarashi Mafra - UTFPR-PR - Membro Titular

Documento assinado digitalmente
 **ALESSANDRO NOGUEIRA**
Data: 28/12/2023 11:03:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 **RENATA DINNIES SANTOS SALEM**
Data: 22/12/2023 11:07:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Renata Dinnies Santos Salem - UEPG-PR - Membro Titular

Ponta Grossa, 20 de dezembro de 2023.

“Há duas pessoas neste mundo a quem devemos orgulhar: a primeira é a nossa versão com 8 anos de idade, a segunda é a versão com 80. Se essas pessoas estiverem felizes com a maneira como conduzimos a vida, significa que trilhamos o caminho certo”.

A essas versões de mim mesma, dedico!

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por Sua infinita graça, misericórdia e benevolência!

Aos meus amados pais, Leiri Zollet Nunes e Valmir Nunes, pilares de força e refúgio em minha existência. Para mim, é uma honra ser a materialização dos sonhos de vocês.

À professora Aline Alberti, minha orientadora, pelo acolhimento, confiança, paciência, ensinamentos enriquecedores e suporte incansável sempre que solicitado.

Aos estimados colegas do Grupo de Trabalho sobre Maçãs, foi uma dádiva trabalhar com vocês. Ao Luís G. do Nascimento, aluno de iniciação científica, cuja contribuição foi imprescindível em várias etapas desta pesquisa.

Ao professor Alessandro Nogueira e à professora Renata D. S. Salem, cujas valiosas sugestões foram fundamentais para a construção deste trabalho.

À Isabela M. M. S. Sola, minha parceira na arte da 'kombucha', por sua prontidão em ajudar, e sempre me lembrar que “*vai dar tudo certo*”. À Thaís. E. Fischer, por seu acolhimento generoso e paciência infinita no laboratório, dedicando tanto do seu tempo para auxiliar na consolidação deste trabalho.

Às minhas queridas amigas Carla T. Pertille, Géssica Sandeski, Janaína S. Borcezi, Jennifer Leuzinski, Kaori Ouba, Maiara P. Biasi e Renata Ribeiro, que personificam o amor de Deus em minha vida.

À Eligiane B. Godoy, minha amada psicóloga, por ser parte da minha história e tornar a minha vida mais leve e possível.

Ao Complexo de Laboratórios multiusuários (C-LABMU) e sua equipe tão querida e acolhedora. À Ana M. Oliveira pelo suporte sempre eficiente e pela amizade que transcende os limites da universidade.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela infraestrutura essencial.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro imprescindível.

A todos, meu amor incondicional.

RESUMO

A crescente demanda por alimentos funcionais tem impulsionado a colaboração entre a comunidade científica e a indústria de alimentos no desenvolvimento de produtos inovadores, e com atividade biológica relevante para a saúde humana. A kombucha emerge como uma bebida fermentada com características promissoras para preencher essa lacuna. Suas propriedades funcionais estão associadas aos compostos bioativos sintetizados durante a fermentação realizada por bactérias e leveduras contidas no biofilme celulósico (SCOBY). A melhora da performance desses microrganismos e das características bioativas da kombucha pode ser obtida com novas alternativas de substratos para fermentação, como as flores comestíveis, que são uma fonte natural rica em substâncias bioativas. Visando atender essas demandas, o presente estudo objetivou desenvolver kombuchas à base de *Camellia sinensis* (chá preto) com adição das pétalas de *Handroanthus albus* (ipê amarelo) e *Tropaeolum majus* (capuchinha), visando potencializar as propriedades bioativas e funcionais da bebida. Esta investigação foi consolidada em três etapas substanciais: otimização das condições de fermentação do chá preto; otimização da extração de compostos bioativos das pétalas de *H. albus* e das folhas e pétalas de *T. majus*; e a cinética de fermentação das kombuchas com os extratos florais. A metodologia de superfície de resposta sugeriu que a maior bioatividade da kombucha padrão (100% de chá preto) pode ser obtida com uma concentração de 12 g/L de chá, 150 g/L de sacarose a 23 °C. Para o maior rendimento no processo de extração de compostos bioativos e atividade antioxidante das pétalas de *H. albus*, sugeriu-se o uso de 80 g/L de tecido floral, a 90 °C por 15 minutos, e para *T. majus* os parâmetros indicados foram 60 g/L de flor, a 90 °C por 10 minutos. As melhores condições de extração para as folhas de capuchinha foram 8 g/L em etanol 50% a 70 °C. As kombuchas com adição dos extratos florais apresentaram um comportamento fermentativo análogo ao da bebida tradicional, sugerindo uma adaptação microbiana satisfatória e conformidade com os critérios de segurança estabelecidos para a bebida. As kombuchas adicionadas de *H. albus* potencializaram a síntese de ácido glucurônico e agregaram o composto β -lapachona, enquanto os pigmentos antocianicos das pétalas de *T. majus* contribuíram para aprimorar a atividade antioxidante das bebidas. O extrato das folhas de capuchinha apresentou elevada concentração de compostos bioativos e atividade antioxidante, sendo uma adição favorável para aumentar o valor funcional de produtos alimentícios. Apesar das divergências observadas entre a kombucha padrão e aquelas adicionadas de substrato alternativo, os tecidos florais demonstraram características favoráveis para incorporação de novos compostos na bebida, resultando em um produto final com maior bioatividade e valor funcional.

Palavras-chave: Atividade antioxidante. Flores comestíveis. Antocianinas. Ácido glucurônico. β -lapachona. HPLC.

ABSTRACT

The growing demand for functional foods has driven collaboration between the scientific community and the food industry in the development of innovative products with biological activity relevant to human health. Kombucha emerges as a fermented drink with promising characteristics to fill this gap. Its functional properties are associated with bioactive compounds synthesized during fermentation carried out by bacteria and yeast contained in the cellulosic biofilm (SCOBY). Improving the performance of these microorganisms and the bioactive characteristics of kombucha can be obtained with new alternative substrates for fermentation, such as edible flowers, which are a natural source rich in bioactive substances. Aiming to meet these demands, the present study aimed to develop kombuchas based on *Camellia sinensis* (black tea) with the addition of *Handroanthus albus* (yellow ipê) and *Tropaeolum majus* (nasturtium) petals, aiming to enhance the bioactive and functional properties of the drink. This investigation was consolidated into three substantial steps: optimization of black tea fermentation conditions; optimization of the extraction of bioactive compounds from *H. albus* petals and *T. majus* leaves and petals; and the fermentation kinetics of kombuchas with floral extracts. Response surface methodology suggested that the highest bioactivity of standard kombucha (100% black tea) can be obtained with a concentration of 12 g/L tea, 150 g/L sucrose at 23 °C. For the highest yield in the process of extracting bioactive compounds and antioxidant activity from *H. albus* petals, it was suggested the use of 80 g/L of floral tissue, at 90 °C for 15 minutes, and for *T. majus*, the parameters recommended were 60 g/L of flower, at 90 °C for 10 minutes. The best extraction conditions for nasturtium leaves were 8 g/L in 50% ethanol at 70 °C. The kombuchas with the addition of floral extracts showed a fermentative behavior analogous to that of the traditional drink, suggesting satisfactory microbial adaptation and compliance with the safety criteria established for the drink. The kombuchas added with *H. albus* enhanced the synthesis of glucuronic acid and added the compound β -lapachone, while the anthocyanin pigments from the petals of *T. majus* contributed to improving the antioxidant activity of the drinks. Nasturtium leaf extract showed a high concentration of bioactive compounds and antioxidant activity, being a favorable addition to increase the functional value of food products. Despite the differences observed between standard kombucha and those added with an alternative substrate, the floral tissues demonstrated favorable characteristics for the incorporation of new compounds into the drink, resulting in a final product with greater bioactivity and functional value.

Keywords: Antioxidant activity. Edible flowers. Anthocyanins. Glucuronic acid. β -lapachone. HPLC.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1 – Fluxograma dos processos microbianos na fermentação da kombucha. | 21 |
| Figura 2 – Fluxograma das etapas de processamento da kombucha | 24 |
| Figura 3 – Características visuais de algumas espécies de flores comestíveis..... | 38 |
| Figura 4 – Flores amarelas da espécie florestal <i>Handroanthus albus</i> | 39 |
| Figura 5 – Estrutura química do lapachol, β -lapachona e α -lapachona..... | 40 |
| Figura 6 – Flores e folhas da variedade de capuchinha (<i>Tropaeolum majus</i>) laranja | 41 |
| Figura 7 – Extratos de <i>Handroanthus albus</i> obtidos a partir do planejamento fatorial Box- Behnken..... | 58 |
| Figura 8 – Superfície de resposta e gráficos de contorno mostrando os efeitos das variáveis independentes (Concentração de pétalas, Tempo, Temperatura) sobre a concentração de compostos bioativos e atividade antioxidante no ponto ótimo dos extratos de <i>Handroanthus albus</i> | 63 |
| Figura 9 – Kombuchas à base de chá preto e adicionadas de <i>Handroanthus albus</i> (ipê amarelo) produzidas em uma cinética de fermentação..... | 76 |
| Figura 10 – Efeito das variáveis tempo e substrato sobre a concentração de compostos fenólicos totais e flavonoides em kombuchas à base de chá preto e adicionadas de <i>Handroanthus albus</i> (ipê amarelo)..... | 77 |
| Figura 11 – Efeito das variáveis tempo e substrato sobre a atividade antioxidante pelos métodos ABTS, FRAP e DPPH das kombuchas à base de chá preto e adicionadas de <i>Handroanthus albus</i> (ipê amarelo)..... | 83 |
| Figura 12 – Efeito das variáveis tempo e substrato sobre o ganho de massa do SCOBY (<i>Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast</i>) formado nas kombuchas à base de chá preto e adicionadas de <i>Handroanthus albus</i> (ipê amarelo)..... | 85 |
| Figura 13 – Efeito das variáveis tempo e substrato sobre o pH e concentração de ácidos orgânicos em kombuchas à base de chá preto e adicionadas de <i>Handroanthus albus</i> (ipê amarelo)..... | 90 |
| Figura 14 – Extratos de <i>Tropaeolum majus</i> obtidos de acordo com planejamento fatorial Box- Behnken..... | 104 |
| Figura 15 – Superfície de resposta e gráficos de contorno mostrando os efeitos das variáveis independentes (Concentração de pétalas, Tempo, Temperatura) sobre a concentração de compostos bioativos e atividade antioxidante no ponto ótimo dos extratos de <i>Tropaeolum majus</i> (capuchinha). | 113 |

| | |
|---|-----|
| Figura 16 – Kombuchas à base de chá preto e adicionadas de <i>Tropaeolum majus</i> (capuchinha) produzidas na cinética de fermentação..... | 116 |
| Figura 17 – Efeito das variáveis tempo e substrato sobre a concentração de compostos fenólicos totais e flavonoides em kombuchas à base de chá preto e adicionadas de <i>Tropaeolum majus</i> (capuchinha)..... | 117 |
| Figura 18 – Efeito do tempo de fermentação sobre a concentração de antocianinas em kombuchas adicionadas de <i>Tropaeolum majus</i> (capuchinha)..... | 121 |
| Figura 19 – Efeito das variáveis tempo e substrato sobre a atividade antioxidante pelos métodos ABTS, FRAP e DPPH das kombuchas à base de chá preto e adicionadas de <i>Tropaeolum majus</i> (capuchinha)..... | 123 |
| Figura 20 – Estrutura química das antocianinas..... | 125 |
| Figura 21 – Efeito das variáveis tempo e substrato sobre o ganho de massa microbiana produzida nas kombuchas à base de chá preto e adicionadas de <i>Tropaeolum majus</i> (capuchinha)..... | 126 |
| Figura 22 – Placa celulósica (SCOBY) desidratada obtida no décimo dia de fermentação de kombuchas à base de chá preto e adicionadas de <i>Tropaeolum majus</i> (capuchinha). | 128 |
| Figura 23 – Efeito das variáveis tempo e substrato sobre o potencial hidrogeniônico (pH) e concentração de ácidos orgânicos de kombuchas à base de chá preto e adicionadas de <i>Tropaeolum majus</i> (capuchinha). | 131 |
| Figura 24 – Extratos das folhas de <i>Tropaeolum majus</i> obtidos a partir do planejamento fatorial Box-Behnken..... | 138 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) popularmente conhecidas no Brasil. | 34 |
| Tabela 2 – Planejamento fatorial Box-Behnken aplicado para otimizar a extração de compostos das pétalas de <i>Handroanthus albus</i> (ipê amarelo). | 49 |
| Tabela 3 – Planejamento fatorial Box-Behnken aplicado para obtenção das kombuchas com diferentes concentrações de chá preto, sacarose e temperatura de fermentação. | 51 |
| Tabela 4 – Distribuição e codificação dos fermentadores de kombucha de <i>Handroanthus albus</i> (ipê amarelo) e chá preto de acordo com o tempo de fermentação. | 52 |
| Tabela 5 – Concentração de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos ABTS, FRAP e DPPH dos extratos de <i>Handroanthus albus</i> | 59 |
| Tabela 6 – Efeitos das variáveis independentes (Concentração de pétalas, Tempo e Temperatura) sobre a concentração de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos ABTS, FRAP e DPPH dos extratos de <i>Handroanthus albus</i> | 62 |
| Tabela 7 – Valores preditos e experimentais das variáveis obtidas no ponto ótimo de extração das pétalas de <i>Handroanthus albus</i> | 64 |
| Tabela 8 – Concentração de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos ABTS, FRAP e DPPH das infusões (P4; P8 e P12) e kombuchas (KP1 a KP15) à base de chá preto. | 67 |
| Tabela 9 – Potencial hidrogeniônico (pH) e concentração de ácido acético das infusões (P4; P8 e P12) e kombuchas à base de chá preto (KP1 a KP15). | 70 |
| Tabela 10 – Efeitos das variáveis independentes (concentração de chá, sacarose e temperatura) sobre a concentração de compostos fenólicos, flavonoides, atividade antioxidante (ABTS, FRAP) e teor de ácido acético das kombuchas fermentadas à base de chá preto. | 73 |
| Tabela 11 – Valores preditos e experimentais das variáveis obtidas no ponto ótimo de extração das kombuchas à base de chá preto. | 75 |
| Tabela 12 – Quantificação cromatográfica de compostos fenólicos individuais em kombuchas à base de chá preto e adicionadas de <i>Handroanthus albus</i> (ipê amarelo). | 80 |
| Tabela 13 – Planejamento fatorial Box-Behnken aplicado para otimizar a extração de compostos das pétalas de <i>Tropaeolum majus</i> (capuchinha). | 97 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 14 – Distribuição e codificação dos fermentadores de kombucha adicionadas de <i>Tropaeolum majus</i> (capuchinha) e chá preto de acordo com o tempo de fermentação. | 98 |
| Tabela 15 – Concentração de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos ABTS, FRAP e DPPH dos extratos de <i>Tropaeolum majus</i> | 107 |
| Tabela 16 – Efeitos das variáveis independentes (Concentração de pétalas; Tempo e Temperatura) sobre a concentração de compostos fenólicos, flavonoides, atividade antioxidante (ABTS e FRAP) e teor de antocianinas dos extratos das pétalas de <i>Tropaeolum majus</i> | 111 |
| Tabela 17 – Valores preditos e experimentais das variáveis obtidas no ponto ótimo de extração das pétalas de <i>Tropaeolum majus</i> (capuchinha)..... | 114 |
| Tabela 18 – Quantificação cromatográfica de compostos fenólicos individuais em kombuchas à base de chá preto e adicionadas de <i>Tropaeolum majus</i> (capuchinha). | 120 |
| Tabela 19 – Planejamento fatorial Box-Behnken aplicado para a extração de compostos das folhas de <i>Tropaeolum majus</i> (capuchinha). | 136 |
| Tabela 20 – Concentração de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos ABTS, FRAP e DPPH dos extratos das folhas de <i>Tropaeolum majus</i> | 140 |
| Tabela 21 – Efeitos das variáveis independentes (Concentração de folha; Temperatura; Concentração de solvente) sobre a concentração de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante (ABTS) dos extratos das folhas de <i>Tropaeolum majus</i> | 142 |
| Tabela 22 – Valores preditos e experimentais das variáveis obtidas no ponto ótimo de extração das folhas de capuchinha <i>Tropaeolum majus</i> | 144 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|----------------|---|
| ABTS | <i>2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)</i> |
| AG | Equivalentes de ácido gálico |
| ALT | Alanina aminotransferase |
| ANOVA | Análise de variância |
| AST | Aspartato aminotransferase |
| CAT | Equivalentes de catequina |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| Cy-3-glu | Cianidina-3-glicosídeo |
| DPPH | <i>2,2-difenil-2-picrilhidrazil</i> |
| DSL | Ácido D-sacárico-1,4-lactona |
| ECA | Enzima conversora da angiotensina |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FRAP | <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> |
| HDL-colesterol | Lipoproteínas de alta densidade |
| HPLC | <i>High-performance liquid chromatography</i> |
| LDL-colesterol | Lipoproteínas de baixa densidade |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| ND | Não detectado ou valores abaixo do limite de detecção |
| PANC | Plantas Alimentícias Não Convencionais |
| PDA | Detector de fotodiodo |
| Pg-3-glu | Pelargonidina-3-glucosídeo |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| PVC | Policloreto de vinila |
| RE | Equivalentes de Rutina |
| SCOBY | <i>Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast</i> |
| SNC | Sistemas nervoso central |
| TE | Equivalentes de Trolox |
| TGO | Transaminase oxalacética |
| TPTZ | <i>2,4,6-Tris(2-Pyridyl)-S-Triazine</i> |
| UEPG | Universidade Estadual de Ponta Grossa |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO | 16 |
| OBJETIVOS | 18 |
| CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA | 19 |
| 1.1 KOMBUCHA | 19 |
| 1.1.1 Definição E Histórico Da Kombucha..... | 19 |
| 1.1.2 Microrganismos Da Kombucha..... | 19 |
| 1.1.3 Preparo Da Kombucha | 21 |
| 1.1.4 Substratos Alternativos Para Fermentação De Kombucha..... | 24 |
| 1.1.5 Legislação Nacional E Internacional | 25 |
| 1.1.6 Composição Físico-Química E Nutricional Da Kombucha | 26 |
| 1.1.7 Benefícios Da Kombucha Para A Saúde Humana..... | 27 |
| 1.1.7.1 Ação Antioxidante | 27 |
| 1.1.7.2 Atividade Anticarcinogênica | 28 |
| 1.1.7.3 Atividade Hipoglicêmica | 29 |
| 1.1.7.4 Atividade Hipocolesterolêmica | 30 |
| 1.1.7.5 Ação Anti-Hipertensiva..... | 30 |
| 1.1.8 Potenciais Riscos Para A Saúde Humana..... | 31 |
| 1.2 PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS | 32 |
| 1.2.1 Conceito E Histórico | 32 |
| 1.2.2 Composição Físico-Química E Nutricional..... | 36 |
| 1.2.3 Flores Comestíveis | 37 |
| 1.2.3.1 Ipê Amarelo (<i>Handroanthus albus</i> (Cham.) Mattos) | 38 |
| 1.2.3.2 Capuchinha (<i>Tropaeolum majus</i>) | 41 |
| 1.2.4 Toxicidade | 42 |
| CAPÍTULO 2 - INFUSÃO DE IPÊ AMARELO (<i>Handroanthus albus</i>) COMO SUBSTRATO ALTERNATIVO PARA FERMENTAÇÃO DE KOMBUCHA | 45 |
| 2.1 INTRODUÇÃO..... | 45 |
| 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 47 |
| 2.2.1 Materiais | 47 |

| | | |
|---|---|-----------|
| 2.2.1.1 | Material vegetal | 47 |
| 2.2.1.2 | Symbiotic culture of bacteria and yeast..... | 47 |
| 2.2.1.3 | Reagentes químicos | 48 |
| 2.2.1.4 | Outros materiais..... | 48 |
| 2.2.2 | Métodos | 48 |
| 2.2.2.1 | Otimização da extração de compostos bioativos das pétalas de <i>Handroanthus albus</i> | 48 |
| 2.2.2.2 | Otimização das kombuchas com infusão de <i>Camellia sinensis</i> | 50 |
| 2.2.2.3 | Cinética de fermentação de kombucha com extrato de <i>Handroanthus albus</i> | 51 |
| 2.2.3 | Análises | 52 |
| 2.2.3.1 | Análises físico-químicas..... | 52 |
| 2.2.3.2 | Compostos fenólicos totais..... | 53 |
| 2.2.3.3 | Flavonoides totais..... | 53 |
| 2.2.3.4 | Atividade antioxidante <i>in vitro</i> | 53 |
| 2.2.3.5 | Identificação e quantificação de compostos por cromatografia líquida | 54 |
| 2.2.3.6 | Atividade antiglicêmica..... | 56 |
| 2.2.3.7 | Análise estatística | 57 |
| 2.3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 57 |
| 2.3.1 | Otimização Da Extração De Compostos Bioativos Das Pétalas De <i>Handroanthus albus</i> | 57 |
| 2.3.2 | Atividade Antiglicêmica..... | 64 |
| 2.3.3 | Otimização Das Kombuchas Com Infusão De <i>Camellia sinensis</i> | 65 |
| 2.3.4 | Cinética De Fermentação De Kombucha Com Extrato De <i>Handroanthus albus</i> | 75 |
| 2.3.4.1 | Compostos fenólicos e flavonoides totais | 75 |
| 2.3.4.2 | Análise cromatográfica de compostos fenólicos individuais | 78 |
| 2.3.4.3 | Análise cromatográfica do composto β -lapachona..... | 80 |
| 2.3.4.4 | Atividade antioxidante..... | 81 |
| 2.3.4.5 | Ganho de massa da placa celulósica..... | 84 |
| 2.3.4.6 | Potencial hidrogeniônico e quantificação de ácidos orgânicos | 86 |
| 2.4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 92 |
| | | |
| CAPÍTULO 3 – FERMENTAÇÃO DE KOMBUCHA COM PÉTALAS DE CAPUCHINHA (<i>Tropaeolum majus</i>) | | 93 |
| 3.1 | INTRODUÇÃO..... | 93 |
| 3.2 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 95 |

| | |
|---|-----|
| 3.2.1 Materiais | 95 |
| 3.2.1.1 Material vegetal | 95 |
| 3.2.1.2 Symbiotic culture of bacteria and yeast..... | 95 |
| 3.2.1.3 Reagentes químicos | 95 |
| 3.2.1.4 Outros materiais..... | 96 |
| 3.2.2 Métodos | 96 |
| 3.2.2.1 Otimização da extração de compostos bioativos das pétalas de <i>Tropaeolum majus</i> | 96 |
| 3.2.2.2 Cinética de fermentação de kombucha com extrato de <i>Tropaeolum majus</i> | 97 |
| 3.2.3 Análises | 99 |
| 3.2.3.1 Análises físico-químicas..... | 99 |
| 3.2.3.2 Compostos fenólicos totais | 99 |
| 3.2.3.3 Flavonoides totais | 100 |
| 3.2.3.4 Antocianinas totais | 100 |
| 3.2.3.5 Identificação e quantificação de compostos cromatografia líquida..... | 100 |
| 3.2.3.6 Atividade antioxidante..... | 102 |
| 3.2.3.7 Atividade antiglicêmica..... | 103 |
| 3.2.3.8 Análise estatística | 103 |
| 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 104 |
| 3.3.1 Otimização Da Extração De Compostos Bioativos Das Pétalas De <i>Tropaeolum majus</i> | 104 |
| 3.3.1.1 Atividade antiglicêmica do extrato otimizado..... | 114 |
| 3.3.2 Cinética de fermentação de kombucha com extrato de <i>Tropaeolum majus</i> | 115 |
| 3.3.2.1 Compostos fenólicos e flavonoides totais | 115 |
| 3.3.2.2 Análise cromatográfica de compostos fenólicos individuais | 118 |
| 3.3.2.3 Antocianinas | 120 |
| 3.3.2.4 Detecção e quantificação de antocianinas por cromatografia líquida | 121 |
| 3.3.2.5 Atividade antioxidante..... | 122 |
| 3.3.2.6 Ganho de massa da placa celulósica..... | 125 |
| 3.3.2.7 Potencial hidrogeniônico (ph) e quantificação de ácidos orgânicos..... | 128 |
| 3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 133 |
| CAPÍTULO 4 – OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DAS FOLHAS DE CAPUCHINHA (<i>Tropaeolum majus</i>) | 134 |

| | |
|--|------------|
| 4.1 INTRODUÇÃO..... | 134 |
| 4.2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 135 |
| 4.2.1 Material Vegetal | 135 |
| 4.2.2 Otimização Da Extração De Compostos Das Folhas De <i>Tropaeolum majus</i> | 135 |
| 4.2.3 Compostos Fenólicos Totais..... | 136 |
| 4.2.4 Flavonoides Totais..... | 136 |
| 4.2.5 Atividade Antioxidante Abts | 137 |
| 4.2.6 Atividade Antioxidante Frap | 137 |
| 4.2.7 Atividade Antioxidante Dpph..... | 137 |
| 4.2.8 Análise Estatística | 137 |
| 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 137 |
| 4.3.1 Planejamento Experimental..... | 137 |
| 4.3.2 Otimização..... | 141 |
| 4.4 CONCLUSÃO..... | 145 |
| CONCLUSÃO..... | 146 |
| REFERÊNCIAS | 147 |
| ANEXOS..... | 162 |
| ANEXO A - EXSICATA DA ESPÉCIE <i>Handroanthus albus</i> | 162 |
| ANEXO B - EXSICATA DA ESPÉCIE <i>Tropaeolum majus</i> | 163 |
| ANEXO C - CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE RESUMO NA MODALIDADE TRABALHO COMPLETO | 164 |

INTRODUÇÃO

A kombucha tem se destacado no mercado de produtos fermentados, sendo considerada a bebida funcional e de baixo teor alcóolico mais popular do mundo. Sua principal característica consiste na presença de um complexo simbiótico de bactérias e leveduras, que se encontram dispersos em uma fase líquida ácida e um biofilme flutuante, também denominado *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast* (SCOBY). Para que o processo fermentativo da kombucha ocorra é necessário imergir o SCOBY em um substrato nutritivo de chá e açúcar. Tradicionalmente o tipo de chá mais utilizado é o chá preto, contudo, outras variedades como o chá verde e chá *oolong* (também conhecido como chá azul) podem ser utilizados. Ademais, alguns estudos sugerem o emprego de outros substratos alternativos para fermentação como sucos de frutas, extrato da soja, chá branco, especiarias e extratos de flores comestíveis.

A bebida fermentada pelos microrganismos da kombucha apresenta uma série de componentes químicos e nutricionais como ácido acético, ácido glucurônico, açúcares, polifenóis, proteínas, vitaminas do complexo B (B1, B2, B6 e B12), vitamina C, elementos essenciais como Cu, Fe, Mn, Ni e Zn, além de diversos compostos bioativos. Frente a essa composição, acredita-se que a kombucha possa desempenhar efeitos profiláticos e terapêuticos em diversas patologias no organismo humano. Os efeitos benéficos incluem potencial anti-inflamatório, antioxidante e antitumoral; fortalecimento do sistema imunológico; melhora das funções hepáticas, gastrointestinais e do sistema nervoso central; prevenção de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas; além de proporcionar redução dos níveis de pressão arterial, colesterol circulante e glicemia.

Algumas culturas de plantas reconhecidas como “invasoras” ou “daninhas”, ainda são espécies subutilizadas, mas que podem apresentar excelente composição para o desenvolvimento de novos produtos fermentados. Na última década essas plantas passaram a ser reconhecidas como plantas alimentícias não convencionais (PANC). As PANC são espécies de plantas selvagens com aptidão alimentícia, apresentam crescimento espontâneo, baixo custo, limitada exigência para cultivo, elevado potencial nutricional e relevante recurso genético. A exclusão dessas plantas na alimentação cotidiana da população ocorreu em face à agricultura convencional, que limitou a dieta contemporânea a uma menor diversidade de espécies. Alguns estudos enfatizam a possibilidade de que as plantas não convencionais apresentem uma composição nutricional favorável para consumo humano.

No Brasil, a espécie florestal *Handroanthus albus* configura uma espécie de PANC, sendo popularmente reconhecida como ipê amarelo. A entrecasca e as flores do ipê podem ser

utilizadas para fins alimentícios, e são consideradas fontes de compostos bioativos e metabólicos secundários, os quais possuem atividades farmacológicas favoráveis para a saúde humana. Na literatura são encontrados registros acerca dos possíveis efeitos anti-inflamatórios, antibacterianos, potencial neuroprotetor e melhora do prognóstico em quadros de obesidade, obtidos através dos compostos extraídos da espécie *H. albus*.

A espécie *Tropaeolum majus* popularmente conhecida como capuchinha, caracteriza-se como uma planta herbácea, da qual as folhas, flores e sementes apresentam potencial alimentício. Diversos compostos como flavonoides, ácidos graxos essenciais (oleico e linoleico), vitamina C e luteína são encontrados naturalmente na planta. Essas substâncias apresentam potencial antiproliferativo contra células cancerosas, efeitos benéficos na melhora do prognóstico de quadros hipertensivos, inflamatórios e infecções das vias urinárias.

Diante deste cenário, observa-se que as PANC emergem como um excelente recurso natural para o desenvolvimento de novos estudos, que objetivem explorar a viabilidade de aplicação dessas plantas em produtos alimentícios. O desenvolvimento de substratos alternativos para fermentação de kombucha, visando agregar valor nutricional à bebida, bem como potencializar seus efeitos farmacológicos, também configura uma lacuna a ser explorada pela comunidade científica. Assim, esta pesquisa tem por objetivo otimizar as condições de fermentação de kombucha à base de chá preto com a adição de extratos das flores de *H. albus* e *T. majus*, com a proposta de determinar os parâmetros ideais para maximização de compostos bioativos na bebida final. Espera-se que os substratos alternativos possam agregar maior valor funcional à kombucha, e por consequência proporcionar benefícios à saúde do consumidor. Os achados desta pesquisa poderão nortear outras investigações, principalmente porque até o presente, este é o primeiro registro sobre o uso das flores de *H. albus* em produtos fermentados.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Otimizar as condições de fermentação da kombucha de *Camellia sinensis* (chá preto) adicionada de extratos das flores de *Handroanthus albus* (ipê amarelo) e *Tropaeolum majus* (capuchinha), visando maximizar as propriedades bioativas e funcionais da bebida.

Objetivos específicos

- Otimizar a extração de compostos bioativos das flores de ipê amarelo (*Handroanthus albus*) e capuchinha (*Tropaeoleum majus*);
- Analisar a atividade antiglicêmica dos extratos florais obtidos;
- Otimizar o processo de fermentação de kombucha com chá preto (*Camellia sinensis*), visando as melhores condições de temperatura, concentração de chá e teor de sacarose para maior obtenção de compostos bioativos;
- Estudar a cinética de fermentação das kombuchas à base de chá preto e adicionadas dos extratos florais;
- Avaliar a cinética da concentração de compostos bioativos, ácido glucurônico e atividade antioxidante das kombuchas desenvolvidas;
- Otimizar as condições de extração de compostos das folhas de *T. majus*.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

1.1 KOMBUCHA

1.1.1 Definição E Histórico Da Kombucha

Segundo a Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019, a kombucha pode ser definida como uma “Bebida fermentada obtida por meio 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). O acrônimo “SCOBY” deriva da expressão em inglês “*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*”, que consiste no complexo simbiótico de bactérias acéticas, lácticas e leveduras organizadas em uma placa celulósica imersa na fase líquida da kombucha (Cardoso *et al.*, 2020). Segundo registros acerca da etimologia da palavra kombucha, a expressão “kombu” estaria associada a uma alga marinha, a qual foi utilizada como precursora do SCOBY. Ao passo que, o sufixo “cha” teria sido empregado devido aos chás utilizados como substrato para o complexo simbiótico de microrganismos (Jarrell; Cal; Bennett, 2000).

Historicamente, há registros de que a kombucha teve suas origens no nordeste da China, por volta de 220 a.C. Na época, a bebida ficou conhecida como “remédio da imortalidade”, pois seu consumo era recomendado para fins desintoxicantes e energizantes. Outros relatos mencionam que em 414 d.C., a kombucha proveniente da Coreia foi trazida para o Japão, pelo doutor Kombu, com a finalidade de solucionar os problemas digestivos do imperador Inkyo (Greenwalt; Steinkraus; Ledford, 2000). Posteriormente a kombucha alcançou a Rússia e Europa Oriental por meio das rotas comerciais, que se estendiam além do Extremo Oriente (Jayabalan *et al.*, 2014). Além disso, há relatos de que o consumo da kombucha remonta desde a Segunda Guerra Mundial (Nielsen, 2018). Contudo, a popularidade da bebida tornou-se mais evidente nas últimas décadas. Segundo relatórios do *Google Trends* (2023), o interesse de pesquisa pelo termo “kombucha” aumentou mais de 3,5 vezes entre os anos de 2013 (24) e 2023 (85). Enfatizando que o pico máximo (100) de popularidade da bebida foi alcançado em janeiro de 2020, coincidindo com o início da pandemia da COVID-19. Esse fato possivelmente está associado ao fortalecimento do sistema imunológico promovido pela kombucha (Kapp; Sumner, 2019).

1.1.2 Microrganismos Da Kombucha

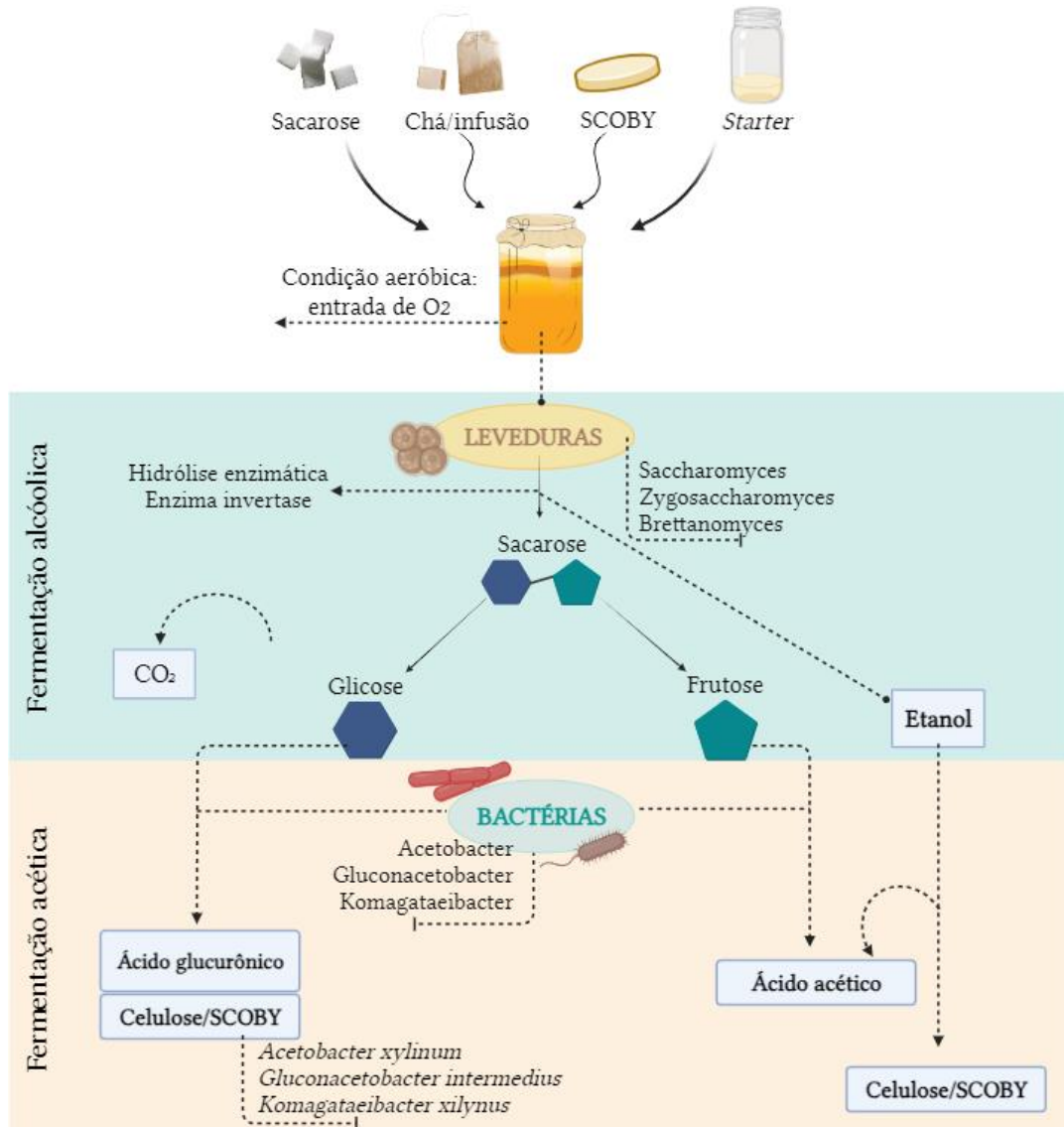
O tipo de microrganismo presente na kombucha pode variar de acordo com alguns fatores como substrato utilizado para fermentação, origem geográfica da cultura, clima da

região, entre outros (Bishop *et al.*, 2022). Assim, não há uma padronização da microbiota do SCOBY. Contudo, um amplo espectro de culturas já foi identificado na matriz celulósica da kombucha, incluindo bactérias acéticas do gênero *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Komagataeibacter*, *Bacterium* e *Tanticharoenia*. Os gêneros de bactérias lácticas já detectadas foram *Lactobacillus* e *Oenococcus*. Em termos de leveduras, destacam-se os gêneros *Candida*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Lachancea*, *Sporopachydermia*, *Sugiyamaella*, *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces* (Chakravorty *et al.*, 2016).

Durante o processo fermentativo da kombucha, a enzima invertase, derivada das leveduras, catalisa a hidrólise da sacarose, convertendo-a em glicose e frutose. Nesta fase também ocorre a produção de etanol, CO₂ e ácidos orgânicos. Por outro lado, as bactérias continuam o processo por meio da conversão de glicose em ácido glucurônico, e da frutose e do etanol em ácido acético. Assim, estas substâncias conferem à kombucha uma característica ácida, com pH próximo a 3,0 o que contribui para a preservação da bebida contra microrganismos patogênicos. Isso porque, esses organismos não possuem capacidade de crescimento em meios com pH inferior a 4, visto que a disponibilidade de oxigênio em meio ácido é reduzida (Leal *et al.*, 2018). Contudo, um pH inferior a 2 tende a agregar características sensoriais desfavoráveis à bebida (Coton *et al.*, 2017). Já um pH acima de 4,2 pode provocar a destruição de algumas espécies de leveduras presentes naturalmente no SCOBY da kombucha (Leal *et al.*, 2018). A Figura 1 ilustra um fluxograma que destaca os principais microrganismos e processos relacionados à fermentação e à síntese de compostos na kombucha.

Entretanto, é válido ressaltar que alguns fungos micotoxigênicos como *Bacillus anthrax*, *Penicillium* e *Aspergillus* apresentam a capacidade de se desenvolver no substrato da kombucha, mesmo diante de um pH ácido (Coton *et al.*, 2017). Os metabólitos secundários produzidos por esses organismos podem desempenhar efeitos tóxicos e carcinogênicos no corpo humano. Assim, todos os procedimentos para elaboração da kombucha devem ser realizados em ambiente devidamente higienizado, e com uso de utensílios nas mesmas condições, visando prevenir a contaminação e crescimento de microrganismos indesejáveis (Leal *et al.*, 2018). Dessa forma, a fermentação da kombucha deve iniciar com um pH ≤ 5 e reduzir para valores próximos a 2,5 em aproximadamente 7 dias. Se em um período de 7 dias o pH da bebida não alcançar um valor de pelo menos 4,2 provavelmente a cultura está contaminada, ou a temperatura de fermentação está muito baixa (< 20 °C). Nesse caso o descarte do conteúdo é recomendado (Nunmer, 2013).

Figura 1 – Fluxograma dos processos microbianos na fermentação da kombucha.



Fonte: Autoria própria (2023).

1.1.3 Preparo Da Kombucha

A primeira etapa de elaboração da kombucha consiste no preparo do mosto de fermentação. Esse meio fermentativo utilizado como substrato é tradicionalmente preparado com infusões das folhas de *Camellia sinensis* como chá o preto, verde, mate, vermelho, zijuan e oolong (chá azul) (Bishop *et al.*, 2022; Zou *et al.*, 2021). O chá deve ser preparado pelo método de infusão com uso de água em temperaturas superiores a 75 °C, visando a eliminação de possíveis patógenos vegetativos (Figura 2) (Nunmer, 2013). O preparo da kombucha também demanda a adição de 5 a 20% de sacarose, uma vez que a sacarose é utilizada como

fonte principal de carbono e nutrientes para o desenvolvimento dos microrganismos. Além disso, durante a produção de uma nova bebida fermentada pelo complexo simbiótico da kombucha, é importante acrescentar cerca de 10% do conteúdo da fermentação anterior. Isso porque, o conteúdo já fermentado acidifica o pH do meio, o que evita a contaminação da bebida por organismos patogênicos, embora alguns subprodutos metabólicos do SCOBY como o ácido acético, também imprimam atividade antibacteriana (Leal *et al.*, 2018).

A colônia microbiológica fermentadora da kombucha inicia o processo fermentativo quando imersa no substrato de chá açucarado. Essa etapa pode ser compreendida como *Primeira Fermentação*. Por meio desse processo, o complexo simbiótico da kombucha é capaz de converter o chá e a sacarose em uma bebida gaseificada, ligeiramente ácida, refrescante e tipicamente efervescente. Além disso, em cada fermentação uma nova placa celulósica de bactérias e leveduras é formada, a qual pode ser utilizada como *starter* (iniciante) em uma próxima fermentação (Coton *et al.*, 2017).

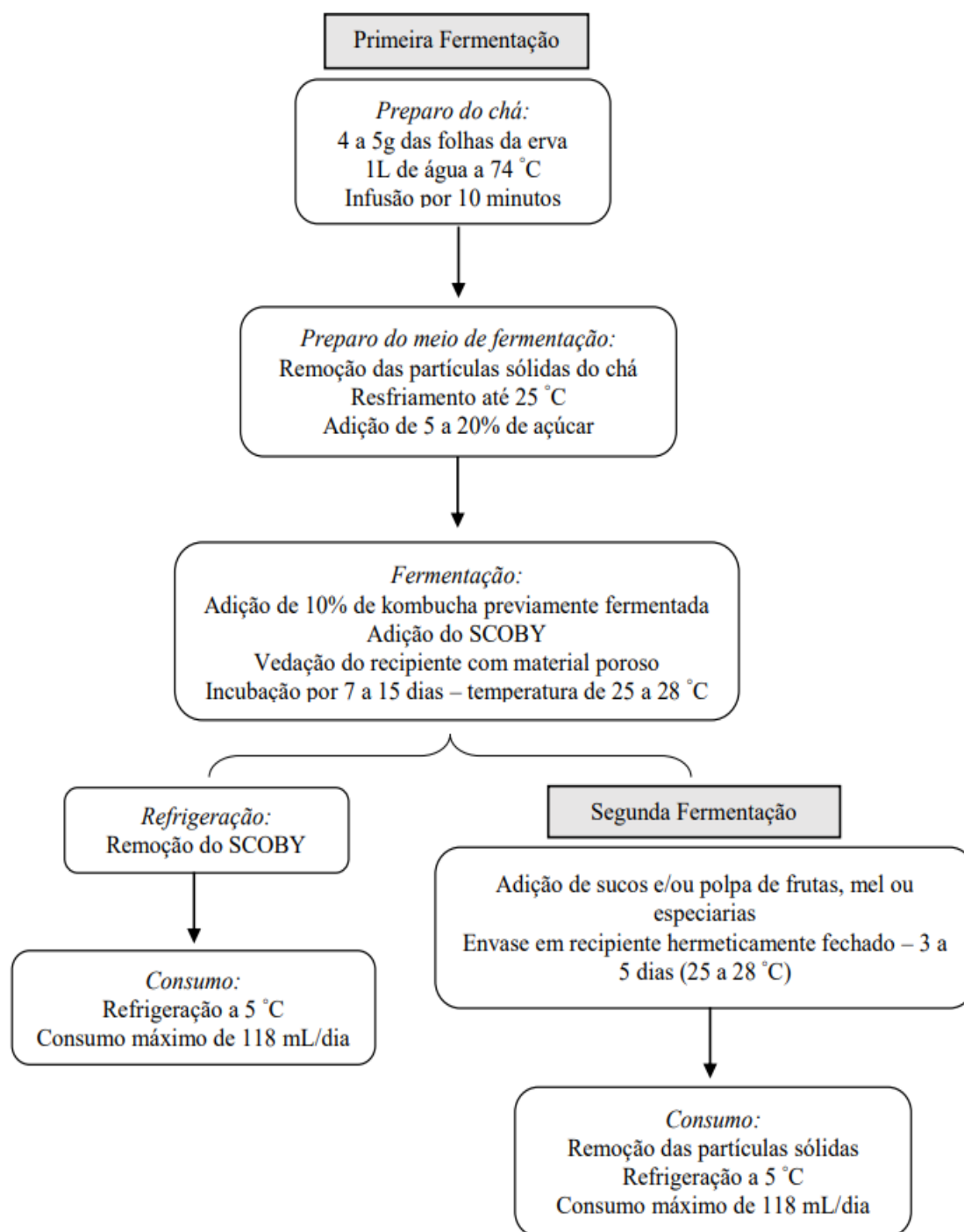
A faixa de temperatura de fermentação ideal é de 22 a 28 °C, pois essa é uma condição propícia e imprescindível para a multiplicação microbiana da kombucha (Bishop *et al.*, 2022). A *Primeira Fermentação* pode ser conduzida durante 7 até 60 dias, sendo os melhores resultados para a composição físico-química e nutricional obtidos em uma média de 14 dias (Villarreal-Soto *et al.*, 2018; Nizioł-Łukaszewska *et al.*, 2020). Isso porque, durante o início do processo fermentativo ocorre a polimerização de compostos bioativos, o que reduz a concentração destas substâncias na bebida. Contudo, ao atingir um período aproximado de 14 dias, a fermentação promove a despolimerização destes compostos, o que implica no aumento de suas concentrações no produto final (Nizioł-Łukaszewska *et al.*, 2020).

Entretanto, apesar do aumento na concentração de compostos bioativos da kombucha com a progressão da fermentação, a incubação prolongada não é recomendada. Isso porque, o gás carbônico produzido pelo complexo simbiótico pode ficar acumulado na interface entre o biofilme e a fase líquida ácida, o que pode bloquear o transporte de nutrientes para os microrganismos (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). Ademais, um período de fermentação muito extenso pode elevar a acidez da bebida para níveis potencialmente prejudiciais aos consumidores. O aumento da acidez ocorre em virtude dos ácidos produzidos durante a fermentação, o que implica na redução dos valores de pH, que devem estar entre 2,5 e 4,2 até o final da fermentação (Brasil, 2019). Essa faixa de pH tolerável, consiste em um parâmetro de controle da inocuidade e qualidade da bebida. Valores de pH abaixo de 2,5 indicam elevada concentração de ácido acético, que em contato com o sistema digestivo humano pode conferir

riscos à saúde (Jakubczyk *et al.*, 2020). Kombuchas com valores de pH acima de 4,2 possivelmente tiveram algum tipo de contaminação por microrganismos patogênicos, que se desenvolvem em uma faixa de pH alcalino ou próximo do neutro como *Clostridium botulinum* (pH ótimo 4,8 a 8,5), *Clostridium perfringens* (pH ótimo 4,5 a 9,5) e *Bacillus cereus* (pH ótimo 5 a 9,3) (Cardoso *et al.*, 2020; Nummer, 2013).

A etapa de *Segunda Fermentação* da kombucha consiste em um processo opcional para saborização da bebida. Nessa operação somente o líquido fermentado será utilizado, no qual poderão ser acrescentadas frutas e/ou sucos, mel ou especiarias para agregar sabor e valor nutricional à bebida, que iniciará um novo processo fermentativo (Figura 2) (Morales, 2020). Ao final desse processo, o conteúdo fermentado tende a apresentar certo teor alcóolico, devido à produção de álcool, o qual é resultante das variações do processo fermentativo e/ou sua duração. Entretanto, a kombucha é classificada como uma bebida não alcoólica, visto que o teor de etanol produzido é baixo, variando entre 1 e 3% conforme o tempo de fermentação (Coton *et al.*, 2017).

Figura 2 – Fluxograma das etapas de processamento da kombucha



Adaptado de Nummer (2013) e Villarreal-Soto *et al.* (2018)

1.1.4 Substratos Alternativos Para Fermentação De Kombucha

A kombucha é tradicionalmente fermentada em infusões das folhas de *Camellia sinensis*, porque essa matéria-prima contém uma diversidade interessante de compostos

bioativos como a catequina, epigalocatequina, epicatequina, teaflavina e tearubigina (Morales, 2020). Quando associados ao processo de fermentação, esses compostos potencializam a atividade antioxidante da kombucha (Permatasari *et al.*, 2022). Por isso, é evidente que, além da microbiota do SCOBY e do tempo de fermentação, o tipo de chá utilizado como substrato influenciará diretamente nas propriedades bioativas da bebida final (Jakubczyk *et al.*, 2020). Assim, outras espécies vegetais com uma composição bioativa robusta e variada, emergem como potenciais substratos alternativos para fermentação de kombucha.

Algumas pesquisas já exploraram novas alternativas de substratos como infusões de *Rhizophora mucronata* (Hardoko *et al.*, 2020) e *Moringa oleifera* (Primiani *et al.*, 2018). Especiarias como manjeriço (*Ocimum basilicum*) (Yikmiş; Tuğgüm, 2019), salsa (*Petroselinum crispum*), hortelã (*Mentha spicata*), urtiga (*Urtica dioica*), tomilho (*Thymus vulgaris*), sabugueiro (*Sambucus nigra*) (Vitas *et al.*, 2020) e canela (*Cinnamomum verum*) (Shahbazi *et al.*, 2018) também já foram investigadas. Outra categoria de material vegetal de interesse para investigações científicas é a das flores comestíveis. As espécies de inflorescência *Malvaviscus arboreus* (Silva *et al.*, 2021), *Achillea millefolium* (Vitas *et al.*, 2018), *Clitoria ternatea* (Permatasari *et al.*, 2022; Wongthai *et al.*, 2021), *Nelumbo nucifera* (Wongthai *et al.*, 2021) e *Echinacea* (Özyurt, 2020), foram aplicadas na fermentação de kombuchas e demonstraram desfechos satisfatórios em termos de composição bioativa e funcional da bebida.

1.1.5 Legislação Nacional E Internacional

A nova película microbiana formada durante a fermentação da kombucha pode ser utilizada individualmente, como uma colônia iniciadora em um novo processo fermentativo. Por isso, o SCOBY pode ser compartilhado de maneira informal entre os consumidores que desejam cultivar e produzir a bebida. Contudo, esse cenário confere maiores riscos de contaminação da bebida, o que dificulta o controle sanitário do produto fermentado. Assim, frente ao crescente consumo de kombucha e a falta de padronização dos processos de produção, Nummer (2013) publicou um relatório de análise de riscos e diretrizes de processamento de kombucha, baseado no Código Alimentar da *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos. O documento discorre sobre os potenciais riscos biológicos e químicos da kombucha, parâmetros para controle da segurança e inocuidade da bebida, e procedimentos operacionais padronizados recomendados, visando as boas práticas de fabricação.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou a Instrução normativa n° 41 (Brasil, 2019), que trata dos padrões de identidade e qualidade da

kombucha. Nesse documento, o item 5.2.1 autoriza o uso de infusões de espécies vegetais em água, ou seus extratos, como ingrediente opcional para a produção de kombucha. Essas infusões devem ser preparadas com base na Resolução RDC n° 716/2022 (Brasil, 2022a), que trata dos padrões sanitários para o preparo de chás e outros produtos. Em complemento, a Instrução Normativa n° 159/2022 (Brasil, 2022b) descreve a lista de vegetais e suas partes autorizadas para o preparo de chás ou uso como especiarias. As espécies vegetais não citadas nesse documento, poderão ser utilizadas para consumo, desde que estejam em conformidade com as exigências da Resolução RDC n° 17/1999 (Brasil, 1999), a qual dispõe sobre as diretrizes básicas para avaliação do risco e segurança de alimentos. Assim, todas as matérias-primas utilizadas para fermentação de kombucha deverão estar em conformidade com as normativas vigentes, ou atender aos requisitos para comprovação de segurança de uso, pautando-se em evidências científicas aplicáveis.

1.1.6 Composição Físico-Química E Nutricional Da Kombucha

As propriedades físico-químicas e a composição nutricional da kombucha podem ser influenciadas por diversos fatores. A origem e composição do SCOBY influencia diretamente nas características do produto final, uma vez que os organismos presentes na microbiota da kombucha são os agentes promotores da fermentação (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). As condições extrínsecas determinadas para o processo fermentativo como teor de sacarose, tempo e temperatura, representam fatores decisivos nas propriedades do fermentado (Leal *et al.*, 2018).

A kombucha é composta de ácidos como o acético, cítrico, L-láctico, málico, tartárico, malônico, oxálico, succínico, pirúvico, úsnico e glucurônico. O ácido glucurônico configura um dos compostos de maior interesse na kombucha, porque é considerado o principal agente terapêutico da kombucha. Esse ácido é produzido naturalmente pelo fígado humano e apresenta efeitos desintoxicantes. Isso porque, possui a capacidade de se ligar aos xenobióticos presentes no corpo e otimizar a excreção destas substâncias tóxicas através dos rins. Além disso, o ácido glucurônico pode ser convertido em glucosamina (aminossacarídeo), substância associada à síntese de colágeno e preservação das cartilagens, o que conseqüentemente mantém a integridade das articulações (Leal *et al.*, 2018). Ademais, aminoácidos, amins biogênicas, purinas, pigmentos, enzimas hidrolíticas, etanol, polifenóis, minerais, ânions, ácido D-sacárico-1,4-lactona (DSL), produtos metabólicos de leveduras e bactérias, vitaminas do completo B (B1, B2, B6 e B12), vitamina C e compostos bioativos, também são nutrientes encontrados na kombucha (Bishop *et al.*, 2022).

Os fitoquímicos são compostos biologicamente ativos, que conferem proteção ao organismo humano contra inflamações, infecções e outras doenças (Permatasari *et al.*, 2022). Esses compostos bioativos são predominantemente representados pelos polifenóis, que são considerados os antioxidantes mais abundantes na dieta humana. Os polifenóis desempenham atividades fundamentais na prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como alguns tipos de cânceres e doenças neurodegenerativas. Esses compostos apresentam a capacidade de modular a atividade enzimática e os receptores celulares no corpo humano, o que confere uma estratégia de defesa contra o estresse oxidativo, o qual é desencadeado por espécies reativas de oxigênio (Leal *et al.*, 2018). Assim, os potenciais efeitos benéficos do consumo de kombucha para a saúde humana, estão intimamente associados à presença de polifenóis na bebida. Na kombucha, os polifenóis são sintetizados durante o processo fermentativo, devido ao efeito sinérgico dos diferentes compostos encontrados no chá utilizado como substrato (Jakubczyk *et al.*, 2020).

1.1.7 Benefícios Da Kombucha Para A Saúde Humana

Diante da robusta e variada composição nutricional e bioativa da kombucha, o fermentado é considerado um produto funcional, devido aos possíveis efeitos benéficos para a saúde. Esses benefícios ainda não foram comprovados em seres humanos, uma vez que os experimentos documentados na literatura foram desenvolvidos *in vitro* ou em modelos com animais como camundongos, coelhos, patos, cães, porcos, gado e frango (Afsharmanesh; Sadaghi, 2014; Fu *et al.*, 2015; Vina *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2015). Assim, tem sido sugerido que a kombucha pode promover o fortalecimento do sistema imunológico; melhora das funções hepáticas, gastrointestinais e do sistema nervoso central; prevenção de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas; redução dos níveis de pressão arterial, colesterol circulante e glicemia; saúde das articulações; além de inibir a proliferação de células cancerosas (Bishop *et al.*, 2022). Essas alegações são associadas aos compostos bioativos como fenóis, flavonoides, ácido glucurônico, rutina, quercetina e vitaminas do complexo B, que tradicionalmente são encontrados no mosto de fermentação, ou são sintetizados durante o processo de produção da kombucha (Permatasari *et al.*, 2022).

1.1.7.1 Ação Antioxidante

O estresse oxidativo no corpo humano é resultante de um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e os mecanismos de defesa antioxidante. Essa alteração metabólica pode

desencadear processos cancerosos, alterações cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (Morales, 2020). Por isso, a ingestão de antioxidantes dietéticos configura uma das ferramentas terapêuticas mais assertivas para restabelecer a homeostase oxidativa (Bishop *et al.*, 2022). Os polifenóis são descritos como os compostos de maior ação antioxidante, porque possuem a capacidade de doar átomos de hidrogênio do grupo –OH ou elétrons. É com base nessa habilidade de neutralização dos polifenóis, que muitos estudos estabelecem correlações estatísticas entre o teor de compostos bioativos da kombucha e suas propriedades antioxidantes (Morales, 2020).

A kombucha já demonstrou eficácia em quadros de estresse oxidativo induzido em modelos animais. Choi *et al.* (2023) observaram que a administração de kombucha de ginseng (*Panax ginseng*) promoveu redução do estresse oxidativo em camundongos, em virtude do aumento da atividade de enzimas antioxidantes. Similarmente, Gamboa-Gómez *et al.* (2017) documentaram uma redução significativa dos níveis séricos de óxido nítrico, em ratos tratados com kombucha adicionada das folhas de carvalho (*Quercus convallata* e *Quercus arizonica*). Em outro estudo, a enzima superóxido dismutase, que está associada à proteção das células contra processos oxidativos, teve sua ação potencializada em roedores tratados com kombucha de chá preto (Yang *et al.*, 2008). O mesmo tipo de bebida reduziu a peroxidação lipídica em ratos expostos ao chumbo (Dipti *et al.*, 2003). Esses desfechos são correlacionados aos compostos bioativos presentes na kombucha, os quais potencializam as propriedades antioxidantes da bebida. Além dos polifenóis presentes no mosto, a atividade antioxidante da kombucha pode ser potencializada durante o processo fermentativo, uma vez que a bioconversão microbiana dos polifenóis conjugados promove a liberação de fenóis livres (Bishop *et al.*, 2022).

1.1.7.2 Atividade Anticarcinogênica

O câncer ocupa a segunda posição no *ranking* de mortalidade global, sendo responsável por 1/6 das causas de morte no planeta. O processo de desenvolvimento do câncer tem uma forte correlação com o estresse oxidativo, porque diversas vias de sinalização intracelular estão associadas com espécies reativas de oxigênio (Ahmadi; Ebrahimzadeh, 2020). Diante da compreensão desses mecanismos, a kombucha emerge como um possível agente anticancerígeno, considerando o potencial antioxidante que desempenha no corpo humano. Segundo dados revisados por Morales (2020), os mecanismos de ação antiproliferativa e anticarcinogênica dos polifenóis da kombucha estão relacionadas ao potencial que esses

compostos possuem em modular vias de sinalização e marcadores de proliferação celular, atuando como inibidores do crescimento tumoral.

De acordo com o tipo de substrato utilizado para a fermentação da kombucha, diversos compostos bioativos podem ser obtidos. Por consequência, essa variedade de compostos pode desencadear diferentes capacidades antiproliferativas, conforme observado em estudos *in vitro*. A kombucha fermentada em chá preto demonstrou potencial antiproliferativo em linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7), cólon humano (HCT-116) (Villarreal-Soto *et al.*, 2019), carcinoma colorretal (CACO-2) e carcinoma ileocecal colorretal (HCT-8) (Cardoso *et al.*, 2020). Quando fermentada em substratos alternativos, a kombucha também apresenta efeitos antiproliferativos. Vitas *et al.* (2018) observaram capacidade antitumoral de kombucha preparada com chá de mil folhas (*Achillea millefolium*), contra linhagens celulares derivadas de rabiomiossarcoma humano (RD), carcinoma cervical (Hep2c) e fibroblasto murinho (L2OB). A adição de pólen multifloral em kombucha promoveu inibição da multiplicação de células CACO-2 (Utoiu; Matei; Toma, 2018), assim como, as folhas de mostarda (*Brassica tournefortii*) inibiram células cancerosas do tipo MCF-7 (Rahmani *et al.*, 2019). Esses achados reforçam o potencial profilático e terapêutico da kombucha para o corpo humano, no que tange ao estresse oxidativo e multiplicação de células tumorais.

1.1.7.3 Atividade Hipoglicêmica

O diabetes mellitus configura uma síndrome metabólica multicausal, caracterizada por níveis elevados de glicose circulante, que pode ser acompanhada por distúrbios cardiovasculares, neurológicos e renais (Bai *et al.*, 2020). Assim, o consumo de alimentos dietéticos hipoglicemiantes é uma alternativa para indivíduos acometidos por essa patologia. Em virtude do elevado teor de polifenóis e propriedades antioxidantes da kombucha, a bebida tem sido explorada como um potencial recurso terapêutico em quadros hiperglicêmicos. Isso porque, os compostos antioxidantes promovem o aumento da captação de glicose celular e inibem a absorção de glicose no intestino delgado. Além disso, também neutralizam os radicais livres que podem danificar as células β pancreáticas do fígado, o que, por consequência, estimula a secreção de insulina, reduzindo os níveis séricos de glicose (Zubaidah *et al.*, 2019).

Os potenciais efeitos hipoglicemiantes da kombucha fermentada em chá preto, ou com substratos alternativos, vêm sendo testados em modelos animais. Os níveis de glicose plasmática de roedores foram reduzidos significativamente com a administração de kombucha de *Salacca zalacca* (Zubaidah *et al.*, 2019). O mesmo cenário foi observado em camundongos

obesos tratados com kombucha de carvalho (Gamboa-Gómez *et al.*, 2017). Já a kombucha à base de chá preto promoveu redução dos níveis de insulina plasmática (Srihari *et al.*, 2013) e inibiu a atividade da enzima α -amilase pancreática (Aloulou *et al.*, 2012) em ratos diabéticos. O potencial hipoglicemiante de kombucha fermentada com chá preto também foi avaliado em experimentos *in vitro*. A bebida apresentou capacidade para inibir as enzimas α -amilase (Kallel *et al.*, 2012) e β -glicosidase (Watawana; Jayawardena; Waisundara, 2018), as quais estão relacionadas com o aumento dos níveis de glicose plasmática.

1.1.7.4 Atividade Hipocolesterolêmica

A hipercolesterolemia representa um dos principais fatores de risco para as desordens cardiovasculares. Comumente, o tratamento farmacológico tem por objetivo reduzir a absorção do colesterol exógeno e inibir a síntese endógena (Gil-Ramírez; Morales; Soler-Rivas *et al.*, 2018). Os alimentos funcionais também podem atuar como agentes terapêuticos, visando a melhora do prognóstico em quadros de hipercolesterolemia (Morales, 2020). A kombucha emerge como um recurso dietético interessante para esse cenário, uma vez que diversos estudos alegam sobre suas propriedades hipocolesterolêmicas (Aloulou *et al.*, 2012; Doudi *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2008; Zubaidah *et al.*, 2019). Essas alegações estão associadas aos polifenóis presentes na bebida, que atuam no metabolismo das gorduras. Os polifenóis inibem a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol), além de retardar a atividade da lipase pancreática, o que reduz a absorção de colesterol e triacilglicerol (Leal *et al.*, 2018).

Esses desfechos foram observados com kombucha à base de chá preto, que promoveu redução significativa dos níveis séricos de triglicerídeos e LDL-colesterol em roedores, além de retardar a atividade enzimática da lipase (Aloulou *et al.*, 2012). O mesmo cenário foi observado em camundongos, que também tiveram redução nos níveis de colesterol total (Yang *et al.*, 2008). Similarmente, Doudi *et al.* (2020) documentaram redução dos triglicerídeos e LDL-colesterol em coelhos, além do aumento nos níveis de HDL-colesterol. O perfil lipídico de roedores apresentou melhora em termos de redução do colesterol total, LDL-colesterol e triglicerídeos; bem como aumento de HDL-colesterol, após a administração de kombucha de *Salacca zalacca* (Zubaidah *et al.*, 2019).

1.1.7.5 Ação Anti-Hipertensiva

Assim como os níveis elevados de colesterol sérico configuram um fator de risco para as desordens cardiovasculares, a hipertensão arterial também representa uma condição preocupante nesse âmbito. A hipertensão pode ser conceituada como uma complicação crônica,

resultante da elevação persistente da pressão arterial (Morales, 2020). O sistema renina-angiotensina é o responsável pela regulação da pressão arterial, assim, o bloqueio desse sistema, principalmente a enzima conversora da angiotensina (ECA), tem sido investigado como uma estratégia para exercer efeitos hipotensivos no corpo humano (Chaudhary *et al.*, 2020).

Os flavonoides presentes na kombucha já foram documentados como potentes inibidores da ECA (Vitas *et al.*, 2020). Também podem promover o relaxamento da musculatura lisa, contribuindo com a redução dos riscos de desenvolvimento de hipertensão arterial (Leal *et al.*, 2018). Gamboa-Gómez *et al.* (2016) testaram o potencial inibitório da ECA para kombucha elaborada com *Eucalyptus camaldulensis*. Os resultados do estudo demonstraram que a bebida fermentada apresentou efeito inibitório semelhante ao captopril, que foi utilizado como controle. Kombuchas preparadas com chá de sabugueiro (*Sambucus nigra*) e urtiga (*Urtica dioica*) também apresentaram efeito inibitório significativo sobre a enzima conversora (Vitas *et al.*, 2020). Esses desfechos comprovam o potencial profilático e terapêutico que a kombucha pode desempenhar no organismo humano, atuando no espectro das doenças cardiovasculares e seus fatores de risco associados como a hipercolesterolemia e a hipertensão arterial.

1.1.8 Potenciais Riscos Para A Saúde Humana

A kombucha não é declarada como uma bebida tóxica para consumo humano. Contudo, alguns estudos relatam uma possível associação entre o consumo da bebida fermentada e quadros de hiponatremia, acidose láctica, complicações renais, pulmonar e hepática (Bailowitz *et al.*, 2017; Leal *et al.*, 2018; Holbourn; Hurdman, 2017). Esses quadros podem estar associados ao consumo excessivo de uma bebida com pH muito baixo (≤ 2). Ou ainda, ao processo de lixiviação de metais pesados provenientes do recipiente de preparo da kombucha. Ademais, o consumo de kombucha por indivíduos com problemas de saúde pré-existentes e suscetíveis à acidose, como HIV e insuficiência renal aguda, também pode desencadear efeitos colaterais atípicos (Leal *et al.*, 2018). Apesar dessas associações, a kombucha não pode ser considerada tóxica, uma vez que as evidências apresentadas não são substanciais para atestar sua toxicidade (Jayabalan *et al.*, 2014).

O consumo da bebida não é encorajado para gestantes, em virtude do possível teor de heparina proveniente do chá. A heparina consiste em um composto químico que inibe as proteínas do sistema de coagulação, o que provoca um distúrbio sanguíneo denominado hemofilia, ou “sangue fino”, como é popularmente conhecido (Bishop *et al.*, 2022; Kapp;

Summer, 2019). O consumo de kombucha também pode desencadear efeitos adversos à saúde bucal, pois a presença de taninos na bebida pode levar ao escurecimento dental. Além disso, em virtude do pH mais ácido, a kombucha pode ocasionar uma degradação do esmalte dentário (Bishop *et al.*, 2022). Contudo, essas intercorrências bucais estão mais associadas ao consumo excessivo e em longo prazo. Assim, apesar das implicações descritas, a kombucha não é considerada prejudicial para consumo humano. A dose diária recomendada e considerada segura para indivíduos saudáveis é de até 118 mL (Kapp; Sumner, 2019).

1.2 PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS

1.2.1 Conceito E Histórico

Existem diversas estimativas acerca do número de espécies de plantas identificadas mundialmente, contudo, não há um consenso na literatura que contemple sua totalidade. Segundo dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), existem cerca de 400.000 espécies de plantas reconhecidas, das quais 30.000 são comestíveis. Contudo, mesmo diante de tamanha diversidade existente, somente 150 culturas são produzidas em escalas significativas para fins de comercialização (FAO, 2020). Dentre essas culturas, destacam-se cereais como o milho, com uma produção mundial de mais de 1 bilhão de toneladas em 2018; o arroz (782.000.147 toneladas) e leguminosas como o feijão (30.434.280 toneladas), que perfazem cerca de 60% da ingestão calórica diária da população (FAOStat, 2018). Essas espécies reconhecidas como “tradicionais” ou “convencionais” são o principal alvo dos sistemas de produção agrícola modernos (Hunter *et al.*, 2019).

Para fins de conceituação, compreende-se como planta alimentícia ou comestível, aquela que apresenta uma ou mais partes que podem ser utilizadas na alimentação humana (raízes, tubérculos, folhas, brotos, flores, frutos e sementes) (FAO, 1992). Pautando-se nesse conceito, algumas espécies de plantas selvagens com aptidão alimentícia, reconhecidas pelas gerações mais atuais como “invasoras” ou “daninhas” ainda são culturas negligenciadas e subutilizadas (Hunter *et al.*, 2019). Em virtude disso, também são espécies pouco exploradas pela comunidade científica (Thongam; Konsam; Handique, 2016). Entretanto, alguns estudos têm direcionado os objetivos de suas pesquisas na investigação dessas culturas, empregando termos como “vegetal não convencional” (Ziegler *et al.*, 2020), “plantas selvagens comestíveis” (Chandra *et al.*, 2016), ou plantas alimentícias não convencionais (PANC) (Kinupp; Lorenzi, 2014).

Essas plantas não convencionais apresentam crescimento espontâneo, baixo custo, limitada exigência para cultivo, elevado potencial nutricional e são um relevante recurso

genético. A exclusão dessas espécies na alimentação cotidiana da população ocorreu em face à agricultura convencional, que limitou a dieta contemporânea a uma menor diversidade de culturas (Chandra *et al.*, 2016; Sato *et al.*, 2019). A distribuição das PANC é restrita a determinadas localidades ou regiões, em virtude disso exercem grande influência na alimentação e na cultura de populações tradicionais (Thongam; Kongsam; Handique, 2016). A Tabela 1 exemplifica algumas espécies de plantas consideradas não convencionais na alimentação dos brasileiros.

Historicamente a alimentação humana perpassou diversas alterações e modismos temporários, com forte influência da mídia, interesses econômicos e descobertas científicas. Diante deste cenário, a especialização dos conhecimentos sobre determinadas espécies de plantas ficou evidente, ao invés da diversificação alimentar. Assim, observa-se certa escassez de estudos voltados a um conhecimento mais profundo sobre as PANC (Kinupp; Lorenzi, 2014). Entretanto, algumas obras podem ser destacadas, a fim de enfatizar os primeiros registros das plantas que foram negligenciadas nas últimas décadas. A nível nacional, as publicações de Mattos (1954; 1978) sobre frutíferas nativas comestíveis, as quais foram desenvolvidas na região do Rio Grande do Sul, podem ser considerados os primeiros registros sobre espécies pouco convencionais para consumo à época. Ainda, na mesma região, Carneiro (1998; 2004) conduziu dois estudos sobre plantas intituladas como adventícias comestíveis ou ruderais com potencial alimentício, corroborando com o estudo de Kinupp (2007) sobre plantas alimentícias não convencionais, que foi desenvolvido na região metropolitana de Porto Alegre – RS. A pesquisa identificou cerca de 1,5 mil espécies nativas, das quais 311 apresentaram potencial comestível. Em 2010, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou o *Manual de Hortaliças Não Convencionais*, no qual algumas variedades de PANC são identificadas e seu consumo é incentivado por meio de receitas presentes no material (MAPA, 2010).

Ademais, é válido ressaltar que, de forma semelhante às plantas convencionais, a incidência de PANC em determinadas regiões pode variar conforme fatores climáticos, condições do solo e até mesmo histórico de ocupação da área (Kinupp; Lorenzi, 2014). Nas regiões da Argentina e México, foram registradas cerca de 1,3 toneladas/hectare e 2,1 toneladas/hectare, respectivamente, de fitomassa comestível composta por plantas não convencionais (Díaz-Bettancourt, 1999). Em um estudo publicado na Itália, foram identificadas 1.097 espécies de vegetais que poderiam ser utilizadas para diversificar a alimentação humana. A pesquisa foi baseada em uma revisão da *Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and*

Horticultural Crops, considerado o material mais completo e consistente para uma análise a nível global (Meldrum *et al.*, 2018).

Tabela 1 – Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) popularmente conhecidas no Brasil.

(Continua)

| Nome popular | Família | Espécie |
|------------------------------|------------------|----------------------------------|
| Abrunheiro-bravo | Rosaceae | <i>Prunus spinosa</i> |
| Aipo-dos-cavalos | Apiaceae | <i>Smyrnum olusatrum</i> |
| Aipo-chimarrão | Apiaceae | <i>Cyclospermum leptophyllum</i> |
| Alfafa | Fabaceae | <i>Medicago sativa</i> |
| Alfarrobeira | Fabaceae | <i>Ceratonia siliqua</i> |
| Araticum | Annonaceae | <i>Rollinia sylvatica</i> |
| Arnica do mato | Chenopodiaceae | <i>Chenopodium álbum</i> |
| Aroeira | Anacardiaceae | <i>Pistacia lentiscus</i> |
| Azedinha | Oxalidaceae | <i>Oxalis acetosella</i> |
| Azinheira | Fagaceae | <i>Quercus rotundifolia</i> |
| Beldroega | Portulacaceae | <i>Portulaca oleracea</i> |
| Brunéla ou prunela | Lamiaceae | <i>Prunella vulgaris</i> |
| Bolsa-de-Pastor | Brassicaceae | <i>Capsella bursa-pastoris</i> |
| Buva | Asteraceae | <i>Conyza bonariensis</i> |
| Brinco de princesa | Onagraceae | <i>Fuchsia magellanica</i> |
| Bertalha | Basellaceae | <i>Anredera cordifolia</i> |
| Café-do-mato | Boraginaceae | <i>Cordia ecalyculata</i> |
| Capuchinha | Tropaeolaceae | <i>Tropaeolum majus</i> |
| Chicória-do-Café | Asteraceae | <i>Cichorium intybus</i> |
| Cardo | Asteraceae | <i>Scolymus hispanicus</i> |
| Carquejinha | Asteraceae | <i>Baccharis articulata</i> |
| Chaya ou espinafre de árvore | Euphorbiaceae | <i>Cnidoscolus aconitifolius</i> |
| Chapéu-de-couro | Alismataceae | <i>Echinodorus grandiflorus</i> |
| Cebolinha-de-perdiz | Amaryllidaceae | <i>Nothoscordum gracile</i> |
| Cará-de-caboclo | Alstroemeriaceae | <i>Bomarea edulis</i> |
| Cimbalária-dos-muros | Plantaginaceae | <i>Cymbalaria muralis</i> |

(Conclusão)

| Nome popular | Família | Espécie |
|--------------------------|-----------------|---------------------------------|
| Dente-de-leão | Asteraceae | <i>Taraxacum officinale</i> |
| Espargo-bravo | Asparagaceae | <i>Asparagus acutifolius</i> |
| Espadanas | Typhaceae | <i>Thypha Latifolia</i> |
| Espinheiro branco | Rosaceae | <i>Crataegus monogyna</i> |
| Erva-das-pombas | Amaranthaceae | <i>Chamissoa altíssima</i> |
| Guaco | Asteraceae | <i>Mikania glomerata</i> |
| Ipê-roxo | Bignoniaceae | <i>Tabebuia avellanadae</i> |
| Lódão | Cannabaceae | <i>Celtis australis</i> |
| Marcela | Asteraceae | <i>Achyrocline satureioides</i> |
| Morugem ou erva- canária | Caryophyllaceae | <i>Stellaria Media</i> |
| Medronheiro | Ericaceae | <i>Arbutus unedo</i> |
| Murta | Myrtaceae | <i>Myrtus communis</i> |
| Parietária | Urticaceae | <i>Parietaria officinalis</i> |
| Papoula-do-brejo | Malvaceae | <i>Hibiscus striatus</i> |
| Picão ou Picão-preto | Asteraceae | <i>Bidens bipinnata</i> |
| Picão-branco | Asteraceae | <i>Galinsoga parviflora</i> |
| Serralha | Asteraceae | <i>Sonchus oleraceus</i> |
| Sabugueiro | Adoxaceae | <i>Sambucus australis</i> |
| Urtiga | Urticaceae | <i>Urtica dioica</i> |
| Zambujeiro | Oleaceae | <i>Olea europaea</i> |

Fonte: Adaptado de Kinupp; Lorenzi (2014).

1.2.2 Composição Físico-Química E Nutricional

O acrônimo PANC está relacionado às plantas que ainda não foram estudadas, ou pouco exploradas pela comunidade técnico-científica e pela sociedade, mas que apresentam potencial alimentício (Kinupp; Lorenzi, 2014). Dessa forma, embora muitos autores enfatizem a possibilidade de que as plantas não convencionais apresentem uma composição nutricional favorável para consumo humano, esse aspecto ainda é tido com uma lacuna dentre as publicações científicas. De modo geral, teores significativos de sais minerais, vitaminas, fibras, carboidratos, proteínas e compostos bioativos podem ser obtidos através destas espécies (Hunter *et al.*, 2019).

Em um estudo que avaliou a composição nutricional de oito PANC (*Musa balbisiana colla*, *Talinum triangulare*, *Chenopodium álbum*, *Stellaria media*, *Vitex nigando*, *Leucas plukenetii*, *Paederia foetida* e *Enhydra fluctuans*), o teor de proteína bruta variou entre 12,24% e 28,80%. Já o teor de carboidrato total oscilou entre 5,35% e 18,80%; enquanto os lipídios foram obtidos entre 2,06% e 6,16%. O conteúdo mineral total obtido pelo teor de cinzas variou de 11,58% a 24,58% (Chandra *et al.*, 2016). Esses resultados demonstram significativa variabilidade de nutrientes entre as diferentes espécies de plantas não convencionais. Contudo, essas divergências também podem ser observadas entre variedades da mesma espécie, o que foi observado no estudo de Otegbayo *et al.* (2018), que objetivou caracterizar 43 genótipos de inhame nigeriano. Na pesquisa o teor proteico variou entre 3,2% e 8,71%. A concentração de sacarose e amido diferiu entre 0,77% e 4,6%; e 49,57% e 86,73%, respectivamente. O teor de cinzas variou de 2,29% a 6,69% entre os genótipos, sendo o potássio identificado como o mineral mais abundante (775 mg/kg a 1890 mg/kg), seguido pelo ferro (10,71 mg/kg a 38,87 mg/kg) (Otegbayo *et al.*, 2018).

No que tange à concentração de substâncias bioativas, algumas espécies de PANC apresentam elevados teores de compostos fenólicos e flavonoides, e por consequência significativo potencial antioxidante (Bahadori *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2017). Rodrigues *et al.* (2020) determinaram o teor de fenóis totais (82 mg AG/100g) e a atividade antioxidante (19699 µg/100 mL – DPPH) da espécie *Cnidocolus aconitifolius* por diferentes métodos de extração e análise. O potencial antioxidante da variedade *Prunella vulgaris* determinado em seu estágio maduro de frutificação pelo método DPPH foi de 74,36% (CHEN *et al.*, 2018). Para a variedade *Rumex Acetosa* o maior conteúdo de compostos fenólicos obtido foi de 149 mg AG/g; enquanto a atividade antioxidante (DPPH) foi igual a 163,4 µg/mL (Santos *et al.*, 2017). Já a espécie *Stachys byzantina* apresentou maior

concentração de fenóis totais (58,06 mg AG/g), flavonoides (34,7 mg RE/g) e atividade antioxidante pelo método FRAP (312,44 mg TE/g), quando comparada às variedades *S. inflata* e *S. lavandulifolia* (Bahadori *et al.*, 2020).

Pautando-se nesses achados, é evidente que o amplo espectro de espécies de PANC confere divergências entre as famílias botânicas e seus gêneros. Ademais, o tipo de método empregado para extração e determinação de compostos, parece ser um dos fatores mais influentes no momento da caracterização. Portanto, as técnicas de extração das espécies devem estar alinhadas às possíveis aplicações do material vegetal. Além do potencial de aplicação das PANC na indústria alimentícia, é notório que o consumo das PANC pode conferir benefícios para a saúde humana, frente ao variado e robusto conteúdo de nutrientes e compostos bioativos.

1.2.3 Flores Comestíveis

As flores também podem ser consideradas partes comestíveis de algumas plantas e essas estruturas têm sido amplamente inseridas na alimentação humana (Garzón *et al.*, 2015). O comércio de flores comestíveis tem sido consolidado no mercado nacional e internacional. No Brasil, os estados de São Paulo e Minas Gerais destacam-se entre os maiores centros produtores (Barros *et al.*, 2020). Além de guarnecer pratos e conferir valor estético na alta gastronomia, as flores podem agregar valor funcional às preparações, porque são consideradas fontes de compostos bioativos (Chensom *et al.*, 2019; Garzón *et al.*, 2015). Algumas espécies de flores com aptidão alimentícia são ilustradas na Figura 3.

As espécies *Begonia*×*semperflorens-cultorum*, *Cosmos sulphureus*, *Lathyrus odoratus*, *Tropaeolum majus*, *Pentas lanceolate*, *Petunia*×*hybrida*, *Primula*×*polyantha*, *Purple Fragrance*, *Yves Piaget*, *Antirrhinum majus* e *Torenia fournieri* foram avaliadas quanto ao teor de compostos bioativos e atividade antioxidante no estudo de Chensom *et al.* (2019). A pesquisa registrou teores de compostos fenólicos totais entre 1,47 mg AG/100g e 13,08 mg AG/100g. Já a atividade antioxidante total variou de 31,82 µM TE/100g a 317,91 µM TE/100g. Similarmente, Garzón *et al.* (2015) investigaram o potencial antioxidante, o teor de compostos fenólicos e a concentração de antocianinas presentes em três variedades de flores de *Tropaeolum majus* (cores vermelho, laranja e amarelo). A maior concentração de antocianinas totais (114,5 mg Cy-3-glu/100g) e compostos fenólicos (908,7 mg AG/100g), bem como potencial antioxidante mais elevado (18719 µmol TE/100g) foram observados na flor vermelha.

Figura 3 – Características visuais de algumas espécies de flores comestíveis.



Nota: (1) *Chrysanthemum morifolium*; (2) *Prunus pérsica*; (3) *Jasminum sambac*; (4) *Calendula officinalis*; (5) *Gomphrena globosa*; (6) *Centaurea cyanus*; (7) *Tropaleum majus*; (8) *Hibiscus sabdariffa*; (9) *Clitoria ternatea*; (10) *Dalia mignon*; (11) *Cosmos sulphureus*; (12) *Papaver rhoeas*

Fonte: Autoria própria (2023).

1.2.3.1 Ipê Amarelo (*Handroanthus albus* (Cham.) Mattos)

O gênero *Handroanthus* pertence à família Bignoniaceae, e juntamente aos gêneros *Tabebuia* e *Roseodendron*, constituem um importante grupo de plantas neotrópicas distribuídas desde o sudoeste dos Estados Unidos ao norte da Argentina e Chile. As espécies florestais pertencentes a esses gêneros são popularmente conhecidas como ipês. Os ipês são reconhecidos e valorizados por suas características ornamentais e qualidade da madeira produzida (Grose; Olmstead, 2007). O período de floração se estende de junho a novembro, iniciando pelas variedades de flores da cor roxa e rosa, seguidas das amarelas e finalizando o ciclo com as inflorescências brancas. As florestas tropicais brasileiras dispõem de aproximadamente 40 tipos de espécies de ipês, com predomínio do gênero *Handroanthus* (Hamed *et al.*, 2020; Suo *et al.*, 2013).

A espécie de ipê amarelo *Handroanthus albus* (Cham.) Mattos ocorre naturalmente nos estados brasileiros, com ênfase às regiões sul e sudeste do país. A árvore pode alcançar até 30

metros de altura e 60 centímetros de diâmetro. As flores amarelas emergem entre os meses de julho a setembro, enquanto a maturação dos frutos inicia em outubro e se estende até novembro (Lohmann, 2020). Os frutos não são comestíveis e possuem uma aparência semelhante à de uma vagem revestida por uma membrana aveludada (Mattos, 1970). Já os tecidos florais possuem aptidão alimentícia e são mencionados como potenciais fontes de nutrientes (Kinupp; Lorenzi, 2014). A Figura 4 ilustra o conjunto floral da variedade *H. albus*. Contudo, a espécie ainda é pouco explorada pela comunidade científica, e as inflorescências não foram caracterizadas quanto à composição físico-química, características nutricionais e potencial de aplicação em produtos alimentícios.

Figura 4 – Flores amarelas da espécie florestal *Handroanthus albus*



Fonte: Autoria própria (2023).

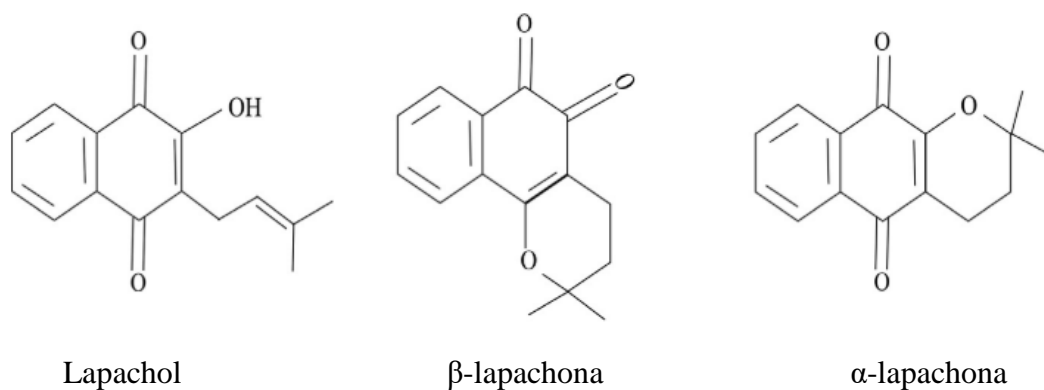
Dentre os estudos já documentados, Ferreira *et al.* (2020) observaram atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias interessantes provenientes das folhas de *H. albus*. Já os extratos da casca de *H. albus* inibiram significativamente a multiplicação de linhagens celulares MCF-7 (câncer de mama) e Caco-2 (adenocarcinoma colorretal) (Carlotto *et al.*, 2020). Os resíduos da casca provenientes do processamento da madeira, também foram eficientes como material adsorvente para descontaminação de efluentes (Hernandes *et al.*, 2019). As sementes de *H. albus* foram utilizadas como matéria-prima em um estudo que objetivou padronizar uma metodologia de extração e visualização do perfil proteico (Shibata *et al.*, 2011). A espécie também já foi explorada em estudos voltados à indústria madeireira (Lima *et al.*, 2020) e sistemas agroflorestais (Ortiz; Benayas; Cayuela *et al.*, 2022).

Em complemento, outras variedades de ipê amarelo pertencentes ao gênero *Tabebuia* como *T. chrysantha* e *T. aurea* já foram investigadas quanto às atividades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana. O interior da casca da espécie *T. chrysantha* demonstrou ser um

potente recurso natural antioxidante (Garzón-Castaño *et al.*, 2018), enquanto a variedade *T. aurea* reduziu a atividade hemorrágica e inflamatória decorrente da picada de serpente em roedores (Reis *et al.*, 2014). Contrariamente, o genótipo *T. aurea* não demonstrou atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro* (Tomazeli *et al.*, 2020). Já o ipê roxo (*Tabebuia avellanedae*) representa a variedade com maior número de investigações científicas até o presente. Na literatura são encontrados registros acerca dos possíveis efeitos anti-inflamatórios, antibacterianos, potencial neuroprotetor e melhora do prognóstico em quadros de obesidade, obtidos através dos compostos extraídos da casca e das flores de ipê roxo (Suo *et al.*, 2013; Iwamoto *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2019).

Além do potencial paisagístico dos ipês, há relatos de que as espécies dos gêneros *Tabebuia* e *Handroanthus* podem ser consideradas fontes de compostos bioativos, os quais possuem atividades farmacológicas favoráveis para a saúde humana (Hamed *et al.*, 2020). A β -lapachona, por exemplo, consiste em um metabólito secundário da classe das quinonas, que se encontra naturalmente na casca das variedades de ipê. Esse composto, de maneira semelhante à α -lapachona, deriva do lapachol, conforme demonstrado na Figura 5 (Mokarizadeh *et al.*, 2020). A β -lapachona foi associada a uma potente atividade citotóxica, visto que pode atuar na interrupção do ciclo celular e impedir a proliferação de células cancerosas. Além disso, a β -lapachona pode apresentar efeitos imunomoduladores e atuar como um composto antioxidante (Löcken *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2020). Oliveira *et al.* (2020) observaram redução da resposta inflamatória sistêmica, melhora na depuração bacteriana e aumento da capacidade antioxidante sérica de camundongos septicêmicos tratados com β -lapachona intraperitoneal. Além disso, no estudo de Löcken *et al.* (2018), os testes *in vitro* comprovaram o potencial da β -lapachona em induzir o processo apoptótico de células cancerosas (MDA-MB-231 e K562).

Figura 5 – Estrutura química do lapachol, β -lapachona e α -lapachona



Fonte: Mokarizadeh *et al.* (2020)

1.2.3.2 Capuchinha (*Tropaeolum majus*)

A espécie *Tropaeolum majus* configura um tipo de planta rústica de porte herbáceo, pertencente à família Tropaeolaceae. É uma espécie nativa do Peru, México e regiões da América Central, sendo cultivada principalmente na América do Sul como planta ornamental e medicinal (Valsalam *et al.*, 2019). Popularmente conhecida como capuchinha, a espécie *T. majus* apresenta flores vistosas que podem ser de coloração branca, amarela, laranja ou vermelha (Ebert *et al.*, 2021). As folhas verdes apresentam aspecto plano, liso e carnososo. A planta pode atingir comprimentos entre 2 e 3 metros, e 30 a 40 centímetros de altura. Na Figura 6, é possível observar as características do tecido floral e das folhas da variedade de capuchinha laranja. O crescimento da espécie é rápido e perene, com melhor desenvolvimento em regiões de clima tropical e nas estações mais quentes como primavera e verão (Sartori *et al.*, 2020). Historicamente acredita-se que o termo “*Tropaeolum*” deriva do grego “*tropaion*” (tropa), em virtude do formato das folhas que remetem a um escudo, e as flores que lembram a estrutura de um capacete (Reis, 2006).

Figura 6 – Flores e folhas da variedade de capuchinha (*Tropaeolum majus*) laranja



Fonte: Autoria própria (2023).

A capuchinha se caracteriza como uma planta comestível porque, tanto as folhas, quanto as flores e sementes podem ser consumidas (Garzón *et al.*, 2015). Assim, além de agregar valor sensorial às preparações, principalmente no que tange à aparência dos pratos, a espécie também se destaca por seu perfil nutricional. Diversos compostos como flavonoides, ácidos graxos essenciais, vitamina C e luteína são encontrados naturalmente na planta (Barros *et al.*, 2020). Essas substâncias apresentam potencial antiproliferativo contra células cancerosas, efeitos

benéficos na melhora do prognóstico de quadros hipertensivos, inflamatórios e infecções das vias urinárias (Valsalam *et al.*, 2019).

Em termos de compostos bioativos e potencial antioxidante, a espécie *T. majus* apresenta destaque quando comparada a outras espécies de flores comestíveis. Barros *et al.* (2020) observaram uma concentração de flavonóis (33,77%), carotenoides (53,23%) e potencial antioxidante (49,38 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$) mais robustos nas pétalas de capuchinha vermelha, quando comparada à variedade laranja e às espécies *Amaranthus hypochondriacus* e *Spilanthus oleracea*. Esses resultados corroboram com os achados de Chensom *et al.* (2019), que identificaram elevada atividade antioxidante (52,17 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$) em amostras de capuchinha laranja, em um comparativo de treze variedades de flores comestíveis. No estudo de Garzón *et al.* (2015), foi possível observar que as variações no teor de compostos bioativos da espécie também ocorrem entre os genótipos. A concentração de antocianinas foi significativamente mais elevada na flor vermelha (114,5 mg Cy-3-glu/100g), quando comparada à laranja (58,2 mg Cy-3-glu/g) e amarela (31,9 mg Cy-3-glu/100g). Assim, a atividade antioxidante da variedade vermelha ($18.719 \pm 696 \mu\text{mol TE}/100\text{g}$) também foi superior em relação às variedades laranja ($11.790 \pm 1570 \mu\text{mol TE}/100\text{g}$) e amarela ($7111 \pm 3545 \mu\text{mol TE}/100\text{g}$).

Os compostos bioativos da capuchinha também apresentaram viabilidade para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas, conforme documentado por Silva e Silva (2020). Os autores observaram que os compostos antioxidantes presentes em extratos de *T. majus* conferiram maior estabilidade e minimizaram o processo oxidativo do fármaco cetoconazol. Além disso, a espécie parece desempenhar ação antibacteriana para *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e *Pseudomonas aeruginosa*; e atividade fungicida para *Peniillum notatum*, *Trichoderma viridiae*, *Mucor spp.*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans*, conforme observado por Valsalam *et al.* (2019). Além disso, o tratamento *in vitro* de células cancerosas MCF7 foi significativamente suprimido, após aplicação dos extratos de *T. majus* (Valsalam *et al.*, 2019).

1.2.4 Toxicidade

Embora muitas pesquisas já tenham caracterizado e comprovado o potencial bioativo e nutricional de diversas espécies de PANC, ainda são escassas as investigações acerca do potencial toxigênico dessas plantas. Os metabólitos secundários são produzidos pelos vegetais como um mecanismo de defesa contra agentes externos ou outras espécies circundantes. Dentre esses metabólitos destacam-se os taninos, fitatos, saponinas, oxalatos entre outros (Kato-

Noguchi; Kurniadie, 2020). Quando sintetizados em excesso nas plantas e em contato com o organismo humano, essas substâncias podem atuar como agentes antinutricionais, prejudicando o processo absorptivo de diversos micronutrientes (Schlemmer *et al.*, 2009), além de afetar a integridade e o funcionamento de vísceras e sistemas como fígado (Erhirhie; Ilodigwe, 2019; Kristanc; Kreft, 2016), rins (Barbosa-Ferreira *et al.*, 2005; Erhirhie; Ilodigwe, 2019), codificação genética (Lemos *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2000), sistema nervoso central (Dampc; Luczkiewicz, 2015), sistema hematopoiético (Erhirhie; Ilodigwe, 2019; Yen; Chen; Peng, 2001) e sistema gastrointestinal (Dampc; Luczkiewicz, 2015).

A toxicidade hepática parece ser a lacuna de maior interesse dentre as investigações já realizadas com espécies não convencionais. Os genótipos *Tabebuia impetiginosa* (Lemos *et al.*, 2012), *Guizotia abyssinica*, *Phalaris canariensis*, *Panicum miliaceum* (Lima *et al.*, 2021), *Talinum paniculatum* (Tolouei *et al.*, 2019), *Acorus calamus* (Shah *et al.*, 2012) e *Chrysanthemum morifolium* (Li *et al.*, 2010) não demonstraram efeito hepatotóxico em experimentos *in vivo*. Enquanto as variedades *Dryopteris filix-mas* e *Plantago australis* demonstraram atividade tóxica sobre a função hepática de roedores (Erhirhie; Ilodigwe, 2019; Kristanc; Kreft, 2016). O extrato hidroetanólico das sementes de *Moringa oleífera* apresentou efeito citotóxico sobre células de fígado suíno (PLP2) (Fernandes *et al.*, 2021). Os metabólitos secundários das PANC estão associados à toxicidade hepática, porque podem danificar os hepatócitos e a membrana que recobre o fígado. Esses danos levam a um extravasamento de enzimas hepáticas como *alanina aminotransferase* (ALT), *aspartato aminotransferase* (AST) e *transaminase oxalacética* (TGO), provocando um desequilíbrio desses agentes em níveis séricos (Ogunola; Afolayan, 2017). Assim como a hepatotoxicidade, os efeitos deletérios das PANC sobre a função renal também configuram um campo de interesse dentre as publicações científicas. A concentração excessiva de fatores antinutricionais nas PANC como taninos e saponinas, pode desencadear prejuízo aos tecidos renais. Esses danos levam ao acúmulo sérico de substâncias como creatinina e uréia, em virtude do comprometimento da depuração renal (Ogbonnaya; Uadia, 2016). A espécie *Senna occidentalis* provocou lesões discretas nos túbulos contorcidos proximais de roedores (Barbosa-Ferreira *et al.* 2005), enquanto a variedade *Dryopteris filix-mas* desencadeou aumento dos níveis circulantes de uréia e creatinina (Erhirhie; Ilodigwe, 2019). Em contrapartida, os genótipos *Gmelina arborea* (Kulkarni; Veeranjanyulu, 2010), *Vernonia cinerea* (Latha *et al.*, 2010), *Talinum paniculatum* (Tolouei *et al.*, 2019) e *Acorus calamus* (Shah *et al.*, 2012) não interferiram negativamente na citoarquitetura e funcionamento renal.

Algumas espécies de PANC demonstraram efeitos nocivos em termos de alterações genéticas e desempenho dos sistemas nervoso central (SNC), hematopoiético e gastrointestinal. Lesões na molécula de DNA de linfócitos, hepatócitos e células renais foram desencadeadas pelas espécies *Solanum nigrum*, *Tabebuia impetiginosa* e *Echinodorus macrophyllus*, respectivamente (Lemos *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2000). Extratos de *Rhododendron groenlandicum*, *Rhododendron tomentosum* e *Rhododendron neoglandulosum* foram associados a distúrbios neurológicos como letargia, falta de coordenação e paralisia progressiva, em virtude da presença de substâncias tóxicas como ledol sesquiterpenóide e graianotoxina (Dampc; Luczkiewicz, 2015). No que tange ao sistema hematopoiético, Erhirhie e Iodigwe (2019) documentaram aumento na concentração de eritrócitos e redução de leucócitos provocada pela espécie *Dryopteris filix-mas*; enquanto a variedade *Solanum nigrum* desencadeou uma redução de linfócitos humanos (Yen; Chen; Peng, 2001). De forma similar ao SNC, as variedades *R. groenlandicum*, *R. tomentosum* e *R. neoglandulosum* provocaram alterações gastrointestinais como vômito e redução da absorção de ferro, em virtude do elevado teor de taninos detectados nos extratos (Dampc; Luczkiewicz, 2015).

Em síntese, a toxicidade das PANC para o organismo humano parece estar intimamente associada a concentrações elevadas de metabólitos secundários, em níveis acima do teor considerado tolerável para ingestão, bem como à exposição crônica dos órgãos e tecidos a essas substâncias. Além disso, o tipo de composto antinutricional pode variar de acordo com a espécie. Portanto, investigações acerca da toxicidade de cada genótipo são encorajadas, visando embasar diretrizes seguras para consumo humano.

CAPÍTULO 2 - INFUSÃO DE IPÊ AMARELO (*Handroanthus albus*) COMO SUBSTRATO ALTERNATIVO PARA FERMENTAÇÃO DE KOMBUCHA

RESUMO: A kombucha é uma bebida fermentada resultante dos processos metabólicos de bactérias e leveduras, organizadas em uma matriz celulósica (SCOBY) imersa em chá preto adoçado. Outras opções de chá para fermentação podem ser empregadas, visando aperfeiçoar as características funcionais e sensoriais da kombucha. As inflorescências da espécie florestal *Handroanthus albus* (ipê amarelo) apresentam potencial alimentício e representam uma alternativa promissora para infusões. O presente estudo teve como proposta o desenvolvimento de kombuchas fermentadas com extratos de *H. albus*. O planejamento experimental do tipo Box-Behnken foi aplicado para otimizar os parâmetros de extração de compostos bioativos das pétalas de ipê amarelo, e determinar as condições ideais de fermentação de kombucha à base de chá preto. Posteriormente, realizou-se a cinética de fermentação das kombuchas adicionadas de ipê, buscando compreender os efeitos do tempo e do substrato nas características da bebida final. O comportamento da bebida com infusão floral se assemelhou ao da kombucha padrão em termos de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante. Contudo, ganho de massa microbiana foi mais lento e menos robusto nas amostras com adição de ipê. Houve uma diminuição nos valores de pH em todas as amostras, estando em conformidade com as normativas estabelecidas. A kombucha adicionada de *H. albus* favoreceu a síntese de ácido glucurônico em comparação à bebida padrão. Essa descoberta representa um resultado de suma importância nesta investigação, evidenciando-se como um avanço relevante no contexto científico atual.

Palavras-chave: Flores comestíveis. Atividade antioxidante. Ácido glucurônico. β -lapachona. Cromatografia Líquida.

2.1 INTRODUÇÃO

A kombucha consiste em uma bebida resultante da fermentação de bactérias e leveduras onde a maioria encontra-se imobilizada em uma matriz celulósica denominada SCOBY (*Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast*) (Cardoso *et al.*, 2020). Quando imerso em um substrato nutritivo, esse complexo simbiótico inicia o processo de fermentação. As matérias-primas tradicionalmente utilizadas como substrato são o chá-preto e a sacarose. Variações de chás provenientes das folhas de *Camellia sinensis* como o chá verde, branco e *oolong* têm sido utilizados na fermentação de kombucha (Bishop *et al.*, 2022). Outros substratos alternativos com a aplicação de especiarias como a canela (*Cinnamomum verum*), cardamomo (*Elettaria cardamomum*) e tomilho (*Zataria multiflora* Boiss) (Shahbazi *et al.*, 2018); ou ainda, infusões de chá Zijuan (Zou *et al.*, 2021) e *Rhizophora mucronata* (Hardoko *et al.*, 2020), já foram testados. As flores comestíveis também configuram um material vegetal com potencial para fermentação de kombuchas. Espécies de flores como *Achillea millefolium* (Vitas *et al.*, 2018),

Echinacea (Özyurt, 2020), *Malvaviscus arboreus* (Silva *et al.*, 2021) e *Clitoria ternatea* (Wongthai *et al.*, 2021) foram exploradas por alguns autores, que obtiveram desfechos satisfatórios em termos de compostos bioativos e atividade antioxidante nas bebidas.

O complexo processo de fermentação da kombucha confere à bebida final uma composição físico-química e nutricional favorável para consumo humano. A bebida é composta por vitaminas (B1, B2, B6, B12 e C), minerais (manganês, ferro, zinco,), açúcares, proteínas, polifenóis e ácidos orgânicos (acético, glucurônico, láctico, cítrico e málico) (Morales, 2020). Os polifenóis e os ácidos acético e glucurônico são os principais compostos associados aos efeitos profiláticos e terapêuticos da kombucha na saúde. O efeito sinérgico desses componentes pode promover ação antioxidante, detoxificante e fortalecimento do sistema imunológico (Bishop *et al.*, 2022).

Além disso, há indícios que os polifenóis da kombucha podem atuar na prevenção de complicações cardiovasculares, porque regulam o metabolismo do colesterol (Doudi *et al.*, 2020), enquanto o ácido glucurônico é descrito como o principal componente potencializador das funções hepáticas (Kapp; Sumner, 2019; Leal *et al.*, 2018). Efeitos anti-hipertensivo, antiglicêmico e antitumoral também são apontados como característicos da kombucha (Bishop *et al.*, 2022). A presença e a concentração dos compostos funcionais na kombucha varia conforme os parâmetros de fermentação como a microbiota do SCOBY, concentração de sacarose, tipo de chá, tempo e temperatura (Leal *et al.*, 2018).

A espécie florestal *Handroanthus albus* (Cham.) Mattos, pertence à família *Bignoniaceae*, sendo popularmente conhecida como ipê amarelo. A árvore consiste em uma espécie nativa amplamente distribuída no Brasil. Comumente seu cultivo ocorre para fins ornamentais, mas as propriedades medicinais da casca e das folhas do ipê amarelo têm sido exploradas com objetivos etnofarmacológicos (Hernandes *et al.*, 2019). Estudos anteriores documentaram efeitos benéficos do gênero *Handroanthus* em quadros de úlcera gástrica (Pereira *et al.*, 2013), redução da proliferação de células cancerosas (Carlotto *et al.*, 2020; Queiroz *et al.*, 2008; Sichaem *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015), e potencial ação antinociceptiva e anti-inflamatória (Ferreira *et al.*, 2020). Esses desfechos foram associados principalmente aos metabólitos secundários presentes na casca e nas folhas do gênero, como as naftoquinonas (lapachol e β -lapachona) e o polissacarídeo conhecido como arabinogalactana tipo II (Carlotto *et al.*, 2020; Ferreira *et al.*, 2020).

Dentre os achados científicos sobre as espécies pertencentes à família *Bignoniaceae*, destacam-se pesquisas com os genótipos *H. impetiginosus*, *H. barbatus*, *H. incanus*, e *H.*

billbergii (Hamed *et al.*, 2020). Entretanto, a variedade *H. albus* ainda é pouco explorada e não há registros acerca das características físico-químicas, perfil nutricional e potencial funcional das flores. Esses tecidos florais apresentam potencial alimentício (Kinupp; Lorenzi, 2014), e, portanto, configuram um potente recurso natural para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios, visando ampliar as possibilidades de consumo das inflorescências. Assim, o preparo de infusões com flores de ipê amarelo pode ser uma alternativa de substrato com potencial para a fermentação de kombucha, visando agregar valor funcional e promover inovações no mercado de bebidas fermentadas. Pautando-se nesses argumentos, esta pesquisa objetivou desenvolver e caracterizar uma bebida fermentada por microrganismos da kombucha com extratos de *H. albus*.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Materiais

2.2.1.1 Material vegetal

A coleta das flores de *Handroanthus albus* (Cham.) Mattos ocorreu no campus da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) (25°05'23.0"S 50°06'03 0"W), Ponta Grossa, Paraná, Brasil. As flores foram colhidas das árvores com auxílio de um colhedor manual de frutas. Em seguida, as inflorescências foram separadas dos pedúnculos e higienizadas com água destilada para remoção das impurezas. Posteriormente o material vegetal foi armazenado em sacos de polietileno selados, sob congelamento em *ultrafreezer* a -86 °C (NuAire®, Glacier NU-9668, Minnesota, EUA) até o momento das análises. A exsicata da espécie vegetal foi autenticada pelo herbário da UEPG e encontra-se tombada na carpoteca sob o espécime de código HU-22804 (Anexo A). O projeto encontra-se cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) do Ministério do Meio Ambiente do Brasil (registro# A20820A). O chá preto (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), (Leão Alimentos e Bebidas Ltda®, Fazenda Rio Grande-PR, Brasil) utilizado para a fermentação das kombuchas foi adquirido no comércio local do mesmo município de coleta das flores.

2.2.1.2 Symbiotic culture of bacteria and yeast

A colônia mãe (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast* – SCOBY) utilizada para o desenvolvimento das kombuchas foi obtida de fonte certificada (*The Kombucha Hub*®, Laboratório *White Labs*, Frankfurt, Alemanha) em sua forma hidratada. De acordo com a descrição do fabricante, a placa celulósica era composta pela presença das seguintes 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.

2.2.1.3 Reagentes químicos

Os reagentes Folin-Ciocalteu, ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)), DPPH (2,2-difenil-2-picrilhidrazil), Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico), TPTZ (2,4,6-Tris(2-Pyridyl)-S-Triazine), β -lapachona e demais padrões para análise cromatográfica de ácidos orgânicos e açúcares foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA). O metanol, o ácido acético e a acetonitrila com grau HPLC foram obtidos da J.T.Baker® (Phillipsburg, NJ, EUA). Os demais reagentes de grau analítico hidróxido de sódio e nitrito de sódio foram obtidos da Merck® (Darmstadt, Alemanha); cloreto de alumínio da FLUKA® (St. Louis, MO, EUA); carbonato de sódio, acetato de sódio anidro, cloreto de ferro e ácido clorídrico da BIOTEC® (Cotia, SP, Brasil); e água ultrapura (Milli-Q®, Millipore, SP, Brasil).

2.2.1.4 Outros materiais

O açúcar cristal (Camil Alimentos S/A®, São Paulo, Brasil) utilizado como fonte de carbono para o desenvolvimento das kombuchas, foi adquirido em comércio local do município de Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

2.2.2 Métodos

2.2.2.1 Otimização da extração de compostos bioativos das pétalas de *Handroanthus albus*

Os extratos de ipê amarelo foram obtidos por infusão das pétalas em água destilada (25 mL) dentro de *erlenmeyers* (capacidade de 100 mL), os quais foram devidamente vedados com filme PVC (policloreto de vinila). Esse processo ocorreu sob aquecimento constante em banho-maria, seguindo as quantidades, tempos e temperaturas de infusão especificados na Tabela 2. Em seguida, as infusões foram filtradas em papel filtro qualitativo Whatman n° 1 (Whatman, Sigma Aldrich®, St Louis, MO, USA) para retenção dos tecidos florais e partículas sólidas.

A otimização dos parâmetros de extração das pétalas de ipê amarelo foi realizada de acordo com planejamento experimental proposto por Box e Behnken (1960). No processo de extração, os efeitos das variáveis independentes Concentração de pétala (X_1), tempo (X_2) e

temperatura de infusão (X_3) foram avaliados com três níveis (Tabela 2). Assim, o desenho experimental consistiu em 15 combinações de tratamento (EI1 a EI15) com três repetições do ponto central, e executado em ordem aleatória para minimizar variações inesperadas. Os intervalos estabelecidos para cada variável foram determinados em testes prévios, pautando-se na concentração de compostos fenólicos totais. Esse delineamento foi realizado com vistas a identificar padrões de resposta, e determinar modelos para maximizar o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides e potencial antioxidante dos extratos.

Tabela 2 – Planejamento fatorial Box-Behnken aplicado para otimizar a extração de compostos das pétalas de *Handroanthus albus* (ipê amarelo).

| Experimento | Concentração de pétala (g/L); X_1 | | Tempo de infusão (minutos); X_2 | | Temperatura ($^{\circ}$ C); X_3 | |
|-------------|-------------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|------------------------------------|-------|
| | Valor | Valor | Valor | Valor | Valor | Valor |
| | codificado | real* | codificado | real | codificado | real |
| EI 1 | -1 | 32 | -1 | 5 | 0 | 75 |
| EI 2 | +1 | 80 | -1 | 5 | 0 | 75 |
| EI 3 | -1 | 32 | +1 | 15 | 0 | 75 |
| EI 4 | +1 | 80 | +1 | 15 | 0 | 75 |
| EI 5 | -1 | 32 | 0 | 10 | -1 | 60 |
| EI 6 | +1 | 80 | 0 | 10 | -1 | 60 |
| EI 7 | -1 | 32 | 0 | 10 | +1 | 90 |
| EI 8 | +1 | 80 | 0 | 10 | +1 | 90 |
| EI 9 | 0 | 56 | -1 | 5 | -1 | 60 |
| EI 10 | 0 | 56 | +1 | 15 | -1 | 60 |
| EI 11 | 0 | 56 | -1 | 5 | +1 | 90 |
| EI 12 | 0 | 56 | +1 | 15 | +1 | 90 |
| EI 13 | 0 | 56 | 0 | 10 | 0 | 75 |
| EI 14 | 0 | 56 | 0 | 10 | 0 | 75 |
| EI 15 | 0 | 56 | 0 | 10 | 0 | 75 |

Nota – X_1 ; X_2 ; X_3 : codificações das variáveis Concentração de pétalas, Tempo de infusão e Temperatura, respectivamente, aplicadas em três níveis no planejamento experimental. *Uma unidade de flor de ipê amarelo corresponde a aproximadamente 1 g de pétalas.

2.2.2.2 Otimização das kombuchas com infusão de *Camellia sinensis*

O chá de *Camellia sinensis* foi preparado conforme protocolo descrito por Zielinski *et al.* (2014). A metodologia prevê a imersão das folhas secas em água destilada aquecida (80 °C), em um frasco de vidro com tampa (capacidade de 2 L) para evitar a evaporação, por um período de 7 min e 30 s sob agitação magnética. Posteriormente, a decocção foi filtrada em papel filtro qualitativo Whatman n° 1 (Whatman, Sigma Aldrich®, St Louis, MO, USA) e transferida para um recipiente fermentador de vidro com capacidade de 400 mL.

O desenvolvimento das kombuchas foi iniciado com a adição de sacarose aos fermentadores previamente adicionados de chá preto. Após o resfriamento da mistura (≤ 25 °C), a colônia de microrganismos fermentadores (SCOBY) (2,5% m/v; em base úmida) e 10% (v/v) de kombucha fermentada anteriormente foram adicionadas ao conjunto. Esses procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar (Quimis®, Q216F21H, São Paulo, Brasil), visando manter um ambiente de preparo estéril. Posteriormente, os fermentadores foram vedados com tecido poroso de poliéster, para fornecer uma condição de aerobiose crucial para a fermentação da kombucha. Os frascos foram mantidos em incubadora BOD (SPLABOR®, SP-500, São Paulo, Brasil) em diferentes temperaturas (Tabela 3), por um período de 12 dias. Após o processo fermentativo, o SCOBY foi retirado e as bebidas fermentadas foram armazenadas (-18 °C) (Gelopar®, GPC-57, Curitiba, Brasil) até o momento das análises.

Com vistas a otimizar as condições de fermentação das kombuchas à base de chá preto, o planejamento experimental Box-Behnken (1960) foi empregado. O efeito das variáveis independentes concentração de chá preto (X_1), concentração de sacarose (X_2) e temperatura de fermentação (X_3), com três níveis, foram avaliados (Tabela 3). O desenho experimental resultou em 15 combinações de tratamento (KP1 a KP15) com três pontos centrais, o qual foi executado em ordem aleatória. Os intervalos máximos e mínimos determinados para cada variável foram pautados em resultados já documentados na literatura (Miranda *et al.*, 2022). Esse planejamento foi realizado visando identificar os padrões de resposta e estabelecer modelos para maximização do teor de compostos fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante (ABTS, FRAP e DPPH), bem como minimizar o teor de ácido acético.

Tabela 3 – Planejamento fatorial Box-Behnken aplicado para obtenção das kombuchas com diferentes concentrações de chá preto, sacarose e temperatura de fermentação.

| Experimento | Concentração de chá preto (g/L); X ₁ | | Concentração de sacarose (g/L); X ₂ | | Temperatura (°C); X ₃ | |
|-------------|---|-------|--|-------|----------------------------------|-------|
| | Valor | Valor | Valor | Valor | Valor | Valor |
| | codificado | real | codificado | real | codificado | real |
| KP1 | -1 | 4 | -1 | 50 | 0 | 25 |
| KP2 | +1 | 12 | -1 | 50 | 0 | 25 |
| KP3 | -1 | 4 | +1 | 150 | 0 | 25 |
| KP4 | +1 | 12 | +1 | 150 | 0 | 25 |
| KP5 | -1 | 4 | 0 | 100 | -1 | 20 |
| KP6 | +1 | 12 | 0 | 100 | -1 | 20 |
| KP7 | -1 | 4 | 0 | 100 | +1 | 30 |
| KP8 | +1 | 12 | 0 | 100 | +1 | 30 |
| KP9 | 0 | 8 | -1 | 50 | -1 | 20 |
| KP10 | 0 | 8 | +1 | 150 | -1 | 20 |
| KP11 | 0 | 8 | -1 | 50 | +1 | 30 |
| KP12 | 0 | 8 | +1 | 150 | +1 | 30 |
| KP13 | 0 | 8 | 0 | 100 | 0 | 25 |
| KP14 | 0 | 8 | 0 | 100 | 0 | 25 |
| KP15 | 0 | 8 | 0 | 100 | 0 | 25 |

Nota – X₁; X₂; X₃: codificações das variáveis Concentração de chá preto, Concentração de sacarose e Temperatura, respectivamente, aplicadas em três níveis no planejamento experimental.

2.2.2.3 Cinética de fermentação de kombucha com extrato de *Handroanthus albus*

Os parâmetros otimizados nos extratos de ipê amarelo e na fermentação de kombucha à base de chá preto, foram considerados como base para a cinética de fermentação da kombucha com adição de extratos de ipê amarelo. O protocolo de preparo das kombuchas foi realizado de forma similar às etapas descritas no item 2.2.2.2. As bebidas foram desenvolvidas com uma proporção de 50% de extrato de ipê amarelo e 50% de chá preto. Essa proporção foi determinada com base em testes sensoriais prévios para avaliar o sabor das bebidas (dados não

apresentados). A kombucha fermentada com 100% de chá preto também foi analisada como amostra controle.

As amostras das bebidas foram coletadas no tempo 0 e após 1, 3, 5, 7 e 10 dias de fermentação. Assim, o experimento totalizou 12 fermentadores (Tabela 4), que foram distribuídos e codificados de acordo com o respectivo tempo de fermentação e proporção de mistura. Ao findar do tempo de fermentação de cada frasco, os SCOBYS foram removidos e as amostras armazenadas (-18 °C) até o momento das análises. As bebidas obtidas na cinética de fermentação foram avaliadas quanto à massa seca de SCOBY formado; pH; concentração de compostos fenólicos totais; flavonoides; atividade antioxidante (ABTS, FRAP DPPH); e ácidos orgânicos (glucurônico, ascórbico e acético).

Tabela 4 – Distribuição e codificação dos fermentadores de kombucha de *Handroanthus albus* (ipê amarelo) e chá preto de acordo com o tempo de fermentação.

| Tempo de fermentação (dias) | Kombucha padrão ¹ | Kombucha controle ² | Kombucha com ipê amarelo ³ |
|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|--|
| | Codificação | | |
| 0 | KP0 | KCT0 | KI0 |
| 1 | KP1 | KCT1 | KI1 |
| 3 | KP3 | KCT3 | KI3 |
| 5 | KP5 | KCT5 | KI5 |
| 7 | KP7 | KCT7 | KI7 |
| 10 | KP10 | KCT10 | KI10 |
| Total de fermentadores | 6 | 6 | 6 |

Nota: ¹Kombuchas com 100% de chá preto, segundo parâmetros otimizados; ²Kombuchas com 50% de chá preto e 50% de água; ³Kombucha com 50% de chá preto e 50% de extrato de ipê amarelo.

2.2.3 Análises

2.2.3.1 Análises físico-químicas

O Potencial Hidrogeniônico (pH) das kombuchas foi analisado em triplicata, os resultados foram obtidos por leitura direta em pHmetro de bancada (Tec -3 MP, Tecnal®, São Paulo, Brasil) calibrado em pH 4,0 e 7,0; a uma temperatura de 20 °C. A massa de SCOBY formada na fermentação das kombuchas, em base seca, foi obtida após secagem em estufa (Quimis®, Q317M, São Paulo, Brasil) a 105 °C até peso constante.

2.2.3.2 Compostos fenólicos totais

A concentração de compostos fenólicos totais dos extratos de ipê amarelo e das kombuchas foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu (Singleton; Rossi, 1965). A análise foi realizada em tubos de ensaio com a adição de água destilada (8,4 mL), 100 µL de amostra e 500 µL de Folin-Ciocalteu 0,2 mol L⁻¹. A mistura foi homogeneizada em agitador para tubos (Vórtex, Vision Scientific®, Daejeon, Coreia do Sul) e após 3 minutos receberam a adição de 1000 µL de Na₂CO₃ 1,0 mol L⁻¹. Após, as amostras foram acomodadas na ausência de luz por uma hora. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (Epoch, Synergy-BioTek®, Winooski, EUA), no comprimento de onda de 765 nm. Para realização do branco as amostras foram substituídas por água deionizada. O ácido gálico (20 a 200 mg/L) foi utilizado como padrão para a curva de calibração do composto ($y = 0,000772x + 0,001610$; $R^2 = 0,989$).

2.2.3.3 Flavonoides totais

A concentração de flavonoides totais dos extratos e das bebidas de kombucha foi obtida por meio do método descrito por Zhishen e Mengcheng (1999). A quantificação do composto foi realizada em tubos de ensaio contendo 2 mL de água deionizada, aos quais foram adicionados 250 µL de amostra e 120 µL de NaNO₂ (0,5 mol/L) com posterior agitação e repouso por 5 minutos. Após esse intervalo, os tubos foram adicionados de 120 µL de AlCl₃ (10%) com agitação e posterior repouso por mais 5 minutos. Em seguida foram adicionados 800 µL de NaOH (1 mol/L) aos tubos, com agitação seguida de leitura em espectrofotômetro de microplaca (Epoch, Synergy-BioTek®, Winooski, EUA), no comprimento de onda de 510 nm. A catequina (10 a 200 mg/L) foi utilizada como padrão para a curva de calibração ($y = 0,003430x - 0,001032$; $R^2 = 0,999$).

2.2.3.4 Atividade antioxidante *in vitro*

Os extratos de ipê amarelo e as kombuchas foram avaliados quanto à atividade antioxidante pelos seguintes métodos:

- ABTS

Capacidade de captura do cátion 2,2-azino-bis (3-ethylbenzot hiazoline-6-sulfonic acid), segundo metodologia proposta por Re *et al.* (1999). O método prevê o preparo do reagente ABTS com a adição de 3 mL de solução ABTS (7 mmol/L) e 3 mL de solução de K₂S₂O₈ (persulfato de potássio). Após 16 horas em repouso no escuro, 4 mL do reagente

preparado foram adicionados em balão volumétrico de 200 mL, com posterior diluição em água deionizada e calibragem até obter uma leitura de absorvância $\geq 0,700$ (Epoch, Synergy-BioTek[®], Winooski, EUA), em comprimento de onda de 734 nm. As amostras (20 μ L) foram adicionadas em microplaca e receberam a adição de 280 μ L do reagente ABTS, e foram mantidas no escuro por 30 minutos. A leitura da absorvância das amostras foi realizada no mesmo equipamento e comprimento de onda de calibragem do reagente. O composto Trolox (50 a 350 μ mol/L) foi utilizado como padrão para a curva de calibração ($y = 0,241560x - 1,937984$; $R^2 = 0,999$).

- FRAP

Atividade de redução do íon férrico presente no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), de acordo com método documentado por Benzie e Strain (1996). As amostras (10 μ L) foram incorporadas diretamente em microplaca e receberam a adição de 290 μ L de reagente FRAP. Após 30 minutos de repouso no escuro, a leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (Epoch, Synergy-BioTek[®], Winooski, EUA), em 595 nm. A curva ($y = 0,001205x + 0,030751$; $R^2 = 0,989$) para quantificação da atividade antioxidante das amostras foi preparada com o padrão Trolox (100 a 1000 μ mol/L).

- DPPH

Potencial de captura do radical nitrogenado 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, conforme protocolo descrito por Brand-Williams, Couvelier e Berset (1995). As amostras (50 μ L) foram adicionadas a tubos de ensaio, com posterior adição de 1,9 mL de solução DPPH, agitação e repouso na ausência de luz por 30 minutos. A leitura da absorvância das amostras foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (Epoch, Synergy-BioTek[®], Winooski, EUA) no comprimento de onda de 517 nm. A curva ($y = 0,039985x - 2,071918$; $R^2 = 0,991$) de calibração desta análise também foi preparada com o padrão Trolox (100 a 700 μ mol/L).

2.2.3.5 Identificação e quantificação de compostos por cromatografia líquida

O sistema de cromatografia líquida foi utilizado para avaliar o extrato otimizado de *H. albus* e as kombuchas produzidas na cinética de fermentação. O equipamento utilizado para executar as análises foi um cromatógrafo (HPLC LC-2040C, Shimadzu[®], Quioto, Japão) acoplado a um detector de arranjo de diodos (PDA), bomba quaternária, desgaseificador e autoinjeter. Previamente à separação cromatográfica as amostras foram submetidas à precipitação proteica, visando maior limpidez do conteúdo. Para esse procedimento as amostras foram homogeneizadas (Vórtex, Vision Scientific[®], Daejeon, Coreia do Sul) com 5% de metanol

por 1 minuto. Posteriormente realizou-se a centrifugação do material (Centrifuga, MPW-351, Med. Instruments®, Varsóvia, Polônia) por 10 minutos a 2224 g. O material sobrenadante foi filtrado em filtro seringa com membrana de nylon (0,22 µm), sendo avaliado posteriormente.

- Compostos fenólicos individuais

Os compostos fenólicos individuais do extrato floral e das kombuchas foram avaliados segundo protocolo proposto por Alberti *et al.* (2014). Para esta separação utilizou-se uma coluna Symmetry C18 (4,6 × 150 mm; 3,5 µm) mantida a 20 °C. Um volume de injeção de 10 µL de amostra foi estabelecido, com tempo de análise de 60 minutos por corrida. A fase móvel constituiu de ácido acético 2,5% (v/v; solvente A) e acetonitrila (solvente B), aplicados de acordo com o seguinte gradiente: 3-9% de B (0-5 minutos); 9-16% de B (5-15 minutos); 16-36,4% de B (15-33 minutos); com posterior eluição isocrática a 100% de B (5 minutos) e acondicionamento da coluna (3% de B; 10 minutos). O volume de fluxo foi mantido em 1 mL/min.

A identificação dos constituintes fenólicos foi realizada por comparação dos tempos de retenção e espectros com os padrões. O comprimento de onda do detector PDA foi definido no intervalo de 200 nm a 400 nm. A quantificação foi realizada através das curvas de calibração (mg/L) dos padrões de ácido cafeico ($y = 21170x - 117801$; $R^2 = 0,997$), ácido clorogênico ($y = 72120x - 405698$; $R^2 = 0,993$), ácido gálico ($y = 31332x - 27051$; $R^2 = 0,991$), ácido p-cumárico ($y = 113841x - 595197$; $R^2 = 0,997$), ácido trans-ferrulico ($y = 67556x - 284328$; $R^2 = 0,998$), cafeína ($y = 78062x - 98510$; $R^2 = 0,999$), catequina ($y = 5716,4x - 54087$; $R^2 = 0,987$), epicatequina ($y = 2714,9x - 2898,8$; $R^2 = 0,797$), epigalocatequina ($y = 9173,5x - 79487$; $R^2 = 0,850$), quercitina ($y = 28863x - 164590$; $R^2 = 0,835$) e rutina ($y = 10082x - 58113$; $R^2 = 0,996$). Os resultados foram expressos em g/L.

- Composto β-lapachona

A naftoquinona β-lapachona foi quantificada no extrato de *H. albus* e nas kombuchas adicionadas da infusão floral, de acordo com a metodologia validada por Kim *et al.* (2016). A coluna utilizada para a separação (Symmetry C18 – 4,6 × 150 mm; 3,5 µm) foi mantida a 30 °C. A fase móvel foi constituída por um gradiente de água ultrapura (solvente A) e acetonitrila (solvente B) nas seguintes proporções: 10 a 100% de B (0 a 30 minutos), seguido de eluição isocrática de 100% de B (5 minutos), e acondicionamento da coluna (10% de B, 15 minutos). A vazão da fase móvel foi de 1 mL/min e volume de injeção de 10 µL de amostra.

A identificação da β -lapachona nas amostras ocorreu por meio da comparação do tempo de retenção e do espectro com o padrão de referência. Uma faixa de 200 nm a 400 nm foi estabelecida para leitura do detector PDA. A quantificação se sucedeu pela curva de calibração da β -lapachona ($y = 43416x + 3791,1$; $R^2 = 0,999$). A concentração final foi expressa em mg/L.

- Ácidos orgânicos

As kombuchas foram analisadas quanto à concentração de ácidos orgânicos (glucurônico, ascórbico, láctico e acético), segundo método adaptado de Santos *et al.* (2014). Para a separação desses compostos utilizou-se uma coluna Aminex HPX-87H (300 \times 7,8 mm) a 30 °C. A fase móvel constituída de ácido sulfúrico (0,005 mol L⁻¹) foi eluída em modo isocrático, com fluxo de 0,5 mL/min e volume de injeção de 10 μ L de amostra.

A detecção dos ácidos ocorreu por comparação dos tempos de retenção com os padrões de referência, enquanto a quantificação foi calculada pelas curvas de calibração do ácido glucurônico ($y = 6,64E+06x - 1,07E+05$; $R^2 = 0,999$), ácido ascórbico ($y = 6,26E+07 - 1,70E+06$; $R^2 = 0,997$), ácido láctico ($y=3,27E+06 - 1,19E+05$; $R^2 = 0,998$) e ácido acético ($y = 7,01E+06x - 2,83E+05$; $R^2 = 0,999$). O teor final dos ácidos foi expresso em g/L.

2.2.3.6 Atividade antiglicêmica

O extrato de ipê foi testado em diferentes concentrações (15,62; 31,25; 62,50; 125; 250; 500; 1000 mg/mL), a fim de calcular os percentuais de inibição da enzima α -glucosidase e estabelecer sua atividade biológica (Moradi-Afrapoli *et al.*, 2012). As amostras (10 μ L) diluídas em DMSO (5%) foram pipetadas em microplaca com a solução de α -glucosidase, composta por 20 μ L de solução enzimática (0,5 UN/mL) e 120 μ L de tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 6,9); o conjunto foi incubado a 37 °C por 15 minutos. Após o tempo de reação 20 μ L de solução de substrato preparada com *p-nitrophenyl- α -D-glucopyronoside* (5 mM) em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 6,9) foram adicionados, seguido de incubação por mais 15 minutos. Em seguida 80 μ L de Na₂CO₃ (0,2 mol L⁻¹) foram adicionados. A absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (Epoch, Synergy-BioTek®, Winooski, EUA) no comprimento de onda de 405 nm. O resultado foi expresso em % de inibição da enzima (Equação 1).

$$\text{Inibição (\%)} = [(\text{Abs. controle} - \text{Abs. amostra}) / \text{Abs. controle}] \times 100. \quad (\text{Equação 1})$$

2.2.3.7 Análise estatística

Os resultados obtidos nas análises foram expressos como média e desvio padrão, com posterior análise de variância (ANOVA) e teste de médias de Fisher LSD (*Fisher Least Significance Difference*), para avaliar a diferença entre as amostras. A força de correlação entre os parâmetros foi analisada pelos produtos de *Pearson* (r). O *software* STATISTICA versão 7.1 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) foi utilizado para delinear o planejamento experimental Box-Behnken, a cinética de fermentação, bem como todas as determinações estatísticas realizadas.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

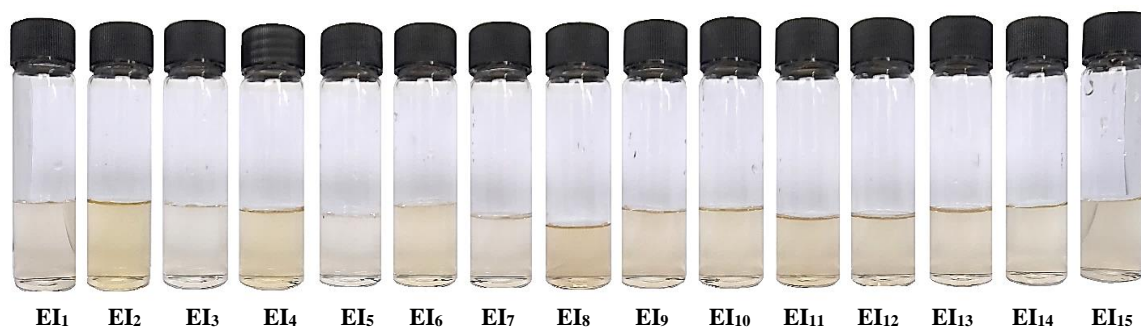
2.3.1 Otimização Da Extração De Compostos Bioativos Das Pétalas De *Handroanthus albus*

Os extratos de ipê amarelo obtidos no planejamento experimental estão apresentados na Figura 7. Esse material foi avaliado quanto à concentração de compostos bioativos e potencial antioxidante (Tabela 5). As maiores concentrações de fenóis e flavonoides com significância estatística ($p \leq 0,05$) foram observadas na amostra EI12, enquanto o extrato EI9 apresentou os menores teores. Esses extratos foram preparados com a mesma concentração de pétalas (56 g/L), mas com tempos (15 e 5 minutos, respectivamente) e temperaturas (90 °C e 60 °C, respectivamente) de infusão diferentes. Esse cenário indica que as variáveis tempo e temperatura de infusão poderiam apresentar maior impacto na extração de compostos das pétalas de ipê amarelo. Entretanto, de acordo com os modelos para compostos fenólicos e flavonoides propostos na análise de regressão múltipla (Tabela 6), o coeficiente de regressão linear demonstrou correlação positiva apenas no fator temperatura (X_3), o que demonstra que essa variável foi a mais influente no processo de extração de compostos dos tecidos florais.

A temperatura de infusão mais elevada favorece a permeabilidade da parede vegetal, bem como amplifica a solubilidade e a difusão de compostos no meio. Por consequência, o tempo de extração pode ser reduzido com o emprego de temperaturas mais altas (Prabawati *et al.*, 2021), o que justifica a ausência de significância ($p > 0,05$) da variável Tempo (X_2) nos modelos propostos para fenóis e flavonoides (Tabela 6). Esse contexto corrobora com o estudo de Zannou, Kelebek e Selli (2020), que documentaram resultados superiores aos observados neste estudo para o teor de fenóis em pétalas de *Hibiscus sabdariffa* infundidas a 98 °C por 40 minutos (2135 mg AG/L) e 16 minutos (2201 mg AG/L). González-Barrio *et al.* (2018) observaram menores concentrações de fenóis e flavonoides nas espécies de flores *Viola wittrockiana* (44,88 mg AG/L; 3,23 mg CAT/L, respectivamente) e *Antirrhinum majus* (28,35 mg AG/L; 1,89 mg AG/L, respectivamente). Nessa pesquisa a extração foi realizada com as amostras liofilizadas, em temperatura ambiente (22 °C – 26 °C), por um período de 24 horas.

Tendo em vista que o emprego de temperaturas mais elevadas otimizou a extração de compostos bioativos das pétalas de ipê amarelo, a mesma tendência foi observada nas atividades antioxidantes avaliadas pelos métodos ABTS, FRAP e DPPH (Tabela 5). A amostra com maior ($p \leq 0,05$) concentração de compostos bioativos (EI12), também demonstrou melhores desfechos em relação ao potencial antioxidante. Por consequência, o inverso foi observado na amostra EI9. A atividade antioxidante tende a ser mais elevada em amostras com expressivas concentrações de compostos bioativos, em virtude da contribuição dessas substâncias para essa bioatividade (Han *et al.*, 2019; Katarzyna *et al.*, 2021). Corroborando com o estudo de Barros *et al.* (2020), no qual a infusão de *Stachys byzantina*, que apresentou maior concentração de compostos, também demonstrou forte efeito inibitório pelos métodos ABTS (330,19 mg TE/g), FRAP (312,44 mg TE/g) e DPPH (139,15 mg TE/g), quando comparada às demais espécies avaliadas. Comportamento similar foi observado na espécie *Viola wittrockiana* pelos métodos antioxidantes DPPH (71,20%) e FRAP (206,37 mmol Fe²⁺ equivalentes/100 g) (González-Barrio *et al.*, 2018); e em flores vermelhas de *Tropaeolum majus* pelo método FRAP (10,97 μ mol TE/g) (Barros *et al.*, 2020).

Figura 7 – Extratos de *Handroanthus albus* obtidos a partir do planejamento fatorial Box-Behnken



Nota – **EI₁** (32 g/L; 5 min; 75 °C); **EI₂** (80 g/L; 5 min; 75 °C); **EI₃** (32 g/L; 15 min; 75 °C); **EI₄** (80 g/L; 15 min; 75 °C); **EI₅** (32 g/L; 10 min; 60 °C); **EI₆** (80 g/L; 10 min; 60 °C); **EI₇** (32 g/L; 10 min; 90 °C); **EI₈** (80 g/L; 10 min; 90 °C); **EI₉** (56 g/L; 5 min; 60 °C); **EI₁₀** (56 g/L; 15 min; 60 °C); **EI₁₁** (56 g/L; 5 min; 90 °C); **EI₁₂** (56 g/L; 15 min; 90 °C); **EI₁₃** (56 g/L; 10 min; 75 °C); **EI₁₄** (56 g/L; 10 min; 75 °C); **EI₁₅** (56 g/L; 10 min; 75 °C).

Fonte: Autoria própria (2023).

Tabela 5 – Concentração de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos ABTS, FRAP e DPPH dos extratos de *Handroanthus albus*.

| Amostra | FENÓIS TOTAIS (mg AG/L) | FLAVONOIDES (mg CAT/L) | ABTS ($\mu\text{mol TE/L}$) | FRAP ($\mu\text{mol TE/L}$) | DPPH ($\mu\text{mol TE/L}$) |
|---------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| EI1 | 904 ^f \pm 84,4 | 319,5 ^f \pm 32,5 | 3894,1 ^d \pm 100,4 | 3526,5 ^g \pm 268,2 | 3277,5 ^g \pm 310,6 |
| EI2 | 899,6 ^f \pm 20,4 | 289,5 ^g \pm 2,3 | 3393,68 ^e \pm 67,94 | 3786,8 ^{fg} \pm 57,8 | 3697,5 ^f \pm 125,3 |
| EI3 | 841,1 ^f \pm 5,6 | 321,5 ^f \pm 28,7 | 3703,1 ^d \pm 163,4 | 2382,1 ^h \pm 77,4 | 3778,7 ^f \pm 311,7 |
| EI4 | 1119,3 ^{de} \pm 38,7 | 375 ^{de} \pm 5 | 3635,5 ^d \pm 74,2 | 3995,1 ^{ef} \pm 135,4 | 5345,7 ^d \pm 100,5 |
| EI5 | 1065,2 ^c \pm 54,4 | 401,75 ^d \pm 12,24 | 3802,9 ^d \pm 106,8 | 3404,24 ^g \pm 161,02 | 2721 ^h \pm 32 |
| EI6 | 729,5 ^g \pm 19,1 | 249,5 ^h \pm 10,8 | 2631,6 ^f \pm 45,9 | 2752,9 ^h \pm 80,6 | 2785 ^h \pm 4 |
| EI7 | 1261,6 ^{bc} \pm 35,1 | 439 ^c \pm 12 | 5540,94 ^a \pm 212,22 | 4765,4 ^d \pm 289,8 | 3550,9 ^{fg} \pm 74,9 |
| EI8 | 1219 ^c \pm 62 | 464,5 ^{bc} \pm 10,1 | 4361 ^c \pm 157 | 15514,5 ^a \pm 262,9 | 7050,2 ^b \pm 68,7 |
| EI9 | 654,2 ^g \pm 70,7 | 217,21 ⁱ \pm 16,24 | 2745 ^f \pm 68 | 2739,2 ^h \pm 117,5 | 1433,7 ⁱ \pm 62,2 |
| EI10 | 902,1 ^f \pm 16,8 | 312,2 ^{fg} \pm 1,9 | 3634,60 ^{de} \pm 146,23 | 3553,90 ^{fg} \pm 111,14 | 2716,9 ^h \pm 2,8 |
| EI11 | 1333,4 ^b \pm 46,4 | 470,6 ^b \pm 18,8 | 5419,2 ^b \pm 158,7 | 5283,08 ^c \pm 127,43 | 5917,7 ^c \pm 108,9 |
| EI12 | 1513,6 ^a \pm 61,7 | 600,38 ^a \pm 8,14 | 5679,9 ^a \pm 84,5 | 7420,60 ^b \pm 80,22 | 8468 ^a \pm 93 |
| EI13 | 1245,4 ^c \pm 46,8 | 441,70 ^c \pm 7,12 | 4659,8 ^c \pm 148,9 | 5106,52 ^d \pm 147,14 | 4302,1 ^e \pm 20,1 |
| EI14 | 1189,1 ^{cd} \pm 39,5 | 452,3 ^{bc} \pm 21,9 | 4572,5 ^c \pm 74,2 | 5172,5 ^c \pm 74,5 | 4207,4 ^e \pm 59,8 |
| EI15 | 1204,5 ^c \pm 46,5 | 368,3 ^e \pm 15,6 | 3377,7 ^e \pm 106,9 | 44578 ^e \pm 73 | 3628,2 ^f \pm 49,8 |

Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. AG: ácido gálico; CAT: catequina; TE: equivalentes de Trolox; EI₁ (32 g/L; 5 min; 75 °C); EI₂ (80 g/L; 5 min; 75 °C); EI₃ (32 g/L; 15 min; 75 °C); EI₄ (80 g/L; 15 min; 75 °C); EI₅ (32 g/L; 10 min; 60 °C); EI₆ (80 g/L; 10 min; 60 °C); EI₇ (32 g/L; 10 min; 90 °C); EI₈ (80 g/L; 10 min; 90 °C); EI₉ (56 g/L; 5 min; 60 °C); EI₁₀ (56 g/L; 15 min; 60 °C); EI₁₁ (56 g/L; 5 min; 90 °C); EI₁₂ (56 g/L; 15 min; 90 °C); EI₁₃ (56 g/L; 10 min; 75 °C); EI₁₄ (56 g/L; 10 min; 75 °C); EI₁₅ (56 g/L; 10 min; 75 °C). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras a nível de significância de 5% pelo teste de Fisher LSD.

Os modelos para cada variável resposta (compostos fenólicos totais; flavonoides; ABTS; FRAP; DPPH) propostos na análise de regressão múltipla estão expressos na Tabela 6. Esses modelos foram significativos ($p \leq 0,05$), não indicaram falta de ajuste (*Plack of fit* > 0,05) e apresentaram R^2 ajustado superior a 0,56.

A temperatura (X_3) demonstrou ser o parâmetro mais significativo sobre a concentração de compostos fenólicos, flavonoides e atividades antioxidantes dos extratos de ipê amarelo. Os coeficientes de regressão linear significativos e com efeito positivo para essa variável indicam que o maior fator testado para esse parâmetro (90 °C) é recomendado, com o propósito de obter o melhor rendimento no processo de extração. Conforme discutido anteriormente, temperaturas mais elevadas aumentam a vibração das moléculas presentes na parede vegetal aumentando com isso a sua permeabilidade, o que otimiza a difusão de compostos dos tecidos florais para o meio (Prabawati *et al.*, 2021). Entretanto, temperaturas acima de 100 °C podem conduzir a uma degradação de compostos, e por consequência impactar negativamente o potencial antioxidante, em virtude da termolabilidade das substâncias bioativas (Muche; Speers; Rupasinghe, 2018).

O parâmetro tempo (X_2) de infusão exerceu influência significativa apenas sobre o potencial de captura DPPH, apresentando coeficiente de regressão linear com efeito positivo. Isso sugere que a condição ótima para essa variável pode ser definida pelo fator superior testado (15 minutos). Zannou, Kelebek e Selli (2020) observaram melhores resultados em termos de atividade antioxidante das flores de *Hibiscus sabdariffa*, em condições de tempo (16 minutos) e temperatura (98 °C) similares ao do presente estudo. Já no estudo de Han *et al.* (2019), a atividade antioxidante pelo método DPPH da flor de *Chrysanthemum morifolium* amarelo foi mais eficiente com uma extração a 100 °C por 2 minutos (47,18%), em comparação ao experimento por 4 minutos (43,40%). Esse contexto reforça o conceito de que, o tempo de extração pode ser minimizado com a aplicação de temperaturas mais elevadas (35 a 100 °C) (Prabawati *et al.*, 2021).

No que tange à variável concentração de pétalas (X_1), foi possível observar influência significativa somente nas variáveis de resposta FRAP e DPPH, com coeficiente de regressão linear positivo. Ademais, sobre a variável de resposta FRAP o fator X_1 e a temperatura (X_3) demonstraram interação linear positiva. Esses desfechos sugerem que a maior concentração de pétalas (80 g/L) avaliada na extração deve ser utilizada, objetivando melhores rendimentos no processo. Entretanto, em um processo de extração, o aumento da quantidade de amostra não necessariamente implica em maior concentração de compostos. Isso porque, o rendimento pode ser afetado pelo equilíbrio entre soluto e solvente, de modo que a saturação do solvente pode

ocorrer em virtude do excesso de amostra (Ozturk; Parkinson; Gonzalez-Miquel *et al.*, 2018), o que pode justificar a ausência de significância da variável concentração de pétalas (X_1) sobre o teor de compostos fenólicos e flavonoides. O emprego de quantidades de tecido floral superiores às testadas, não implicaria em maior extração de bioativos.

O impacto significativo da concentração de pétalas (X_1) sobre as atividades antioxidantes FRAP e DPPH pode ser correlacionado com a exposição de diferentes biomoléculas e compostos de interesse, que influenciam diretamente o potencial antioxidante (Ozturk; Parkinson; Gonzalez-Miquel *et al.*, 2018). Os ensaios antioxidantes testados avaliam porções limitadas do potencial redutor total de uma amostra, uma vez que possuem mecanismos distintos de análise. Enquanto os métodos ABTS e DPPH são baseados no potencial de eliminação dos radicais livres pela amostra avaliada, a partir da transferência de elétrons, o teste de FRAP é pautado na capacidade de redução do íon férrico. Além disso, o método DPPH não permite a determinação do poder antioxidante da porção hidrofílica de uma amostra (Jakubczyk *et al.*, 2020). Em complemento, a estrutura da matéria-prima avaliada, a concentração e a eficácia intrínseca de reatividade dos compostos aos radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio, são fatores que exercem influência significativa nos resultados de uma análise antioxidante (Rumpf; Burger; Schulze, 2023). Portanto, os testes antioxidantes podem ser considerados métodos mais sensíveis às variações no processo de extração, e por consequência apresentam interferência significativa de diversos parâmetros.

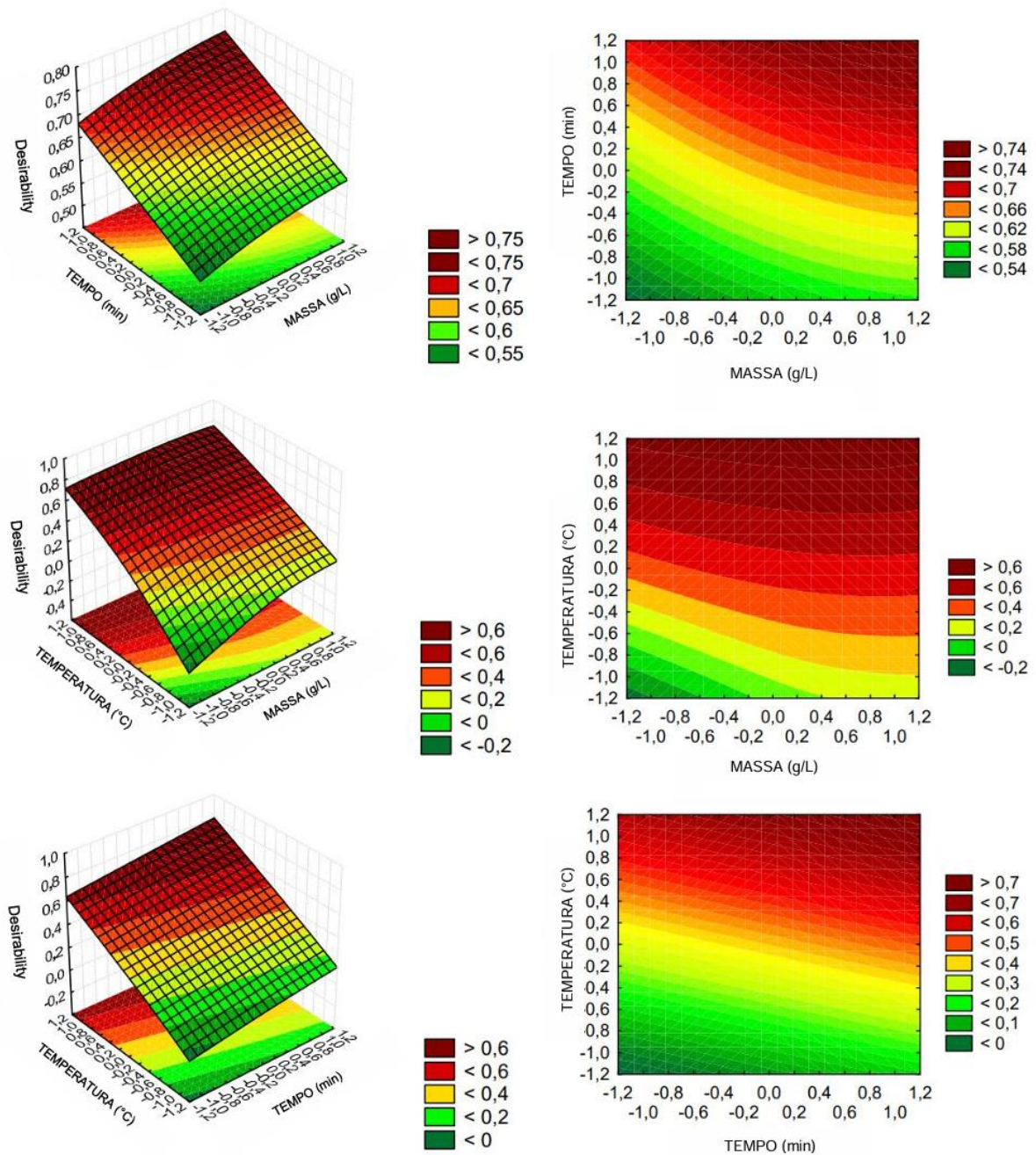
Pautando-se nesse contexto, foi possível determinar o ponto ótimo de todas as variáveis de forma simultânea (Figura 8). Assim, a partir das condições ótimas de cada parâmetro, é possível obter melhor desempenho do sistema em termos de extração de compostos bioativos e potencial antioxidante. Portanto, segundo a otimização da extração de compostos do ipê amarelo, foi sugerido que os melhores resultados podem ser obtidos com uma concentração de pétalas de 80g/L a 90 °C, por 15 minutos.

Tabela 6 – Efeitos das variáveis independentes (Concentração de pétalas, Tempo e Temperatura) sobre a concentração de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos ABTS, FRAP e DPPH dos extratos de *Handroanthus albus*.

| Variáveis respostas | Fatores | Coef. de Regressão | Erro padrão | t-valor | p-valor | -95% de confiança | +95% de confiança |
|-------------------------------|-------------------------------|--------------------|-------------|---------|---------|-------------------|-------------------|
| Compostos fenólicos (mg AG/L) | Constante | 1072,12 | 41,01 | 26,13 | <0,0001 | 983,50 | 1160,73 |
| | X ₃ | 247,11 | 56,16 | 4,39 | <0,0007 | 125,77 | 368,45 |
| | R ² ajustado | 0,567 | | | | | |
| | Plack-of-fit | 0,058 | | | | | |
| Flavonoides (mg CAT/L) | Constante | 381,53 | 17,78 | 21,45 | <0,0001 | 343,12 | 419,95 |
| | X ₃ | 99,21 | 24,34 | 4,07 | <0,0013 | 46,61 | 151,81 |
| | R ² ajustado | 0,560 | | | | | |
| | Plack-of-fit | 0,320 | | | | | |
| ABTS (μmol TE/L) | Constante | 4004,51 | 144,99 | 27,61 | <0,0001 | 3691,27 | 4317,75 |
| | X ₃ | 924,96 | 198,53 | 4,65 | <0,0004 | 496,04 | 1353,87 |
| | R ² ajustado | 0,596 | | | | | |
| | Plack-of-fit | 0,701 | | | | | |
| FRAP (μmol TE/L) | Constante | 4912,34 | 471,96 | 10,40 | <0,0001 | 3873,55 | 5951,14 |
| | X ₁ | 1499,32 | 646,26 | 2,31 | <0,040 | 76,89 | 2921,75 |
| | X ₃ | 2540,99 | 646,26 | 3,93 | <0,002 | 1118,56 | 3963,42 |
| | X ₁ X ₃ | 2654,80 | 913,96 | 2,90 | <0,0143 | 643,18 | 4666,42 |
| | R ² ajustado | 0,652 | | | | | |
| | Plack-of-fit | 0,101 | | | | | |
| DPPH (μmol TE/L) | Constante | 4250,08 | 200,41 | 21,20 | <0,0001 | 3808,96 | 4691,20 |
| | X ₁ | 636,50 | 274,43 | 2,31 | <0,040 | 32,48 | 1240,53 |
| | X ₂ | 670,81 | 274,43 | 2,44 | <0,032 | 66,78 | 1274,84 |
| | X ₃ | 1948,75 | 274,43 | 7,10 | <0,0001 | 1344,72 | 2552,78 |
| | R ² ajustado | 0,807 | | | | | |
| | Plack-of-fit | 0,064 | | | | | |

Nota - X₁: Concentração de pétalas (32, 56 e 80 g/L); X₂: Tempo (5, 10 e 15 min); X₃: Temperatura (60, 75 e 90 °C); AG: ácido gálico; CAT: catequina; TE: equivalentes de Trolox.

Figura 8 – Superfície de resposta e gráficos de contorno mostrando os efeitos das variáveis independentes (Concentração de pétalas, Tempo, Temperatura) sobre a concentração de compostos bioativos e atividade antioxidante no ponto ótimo dos extratos de *Handroanthus albus*.



Os resultados preditos para cada parâmetro de resposta avaliado em condições ótimas, bem como os valores obtidos experimentalmente estão dispostos na Tabela 7. Mediante os dados apresentados, os modelos para compostos fenólicos totais, flavonoides, ABTS, FRAP e DPPH foram validados para fins preditivos, considerando que os valores experimentais estão contidos em um intervalo de 95% de confiança.

Tabela 7 – Valores preditos e experimentais das variáveis obtidas no ponto ótimo de extração das pétalas de *Handroanthus albus*.

| Variável resposta | Valores | | | Experimental |
|--------------------------------------|---------|-------------------|-------------------|------------------|
| | Predito | -95% de confiança | +95% de confiança | |
| Compostos fenólicos totais (mg AG/L) | 1379,33 | 1296,19 | 1462,46 | 1384,86 ± 34,43 |
| Flavonoides (mg CAT/L) | 506,90 | 376,17 | 637,63 | 507,28 ± 17,05 |
| ABTS (µmol TE/L) | 4734,99 | 2916,00 | 6.553,99 | 3498,62 ± 101,14 |
| FRAP (µmol TE/L) | 9197,68 | 7321,28 | 11074,09 | 7715,73 ± 29,34 |
| DPPH (µmol TE/L) | 7506,15 | 6873,59 | 8138,72 | 7474,96 ± 140,58 |

Nota: AG: ácido gálico; CAT: catequina; TE: equivalentes de Trolox.

2.3.2 Atividade Antiglicêmica

O extrato de ipê obtido na otimização foi avaliado quanto à atividade antiglicêmica por meio do potencial de inibição da enzima α -glicosidase (dados não apresentados). Pautando-se nos valores obtidos, nenhuma atividade antiglicêmica foi detectada no extrato avaliado. Em comparação à acarbose (controle positivo), o extrato de ipê amarelo não demonstrou eficácia na inibição da enzima α -glicosidase. Essa enzima está associada à hidrólise dos carboidratos dietéticos a nível intestinal, o que otimiza o processo absorptivo dessas moléculas e eleva os níveis de glicose plasmática. Assim, a inibição dessa enzima é uma condição desejável para minimizar os desequilíbrios metabólicos relacionados à hiperglicemia e diabetes mellitus (Nowicka; Wojdyło, 2019). Até o presente, este é o primeiro registro sobre o efeito hipoglicemiante de extratos das flores de *H. albus*.

O efeito hipoglicemiante de determinada espécie parece estar intimamente associado aos compostos polifenólicos presentes nos tecidos vegetais avaliados. Esses compostos atuam como supressores dos níveis de glicose circulante, porque estão envolvidos na proteção e

reparação das células β pancreáticas, potencializando a secreção de insulina, além de contribuir com o aumento da absorção de glicose pelas células, e inibir sua absorção no intestino delgado (Aekunowo *et al.*, 2019). Comumente os compostos bioativos apresentam maiores taxas de extração em solventes polares como etanol, metanol, acetona e até mesmo a água (Takahashi *et al.*, 2020). Entretanto, alguns compostos apolares podem ter sua extração limitada em virtude da incompatibilidade com o solvente empregado (Akinmoladun *et al.*, 2022). Assim, a ausência de atividade antiglicêmica observada no extrato de ipê pode estar associada à real incapacidade de inibição de α -glicosidase pela espécie. Ou ainda, à extração ineficiente dos compostos bioativos associados aos efeitos hipoglicemiantes, considerando que a água foi utilizada como solvente no processo.

2.3.3 Otimização Das Kombuchas Com Infusão De *Camellia sinensis*

Com o intuito de otimizar as kombuchas à base de chá preto, as infusões e bebidas fermentadas foram caracterizadas quanto ao teor de compostos bioativos e potencial antioxidante (Tabela 8). Os resultados indicaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os experimentos, o que demonstra influência das variáveis testadas (concentração de chá; teor de sacarose; temperatura) no rendimento do processo.

Em termos de compostos fenólicos totais e flavonoides, o mosto com maior concentração de chá preto (P12) apresentou melhores resultados, em comparação às infusões P4 e P8. Esse desfecho está associado à composição natural do chá preto, que apresenta uma concentração robusta e variada de compostos bioativos (Cardoso *et al.*, 2020). O processo de fabricação do chá preto envolve a oxidação das folhas de *Camelia sinensis*, a qual estimula a ação das enzimas polifenoloxidasas. Essa ação enzimática promove uma alteração na estrutura de compostos mais complexos como a catequina, levando à formação de flavonóis diméricos e poliméricos conhecidos como teaflavinas e tearubiginas (Bishop *et al.*, 2022).

Por consequência, as kombuchas com maior concentração de chá preto (KP2; KP4; KP6 e KP8), também agregaram maior teor de compostos. As amostras KP2, KP4 e KP8 apresentaram uma concentração de aproximadamente 1,1 vezes maior de compostos fenólicos; e 1,2 vezes superior para flavonoides, em comparação ao mosto na concentração de 12 g/L (P12). Resultados similares para o teor de compostos fenólicos (1090 mg AG/L) em kombucha fermentada com chá preto foram documentados por Cardoso *et al.* (2020). Nessa pesquisa a infusão foi preparada com a mesma concentração máxima de chá preto (12 g/L), mas em temperatura (75 °C) e tempo (2 minutos) inferiores aos utilizados neste experimento. Jakubczyk *et al.* (2020) observaram menores concentrações de fenóis e flavonoides em kombucha (206

mg AG/L; 126,7 mg RE/L, respectivamente) e mosto de chá preto (183,1 mg AG/L; 231,7 mg RE/L, respectivamente). A fermentação foi realizada por 14 dias e o chá preparado com uma concentração de 8g/L. A assimilação de compostos polifenólicos durante a fermentação da kombucha é esperada, pois a ação microbiana e enzimática do meio promove a conversão de compostos mais complexos como a tearubigina, em moléculas mais simples como a teaflavina (Jafari *et al.*, 2020).

Os polifenóis configuram uma classe de compostos com o mais alto nível de propriedades antioxidantes, em virtude da capacidade em eliminar radicais livres e espécies reativas de oxigênio (Bishop *et al.*, 2022). Dessa forma, o potencial antioxidante da kombucha está associado ao teor de compostos bioativos presentes no mosto, bem como àqueles sintetizados durante o processo fermentativo (Morales, 2020). Assim, o comportamento das infusões e das kombuchas à base de chá preto desenvolvidas, em relação às atividades antioxidantes (Tabela 8), está em consonância com a literatura. A infusão com maior concentração de chá preto (P12) apresentou elevado teor de compostos bioativos, e por consequência atividades antioxidantes mais expressivas em relação às demais (P4 e P8). Similarmente, as kombuchas com elevado teor de compostos como KP2, KP6 e KP8, também apresentaram os melhores resultados em termos de potencial de neutralização de substâncias reativas. Esses desfechos corroboram com os resultados obtidos por Jakubczyk *et al.* (2020), que observaram um potencial antioxidante pelo método FRAP de 4486,7 $\mu\text{M Fe(II)/L}$ em infusão de chá preto, enquanto para a kombucha o resultado foi igual a 1573,9 $\mu\text{M Fe(II)/L}$. Pelo método ABTS, Cardoso *et al.* (2020) obtiveram resultados próximos aos obtidos no presente estudo, em kombucha fermentada com chá preto (8220 $\mu\text{mol TE/L}$).

Tabela 8 – Concentração de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos ABTS, FRAP e DPPH das infusões (P4; P8 e P12) e kombuchas (KP1 a KP15) à base de chá preto.

(Continua)

| Amostra | FENÓIS TOTAIS (mg AG/L) | FLAVONOIDES (mg CAT/L) | ABTS (μmol TE/L) | FRAP (μmol TE/L) | DPPH (μmol TE/L) |
|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|--|--|--|
| P4 | 351,07 ^l \pm 26,51 | 52,79 ^h \pm 2,71 | 2606,88 ^k \pm 91,79 | 1925,69 ^k \pm 109 | 5021,14 ^h \pm 329,54 |
| P8 | 978,78 ^{de} \pm 55,69 | 108,94 ^c \pm 8,57 | 6391,25 ^g \pm 122,15 | 4642,07 ^e \pm 387,77 | 12339,43 ^{cd} \pm 938,88 |
| P12 | 1135,04 ^c \pm 100,95 | 144,22 ^c \pm 10,74 | 8921,31 ^b \pm 112,11 | 6887,79 ^{ab} \pm 238,23 | 18718,42 ^b \pm 1955,17 |
| KP1 | 401,94 ^{kl} \pm 31,23 | 46,28 ^{ij} \pm 2,78 | 2432,73 ^l \pm 118,45 | 2277,37 ^{ij} \pm 41,85 | 6824,43 ^f \pm 662,52 |
| KP2 | 1246,63 ^{ab} \pm 51,76 | 169,21 ^a \pm 3,09 | 10375,22 ^a \pm 443,33 | 6718,88 ^c \pm 272,92 | 20746,68 ^a \pm 767,10 |
| KP3 | 459,30 ^{jk} \pm 35,07 | 46,85 ^{ij} \pm 2,08 | 2383,24 ^l \pm 59,95 | 2241,79 ^{ij} \pm 127,64 | 4315,07 ^h \pm 150,44 |
| KP4 | 1203,34 ^{bc} \pm 50,73 | 156,24 ^b \pm 2,93 | 6283,07 ^g \pm 165,11 | 6275,18 ^d \pm 363,08 | 11488,03 ^d \pm 466,56 |
| KP5 | 445,77 ^k \pm 33,79 | 42,47 ^j \pm 2,37 | 4970,06 ^j \pm 86,04 | 1971,20 ^{jk} \pm 148,55 | 8776,37 ^e \pm 746,39 |
| KP6 | 1022,07 ^d \pm 95,35 | 143,83 ^c \pm 3,45 | 6782,37 ^c \pm 54,93 | 6152,49 ^d \pm 237,86 | 12708,95 ^c \pm 1131,97 |
| KP7 | 437,65 ^k \pm 20,53 | 51,16 ^{hi} \pm 3,14 | 2425,88 ^l \pm 115,13 | 2172,89 ^{ijk} \pm 111,80 | 4565,87 ^h \pm 288,57 |
| KP8 | 1292,63 ^a \pm 28,43 | 166,41 ^a \pm 3,82 | 6751,16 ^{cd} \pm 73,92 | 7141,29 ^a \pm 191,82 | 13223,75 ^c \pm 584,08 |
| KP9 | 529,64 ^j \pm 52,18 | 103,44 ^f \pm 5,05 | 6307,07 ^g \pm 159,5 | 4105,66 ^{fg} \pm 97,28 | 5478,09 ^{gh} \pm 366,40 |
| KP10 | 759,08 ⁱ \pm 57,85 | 97,34 ^g \pm 2,64 | 6014,17 ^h \pm 155,75 | 3729,61 ^h \pm 309,32 | 6988,79 ^f \pm 642,58 |
| KP11 | 816,44 ^{hi} \pm 47,79 | 128,2 ^d \pm 4,39 | 6393,66 ^g \pm 119,69 | 4685,49 ^e \pm 179,92 | 6577,70 ^f \pm 605,86 |
| KP12 | 921,96 ^{ef} \pm 56,62 | 106,33 ^{ef} \pm 2,23 | 6566,86 ^{ef} \pm 62,53 | 4670,08 ^e \pm 131,74 | 6849,69 ^f \pm 631,69 |

(Conclusão)

| Amostra | FENÓIS TOTAIS (mg AG/L) | FLAVONOIDES (mg CAT/L) | ABTS (μmol TE/L) | FRAP (μmol TE/L) | DPPH (μmol TE/L) |
|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| KP13 | 918,17 ^{ef} ± 58,59 | 110,11 ^e ± 1,17 | 6434,41 ^{fg} ± 100,53 | 4212,80 ^f ± 164,87 | 6695,04 ^f ± 545,10 |
| KP14 | 889,49 ^{fg} ± 50,73 | 107,56 ^{ef} ± 6,80 | 6608,88 ^{de} ± 122,7 | 4579,05 ^e ± 113,7 | 6323,19 ^{fg} ± 376,10 |
| KP15 | 829,97 ^{gh} ± 48,61 | 110,76 ^e ± 2,72 | 5201,88 ⁱ ± 101,08 | 3929,19 ^{gh} ± 244,62 | 6352,34 ^{fg} ± 635,48 |

Nota: Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. **P4**: chá preto na concentração de 4g/L; **P8**: chá preto na concentração de 8g/L; **P12**: chá preto na concentração de 12g/L; **KP1** (4 g/L; 50 g/L; 25 °C); **KP2** (12 g/L; 50 g/L; 25 °C); **KP3** (4 g/L; 100 g/L; 25 °C); **KP4** (12 g/L; 150 g/L; 25 °C); **KP5** (4 g/L; 100 g/L; 20 °C); **KP6** (12 g/L; 100 g/L; 20 °C); **KP7** (4 g/L; 100 g/L; 30 °C); **KP8** (12 g/L; 100 g/L; 30 °C); **KP9** (8 g/L; 50 g/L; 20 °C); **KP10** (8 g/L; 150 g/L; 20 °C); **KP11** (8 g/L; 50 g/L; 30 °C); **KP12** (8 g/L; 150 g/L; 30 °C); **KP13** (8 g/L; 100 g/L; 25 °C); **KP14** (8 g/L; 100 g/L; 25 °C); **KP15** (8 g/L; 100 g/L; 25 °C); AG: ácido gálico; CAT: catequina; TE: equivalentes de Trolox. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras a nível de significância de 5% pelo teste de Fisher.

As infusões e kombuchas à base de chá preto foram avaliadas quanto ao potencial hidrogeniônico (pH) e teor de ácido acético (Tabela 9). O pH das infusões com diferentes concentrações de chá preto oscilou entre 5,15 (P12) e 6,50 (P4). O chá preto apresenta um pH mais ácido (pH 4,9), em virtude da presença de ácidos fenólicos (ácido gálico; catequina) e orgânicos (ácido málico; ácido cítrico). Portanto, quanto maior sua concentração em uma infusão, a tendência é que os valores do pH sejam reduzidos nessa solução (Primiani *et al.*, 2018). Ou seja, quanto maior a concentração de chá, menor o pH da infusão, e, portanto, mais ácido o meio se encontra.

Já em relação às kombuchas fermentadas por 15 dias o pH variou de 2,61 (KP3) a 3,13 (KP2). De maneira geral, ao final do processo fermentativo todas as amostras de kombucha apresentaram redução dos valores de pH, em relação às infusões. Esse cenário é justificado pela formação de ácidos orgânicos como acético, glucurônico, láctico e málico, que ocorre naturalmente durante a fermentação. Além disso, fatores como a composição do SCOBY e os parâmetros de fermentação podem interferir na produção dos ácidos e metabólitos presentes na bebida final (Bishop *et al.*, 2022). A predominância de diferentes espécies de bactérias acéticas e lácticas na bebida também pode variar a produção de ácidos orgânicos, de acordo com o tipo de chá utilizado (Cardoso *et al.*, 2020).

Quanto à concentração de ácido acético, os valores obtidos nas kombuchas após 15 dias de fermentação oscilaram entre 3,89 g/L (KP6) e 9,60 g/L (KP12). O aumento do teor de ácido acético durante o processo fermentativo é esperado, porque as bactérias acéticas realizam a síntese desse composto a partir da conversão do etanol presente no meio (Bishop *et al.*, 2022). Essas bactérias também podem sintetizar ácido acético a partir da frutose, que é utilizada como substrato para formação de outros ácidos orgânicos como glucurônico, málico e láctico (Ayed; Abid; Hamdi, 2017). Além disso, quando a concentração de ácido acético está elevada, o pH do meio tende a ser mais ácido, o que foi observado nas bebidas KP12 com pH de 2,63 e por consequência maior concentração de ácido (9,6 g/L).

Contudo, a amostra KP3 apresentou pH ácido (2,61) e baixa concentração de ácido acético (3,94 g/L), em relação às outras amostras. Esse fenômeno possivelmente está associado a um efeito de tamponamento ineficaz do meio de fermentação. A presença de ácidos na kombucha implica na liberação de íons hidrogênio (H^+), que tornam o meio de fermentação mais ácido se não houver a neutralização do sistema pela ação de substâncias alcalinizantes. Além disso, a dissociação do dióxido de carbono (CO_2) e a produção de íons bicarbonato (HCO_3^-) também contribui para o caráter tampão do sistema (Silva *et al.*, 2021). Na kombucha,

os polifenóis configuram uma classe de compostos alcalinos capazes de equilibrar a acidez da bebida. Dessa forma, considerando que a formulação KP3 foi desenvolvida com a menor concentração de chá testada (4 g/L), o teor destes compostos não foi suficiente para conferir um efeito tamponante eficaz na neutralização dos íons H^+ dispersos no meio.

Segundo a Instrução Normativa n° 41, de 17 de setembro de 2019, que determina os padrões de identidade e qualidade da kombucha em todo o território brasileiro, o pH mínimo da bebida deve ser de 2,5 e máximo de 4,2 (Brasil, 2019). Kombuchas com $pH < 2,5$ podem indicar elevada concentração de ácido acético, o que pode influenciar negativamente o sistema digestivo, conferindo risco à saúde do consumidor (Jakubczyk *et al.*, 2020). Enquanto $pH > 4,2$ pode comprometer a inocuidade da bebida, sugerindo contaminação por microrganismos patogênicos (Cardoso *et al.*, 2020). Dessa forma, todas as kombuchas produzidas apresentaram pH em conformidade com a normativa vigente. Jakubczyk *et al.* (2020) documentaram um valor de pH inferior (2,53) aos obtidos neste estudo, em kombucha à base de chá preto (8 g/L) fermentada por 14 dias. Já no estudo de Cardoso *et al.* (2020) a kombucha desenvolvida com mosto de chá preto (12 g/L) apresentou pH de 3,5 após 10 dias de fermentação.

Tabela 9 – Potencial hidrogeniônico (pH) e concentração de ácido acético das infusões (P4; P8 e P12) e kombuchas à base de chá preto (KP1 a KP15).

(Continua)

| Amostras | pH | Ácido acético (g/L) |
|-------------|---------------------------|--------------------------|
| P4 | 6,50 ± 0,01 ^a | ND |
| P8 | 5,98 ± 0,01 ^b | ND |
| P12 | 5,16 ± 0,01 ^c | ND |
| KP1 | 2,77 ± 0,01 ^{hi} | 7,70 ± 0,01 ^d |
| KP2 | 3,13 ± 0,02 ^d | 6,67 ± 0,47 ^d |
| KP3 | 2,61 ± 0,19 ^j | 3,94 ± 0,19 ^h |
| KP4 | 2,95 ± 0,01 ^e | 5,34 ± 0,47 ^f |
| KP5 | 2,80 ± 0,01 ^{gh} | 4,35 ± 0,17 ^g |
| KP6 | 3,07 ± 0,01 ^d | 3,89 ± 0,05 ^h |
| KP7 | 2,63 ± 0,02 ^j | 6,42 ± 0,03 ^d |
| KP8 | 2,86 ± 0,01 ^{fg} | 8,99 ± 0,23 ^b |
| KP9 | 2,91 ± 0,01 ^{ef} | 7,18 ± 0,01 ^e |
| KP10 | 2,85 ± 0,01 ^{fg} | 5,21 ± 0,01 ^f |
| KP11 | 2,87 ± 0,01 ^{fg} | 9,35 ± 0,04 ^a |

| (Conclusão) | | |
|-------------|---------------------------|--------------------------|
| Amostras | pH | Ácido acético (g/L) |
| KP12 | 2,63 ± 0,01 ^j | 9,60 ± 0,02 ^a |
| KP13 | 2,72 ± 0,01 ⁱ | 8,17 ± 0,36 ^c |
| KP14 | 2,81 ± 0,02 ^{gh} | 6,03 ± 0,05 ^e |
| KP15 | 2,75 ± 0,02 ^{hi} | 5,29 ± 0,02 ^f |

Nota: Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. **P4**: chá preto na concentração de 4 g/L; **P8**: chá preto na concentração de 8 g/L; **P12**: chá preto na concentração de 12 g/L; **KP1** (4 g/L; 50 g/L; 25 °C); **KP2** (12 g/L; 50 g/L; 25 °C); **KP3** (4 g/L; 100 g/L; 25 °C); **KP4** (12 g/L; 150 g/L; 25 °C); **KP5** (4 g/L; 100 g/L; 20 °C); **KP6** (12 g/L; 100 g/L; 20 °C); **KP7** (4 g/L; 100 g/L; 30 °C); **KP8** (12 g/L; 100 g/L; 30 °C); **KP9** (8 g/L; 50 g/L; 20 °C); **KP10** (8 g/L; 150 g/L; 20 °C); **KP11** (8 g/L; 50 g/L; 30 °C); **KP12** (8 g/L; 150 g/L; 30 °C); **KP13** (8 g/L; 100 g/L; 25 °C); **KP14** (8 g/L; 100 g/L; 25 °C); **KP15** (8 g/L; 100 g/L; 25 °C); ND: não detectado ou valores abaixo do limite de detecção; Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras a nível de significância de 5% pelo teste de Fisher.

Os modelos para as variáveis de resposta (compostos fenólicos totais; flavonoides; ABTS; FRAP; ácido acético) sugeridos na análise de regressão múltipla foram significativos ($p \leq 0,05$) (Tabela 10). Os modelos não apresentaram falta de ajuste ($Plack\ of\ fit > 0,05$) e foram representados por um R^2 ajustado superior a 0,42. Os modelos foram ajustados objetivando maximizar compostos bioativos e potencial antioxidante, e minimizar a concentração de ácido acético. Não foi possível descrever os resultados obtidos pelo método DPPH utilizando o modelo, uma vez que o conjunto de dados apresentou falta de ajuste significativo ($Plack\ of\ fit \leq 0,05$).

A variável concentração de chá (X_1) demonstrou ser um dos parâmetros com maior interferência sobre a concentração de fenóis totais, flavonoides e potencial antioxidante (ABTS e FRAP) das infusões e kombuchas à base de chá preto. A interação dessa variável resultou em um coeficiente de regressão linear positivo, o que sugere o emprego do maior fator testado (12 g/L) para otimizar o processo. Assim, a composição bioativa da kombucha pode variar consideravelmente, quando fermentada em infusões menos concentradas. Em kombucha fermentada com mosto de chá preto na concentração de 10 g/L foram registradas concentrações de fenóis (231,92 mg AG/L), flavonoides (20,45 mg CAT/L) e atividade antioxidante por DPPH (61,11%) muito abaixo dos valores obtidos no presente estudo (Yikmiş; Tuğgüm, 2019).

A concentração de sacarose (X_2) foi o parâmetro com menor interferência sobre as variáveis de resposta correlacionadas. O fator X_2 apresentou coeficiente de regressão linear significativo ($p \leq 0,05$) somente em relação ao teor de flavonoides, demonstrando uma interação negativa. Apesar desse contexto sugerir que, menores teores de sacarose poderiam resultar em melhores rendimentos para a concentração de flavonoides, a metodologia de superfície de

resposta sugere que o maior fator testado (150 g/L) para esse parâmetro poderá apresentar os melhores desfechos. Isso porque, a concentração de sacarose não demonstrou interferência considerável ($p > 0,05$) sobre as demais variáveis analisadas (compostos fenólicos totais, ABTS; FRAP; ácido acético).

Ademais, segundo Dwiputri e Feroniasanti (2019), o aumento na concentração de flavonoides parece estar mais correlacionado ao tempo de fermentação, e à conversão de compostos polifenólicos pelos microrganismos contidos no meio. Essa ação microbiana está diretamente associada à concentração de sacarose, pois as bactérias e leveduras utilizam cerca de 60 a 70% desse composto como fonte energética (Bishop *et al.*, 2022). Em contraste aos valores obtidos nesta pesquisa, alguns experimentos que utilizaram 100 g/L de sacarose para produção de kombucha à base de chá preto, obtiveram menores concentrações de flavonoides após 10 dias (20,45 mg CAT/L) (Yikmiş; Tuğgüm, 2019) e 14 dias de fermentação (126,7 mg CAT/L) (Jakubczyk *et al.*, 2020).

De forma similar à concentração de chá (X_1), a variável temperatura (X_3) foi um dos parâmetros com impacto em maior número de variáveis de resposta. Para a concentração de fenóis totais, flavonoides, atividade antioxidante pelo método FRAP e teor de ácido acético, o coeficiente de regressão linear apresentou correlação positiva com a variável temperatura (X_3). O que resultou em uma temperatura de fermentação intermediária (23 °C), segundo os valores preditos pelo método de superfície de resposta, para obter melhores rendimentos do sistema. O processo de fermentação ideal para a kombucha deve ser realizado em temperaturas entre 22 e 28 °C. Essa condição se justifica pela necessidade de um ambiente favorável à multiplicação e ação microbiana no meio fermentativo (Bishop *et al.*, 2022).

Comparativamente aos resultados obtidos, menores concentrações de compostos fenólicos e flavonoides foram documentadas em kombuchas de chá preto fermentadas a 24 °C (Yikmiş; Tuğgüm, 2019) e 28 °C (Jakubczyk *et al.*, 2020). Na pesquisa de Cardoso *et al.* (2020), as bebidas fermentadas a 25 °C apresentaram menor atividade redutora pelo método ABTS. Em ambos os estudos a concentração de chá preto (10 g/L; 12 g/L; 8 g/L, respectivamente) e sacarose (100 g/L; 50 g/L; 100 g/L, respectivamente) foram semelhantes às utilizadas nesta pesquisa.

Tabela 10 – Efeitos das variáveis independentes (concentração de chá, sacarose e temperatura) sobre a concentração de compostos fenólicos, flavonoides, atividade antioxidante (ABTS, FRAP) e teor de ácido acético das kombuchas fermentadas à base de chá preto.

(Continua)

| Variáveis respostas | Fatores | Coef. De regressão | Erro padrão | t-valor | p-valor | -95% de confiança | +95% de confiança |
|--------------------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------|----------------|----------------|--------------------------|--------------------------|
| Compostos fenólicos totais (mg AG/L) | Constante | 811,60 | 22,70 | 35,75 | <0,001 | 762,14 | 861,07 |
| | X ₁ | 377,50 | 31,09 | 12,14 | <0,001 | 309,76 | 445,24 |
| | X ₃ | 89,01 | 31,09 | 2,86 | 0,014 | 21,28 | 156,75 |
| | R ² ajustado | 0,916 | | | | | |
| | <i>Plack-of-fit</i> | 0,199 | | | | | |
| Flavonoides (mg CAT/L) | Constante | 105,75 | 1,56 | 67,93 | <0,001 | 102,32 | 109,17 |
| | X ₁ | 56,11 | 2,13 | 26,32 | <0,001 | 51,42 | 60,81 |
| | X ₂ | -5,04 | 2,13 | -2,36 | 0,037 | -9,74 | -0,35 |
| | X ₃ | 8,13 | 2,13 | 3,81 | 0,002 | 3,44 | 12,82 |
| | R ² ajustado | 0,981 | | | | | |
| | <i>Plack-of-fit</i> | 0,063 | | | | | |
| ABTS (μmol TE/L) | Constante | 5728,71 | 322,60 | 17,76 | <0,001 | 5031,77 | 6425,65 |
| | X ₁ | 2247,49 | 441,74 | 5,09 | <0,001 | 1293,16 | 320,81 |
| | R ² ajustado | 0,639 | | | | | |
| | <i>Plack-of-fit</i> | 0,279 | | | | | |

(Conclusão)

| Variáveis | Fatores | Coef. De | Erro | t-valor | p-valor | -95% de | +95% de |
|----------------------------------|-------------------------|------------------|---------------|----------------|----------------|------------------|------------------|
| respostas | | regressão | padrão | | | confiança | confiança |
| FRAP ($\mu\text{mol TE/L}$) | Constante | 4324,19 | 60,01 | 72,06 | <0,001 | 4193,45 | 4454,94 |
| | X ₁ | 2203,07 | 82,17 | 26,81 | <0,001 | 2024,04 | 2382,10 |
| | X ₃ | 338,85 | 82,17 | 4,12 | 0,001 | 159,82 | 517,88 |
| | R ² ajustado | 0,981 | | | | | |
| | <i>Plack-of-fit</i> | 0,862 | | | | | |
| Ácido acético (g/L) | Constante | 6,54 | 0,38 | 17,33 | <0,001 | 5,73 | 7,36 |
| | X ₃ | 1,17 | 0,52 | 3,32 | 0,005 | 0,60 | 2,83 |
| | R ² ajustado | 0,418 | | | | | |
| | <i>Plack-of-fit</i> | 0,619 | | | | | |

Nota - X₁: concentração de chá (4, 8 e 12 g/L); X₂: concentração de sacarose (50, 100 e 150 g/L); X₃: temperatura (20, 25 e 30 °C); AG: ácido gálico; CAT: catequina; TE: equivalentes de Trolox.

Os experimentos foram reproduzidos nas condições ótimas previstas (12 g/L de chá preto; 150 g/L de sacarose; 23 °C), objetivando a validação dos modelos que propõem a maximização de compostos fenólicos, flavonoides, atividade ABTS, FRAP; e redução do teor de ácido acético. Os valores previstos e experimentais estão sumarizados na Tabela 11. Os modelos para fenóis totais, ABTS e FRAP podem ser considerados válidos para fins preditivos, uma vez que os valores experimentais estão inseridos em um intervalo de 95% de confiança. Já para o teor de flavonoides e ácido acético, os modelos não poderão ser empregados em outros experimentos para predição de valores, uma vez que os resultados experimentais não foram obtidos dentro do intervalo de confiança (95%).

Tabela 11 – Valores previstos e experimentais das variáveis obtidas no ponto ótimo de extração das kombuchas à base de chá preto.

| Variável resposta | Valores | | | Experimental |
|-------------------------|---------|-------------------|-------------------|-----------------|
| | Predito | -95% de confiança | +95% de confiança | |
| Fenóis totais (mg AG/L) | 1197,13 | 1089,90 | 1304,36 | 1187,11 ± 47,79 |
| Flavonoides (mg CAT/L) | 153,56 | 145,86 | 161,26 | 138,44 ± 3,01 |
| ABTS (µmol TE/L) | 7540,34 | 5926,98 | 9153,69 | 6242,44 ± 14,92 |
| FRAP (µmol TE/L) | 6282,89 | 5996,45 | 6712,13 | 6449,41±126,89 |
| Ácido acético (g/L) | 5,31 | 3,54 | 7,09 | 10,97 ± 0,38 |

Nota: AG: ácido gálico; CAT: catequina; TE: equivalentes de Trolox.

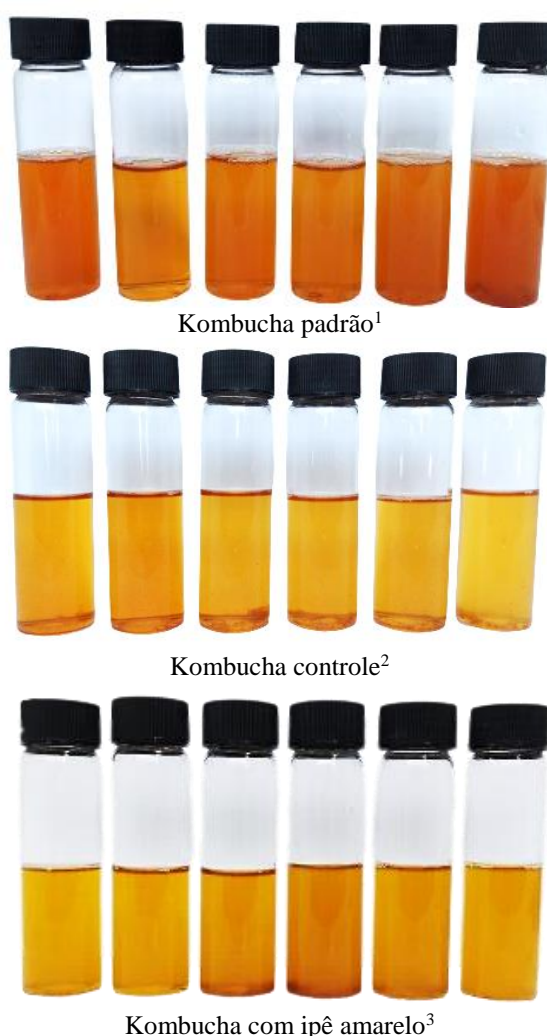
2.3.4 Cinética De Fermentação De Kombucha Com Extrato De *Handroanthus albus*

2.3.4.1 Compostos fenólicos e flavonoides totais

O aspecto visual das kombuchas obtidas na cinética de fermentação, incluindo a bebida padrão (100% de chá preto), controle (50% de chá preto + 50% de água) e adicionadas de ipê amarelo (50% de chá preto + 50% de extrato floral), pode ser observado na Figura 9. Essas amostras foram caracterizadas quanto ao teor de compostos fenólicos e flavonoides (Figura 10), visando avaliar a influência das variáveis tempo e substrato sobre a composição das bebidas. Nas kombuchas padrão a concentração de fenóis totais variou entre 654,54 ± 41,07 mg AG/L e 841,26 ± 6,94 mg AG/L, sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre o dia 0 e o décimo dia de fermentação. O mesmo comportamento foi observado para o teor de flavonoides, que apresentou valores entre 75,72 ± 3,58 mg CAT/L e 119,22 ± 7,73 mg CAT/L. Desfechos similares foram documentados por Özyurt (2020), que não identificou diferença ($p > 0,05$) na concentração de fenóis totais entre o dia 0 e dia 9 de fermentação de kombucha com chá preto.

Corroborando com Jakubczyk *et al.* (2020), que obtiveram mesmo cenário para o teor de flavonoides no primeiro (1) e último dia (14) de cinética de fermentação. A epicatequina e a epigallocatequina são os polifenóis de maior predominância no chá preto. A concentração desses compostos tende a aumentar com a progressão da fermentação (Bishop *et al.*, 2022), conforme observado na análise cromatográfica (Tabela 12). Isso ocorre porque, o consórcio microbiano promove a liberação de enzimas que catalisam a bioconversão de polifenóis mais complexos, presentes inicialmente no chá, convertendo-os em compostos despolimerizados ao final da fermentação (Nizioł-Lukaszewska *et al.*, 2020).

Figura 9 – Kombuchas à base de chá preto e adicionadas de *Handroanthus albus* (ipê amarelo) produzidas em uma cinética de fermentação.

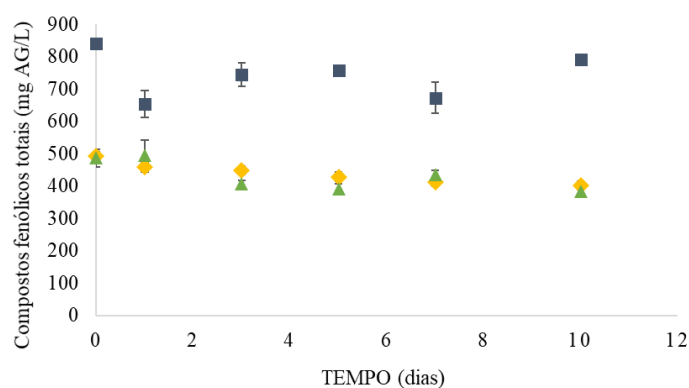


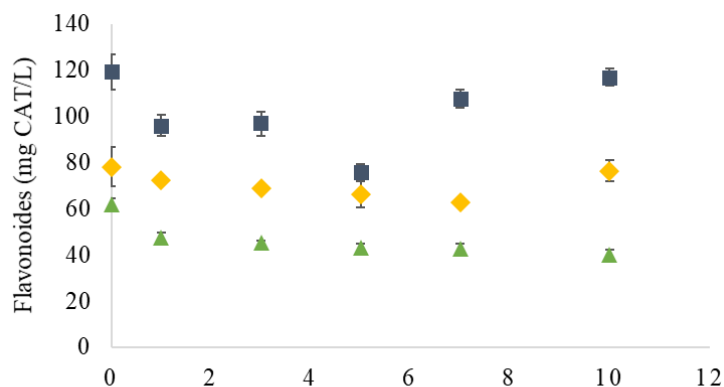
Nota: ¹Kombucha com 100% de chá preto; ²Kombucha com 50% de chá preto e 50% de água; ³Kombucha com 50% de chá preto e 50% de extrato de ipê amarelo; os recipientes estão organizados conforme a ordem da cinética de fermentação (dia 0; 1; 3; 5; 7 e 10).

Fonte: Autoria própria (2023).

No que tange às kombuchas fermentadas com extrato de *H. albus*, o teor de compostos fenólicos variou entre $402,3 \pm 1,66$ mg AG/L e $492,2 \pm 10,88$ mg AG/L. Para o teor de flavonoides foram registrados valores entre $62,87 \pm 1,17$ mg CAT/L e $78,17 \pm 8,45$ mg CAT/L. Quando comparadas às kombuchas com 100% de chá preto no tempo zero de fermentação, as bebidas com ipê apresentaram redução de 1,7 vezes no teor de fenóis totais e 1,5 em flavonoides. Essas alterações são esperadas quando o substrato de fermentação convencional é alterado, uma vez que a maior concentração de polifenóis está nas folhas de *Camellia sinensis* (Bishop *et al.*, 2022). De forma similar às kombuchas de chá preto, as bebidas com adição de ipê não apresentaram redução considerável ($p \leq 0,05$) na concentração de compostos ao final do tempo de fermentação. Comportamento semelhante foi observado por Hardoko *et al.* (2020) em kombucha fermentada com extrato de *Rhizophora mucronata*, na qual o teor de fenóis totais não apresentou alterações ($p > 0,05$) entre o 7º e 14º dia de fermentação. Contrariamente, kombuchas com adição de *Clitoria ternatea* apresentaram aumento no teor de compostos fenólicos e flavonoides após 12 dias de fermentação (Wongthai *et al.*, 2021). Essas variações enfatizam a degradação enzimática de polifenóis e flavonoides complexos em moléculas menores, o que resulta no aumento das suas concentrações com a progressão da fermentação (Chakravorty *et al.*, 2016). Além disso, alterações no substrato de fermentação da kombucha implicam em variações nos compostos presentes no meio, o que resulta em comportamentos diferentes dos microrganismos e síntese variada de novos compostos (Zou *et al.*, 2021).

Figura 10 – Efeito das variáveis tempo e substrato sobre a concentração de compostos fenólicos totais e flavonoides em kombuchas à base de chá preto e adicionadas de *Handroanthus albus* (ipê amarelo).





Legenda: ■ **Kombucha padrão**: 100% de chá preto; ◆ **Kombucha com Ipê amarelo**: com 50% de chá preto e 50% de extrato de ipê amarelo; ▲ **Kombucha controle**: com 50% de chá preto e 50% de água; AG: ácido gálico; CAT: catequina.

Nas amostras de kombucha controle, os resultados observados para fenóis se assemelharam ao fermentado contendo ipê amarelo ($382,9 \pm 15,9$ mg AG/L a $495,12 \pm 47,2$ mg AG/L), ao passo que as concentrações de flavonoides foram inferiores ($40,23 \pm 2,01$ mg CAT/L a $61,8 \pm 2,5$ mg CAT/L). Em um comparativo da kombucha controle com aquela adicionada de extrato floral, constata-se uma melhor performance em termos de flavonoides na kombucha contendo a flor, evidenciando a incorporação de compostos adicionais provenientes do extrato de *H. albus* à bebida final. Contudo, é pertinente ressaltar que os níveis obtidos ainda são inferiores quando comparados ao fermentado padrão (100% de chá preto).

2.3.4.2 Análise cromatográfica de compostos fenólicos individuais

Os componentes fenólicos identificados e quantificados por cromatografia líquida nas kombuchas à base de chá preto e adicionadas de *H. albus* estão ilustrados na Tabela 12. Os resultados revelaram ausência de ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido transferrulico, catequina, epicatequina e quercetina em todas as amostras. O extrato de ipê amarelo obtido nas condições ótimas também foi avaliado, demonstrando a presença de ácido clorogênico e epigallocatequina nos tecidos florais. A kombucha com 100% de chá preto apresentou as maiores concentrações ($p \leq 0,05$) dos compostos detectados (ácido clorogênico; ácido gálico; cafeína; epigallocatequina; rutina), que foram reduzidos paralelamente ao incremento do extrato de *H. albus*. Apesar da redução significativa de compostos frente à substituição de chá preto pelo extrato de ipê amarelo, as kombuchas com infusão floral apresentaram uma composição fenólica mais favorável, quando comparadas ao fermentado controle (50% de chá preto e 50% de água destilada). Ademais, a concentração de todos os compostos detectados na kombucha controle foi

reduzida com a progressão da fermentação, possivelmente em virtude do esgotamento de substrato e nutrientes nesta amostra.

O teor de ácido clorogênico nas kombuchas com ipê amarelo foi igual ($p > 0,05$) à bebida padrão com 100% de chá preto, o que pode estar relacionado à presença do composto no extrato floral. Essas amostras demonstraram comportamento similar em termos de ácido gálico, epigallocatequina e rutina, com aumento progressivo das concentrações após 10 dias de fermentação. Contrariamente, todas as amostras tiveram redução nos teores de cafeína ao final do experimento. Essas oscilações na concentração de compostos fenólicos individuais estão em consonância com o teor de fenóis e flavonoides totais discutidos anteriormente (Figura 10), que demonstraram variações entre as amostras, e superioridade de substâncias bioativas na kombucha com 100% de chá preto. Isso porque, a infusão de chá preto detém uma diversidade de fenólicos diméricos e poliméricos, que são convertidos em substâncias de menor massa molar. Portanto, a variabilidade nos teores de compostos das kombuchas está relacionada à biotransformação ou degradação enzimática, as quais contribuem para o aumento ou redução de bioativos na bebida (Cardoso *et al.*, 2020). Já os estoques de cafeína comumente são reduzidos ou esgotados em virtude do consumo desse constituinte fenólico pelas bactérias e leveduras (Chakravorty *et al.*, 2016).

Comportamento similar às amostras deste estudo foi observado na investigação de Villarreal-Soto *et al.* (2019), que observaram uma redução nos teores de cafeína e epicatequina, em kombuchas à base de chá preto fermentadas em recipientes com diferentes diâmetros por 21 dias. Cardoso *et al.* (2020) documentaram uma predominância do composto epigallocatequina-3-O-galato dentre as catequinas de kombuchas fermentadas com chá preto e chá verde. Já na pesquisa de Amjadi *et al.* (2023), os autores buscaram inovar o processo fermentativo da kombucha a partir da substituição do chá preto por uma infusão das pétalas de *Echium amoenum*. Os pesquisadores registraram um teor de ácido clorogênico de 0,102 g/L nas bebidas à base de chá preto, mas não detectaram a presença desse composto na kombucha com substrato alternativo.

Tabela 12 – Quantificação cromatográfica de compostos fenólicos individuais em kombuchas à base de chá preto e adicionadas de *Handroanthus albus* (ipê amarelo).

| Composto fenólico (g/L) | Dia* | Kombuchas | | | Extrato ⁴ |
|----------------------------|------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------|
| | | Padrão ¹ | Controle ² | Ipê amarelo ³ | |
| Ácido clorogênico | 0 | 0,0070 ^a ± 0,01 | 0,0065 ^b ± 0,02 | 0,0071 ^a ± 0,02 | 0,0063 ^c |
| | 10 | 0,0070 ^a ± 0,01 | 0,0063 ^c ± 0,01 | 0,0071 ^a ± 0,01 | ± 0,01 |
| Ácido gálico | 0 | 0,070 ^b ± 0,01 | 0,041 ^d ± 0,01 | 0,041 ^d ± 0,02 | ND |
| | 10 | 0,108 ^a ± 0,01 | 0,039 ^e ± 0,01 | 0,049 ^c ± 0,02 | |
| Cafeína | 0 | 0,351 ^a ± 0,01 | 0,058 ^e ± 0,01 | 0,143 ^c ± 0,02 | ND |
| | 10 | 0,314 ^b ± 0,01 | 0,028 ^f ± 0,01 | 0,107 ^d ± 0,01 | |
| Epigallocatequina | 0 | 0,038 ^b ± 0,01 | 0,021 ^d ± 0,01 | 0,019 ^e ± 0,01 | 0,011 ^g |
| | 10 | 0,077 ^a ± 0,01 | 0,016 ^f ± 0,02 | 0,026 ^c ± 0,01 | |
| Rutina | 0 | 0,032 ^b ± 0,02 | 0,016 ^e ± 0,01 | 0,021 ^d ± 0,01 | ND |
| | 10 | 0,035 ^a ± 0,01 | 0,013 ^f ± 0,01 | 0,022 ^c ± 0,01 | |

Nota: *Dia de fermentação; ¹Kombucha padrão: 100% de chá preto; ²Kombucha controle: 50% de chá preto e 50% de água; ³Kombucha com ipê amarelo: 50% de chá preto e 50% de extrato de ipê amarelo; ⁴extrato de *H. albus* obtido nas condições ótimas de extração; ND: não detectado ou valores abaixo do limite de detecção. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as amostras a nível de significância de 5% pelo teste de Fisher.

2.3.4.3 Análise cromatográfica do composto β-lapachona

A β-lapachona consiste em uma naftoquinona lipofílica derivada do lapachol (Mokarizadeh *et al.*, 2020). Esses elementos ocorrem naturalmente na casca das espécies florestais dos gêneros *Handroanthus* e *Tabebuia*, popularmente denominados “ipês” (Grose; Olmstead, 2007). Segundo Vianal *et al.* (2003), a quantidade de β-lapachona presente no cerne dos ipês é relativamente inferior a 0,1%. Em relação às flores, até o presente, não foram encontradas investigações sobre a presença de β-lapachona nos tecidos florais da espécie *H. albus*. Portanto, este parece ser o primeiro registro acerca da composição de um extrato das pétalas de ipê amarelo, assim como do produto fermentado resultante de sua aplicação.

O extrato otimizado e as kombuchas adicionadas de *H. albus* foram avaliados cromatograficamente quanto à presença e concentração de β-lapachona. A naftoquinona foi detectada em todas as amostras avaliadas. A maior concentração ($p \leq 0,05$) foi obtida no extrato floral ($202,5^a \pm 2,5$ mg/L), seguido das kombuchas no tempo zero ($135^b \pm 3,61$ mg/L) e décimo dia de fermentação ($137^b \pm 0,20$ mg/L), que não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$). Considerando esses dados em conjunto, é razoável afirmar que a β-lapachona além

de estar presente nos tecidos florais, também agregou valor funcional às kombuchas, mantendo-se estável durante o processo de fermentação.

O crescente interesse pela β -lapachona está arraigado a seus potenciais efeitos benéficos na saúde humana. A naftoquinona já demonstrou efeitos anti-inflamatórios em quadros de Alzheimer, pancreatite e esclerose múltipla (Mokarizadeh *et al.*, 2020). O composto também parece desempenhar ação antioxidante, bactericida e fungicida (Hamed *et al.*, 2020). Além dessas atividades, a β -lapachona já foi reconhecida por sua atividade antitumoral, otimizando o processo apoptótico em células de carcinoma humano (Mokarizadeh *et al.*, 2020; Löcken *et al.*, 2018). Em camundongos portadores de tumor de ascite de Ehrlich, a administração de 1 mg/kg de β -lapachona demonstrou melhor eficácia no prolongamento da vida dos animais (Queiroz *et al.*, 2008). Com base nesse desfecho, é também razoável ressaltar que a biodisponibilidade da β -lapachona é considerada baixa (15,54%), em virtude de sua reduzida solubilidade em água e elevada biodegradação intestinal e hepática (Mokarizadeh *et al.*, 2020). Outra categoria de compostos identificados no ipê amarelo, os polissacarídeos, tem demonstrado atividade antitumoral, conforme investigado previamente por Carlotto *et al.* (2020). Contudo, as evidências nesta área são limitadas a modelos animais e cultura celular.

2.3.4.4 Atividade antioxidante

Em termos de atividade antioxidante pelos métodos ABTS, FRAP e DPPH, as variáveis tempo e substrato de fermentação interferiram significativamente ($p \leq 0,05$) nas kombuchas desenvolvidas (Figura 11). As bebidas fermentadas com mosto de chá preto apresentaram propriedades antioxidantes mais potentes, quando comparadas às kombuchas adicionadas de ipê amarelo e ao fermentado controle. Pelo método ABTS a amostra à base de chá preto com maior potencial foi a KP10 ($6874,52 \pm 28,3 \mu\text{mol TE/L}$), que também se destacou pelo método FRAP ($6708,13 \pm 33,2 \mu\text{mol TE/L}$); enquanto o experimento KP5 apresentou maior resultado para o método DPPH ($12618,77 \pm 38,4 \mu\text{mol TE/L}$). De maneira geral, foi possível observar um aumento progressivo da atividade antioxidante das bebidas durante os 10 dias de experimento. Comportamento similar foi observado por Zou *et al.* (2021), em kombuchas fermentadas com menor concentração de chá preto (6 g/L) e maior tempo de fermentação (14 dias) em comparação ao presente estudo. Yıkmış e Tuğgüm (2019) não observaram diferença estatística ($p > 0,05$) no potencial antioxidante por DPPH, entre o primeiro e o décimo dia de fermentação de kombuchas à base de chá preto. Em outro estudo, pelos métodos ABTS e DPPH

houve redução da atividade antioxidante de kombuchas à base de chá preto após 9 dias de fermentação, enquanto pelo método FRAP essa bioatividade aumentou (Özyurt, 2020).

Já as bebidas adicionadas de ipê amarelo demonstraram menor potencial neutralizador de substâncias reativas. A amostra KI0 apresentou atividade mais elevada ($p \leq 0,05$) pelos métodos ABTS ($4758,8 \pm 98,3 \mu\text{mol TE/L}$) e FRAP ($3522,10 \pm 98,2 \mu\text{mol TE/L}$), em comparação às outras kombuchas com ipê. Pelo método DPPH a bebida codificada como KI1 teve maior destaque ($6819,60 \pm 68,3 \mu\text{mol TE/L}$). Assim, após 10 dias de fermentação foi possível observar uma redução sutil da atividade antioxidante das bebidas com ipê amarelo. Em kombuchas fermentadas com 50% de chá preto e 50% de *Ocimum basilicum*, a atividade antioxidante por DPPH também demonstrou redução significativa com o decorrer do processo fermentativo (Yikmiş; Tuğgüm, 2019). Enquanto kombuchas preparadas com extrato de *Clitoria ternatea* apresentaram aumento progressivo da atividade antioxidante (DPPH e ABTS) após 12 dias de fermentação (Wongthai *et al.*, 2021). Segundo Muhialdin *et al.*, (2019), períodos de fermentação de kombucha por mais de 14 dias não são favoráveis, pois a atividade antioxidante da bebida tende a ser reduzida, o que pode ser associado ao consumo de compostos e ácidos orgânicos como fonte de carbono pelos microrganismos presentes no meio (Jayabalan *et al.*, 2014).

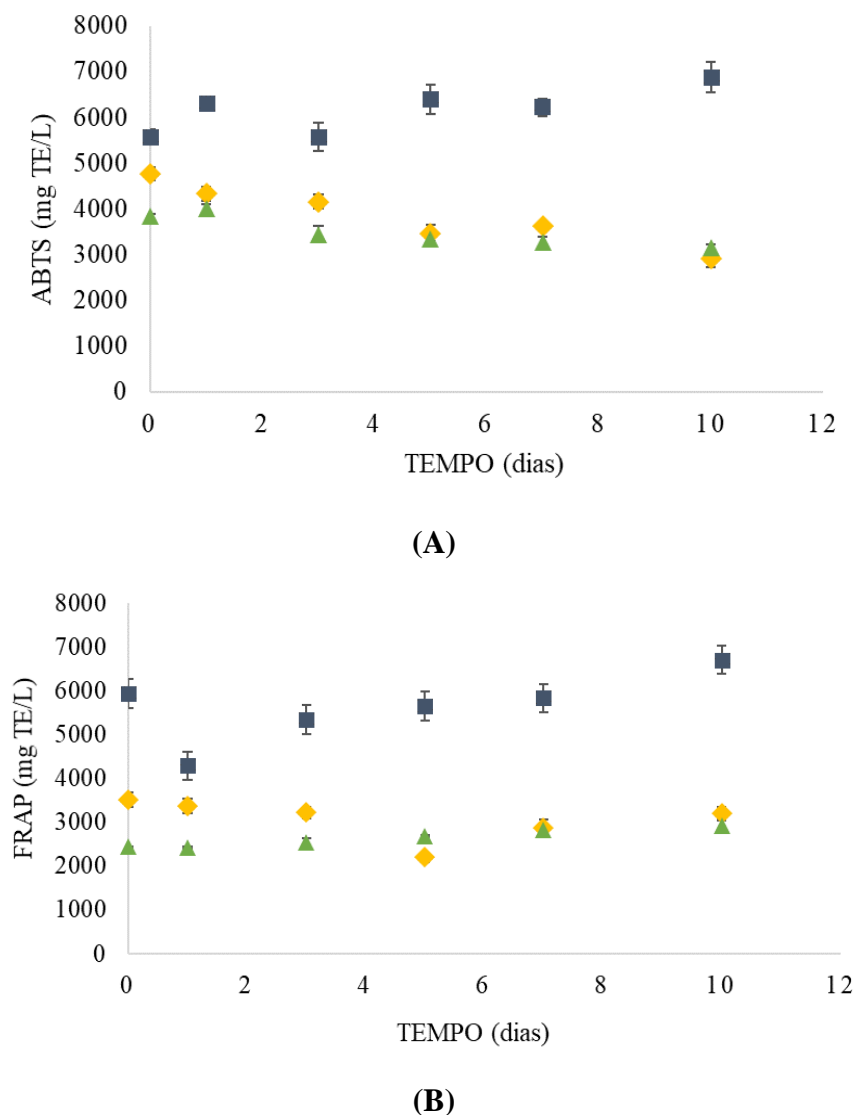
De maneira análoga à kombucha com ipê amarelo, o fermentado controle demonstrou uma performance antioxidante inferior em relação aos ensaios de ABTS ($3138,6 \pm 88,6 \text{ mg TE/L}$ a $4002,4 \pm 57,6 \text{ mg TE/L}$) e FRAP ($2426,4 \pm 22,3 \text{ mg TE/L}$ a $2930,14 \pm 17,8 \text{ mg TE/L}$) quando comparado à bebida padrão, apresentando uma redução progressiva ao longo do processo de fermentação. Pelo método DPPH, embora tenha apresentado um comportamento similar às outras atividades, a kombucha controle evidenciou um desempenho inferior ($3177,15 \pm 74,2 \text{ mg TE/L}$) em relação à bebida contendo *H. albus* ($5906,42 \pm 47,14 \text{ mg TE/L}$) ao final da fermentação (dia 10), confirmando, assim, a incorporação de compostos antioxidantes derivados do tecido floral.

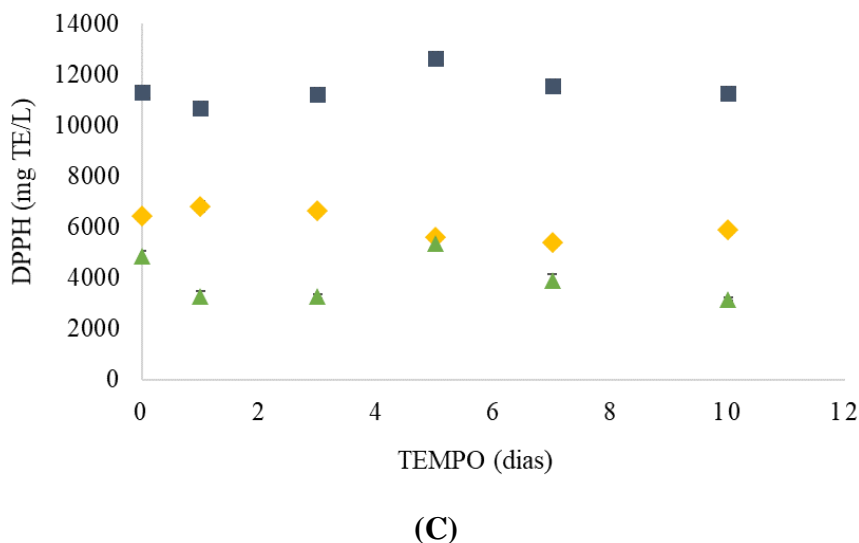
O ligeiro decréscimo observado nas atividades antioxidantes das amostras controle e adicionadas de ipê amarelo está intimamente relacionado à substituição do chá preto. Isso porque, as folhas de *Camellia sinensis* detém a maior concentração de compostos bioativos com potencial de eliminação e neutralização de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (Wang *et al.*, 2019). Os compostos fenólicos possuem a capacidade de doar elétrons e átomos de hidrogênio do grupo $-\text{OH}$, por isso são considerados potentes agentes antioxidantes (Zubaidah *et al.*, 2019). No chá preto a galocatequina, a epigalocatequina e a cafeína se destacam como os fenóis mais predominantes (Wang *et al.*, 2019). Diante desse contexto, o teor de fenóis totais obtido nas

kombuchas com ipê apresentou forte correlação ($p \leq 0,05$) com a atividade antioxidante pelos métodos ABTS ($r = 0,95$) e DPPH ($r = 0,71$). Enquanto nas kombuchas de chá preto foi observada correlação similar também para ABTS ($r = 0,87$) e DPPH ($r = 0,80$).

Além disso, de acordo com o tipo de substrato utilizado, concentração de sacarose e tempo de fermentação, o comportamento da microbiota também pode variar, resultando em diferentes composições da bebida final (Jakubczyk *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2021). Assim, apesar das variações observadas no decorrer do processo fermentativo das kombuchas à base de chá preto e com adição de ipê, o tempo de fermentação de 10 dias demonstrou ser o período mais satisfatório em termos de compostos bioativos e potencial antioxidante.

Figura 11 – Efeito das variáveis tempo e substrato sobre a atividade antioxidante pelos métodos ABTS, FRAP e DPPH das kombuchas à base de chá preto e adicionadas de *Handroanthus albus* (ipê amarelo).





Legenda: ■ **Kombucha padrão**: 100% de chá preto; ◆ **Kombucha com Ipê amarelo**: com 50% de chá preto e 50% de extrato de ipê amarelo; ▲ **Kombucha controle**: com 50% de chá preto e 50% de água; TE: equivalentes de Trolox.

2.3.4.5 Ganho de massa da placa celulósica

O ganho de massa da matriz celulósica foi monitorado com o propósito de avaliar a dinâmica dos microrganismos em relação à variação temporal e ao substrato de fermentação das kombuchas (Figura 12). Nas bebidas desenvolvidas com mosto de chá preto (100%) foi possível observar uma rápida adaptação das bactérias e leveduras, visto que a formação de uma nova película ocorreu no 3º dia de fermentação. Nas kombuchas enriquecidas com ipê amarelo, a nova placa celulósica foi observada somente após o 5º dia, o que poderia sugerir certo grau de atividade antimicrobiana oriunda do tecido floral. Essa suposição ganha consistência ao considerar o comportamento do SCOBY na kombucha controle, o qual assemelhou-se ao da bebida padrão. Apesar de fermentada com uma proporção de 50% de chá preto e 50% de água, a similaridade de desempenho com a kombucha tradicional pode ser explicada pela ausência do extrato floral na composição. No 10º dia de experimento o SCOBY das kombuchas à base de chá preto foi 2,8 vezes mais robusto ($2,83 \pm 0,02$ g), quando comparado à massa de celulose microbiana das kombuchas com ipê amarelo ($0,95 \pm 0,02$ g). Ao final do experimento, a placa microbiana do fermentado controle apresentou uma massa equivalente a $2,34 \pm 0,01$ g.

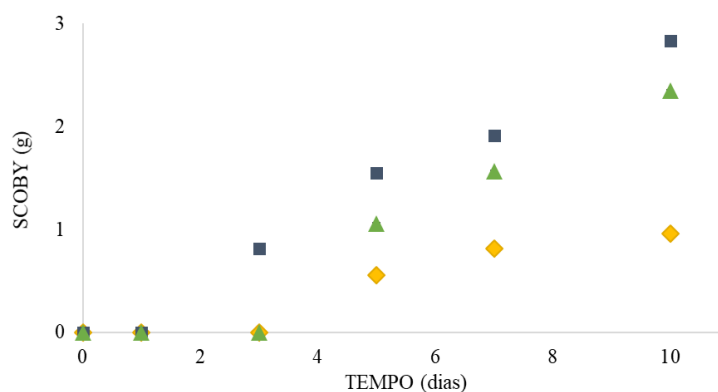
A formação de uma nova placa celulósica indica que o processo fermentativo está ocorrendo (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). Inicialmente as bactérias acéticas utilizam o substrato como combustível para a multiplicação celular (Bishop *et al.*, 2022). Em seguida, parte da glicose e do etanol são consumidos para sintetizar e polimerizar as cadeias de celulose,

formando as fibrilas da rede do SCOBY. Destacam-se nesse processo bactérias do gênero *Acetobacter* como *Komagataeibacter xilynus* e *Gluconacetobacter intermedius*, por exemplo (Morales, 2020).

Assim, embora tenha transcorrido de maneira mais lenta, o processo de formação do SCOBY nas kombuchas adicionadas de ipê também ocorreu. Isso indica que o complexo de microrganismos se adaptou ao ambiente fermentativo. Esse retardo na formação da nova placa celulósica, bem como a menor quantidade de massa formada podem estar associados à uma possível atividade antimicrobiana. Entretanto, estudos sobre essa bioatividade dos tecidos florais de *H. albus* ainda configuram uma lacuna na literatura. A porção anatômica da espécie com predominância de estudos sobre essa temática é a casca. Isso porque, no cerne são encontrados os metabólitos lapachol e a β -lapachona, que podem desempenhar ação antimicrobiana (Hamed *et al.*, 2020). Portanto, conforme discutido previamente (seção 2.3.4.3), a presença da β -lapachona no extrato floral e nas kombuchas produzidas pode constituir uma explicação plausível para o retardo na formação do SCOBY nas bebidas contendo *H. albus*.

Na formação de biofilmes, a β -lapachona inibiu a atividade de *Staphylococcus aureus* (Fernandes *et al.*, 2020). Já no estudo de Tomazeli *et al.* (2020), os extratos das flores de uma outra variedade de ipê amarelo (*Tabebuia aurea*) não demonstraram atividade antibacteriana e antifúngica. Portanto, novas investigações seriam necessárias para tecer maiores explicações acerca dos compostos presentes nas pétalas de *H. albus*, e sua possível interação com o complexo microbiano do SCOBY.

Figura 12 – Efeito das variáveis tempo e substrato sobre o ganho de massa do SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) formado nas kombuchas à base de chá preto e adicionadas de *Handroanthus albus* (ipê amarelo).



Legenda: ■ **Kombucha padrão**: 100% de chá preto; ◆ **Kombucha com Ipê amarelo**: com 50% de chá preto e 50% de extrato de ipê amarelo; ▲ **Kombucha controle**: com 50% de chá preto e 50% de água.

2.3.4.6 Potencial hidrogeniônico e quantificação de ácidos orgânicos

A influência do tempo e do substrato de fermentação sobre o pH e síntese de ácidos orgânicos foi avaliada nas kombuchas elaboradas (Figura 13). O comportamento das bebidas em relação ao pH foi semelhante em ambos os substratos, com redução progressiva dos valores até o final da fermentação. As kombuchas alcançaram valores de pH situados entre $2,51 \pm 0,02$ e $2,62 \pm 0,04$ no décimo dia de fermentação ($p > 0,05$), estando em consonância com a legislação nacional em vigor (Brasil, 2019). A redução gradativa do pH das bebidas está intimamente associada à síntese de ácidos orgânicos, que são produzidos pelo complexo simbiótico de microrganismos durante a fermentação (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). Essa diminuição nos valores de pH também foi observada em kombuchas à base de chá preto (Jakubczyk *et al.*, 2020) e adicionadas de flores de *Malaviscus arboreus* (Silva *et al.*, 2021), fermentadas por 14 dias. Ademais, a acidificação do meio fermentativo da kombucha é favorável para a inocuidade da bebida, pois limita o desenvolvimento de organismos patogênicos (Bishop *et al.*, 2022).

Durante a fermentação da kombucha as bactérias acéticas realizam a conversão do etanol em ácido acético (Bishop *et al.*, 2022). Por isso a bebida é considerada não alcoólica, porque em condições adequadas de fermentação seu teor de etanol não deve ser superior a 0,5% (v/v), em virtude do consumo desse composto pelo complexo microbiano (Brasil, 2019). A concentração de ácido acético tende a apresentar uma redução com a progressão da fermentação, o que foi observado nas bebidas desenvolvidas (Figura 13). O teor máximo de ácido acético foi alcançado no sétimo dia de fermentação para as kombuchas padrão ($12 \pm 0,02$ g/L) e adicionada de ipê amarelo ($9,2 \pm 0,02$ g/L). Entretanto, na bebida controle, esse pico foi observado no quinto dia ($1,5 \pm 0,02$ g/L), sofrendo uma redução significativa ($p \leq 0,05$) em ambas as amostras ao término do experimento. Essa redução pode ser explicada pelo uso do ácido acético como fonte de carbono pelos microrganismos presentes no meio, uma vez que as reservas de sacarose e etanol na matriz de fermentação vão sendo esgotados no decorrer do processo (Bishop *et al.*, 2022).

Em termos de ácido acético, os resultados desta investigação corroboram com os achados descritos na literatura. Em kombuchas fermentadas com chá preto, Jakubczyk *et al.* (2020) registraram um teor de ácido acético de 7,03 g/L, enquanto Neffe-Skocińska *et al.* (2017) apresentaram uma variação de 1,42 a 1,65 g/L. Por outro lado, Cardoso *et al.* (2020) observaram uma concentração inferior a 10 g/L nesse contexto. Em kombuchas enriquecidas com *Achillea millefolium*, a concentração de ácido acético atingiu 17,76 g/L (Vitas *et al.*, 2018). Silva *et al.*

(2021) obtiveram 8,8 g/L desse composto em kombuchas com extratos de *Malvaviscus arboreus* e 3,9 g/L nas bebidas à base de chá verde. É importante destacar que essa variação de valores está diretamente ligada aos parâmetros metodológicos empregados. Dentre os estudos citados, por exemplo, os teores de sacarose variaram de 35 a 100 g/L, a concentração de chá foi de 2,26 a 12 g/L e as temperaturas de fermentação oscilaram entre 20 e 30 °C. Quanto à duração do experimento, os estudos estipularam períodos de 7 a 14 dias de protocolo. O tempo de fermentação parece ser o fator de maior impacto nos teores de ácido acético, que demonstram valores mais altos quando associados a períodos de fermentação mais longos.

A concentração de ácido ascórbico aumentou significativamente ($p \leq 0,05$) ao longo do processo fermentativo tanto nas kombuchas padrão (100% de chá preto), quanto naquelas adicionadas de ipê amarelo. O teor máximo desse composto foi observado na bebida à base de chá preto após 10 dias de fermentação ($0,95 \pm 0,01$ g/L), que foi 2,4 vezes superior em relação à kombucha com extrato floral no mesmo período de experimento ($0,39 \pm 0,02$ g/L). Contrariamente, no fermentado controle, observou-se uma redução ($p \leq 0,05$) desse composto à medida que a fermentação progredia, possivelmente devido à escassez de substrato no mosto. A vitamina C é um micronutriente característico da kombucha, por isso uma pequena concentração (0,30 g/L) foi detectada nas bebidas antes da fermentação (dia 0), em virtude da presença do ácido ascórbico no *starter* fermentado previamente. A concentração desse micronutriente tende a aumentar com o avanço da fermentação, em virtude da síntese de ácido ascórbico realizada pelas bactérias a partir da glicose (Miranda *et al.*, 2022). Corroborando com os achados de Vitas *et al.* (2018) e Lonăr *et al.*, (2006), que registraram aumento na concentração de vitamina C com a progressão da fermentação de kombuchas adicionadas de *Achillea millefolium* e à base de chá preto, respectivamente. Ademais, infusões de chá preto ou verde configuram as alternativas de substrato para fermentação de kombucha mais indicadas, para obter melhores resultados em termos de síntese de ácido ascórbico (Bishop *et al.*, 2022), conforme observado no presente estudo. Apesar da concentração de vitamina C ser semelhante em ambos os substratos no ponto inicial da fermentação (dia 0), as kombuchas com 100% de chá preto apresentaram aumento desse composto em 3,2 vezes ao final do processo (dia 10); enquanto nas kombuchas com extrato de *H. albus* a proporção de aumento foi de apenas 1,3 vezes.

Foi possível observar um comportamento satisfatório em termos de síntese de ácido glucurônico nas kombuchas desenvolvidas com adição de ipê amarelo (Figura 13). O fermentado à base de chá preto apresentou concentração máxima do composto somente no 10°

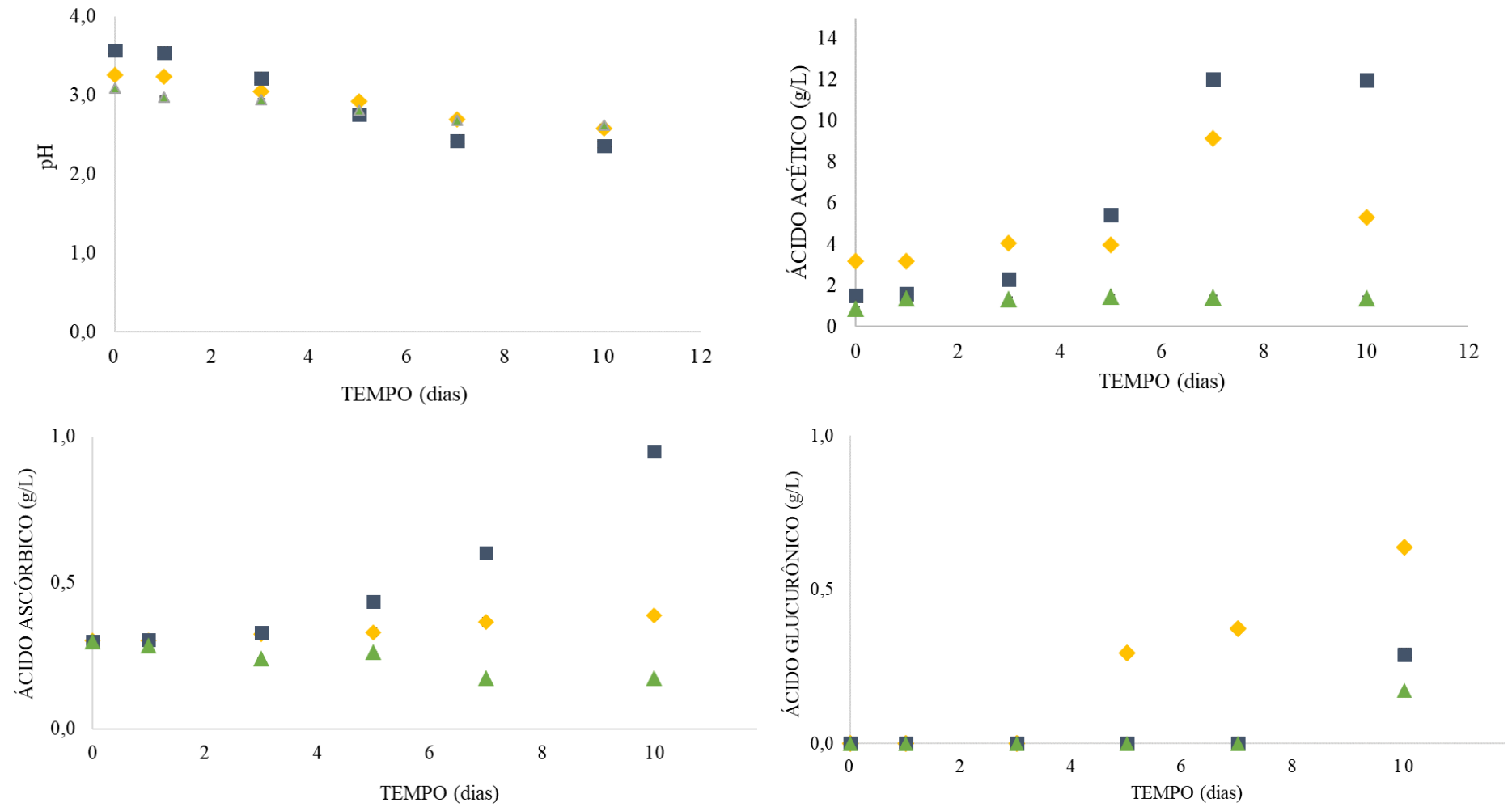
dia de experimento ($0,29 \pm 0,02$ g/L), sendo que essa mesma concentração ($p > 0,05$) foi obtida no 5° dia de fermentação das kombuchas com ipê. O teor máximo de ácido glucurônico detectado nas bebidas foi de $0,64 \pm 0,01$ g/L, encontrado no fermentado com extrato de ipê amarelo no décimo dia de fermentação. No experimento controle, de forma similar à kombucha padrão, o ácido glucurônico foi detectado somente no 10° dia de experimento ($0,17 \pm 0,01$ g/L). Esse composto é sintetizado pelas bactérias acéticas (*Acetobacter xylinoides*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Bacterium gluconicum* e *Gluconobacter oxydans*), que utilizam os monossacarídeos como substrato energético (Jakubczyk *et al.*, 2020; Morales, 2020). Os resultados obtidos neste estudo indicam teores de ácido glucurônico inferiores aos encontrados em kombuchas fermentadas com chá verde ($0,84$ g/L) (Shahbazi *et al.*, 2018), porém superiores aos identificados em kombuchas preparadas com chá preto ($0,47$ g/L) (Cardoso *et al.*, 2020), conduzidas ao longo de períodos de fermentação de 16 e 10 dias, respectivamente. Nguyen *et al.* (2014) reportaram a mais alta concentração de ácido glucurônico ($0,043$ g/L) em kombuchas adicionadas de cepas de bactérias lácticas *Lactobacillus casei*. Segundo os autores, as bactérias lácticas podem melhorar a sobrevivência das bactérias acéticas, potencializando assim a ação desses organismos na kombucha. Portanto, as disparidades na síntese de ácido glucurônico na kombucha parecem estar estreitamente associadas à diversidade microbiológica da cultura iniciadora e às interações sinérgicas entre esses organismos.

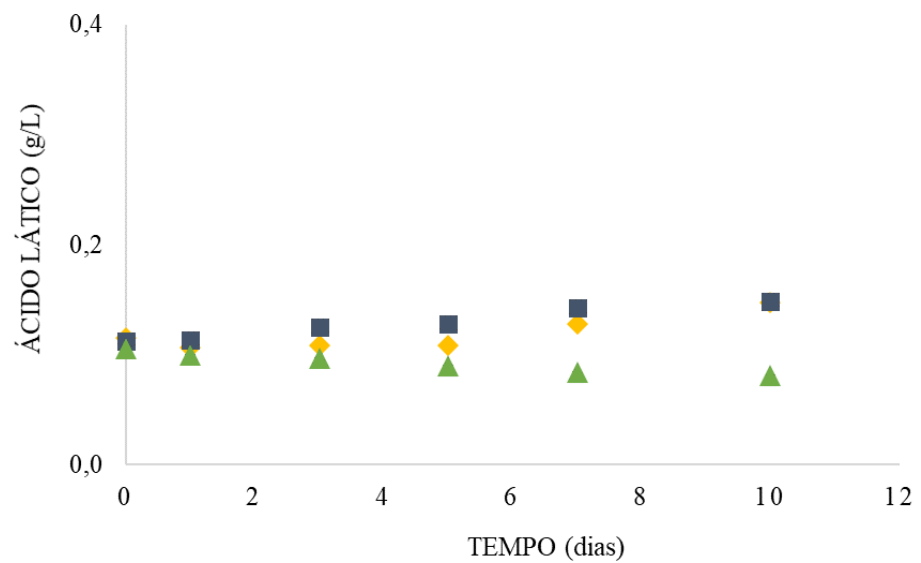
O ácido glucurônico configura um composto de interesse na kombucha, pois participa da desintoxicação xenobiótica do fígado. Esse composto bioativo se liga a substâncias químicas exógenas, excesso de hormônios, esteroides e poluentes, e através do sistema urinário otimiza a eliminação dessas toxinas (Leal *et al.*, 2018). Além de participar da biossíntese de vitamina C, aumentar a biodisponibilidade de polifenóis e contribuir na profilaxia da osteoartrite (Bishop *et al.*, 2022). Diante desse contexto, o teor de ácido glucurônico obtido na kombucha adicionada de *H. albus*, configura um avanço para a comunidade científica. O extrato de ipê promoveu um ambiente favorável para a multiplicação e sinergia dos microrganismos envolvidos na síntese de ácido glucurônico. Assim, a adição de tecidos florais como substrato alternativo para a kombucha, consolida-se como uma opção eficiente para o aperfeiçoamento das características funcionais da bebida.

Os níveis de ácido láctico apresentaram variações entre $0,11 \pm 0,01$ g/L e $0,15 \pm 0,02$ g/L nas kombuchas preparadas com chá preto e naquelas enriquecidas com ipê. A bebida controle exibiu teores de ácido láctico entre $0,08 \pm 0,02$ g/L e $0,11 \pm 0,03$ g/L. Observou-se que as kombuchas iniciaram o processo fermentativo com teores semelhantes de ácido láctico ($0,10$

g/L), sem diferença ($p > 0,05$) entre as amostras. A síntese desse ácido permaneceu constante e muito similar nos substratos de chá preto e adicionado de *H. albus*, mantendo-se estável na kombucha controle. Na literatura são encontrados resultados inferiores (0,02 g/L) (Cardoso *et al.*, 2020) ou muito similares ao deste estudo (0,15 g/L) (Shahbazi *et al.*, 2018), em kombuchas preparadas com chá preto e verde, respectivamente. O elevado teor de ácido láctico nas kombuchas indica a presença de bactérias lácticas metabolicamente ativas no meio fermentativo (Jakubczyk *et al.*, 2020). Esses microrganismos possivelmente contribuíram para a sobrevivência das bactérias acéticas, potencializando a síntese de ácido glucurônico (Nguyen *et al.*, 2014), conforme observado nas kombuchas desenvolvidas.

Figura 13 – Efeito das variáveis tempo e substrato sobre o pH e concentração de ácidos orgânicos em kombuchas à base de chá preto e adicionadas de *Handroanthus albus* (ipê amarelo).





Legenda: ■ **Kombucha padrão**: 100% de chá preto; ◆ **Kombucha com Ipê amarelo**: com 50% de chá preto e 50% de extrato de ipê amarelo; ▲ **Kombucha controle**: com 50% de chá preto e 50% de água destilada.

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato otimizado de *H. albus* demonstrou características favoráveis para a fermentação de kombucha, conferindo à bebida final um perfil funcional atrativo para consumo humano. Apesar da menor concentração de compostos bioativos na kombucha fermentada com tecido floral, essa bebida apresentou um comportamento similar à kombucha padrão. Ademais, a adição do extrato de ipê amarelo proporcionou a incorporação do composto β -lapachona à bebida final, bem como favoreceu a síntese de ácido glucurônico, um dos principais compostos de interesse na kombucha. Essa descoberta representa um dos resultados mais relevantes deste estudo, apresentando-se como um avanço significativo para a comunidade científica. Novas pesquisas em diferentes condições experimentais são encorajadas para avaliar o potencial antiglicêmico das pétalas de *H. albus*, já que nesta investigação não foi identificada atividade hipoglicemiante. Além disso, os resultados aqui documentados poderão fornecer *insights* valiosos para futuras investigações, uma vez que este é o primeiro registro conhecido sobre a adição das pétalas de *H. albus* na kombucha.

CAPÍTULO 3 – FERMENTAÇÃO DE KOMBUCHA COM PÉTALAS DE CAPUCHINHA (*Tropaeolum majus*)

RESUMO: A kombucha é uma bebida amplamente consumida e apreciada por suas propriedades bioativas desintoxicantes no organismo humano. A bebida é obtida a partir da fermentação de chá adoçado por um consórcio microbiano denominado SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*). Além das infusões tradicionais provenientes das folhas de *Camellia sinensis*, outras alternativas de substratos vêm sendo exploradas para aperfeiçoar as características bioativas e funcionais da kombucha. Por isso, considerando a diversidade de compostos bioativos presentes nas flores comestíveis, a espécie *Tropaeolum majus*, popularmente conhecida como capuchinha, emerge como uma fonte natural com grande potencial para a fermentação da kombucha. Esta investigação objetivou desenvolver kombuchas à base de chá preto com a adição de extratos das pétalas de *T. majus*. O experimento iniciou com a identificação das condições ideais de extração dos compostos bioativos presentes nas pétalas florais, empregando um delineamento experimental do tipo Box-Behnken. Posteriormente, o extrato otimizado foi adicionado às kombuchas à base de chá preto, fermentadas durante 10 dias, com análises da cinética de fermentação realizadas nos dias 0, 1, 3, 5, 7 e 10. As bebidas com extrato floral apresentaram comportamento similar em termos de compostos bioativos e redução dos valores de pH, comparativamente à kombucha padrão. Todas as amostras de kombucha mantiveram valores de pH dentro das normas regulatórias. Os pigmentos antocianínicos conferiram um aumento na atividade antioxidante nas bebidas adicionadas de extrato floral. A síntese de ácidos orgânicos nas bebidas com extrato floral foi comparável ao fermentado padrão, indicando que o extrato pode ser considerado um ingrediente alternativo viável para a produção de kombucha.

Palavras-chave: Bebida fermentada. Flores comestíveis. Bioatividade. Antocianinas. HPLC. Ácidos orgânicos.

3.1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda dos consumidores por alimentos funcionais com propriedades biológicas relevantes para a saúde humana, tem incentivado a comunidade científica e a indústria de alimentos ao desenvolvimento de novos produtos, ou aperfeiçoamento daqueles já consolidados no mercado. A kombucha é uma bebida milenar de origem Chinesa, com registros de seu conhecimento e consumo desde 200 a.C. (Kapp; Summer, 2019). A bebida consiste no produto da fermentação alcoólica conduzida por leveduras e acidificação de bactérias acéticas aglomeradas em uma rede celulósica denominada SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) (Bishop *et al.*, 2022). O processo fermentativo ocorre a partir da inoculação da placa de celulose em um substrato, comumente preparado com chá preto e sacarose (Cardoso *et al.*, 2020). Como resultado desse processo e consumo do substrato, obtém-se uma bebida com perfil bioativo favorável para consumo humano, capaz de fornecer profilaxia e recuperação da saúde.

Em vista disso, tem sido sugerido que a kombucha pode desempenhar atividade anti-inflamatória, antiglicêmica, hipotensora, hipocolesterolêmica, além de conferir fortalecimento do sistema imunológico, otimizar os processos de desintoxicação hepática e inibir a proliferação de células cancerígenas (Bishop *et al.*, 2022).

Os benefícios associados à kombucha estão relacionados com suas propriedades antioxidantes e presença de compostos bioativos como catequina, epicatequina, teaflavina e tearubigina. Essas propriedades são provenientes do processo fermentativo, bem como das folhas de *Camellia sinensis*, que é a matéria-prima tradicionalmente utilizada para o preparo do chá (Morales, 2020; Permatasari *et al.*, 2022). Além do chá preto, outras variações de chá das folhas de *C. sinensis* podem ser empregadas como chá verde, branco e *oolong* (Bishop *et al.*, 2022). Além dessas variações de chás, alguns estudos têm investigado a viabilidade de outras espécies vegetais para fermentação de kombucha como *Moringa oleifera* (Primiani *et al.*, 2018), *Rhizophora mucronata* (Hardoko *et al.*, 2020), manjerição (*Ocimum basilicum*) (Yikmiş; Tuğgüm, 2019), sabugueiro (*Sambucus nigra*) (Vitas *et al.*, 2020) e canela (*Cinnamomum verum*) (Shahbazi *et al.*, 2018). Flores comestíveis como *Clitoria ternatea* (Permatasari *et al.*, 2022; Wongthai *et al.*, 2021) *Achillea millefolium* (Vitas *et al.*, 2018) e *Malvaviscus arboreus* (Silva *et al.*, 2021) também já foram exploradas.

A espécie *Tropaeolum majus*, pertencente à família Tropaeolaceae, é uma planta herbácea nativa dos Andes, popularmente conhecida como capuchinha, caracterizada por suas flores vistosas com potencial alimentício (Valsalam *et al.*, 2019). As inflorescências possuem pétalas com tonalidades variadas, do amarelo ao laranja e vermelho, sendo frequentemente utilizadas na alta gastronomia para guarnecer pratos ou enriquecer saladas, conferindo-lhes um sabor apimentado atribuído à presença de glucosinolatos (Česlová *et al.*, 2023). Os tecidos florais da planta apresentam uma composição rica em compostos fenólicos, vitamina C, luteína, ácidos graxos essenciais como o linoleico, e glucotropaeolina (Barros *et al.*, 2020; Česlová *et al.*, 2023). Essa composição nutricional torna a capuchinha um recurso valioso na medicina tradicional, em virtude dos potenciais efeitos terapêuticos na saúde humana. Seus benefícios incluem melhorias em infecções do trato urinário devido à ação antibacteriana, além de contribuir positivamente para distúrbios cardiovasculares, hipertensão e asma (Garzón *et al.*, 2015).

De posse desse contexto, torna-se evidente que a capuchinha emerge como um recurso natural com potencial para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios, visando agregar valor sensorial e funcional. Em complemento, a kombucha carece de novas alternativas de

substratos para fermentação, com vistas a inovar as características e propriedades bioativas da bebida. Portanto, esta investigação se propõe a desenvolver uma bebida fermentada por microrganismos da kombucha, com a adição de extratos das pétalas de *T. majus*.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Materiais

3.2.1.1 Material vegetal

As flores de *Tropaeolum majus* L. (variedade da cor laranja) foram cultivadas no campus da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) (25°05'23.0"S 50°06'03 0"W), Ponta Grossa, Paraná, Brasil. As inflorescências foram removidas dos pedúnculos, com posterior enxágue das flores em água destilada e acondicionamento em sacos de polietileno selados (3L – 23cm x 38cm), para congelamento em *ultrafreezer* a -86 °C (NuAire®, Glacier NU-9668, Minnesota, EUA) até o momento das análises. Uma exsiccata contendo folhas, flores, caules, raízes e sementes foi coletada para autenticação da espécie pelo herbário da UEPG. O material encontra-se tombado na carpoteca sob o espécime de código HU-22803 (Anexo B). Este projeto se encontra cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) do Ministério do Meio Ambiente do Brasil (registro# A20820A). As folhas de *Camelia sinensis* (L.) Kuntze (Leão Alimentos e Bebidas Ltda®, Fazenda Rio Grande-PR, Brasil) foram obtidas em comércio local do município de Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

3.2.1.2 Symbiotic culture of bacteria and yeast

O SCOBY utilizado para a fermentação das kombuchas foi adquirido em sua forma hidratada e de fonte certificada (*The Kombucha Hub*®, Laboratório *White Labs*, Frankfurt, Alemanha). A massa celulósica era composta por 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.

3.2.1.3 Reagentes químicos

Os seguintes reagentes foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA): ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)), DPPH (2,2-difenil-2-picrilhidrazil), Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico), TPTZ (2,4,6-Tris(2-Pyridyl)-S-Triazine), Folin-Ciocalteu, β-lapachona e demais padrões para análise cromatográfica. Os reagentes de grau HPLC (High Performance Liquid Chromatography) como

metanol, ácido acético e acetonitrila foram obtidos da J. T. Baker[®] (Phillipsburg, New Jersey, EUA). O hidróxido de sódio e o nitrito de sódio de grau analítico foram obtidos da Merck[®] (Darmstadt, Alemanha); assim como o cloreto de alumínio foi adquirido da FLUKA[®] (St. Louis, MO, EUA); acetato de sódio anidro, cloreto de ferro e ácido clorídrico da BIOTEC[®] (Cotia, SP, Brasil); e água ultrapura (Milli-Q[®], Millipore, SP, Brasil).

3.2.1.4 Outros materiais

Como fonte de carbono para as kombuchas utilizou-se açúcar cristal (Camil Alimentos S/A[®], São Paulo, Brasil), que foi obtido em comércio local do município de Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Otimização da extração de compostos bioativos das pétalas de *Tropaeolum majus*

As pétalas de capuchinha foram infundidas em *erlenmeyers* (capacidade de 100 mL) com água destilada aquecida (25 mL) e em banho-maria sob aquecimento constante, de acordo com as temperaturas estabelecidas no planejamento fatorial (Tabela 13). Durante o processo os frascos foram devidamente selados com filme PVC (policloreto de vinila) para evitar a evaporação. Após a extração utilizou-se papel filtro qualitativo Whatman n^o 1 (Whatman, Sigma Aldrich[®], St Louis, MO, USA) para filtrar as infusões e reter os tecidos florais.

Visando otimizar os parâmetros de extração de compostos bioativos das pétalas de *T. majus*, um planejamento experimental Box-Behnken (1960) foi aplicado para avaliar os efeitos das variáveis independentes concentração de pétalas (X_1), tempo (X_2) e temperatura de infusão (X_3) (Tabela 13). As variáveis foram testadas com três níveis, sendo os intervalos estabelecidos com base na concentração de compostos fenólicos totais determinados em testes prévios. O delineamento experimental resultou em 15 combinações (CAP1 a CAP15) de ordem aleatória para minimizar variações inesperadas, e três pontos centrais. A execução desse planejamento objetivou detectar padrões de resposta e determinar modelos para maximizar o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante dos extratos.

Tabela 13 – Planejamento fatorial Box-Behnken aplicado para otimizar a extração de compostos das pétalas de *Tropaeolum majus* (capuchinha).

| Experimento | Concentração de pétalas (g/L); X ₁ | | Tempo (minutos); X ₂ | | Temperatura (°C); X ₃ | |
|-------------|--|-------------------|------------------------------------|------------------|-------------------------------------|------------------|
| | Fatores | Valores reais* | Fatores | Valores reais | Fatores | Valores reais |
| | CAP 1 | -1 | 20 | -1 | 2 | 0 |
| CAP 2 | +1 | 60 | -1 | 2 | 0 | 65 |
| CAP 3 | -1 | 20 | +1 | 10 | 0 | 65 |
| CAP 4 | +1 | 60 | +1 | 10 | 0 | 65 |
| CAP 5 | -1 | 20 | 0 | 6 | -1 | 40 |
| CAP 6 | +1 | 60 | 0 | 6 | -1 | 40 |
| CAP 7 | -1 | 20 | 0 | 6 | +1 | 90 |
| CAP 8 | +1 | 60 | 0 | 6 | +1 | 90 |
| CAP 9 | 0 | 40 | -1 | 2 | -1 | 40 |
| CAP 10 | 0 | 40 | +1 | 10 | -1 | 40 |
| CAP 11 | 0 | 40 | -1 | 2 | +1 | 90 |
| CAP 12 | 0 | 40 | +1 | 10 | +1 | 90 |
| CAP 13 | 0 | 40 | 0 | 6 | 0 | 65 |
| CAP 14 | 0 | 40 | 0 | 6 | 0 | 65 |
| CAP 15 | 0 | 40 | 0 | 6 | 0 | 65 |

Nota – X₁; X₂; X₃: codificações das variáveis concentração de pétalas, tempo e temperatura, respectivamente, aplicadas em três níveis no planejamento experimental. *Uma unidade de flor de capuchinha corresponde a aproximadamente 0,5 g de pétalas.

3.2.2.2 Cinética de fermentação de kombucha com extrato de *Tropaeolum majus*

O extrato de capuchinha otimizado foi adicionado em kombuchas à base de chá preto, visando avaliar a cinética de fermentação da bebida por um período de 10 dias. O chá preto utilizado como substrato base foi preparado conforme método proposto por Zielinski *et al.* (2014). A infusão foi preparada com uma concentração de 12 g/L de chá e adicionada de 150 g/L de sacarose, conforme parâmetros otimizados previamente (Capítulo 2).

Após o resfriamento do chá (≤ 25 °C), o conteúdo foi distribuído em fermentadores (capacidade de 400 mL), com variação nas proporções. Para as kombuchas adicionadas de *T.*

majus a fermentação foi realizada com 50% de chá preto (90 mL) e 50% de extrato (90 mL). Amostras de kombuchas com 100% de chá preto (180 mL) utilizadas para controle, também foram submetidas à cinética. Em seguida todos os fermentadores foram adicionados de 10% (v/v) de kombucha fermentada previamente (líquido) e do SCOBY (2,5% m/v; em base úmida). Visando manter um ambiente de preparo estéril, os procedimentos descritos foram realizados em câmara de fluxo laminar (Quimis[®], Q216F21H, São Paulo, Brasil). Em seguida, os fermentadores foram fechados com tecido poroso de poliéster, para permitir uma condição de aerobiose necessária à fermentação da kombucha. Os frascos foram acondicionados em incubadora BOD com temperatura controlada de 23 °C (SPLABOR[®], SP-500, São Paulo, Brasil), que também foi definida com base em experimento de otimização prévio (Capítulo 2).

O experimento da cinética de fermentação foi conduzido por 10 dias com coleta de amostras nos dias 0, 1, 3, 5, 7 e 10. Portanto, o desenho experimental resultou em 12 fermentadores (Tabela 14) codificados conforme seu respectivo tempo e substrato de fermentação. Após o tempo de fermentação de cada frasco, os SCOBYS foram removidos com uma pinça histológica esterilizada e acomodados em placas de petri para secagem, enquanto as amostras fermentadas foram congeladas (-18 °C) (Gelopar[®], GPC-57, Curitiba, Brasil) até o momento das determinações analíticas. As amostras produzidas durante a cinética foram avaliadas quanto ao ganho de massa de SCOBY; pH; teor de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos ABTS, FRAP e DPPH.

Tabela 14 – Distribuição e codificação dos fermentadores de kombucha adicionadas de *Tropaeolum majus* (capuchinha) e chá preto de acordo com o tempo de fermentação.

(Continua)

| Tempo de fermentação (dias) | Kombucha padrão ¹ | Kombucha controle ² | Kombucha com capuchinha ³ |
|-----------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| | Codificação | | |
| 0 | KPC0 | KCT0 | KC0 |
| 1 | KPC1 | KCT1 | KC1 |
| 3 | KPC3 | KCT3 | KC3 |
| 5 | KPC5 | KCT5 | KC5 |

(Conclusão)

| Tempo de fermentação (dias) | Kombucha padrão ¹ | Kombucha controle ² | Kombucha com capuchinha ³ |
|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| | <i>Codificação</i> | | |
| 7 | KPC7 | KCT7 | KC7 |
| 10 | KPC10 | KCT10 | KC10 |
| Total de fermentadores | 6 | 6 | 6 |

Nota: ¹Kombuchas com 100% de chá preto; ²Kombucha com 50% de chá preto e 50% de água; ³Kombucha com 50% de chá preto e 50% de extrato de capuchinha.

3.2.3 Análises

3.2.3.1 Análises físico-químicas

O ganho de massa de SCOBY formado durante a fermentação das kombuchas foi calculado em base seca, após a secagem do material em estufa (Quimis[®], Q317M, São Paulo, Brasil) a 105 °C até peso constante. Os valores de Potencial Hidrogeniônico (pH) das bebidas fermentadas foram obtidos por leitura direta em pHmetro de bancada (Tec -3 MP, Tecnal[®], São Paulo, Brasil) calibrado em pH 4,0 e 7,0, a 20 °C.

3.2.3.2 Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais dos extratos de *T. majus* e das kombuchas foi determinado com base no método de *Folin-Ciocalteu* proposto por Singleton e Rossi (1965). A determinação foi realizada em tubos de ensaio com adição de água destilada (8,4 mL); 100 µL de amostra e 500 µL de *Folin-Ciocalteu* (0,2 mol L⁻¹). Os tubos foram agitados (Vórtex, Vision Scientific[®], Daejeon, Coreia do Sul) por 30 segundos, e após 3 minutos da adição de *Folin-Ciocalteu* os tubos receberam a adição de 1000 µL de Na₂CO₃ (1 mol L⁻¹). Os tubos foram agitados novamente e acomodados na ausência de luz por 1 hora. Após o tempo de repouso foi realizada a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro de microplaca (Epoch, Synergy-BioTek[®], Winooski, EUA), no comprimento de onda de 765 nm. As amostras foram substituídas por água destilada para a realização do branco. Para a curva de quantificação ($y = 0,000772x + 0,001610$; $R^2 = 0,989$) utilizou-se o ácido gálico (20 a 200 mg/L) como composto padrão.

3.2.3.3 Flavonoides totais

Os extratos de capuchinha e as kombuchas foram avaliadas quanto à concentração de flavonoides totais, segundo o método descrito por Zhishen e Mengcheng (1999). A análise foi realizada em tubos de ensaio adicionados de água destilada (2 mL); 250 µL de amostra e 120 µL de NaNO₂ (0,5 mol/L). Os tubos foram agitados por 30 segundos (Vórtex, Vision Scientific[®], Daejeon, Coreia do Sul) e mantidos em repouso por 5 minutos. Após o intervalo, os tubos receberam a adição de 120 µL de AlCl₃ (10%), seguida de nova agitação e repouso pelo mesmo período descrito anteriormente. Na sequência foram adicionados 800 µL de NaOH (1 mol/L), com agitação (30 segundos) e leitura imediata das absorbâncias a 510 nm. A catequina (10 a 200 mg/L) foi utilizada como composto padrão para a curva de quantificação ($y = 0,003430x - 0,001032$; $R^2 = 0,999$).

3.2.3.4 Antocianinas totais

As antocianinas do extrato de *T. majus* otimizado foram quantificadas pelo método diferencial de pH (Giusti e Wrolstsad, 2001). A análise foi realizada em microplacas com a adição de 10 µL de amostra e 290 µL de reagente tampão de cloreto de potássio (0,025 mol L⁻¹; pH 1,0) e acetato de sódio (0,4 mol L⁻¹; pH 4,5), separadamente. As microplacas foram acomodadas no escuro por 30 minutos e em seguida realizou-se a leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 490 nm e 700 nm. Os resultados foram expressos em mg de pelargonidina-3-glicosídeo (pg-3-glu).

3.2.3.5 Identificação e quantificação de compostos por cromatografia líquida

O extrato das pétalas de capuchinha e as kombuchas obtidas na cinética de fermentação foram analisados pelo sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC). Para execução dos métodos utilizou-se um cromatógrafo (HPLC LC-2040C, Shimadzu[®], Quioto, Japão) equipado com detector de fotodiodo (PDA), autoinjeter e bomba quaternária. Visando maior eficiência na detecção, as amostras foram submetidas à precipitação proteica pela adição de 5% de metanol, agitação (Vórtex, Vision Scientific[®], Daejeon, Coreia do Sul) por 1 minuto, com posterior centrifugação (Centrifuga, MPW-351, Med. Instruments[®], Varsóvia, Polônia) por 10 minutos a 2224 g. Somente o conteúdo sobrenadante foi filtrado (filtro seringa com membrana de nylon 0,22 µm) e avaliado.

- Antocianinas

As antocianinas foram identificadas e quantificadas apenas no extrato de capuchinha e nas kombuchas adicionadas da infusão floral, segundo protocolo adaptado de Ito *et al.* (2019). A separação foi realizada com uma coluna XTerra C18 (4,6 x 250mm; 5 μ m) mantida a 20 °C. A fase móvel constituída por ácido fórmico 0,1% (v/v; solvente A) e acetonitrila (solvente B), foi infundida com fluxo de 1 mL/min em gradiente nas seguintes proporções: 2 a 22% de B (0 a 5 minutos), 22 a 35% de B (5 a 15 minutos), seguido de lavagem e acondicionamento da coluna. A detecção das antocianinas foi realizada em 515 nm e a quantificação pela curva de calibração do padrão de cianidina-3-glicosídeo, na faixa de concentração de 0,001 a 0,25 mg/L ($y = 25482x - 20152$; $R^2 = 0.999$). Portanto, os resultados foram expressos em mg de cianidina-3-glicosídeo por litro.

- Compostos fenólicos individuais

Os componentes fenólicos foram quantificados no extrato e nas kombuchas produzidas na cinética de fermentação. Para esse protocolo utilizou-se uma coluna Symmetry C18 (4,6 x 150 mm; 3,5 μ m) mantida a 20 °C. O ácido acético 2,5% (v/v; solvente A) e a acetonitrila (solvente B) foram utilizados como constituintes da fase móvel. Utilizou-se um fluxo (1 mL/min) em gradiente nas seguintes proporções: 3-9% de B (0-5 minutos); 9-16% de B (5-15 minutos); 16-36,4% de B (15-33 minutos); seguido de eluição isocrática a 100% de B (5 minutos); e após, acondicionamento da coluna (3% de B; 10 minutos). Para identificação dos compostos comparou-se o tempo de retenção dos picos ao dos padrões. A quantificação foi realizada pelas curvas de calibração dos padrões avaliados: ácido cafeico ($y = 21170x - 117801$; $R^2 = 0,997$), ácido clorogênico ($y = 72120x - 405698$; $R^2 = 0,993$), ácido gálico ($y = 31332x - 27051$; $R^2 = 0,991$), ácido p-cumárico ($y = 113841x - 595197$; $R^2 = 0,997$), ácido trans-ferrulico ($y = 67556x - 284328$; $R^2 = 0,998$), cafeína ($y = 78062x - 98510$; $R^2 = 0,999$), catequina ($y = 5716,4x - 54087$; $R^2 = 0,987$), epicatequina ($y = 2714,9x - 2898,8$; $R^2 = 0,897$), epigallocatequina ($y = 9173,5x - 79487$; $R^2 = 0,850$), quercitina ($y = 28863x - 164590$; $R^2 = 0,835$) e rutina ($y = 10082x - 58113$; $R^2 = 0,996$). O método foi executado em um intervalo de comprimentos de onda de 200 nm a 400 nm.

- Ácidos orgânicos

Em termos de ácidos orgânicos (glucurônico, ascórbico, láctico e acético), somente as kombuchas foram caracterizadas, segundo método adaptado de Santos *et al.* (2014). A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) a 30 °C. O volume de injeção aplicado foi de 10 μ L. A eluição da fase móvel, constituída por

ácido sulfúrico ($0,005 \text{ mol L}^{-1}$), foi realizada com fluxo isocrático de $0,5 \text{ mL/min}$. Utilizou-se o comparativo dos tempos de retenção das amostras e dos padrões como protocolo para identificação dos compostos. As concentrações dos ácidos foram calculadas com base nas curvas de calibração do ácido glucurônico ($y = 3018034,502x - 37137,191$; $R^2 = 0,997$), ácido ascórbico ($y = 34734101,356x + 304608,113$; $R^2 = 0,999$), ácido láctico ($y = 5629974,721x - 12069,247$; $R^2 = 1,000$) e ácido acético ($y = 6690891,927x - 29259,384$; $R^2 = 1,000$). Os resultados foram expressos em gramas do composto ácido por litro.

3.2.3.6 Atividade antioxidante

As atividades antioxidantes dos extratos de capuchinha e das kombuchas foram avaliadas pelos seguintes métodos:

- ABTS

Método baseado na capacidade de captura do cátion *2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)* (Re *et al.*, 1999). O reagente ABTS foi preparado com 3 mL de solução ABTS (7 mmol/L) e 3 mL de solução de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. A mistura foi adicionada em frasco âmbar, agitada manualmente e acomodada no escuro durante 16 horas. Decorrido o período de repouso, 4 mL do reagente ABTS foram depositadas em balão volumétrico (200 mL), que foi completado com água destilada e calibrado até uma leitura de absorvância $\geq 0,700 \text{ nm}$, a 734 nm . Após a calibragem, as amostras ($20 \mu\text{L}$) foram adicionadas em microplaca, com posterior transferência do reagente ABTS ($280 \mu\text{L}$) e repouso na ausência de luz por 30 minutos. A leitura das amostras foi realizada nas mesmas condições e equipamento utilizado para a calibração do reagente. Para a curva de quantificação ($y = 0,241560x - 1,937984$; $R^2 = 0,999$) utilizou-se o composto Trolox ($50 \text{ a } 350 \mu\text{mol/L}$) como padrão.

- FRAP

Essa metodologia está baseada na atividade de redução do íon férrico presente no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (Benzie; Strain, 1996). A análise foi realizada em microplaca com a adição das amostras ($10 \mu\text{L}$) e reagente FRAP ($290 \mu\text{L}$). Após 30 minutos de repouso na ausência de luz, a leitura das absorvâncias das amostras foi realizada em espectrofotômetro de microplaca, em 595 nm . O padrão Trolox ($100 \text{ a } 1000 \mu\text{mol/L}$) foi utilizado para a curva de calibração ($y = 0,001205x + 0,030751$; $R^2 = 0,989$).

- DPPH

Conforme documentado por Brand-Williams, Couvelier e Berset (1995), esse protocolo prevê a análise do potencial de captura do radical nitrogenado *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*. A determinação foi realizada em tubos de ensaio adicionados de amostra (50 µL) e 1,9 mL de solução DPPH. Os tubos foram tampados, agitados (Vórtex, Vision Scientific®, Daejeon, Coreia do Sul) e mantidos no escuro por 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca a 517 nm. Assim como nas demais determinações antioxidantes, o padrão Trolox (100 a 700 µmol/L) foi utilizado para a curva de quantificação ($y = 0,039985x - 2,071918$; $R^2 = 0,991$).

3.2.3.7 Atividade antiglicêmica

O extrato de *T. majus* otimizado foi avaliado quanto ao potencial de inibição da enzima α -glicosidase, conforme protocolo de Moradi-Afrapoli *et al.* (2012). O extrato liofilizado (25 mL) foi ressuscitado em 1 mL de DMSO (5%). Essa amostra foi então adicionada em microplaca (10 µL) com a solução de α -glicosidase (20 µL de solução enzimática (0,5 UN/mL) e 120 µL de tampão fosfato (0,1 mol/L⁻¹; pH 6,9)). A microplaca foi incubada a 37 °C por 15 minutos. Após o período de reação mais 20 µL de solução de substrato (*p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside* (5 mmol L⁻¹) em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 6,9)) foi adicionada, com nova incubação por mais 15 minutos. Ao findar da incubação a microplaca foi adicionada de 80 µL de Na₂CO₃ (0,2 mol L⁻¹) e leitura imediata em espectrofotômetro de microplaca a 405 nm. O resultado foi expresso em % de inibição da enzima (Equação 2).

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{[\text{Abs. controle} - \text{Abs. amostra}] / \text{Abs. controle} \times 100}{100} \quad (\text{Equação 2})$$

3.2.3.8 Análise estatística

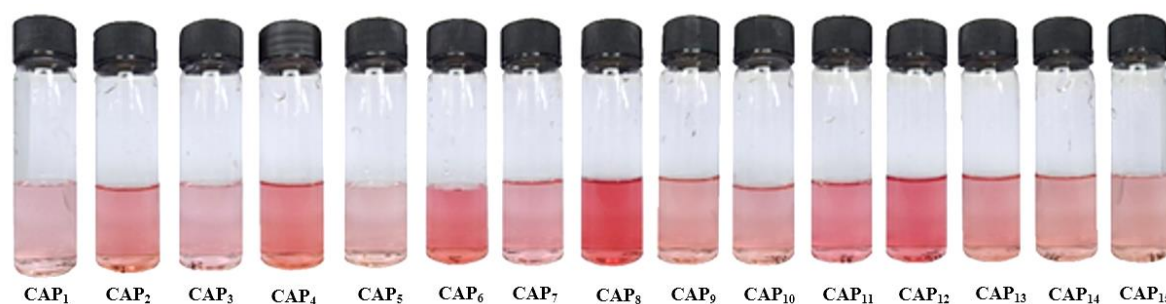
Os resultados obtidos nas determinações analíticas foram expressos como média e desvio padrão. Todos os valores foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de médias de Fisher LSD (*Fisher Least Significance Difference*), para verificar as diferenças entre as amostras. A correlação entre os parâmetros foi analisada pelos produtos de *Pearson* (r). O tratamento estatístico dos dados foi executado pelo *software* STATISTICA versão 7.1 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), incluindo os planejamentos experimentais Box-Behnken e demais testes realizados.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Otimização Da Extração De Compostos Bioativos Das Pétalas De *Tropaeolum majus*

Os extratos das pétalas de capuchinha obtidos a partir do planejamento experimental estão expostos na Figura 14. O material extraído foi avaliado quanto ao teor de compostos bioativos e atividade antioxidante por diferentes métodos (Tabela 15). Em termos de fenóis totais, a amostra CAP12 apresentou a maior concentração ($p \leq 0,05$) em relação aos demais extratos, enquanto o menor teor foi observado no experimento CAP10. Essas amostras foram extraídas com os mesmos parâmetros de concentração de pétalas (40 g/L) e tempo (10 minutos), mas com temperaturas distintas (90 e 40 °C, respectivamente). Um comportamento semelhante para essas amostras foi observado em relação ao teor de flavonoides totais. A amostra CAP7 também se destacou positivamente em relação à concentração de flavonoides ($p \leq 0,05$), ao passo que as amostras CAP2, CAP5, CAP10, CAP13, CAP14 e CAP15 demonstraram teores mais baixos, não diferindo significativamente entre si ($p > 0,05$). Esses resultados evidenciam que a temperatura foi um dos parâmetros de maior influência na extração de compostos das pétalas de *T. majus*. As extrações realizadas com o maior fator de temperatura testado (90 °C) demonstraram maiores teores de substâncias bioativas. Isso ocorre porque, sob temperaturas de infusão mais elevadas, a parede vegetal torna-se mais permeável favorecendo a difusão de compostos (Prabawati *et al.*, 2021). É por isso que, temperaturas de 70, 80 e 90 °C são os parâmetros mais utilizados no preparo de infusões de plantas (Katarzyna *et al.*, 2021). Contudo, o tratamento térmico deve ser comedido, uma vez que infusões acima de 100 °C podem provocar a degradação de compostos termolábeis (Muche; Speers; Rupasinghe, 2018).

Figura 14 – Extratos de *Tropaeolum majus* obtidos de acordo com planejamento fatorial Box-Behnken.



Nota – CAP₁ (20 g/L; 2 min; 65 °C); CAP₂ (60 g/L; 2 min; 65 °C); CAP₃ (20 g/L; 10 min; 65 °C); CAP₄ (60 g/L; 10 min; 65 °C); CAP₅ (20 g/L; 6 min; 40 °C); CAP₆ (60 g/L; 6 min; 40 °C); CAP₇ (20 g/L; 6 min; 90 °C); CAP₈ (60 g/L; 6 min; 90 °C); CAP₉ (40 g/L; 2 min; 40 °C); CAP₁₀ (40 g/L; 10 min; 40 °C); CAP₁₁ (40 g/L; 2 min; 90 °C); CAP₁₂ (40 g/L; 10 min; 90 °C); CAP₁₃ (40 g/L; 6 min; 65 °C); CAP₁₄ (40 g/L; 6 min; 65 °C); CAP₁₅ (40 g/L; 6 min; 65 °C).

Fonte: Autoria própria (2023).

Os extratos produzidos com temperatura de 90 °C apresentaram altos níveis de atividade antioxidante, como a amostra CAP7 que se destacou em relação ao método ABTS ($p \leq 0,05$), enquanto para FRAP e DPPH o experimento CAP12 teve melhores resultados. Além disso, o conteúdo de flavonoides e fenóis totais também foi mais robusto nessas amostras. Portanto, o emprego de temperatura mais elevada potencializou a extração de compostos bioativos, os quais estão fortemente correlacionados com a capacidade antioxidante de uma amostra. Isso porque, acredita-se que a capacidade dos compostos fenólicos em doar elétrons ou átomos de hidrogênio, lhes confere um potencial deletério sobre os radicais livres e espécies reativas de oxigênio (Bishop *et al.*, 2022; Morales, 2020).

Por consequência, os experimentos com menor teor de compostos bioativos demonstraram atividade antioxidante reduzida. As amostras CAP2, CAP4 e CAP6 apresentaram menor potencial redutor ($p \leq 0,05$) pelo método ABTS. Já os extratos CAP2 e CAP10 tiveram o menor desempenho antioxidante para FRAP e DPPH, respectivamente. O que corrobora com o estudo de Garzón *et al.* (2015), que avaliaram as variedades de flores de *T. majus*, observando maior teor de substâncias bioativas, e, conseqüentemente, maior potencial antioxidante na flor vermelha. Mlcek *et al.* (2021) investigaram a bioatividade de seis extratos hidroetanólicos de flores comestíveis, dentre as quais a variedade *T. majus* (vermelha) demonstrou consideráveis teores de fenóis (3,23 g AG/kg), flavonoides (1,29 g RE/kg) e atividade antioxidante FRAP (4,98 AG/kg).

A concentração de pigmentos antocianínicos dos extratos variou de 16,22 mg pg-3-glu/L (CAP10) a 41,7 mg pg-3-glu/L (CAP12). O experimento CAP5 também apresentou baixas concentrações (18,1 mg pg-3-glu/L), não diferindo estatisticamente ($p > 0,05$) da amostra CAP10. As antocianinas configuram um tipo de pigmento natural hidrossolúvel pertencente à classe dos flavonoides. Nas pétalas da capuchinha destacam-se a delphinidina-3-dihexosídeo, cianidina-3-soforósido e pelargonidina-3-soforósido, conforme caracterizado no estudo de Garzón *et al.* (2015). No estudo mencionado, o teor de antocianinas totais, também determinado pelo método diferencial de pH, variou entre 108,8 mg cy-3-glu/100g (flor laranja) e 168,0 mg cy-3-glu/100g (flor vermelha) (Garzón *et al.*, 2015). Além de agregar valor ornamental para os tecidos florais, as antocianinas também conferem potencial antioxidante às flores (Prabawati *et al.*, 2021), o que foi observado nos experimentos (Tabela 15), uma vez que os extratos com maiores atividades antioxidantes, também apresentaram teores consideráveis de antocianinas. Esse comportamento das amostras em relação ao teor de antocianinas pressupõe que a temperatura máxima de extração testada (90 °C), não influenciou negativamente a concentração

de pigmentos extraídos. Isso porque, as antocianinas são substâncias mais suscetíveis às reações de degradação por efeito de temperaturas mais elevadas, variações de pH e incidência de luz (Keenan *et al.*, 2010).

Tabela 15 – Concentração de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos ABTS, FRAP e DPPH dos extratos de *Tropaeolum majus*.

| Amostra | FENÓIS TOTAIS (mg AG/L) | FLAVONOIDES (mg CAT/L) | ABTS (μ mol TE/L) | FRAP (μ mol TE/L) | DPPH (μ mol TE/L) | Antocianinas (mg pg-3-glu/L) |
|--------------|------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| CAP1 | 2071 ^{cde} \pm 33 | 326,3 ^{cd} \pm 66,8 | 12199,6 ^c \pm 43,9 | 8929 ^f \pm 105 | 5751,02 ^f \pm 23,32 | 29,4 ^e \pm 2,5 |
| CAP2 | 1631,1 ^h \pm 189,3 | 238,3 ^f \pm 12,9 | 6203,1 ^j \pm 41,5 | 6605 ^m \pm 38 | 5054 ^g \pm 51 | 21,7 ^g \pm 2,1 |
| CAP3 | 2120,2 ^{cd} \pm 96,6 | 397 ^{ab} \pm 13 | 13176,52 ^b \pm 119,21 | 9791,7 ^c \pm 30,1 | 8851 ^b \pm 32 | 27,2 ^{ef} \pm 1,6 |
| CAP4 | 2140 ^{cd} \pm 144 | 333 ^{cd} \pm 34 | 6263,5 ^j \pm 135,6 | 8400 ^h \pm 41 | 6420,1 ^d \pm 16,1 | 23,5 ^g \pm 0,03 |
| CAP5 | 1827,9 ^{fg} \pm 52,1 | 227,6 ^f \pm 35,8 | 10214,7 ^d \pm 4,5 | 6732 ^l \pm 56 | 3820,25 ^h \pm 24,25 | 18,1 ^h \pm 2,4 |
| CAP6 | 1984,34 ^{def} \pm 69,24 | 303,1 ^{de} \pm 28,8 | 6190,5 ^j \pm 11,7 | 7390,1 ^k \pm 14,3 | 6148,9 ^e \pm 5,7 | 24,6 ^{fg} \pm 0,7 |
| CAP7 | 2808,0 ^b \pm 111,5 | 443,49 ^a \pm 29,25 | 14545,2 ^a \pm 100,8 | 10579 ^c \pm 85 | 6459,7 ^d \pm 12,9 | 41,7 ^b \pm 2,8 |
| CAP8 | 2143,9 ^{cd} \pm 116,3 | 362,2 ^{bc} \pm 21,3 | 6457,1 ⁱ \pm 12,7 | 10689,6 ^b \pm 24,7 | 7530,4 ^c \pm 9,6 | 34,1 ^d \pm 3,3 |
| CAP9 | 1680,4 ^{gh} \pm 112,5 | 331,3 ^{cd} \pm 36,5 | 8424,4 ^g \pm 47,5 | 8173,0 ⁱ \pm 61,4 | 1884,4 ⁱ \pm 16,2 | 21,9 \pm 1,8 ^g |
| CAP10 | 1369,8 ⁱ \pm 45,6 | 235,9 ^f \pm 2,8 | 7792,6 ^h \pm 69,4 | 7791,3 ^j \pm 21,5 | 834 ^j \pm 22 | 16,22 ^h \pm 1,43 |
| CAP11 | 2155,3 ^c \pm 4,7 | 274,8 ^{ef} \pm 9,0 | 9679,14 ^e \pm 2,23 | 10227,42 ^d \pm 33,15 | 7612,3 ^c \pm 56,6 | 38,2 ^c \pm 1,9 |
| CAP12 | 3372 ^a \pm 103 | 375,6 ^{bc} \pm 28,4 | 9658,53 ^e \pm 2,23 | 13200,51 ^a \pm 33,15 | 9449,1 ^a \pm 103,1 | 47,1 ^a \pm 3,4 |
| CAP13 | 2086,6 ^{cd} \pm 64,6 | 242 ^f \pm 23 | 8620,5 ^f \pm 24,7 | 8560,6 ^g \pm 20,4 | 5725,7 ^f \pm 7,9 | 26,7 ^{ef} \pm 0,9 |
| CAP14 | 2107,8 ^{cd} \pm 95,3 | 236 ^f \pm 22 | 8634,3 ^f \pm 99,7 | 8565,9 ^g \pm 17,4 | 5784,50 ^f \pm 91,15 | 26,9 ^{ef} \pm 1,9 |
| CAP15 | 1912,5 ^{ef} \pm 24,7 | 239,5 ^f \pm 26,4 | 8628 ^f \pm 122 | 8541,9 ^g \pm 21,7 | 5712,5 ^f \pm 23,8 | 26,9 ^{ef} \pm 1,8 |

Nota: Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. AG: ácido gálico; CAT: catequina; TE: equivalentes de Trolox; pg-3-glu: pelargonidin-3-glucoside; **CAP**₁ (20 g/L; 2 min; 65 °C); **CAP**₂ (60 g/L; 2 min; 65 °C); **CAP**₃ (20 g/L; 10 min; 65 °C); **CAP**₄ (60 g/L; 10 min; 65 °C); **CAP**₅ (20 g/L; 6 min; 40 °C); **CAP**₆ (60 g/L; 6 min; 40 °C); **CAP**₇ (20 g/L; 6 min; 90 °C); **CAP**₈ (60 g/L; 6 min; 90 °C); **CAP**₉ (40 g/L; 2 min; 40 °C); **CAP**₁₀ (40 g/L; 10 min; 40 °C); **CAP**₁₁ (40 g/L; 2 min; 90 °C); **CAP**₁₂ (40 g/L; 10

min; 90 °C); **CAP₁₃** (40 g/L; 6 min; 65 °C); **CAP₁₄** (40 g/L; 6 min; 65 °C); **CAP₁₅** (40 g/L; 6 min; 65 °C). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras a nível de significância de 5% pelo teste de Fisher.

Os modelos propostos na análise de regressão múltipla para as variáveis de resposta avaliadas (compostos fenólicos totais; ABTS; FRAP; antocianinas) foram significativos ($p \leq 0,05$) e estão sumarizados na Tabela 16. O conjunto de modelos foi representado por um R^2 ajustado superior a 0,58 e não indicaram falta de ajuste ($Plack\ of\ fit > 0,05$). Os resultados obtidos para flavonoides totais não puderam ser descritos pelo modelo sugerido, pois a falta de ajuste dos dados foi significativa ($Plack\ of\ fit \leq 0,05$). O baixo valor do R^2 ajustado (0,46) obtido para DPPH indicou que os dados não se ajustaram bem ao modelo, portanto, o mesmo também foi desconsiderado na otimização.

Conforme observado nos extratos das pétalas de *T. majus*, a temperatura foi o parâmetro de maior influência no rendimento de compostos. Isso se comprova por meio da significância ($p \leq 0,05$) dos coeficientes de regressão lineares da variável temperatura (X_3), com efeito positivo sobre a concentração de compostos fenólicos, atividades antioxidantes (ABTS, FRAP) e antocianinas (Tabela 16). A temperatura (X_3) também apresentou efeito positivo e coeficiente de regressão quadrático na concentração de antocianinas. Essas interações sugerem que, para obter melhores rendimentos no processo de extração de compostos bioativos das pétalas de capuchinha, o maior fator de temperatura testado (90 °C) deve ser utilizado.

Contrariamente à temperatura, a variável tempo de extração (X_2) não demonstrou impacto notório sobre o processo de extração, apresentando coeficiente de regressão linear com efeito positivo apenas sobre a concentração de fenóis totais. Sobre essa mesma variável de resposta (fenóis totais), o tempo de extração (X_2) também apresentou interação linear positiva com o parâmetro de temperatura (X_3). De acordo com a metodologia estatística, esse desfecho indica que o tempo máximo (10 minutos) empregado no planejamento experimental de extração deve ser utilizado, visando maximizar o rendimento do processo. Ainda que, o tempo de extração possa ser reduzido, frente ao uso de temperaturas de infusão mais elevadas (Prabawati *et al.*, 2021), o tempo máximo testado pode ser considerado ótimo para essa variável. Isso porque, as interações do tempo (X_2) sobre os compostos fenólicos foram positivas. Além disso, as demais variáveis resposta avaliadas (ABTS; FRAP e antocianinas) não apresentaram interferência significativa do tempo de extração. Em complemento, o período de extração de 10 minutos pode ser considerado adequado para tecidos florais, conforme experimentos documentados que já testaram intervalos de 4 (Han *et al.*, 2019), 10 (Katarzyna *et al.*, 2021), 16 (Zannou; Kelebek; Selli, 2020) e 45 minutos (Zheng; Xia; Lu, 2015), e temperaturas variando entre 25 °C e 100 °C.

A variável X_1 (Concentração de pétalas) apresentou interferência significativa ($p \leq 0,05$) apenas sobre a variável resposta ABTS, com coeficiente de regressão linear e interação em X_3 , ambos com efeito negativo. Essas interações poderiam sugerir que a quantidade de tecido floral deveria ser reduzida, visando melhores resultados no processo de extração, o que, segundo Ozturk, Parkinson e Gonzalez-Miquel (2018), está relacionado à saturação do solvente, pois a adição de amostra reduz a força motriz para a transferência de massa. Contudo, a metodologia de superfície de resposta indica que, melhores rendimentos no processo de extração das pétalas de capuchinha poderão ser obtidos com uma concentração de pétalas de 60 g/L, que foi o maior nível testado para esse parâmetro. Essa resposta otimizada para o fator X_1 está relacionada ao objetivo da metodologia proposta, que consiste na determinação do nível mais adequado de cada parâmetro, visando obter os melhores resultados no processo para todas as variáveis analisadas (fenóis; ABTS; FRAP; antocianinas). Portanto, considerando que a concentração de pétalas (X_1) interferiu apenas na atividade antioxidante ABTS, o meio de extração possivelmente não sofreu saturação, e o maior nível testado (60 g/L) pode ser utilizado para maximizar a bioatividade do extrato otimizado, pautando-se no equilíbrio entre todas as respostas desejadas.

Tabela 16 – Efeitos das variáveis independentes (Concentração de pétalas; Tempo e Temperatura) sobre a concentração de compostos fenólicos, flavonoides, atividade antioxidante (ABTS e FRAP) e teor de antocianinas dos extratos das pétalas de *Tropaeolum majus*.

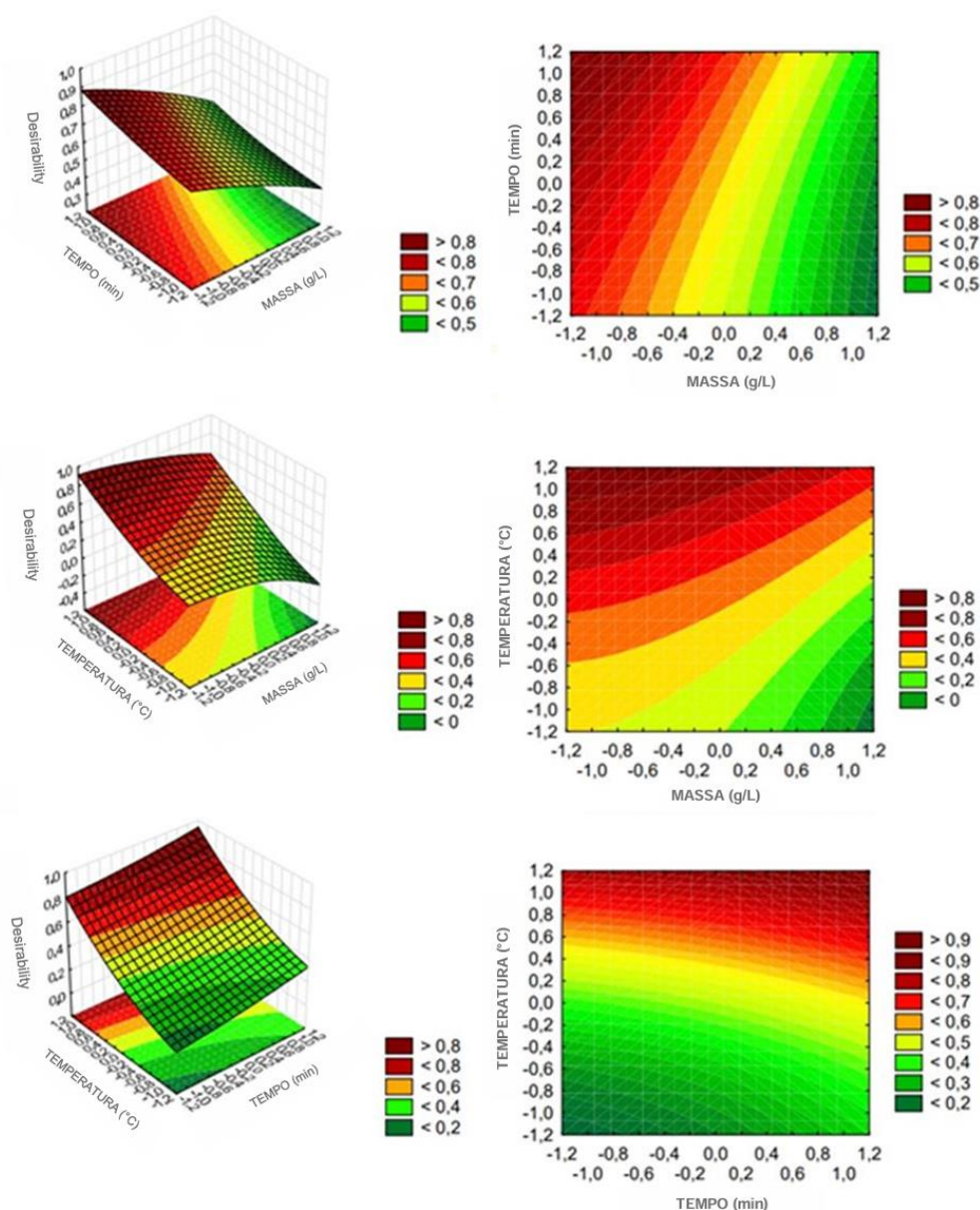
| (Continua) | | | | | | | |
|--------------------------------------|-------------------------------|--------------------|-------------|---------|---------|-------------------|-------------------|
| Variáveis respostas | Fatores | Coef. de Regressão | Erro padrão | t-valor | p-valor | -95% de confiança | +95% de confiança |
| Compostos fenólicos totais (mg AG/L) | Constante | 2094,00 | 65,81 | 31,81 | <0,0001 | 1949,13 | 2238,87 |
| | X ₂ | 202,87 | 90,12 | 2,25 | <0,0458 | 4,51 | 401,24 |
| | X ₃ | 461,93 | 90,12 | 5,12 | <0,0003 | 263,57 | 660,30 |
| | X ₂ X ₃ | 401,47 | 127,45 | 3,14 | <0,0092 | 120,93 | 682,00 |
| | R ² ajustado | 0,789 | | | | | |
| | <i>Plack-of-fit</i> | 0,136 | | | | | |
| ABTS (μmol TE/L) | Constante | 9149,68 | 135,38 | 67,58 | <0,0001 | 8851,70 | 9447,66 |
| | X ₁ | -3075,93 | 185,38 | -16,59 | <0,0001 | -3483,96 | -2667,91 |
| | X ₃ | 932,63 | 185,38 | 5,03 | <0,0003 | 524,60 | 1340,66 |
| | X ₁ X ₃ | -997,22 | 262,17 | -3,80 | <0,0029 | -1574,26 | -420,19 |
| | R ² ajustado | 0,957 | | | | | |
| | <i>Plack-of-fit</i> | 0,327 | | | | | |

| Variáveis respostas | Fatores | Coef. de Regressão | Erro padrão | t- valor | p-valor | (Conclusão) | |
|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------|----------------|-------------|---------|----------------------|----------------------|
| | | | | | | -95% de confiança | +95% de confiança |
| FRAP ($\mu\text{mol TE/L}$) | Constante | 9110,02 | 281,93 | 32,31 | <0,0001 | 8500,95 | 9719,10 |
| | X ₃ | 1748,14 | 386,05 | 4,52 | <0,0005 | 914,13 | 2582,16 |
| | R ² ajustado | 0,582 | | | | | |
| | <i>Plack-of-fit</i> | 0,356 | | | | | |
| Antocianinas (mg pg-3- glu/L) | Constante | 22,32 | 1,93 | 11,56 | <0,0001 | 18,11 | 26,52 |
| | X ₃ | 10,07 | 1,80 | 5,58 | <0,0001 | 6,14 | 14,01 |
| | X ₃ ² | 7,39 | 2,64 | 2,79 | <0,0160 | 1,63 | 13,15 |
| | R ² ajustado | 0,725 | | | | | |
| | <i>Plack-of-fit</i> | 0,612 | | | | | |

Nota - X₁: Concentração de pétalas (20, 40 e 60 g/L); X₂: Tempo (2, 6 e 10 min); X₃: Temperatura (40, 65 e 90 °C); AG: ácido gálico; CAT: catequina; TE: equivalentes de Trolox; pg-3-glu: pelargonidin-3-glucoside.

O ponto ótimo das variáveis concentração de pétalas, tempo e temperatura de extração foi determinado de forma simultânea, visando obter o melhor rendimento na extração de compostos bioativos (fenóis e antocianinas) e atividade antioxidante (ABTS e FRAP) das pétalas de *T. majus* (Figura 15). Em suma, os resultados otimizados por meio da superfície de resposta sugerem a aplicação dos maiores níveis testados para a concentração de pétalas (60 g/L), tempo (10 minutos) e temperatura de extração (90 °C).

Figura 15 – Superfície de resposta e gráficos de contorno mostrando os efeitos das variáveis independentes (Concentração de pétalas, Tempo, Temperatura) sobre a concentração de compostos bioativos e atividade antioxidante no ponto ótimo dos extratos de *Tropaeolum majus* (capuchinha).



Visando a validação dos modelos sugeridos para compostos fenólicos totais, antocianinas, ABTS e FRAP o extrato nas condições otimizadas foi reproduzido. Os valores preditos para cada parâmetro em condições ótimas e os resultados obtidos experimentalmente estão contidos na Tabela 17. Assim, considerando que os resultados experimentais para fenóis totais, ABTS, FRAP e antocianinas estão contidos em um intervalo de 95% de confiança, os modelos foram validados para fins preditivos.

Tabela 17 – Valores preditos e experimentais das variáveis obtidas no ponto ótimo de extração das pétalas de *Tropaeolum majus* (capuchinha).

| Variável resposta | Valores | | | |
|-------------------------------|----------|----------------------|----------------------|----------|
| | Predito | -95% de confiança | +95% de confiança | EXP. |
| Fenóis totais (mg AG/L) | 2.736,4 | 2.410,3 | 3.062,5 | 2.843,8 |
| ABTS ($\mu\text{mol TE/L}$) | 7.026,9 | 5.940,7 | 8.113,2 | 5.969,8 |
| FRAP ($\mu\text{mol TE/L}$) | 11.471,7 | 9.119,6 | 13.823,8 | 11.933,6 |
| Antocianinas (mg pg-3-glu/L) | 38,8 | 23 | 54,6 | 43,4 |

Nota: EXP: experimental; AG: ácido gálico; TE: equivalentes de Trolox.

3.3.1.1 Atividade antiglicêmica do extrato otimizado

A atividade antiglicêmica do extrato otimizado de *Tropaeolum majus* em diferentes concentrações (15,62; 31,25; 62,50; 125; 250; 500 e 1000 mg/mL) foi avaliada, visando determinar o potencial de inibição da enzima α -glicosidase (dados não apresentados). A supressão direcionada dessa enzima, configura uma estratégia desejável para atenuar as desordens metabólicas associadas a níveis elevados de glicose plasmática e diabetes mellitus. Isso porque, a nível intestinal a α -glicosidase atua diretamente na hidrólise e absorção de carboidratos, o que otimiza a liberação de glicose circulante (Nowicka; Wojdyło, 2019). Pautando-se nesse contexto e de posse dos resultados obtidos, o extrato avaliado não apresentou efeito inibitório sobre α -glicosidase em nenhuma das concentrações testadas, quando comparado à acarbose (medicamento antidiabético comercial).

Os tecidos vegetais contêm diversos compostos polifenólicos (catequina; epigallocatequina), flavonoides (quercetina; kaempferol), ácidos fenólicos (ácido gálico; ácido clorogênico) e alcalóides (berberina; piperina), que podem desempenhar ação inibitória sobre α -glicosidase (Yin *et al.*, 2014). Entretanto, a potência e a especificidade dessas substâncias

para inibir a enzima pode variar dependendo da concentração do composto, interação com outras substâncias e fonte vegetal de origem (Bruneton, 2008). Dessa forma, apesar de alguns desses compostos serem detectados nas pétalas de *T. majus*, as concentrações são insuficientes para promover efeitos hipoglicemiantes (Garzón *et al.*, 2015). Os efeitos profiláticos e terapêuticos da capuchinha parecem estar mais associados a quadros infecciosos do trato urinário, hipertensão, distúrbios cardiovasculares e bronquite (ALBRECHT *et al.*, 2023; BAWAZEER *et al.*, 2021; Valsalam *et al.*, 2019).

3.3.2 Cinética de fermentação de kombucha com extrato de *Tropaeolum majus*

3.3.2.1 Compostos fenólicos e flavonoides totais

A Figura 16 ilustra a evolução das kombuchas ao longo do processo de fermentação, viabilizando a comparação dos aspectos visuais das amostras. Objetivando avaliar o comportamento dos compostos bioativos dessas bebidas, os teores de fenóis e flavonoides totais foram avaliados (Figura 17). A concentração de compostos fenólicos totais das kombuchas com 100% de chá preto variaram entre $732,1 \pm 6,0$ mg AG/L (dia 10) e $823,76 \pm 10,4$ mg AG/L (dia 0). Nas kombuchas com extrato de capuchinha as amostras alcançaram valores entre $466,3 \pm 8,1$ mg AG/L (dia 10) e $537,93 \pm 9,72$ mg AG/L (dia 0), superando o fermentado controle que oscilou entre $382,9 \pm 15,97$ mg AG/L (dia 10) e $495,12 \pm 15,12$ mg AG/L (dia 1). Esses resultados demonstram que houve uma redução gradativa no teor de fenóis totais com a progressão da fermentação, o mesmo comportamento foi observado em ambos os extratos para o teor de flavonoides. Para as kombuchas fermentadas em chá preto foram obtidas concentrações de flavonoides entre $84,3 \pm 3,2$ mg CAT/L (dia 10) e $113,9 \pm 4,8$ mg CAT/L (dia 0). Já nas bebidas com adição de *T. majus* foram encontrados valores em um intervalo de $47,8 \pm 4,7$ mg CAT/L (dia 10) a $65,5 \pm 2,7$ mg CAT/L (dia 0), que também superou a bebida controle ($40,23 \pm 1,92$ mg CAT/L a $61,79 \pm 2,5$ mg CAT/L).

Uma redução similar para a concentração de flavonoides foi observada por Jakubczyk *et al.* (2020), em kombucha de chá preto (concentração de 8g/L) fermentada por 14 dias. Contrariamente, Vitas *et al.* (2020) documentaram um ligeiro aumento, mas sem relevância estatística ($p > 0,05$), no teor de fenóis e flavonoides de kombuchas à base de chá preto e adicionadas de hortelã (*Mentha spicata*). Em kombucha fermentada com chá verde e canela (*Cinnamomum verum*) (50:50), Shahbazi *et al.* (2018) não registraram aumento significativo ($p > 0,05$) no teor de polifenóis até o 12^o dia de experimento. Essas alterações na concentração de bioativos da kombucha durante a fermentação estão associadas à bioconversão de compostos mais complexos em moléculas mais simples. Um exemplo dessa biotransformação é a

conversão enzimática da epigalocatequina-galato em epigalocatequina, e da epicatequina-galato em epicatequina, que são compostos presentes em infusões de chá preto (Bishop *et al.*, 2022; Nizioł-Lukaszewska *et al.*, 2020). Ademais, algumas cepas de bactérias do ácido láctico podem metabolizar flavonoides como a catequina e epicatequina, originando ácidos orgânicos como o vanílico, por exemplo (Alves-Santos *et al.*, 2020; Rocha-Guzmán *et al.*, 2023).

Figura 16 – Kombuchas à base de chá preto e adicionadas de *Tropaeolum majus* (capuchinha) produzidas na cinética de fermentação.

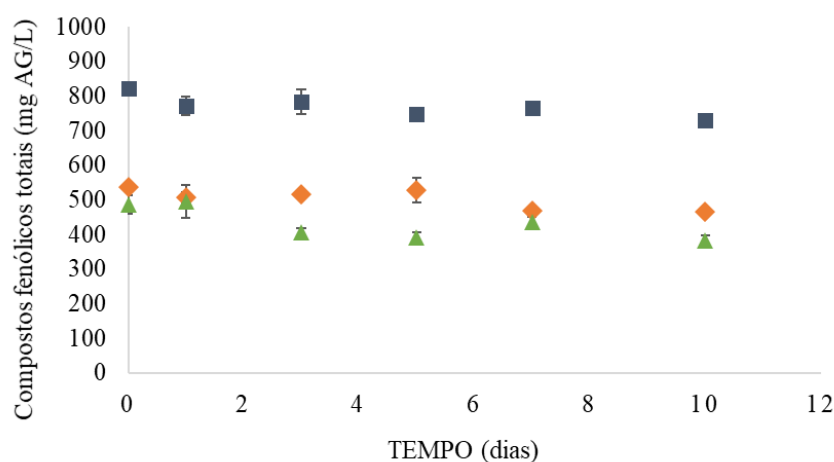


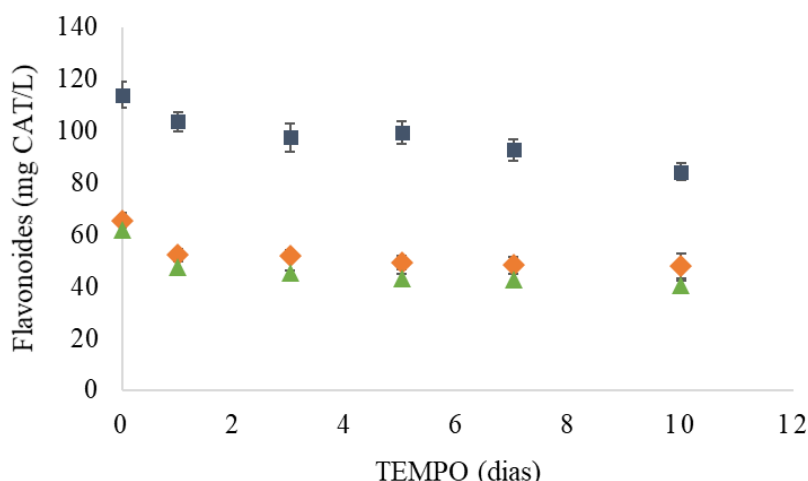
Nota: ¹Kombucha com 100% de chá preto; ²Kombucha com 50% de chá preto e 50% de extrato de capuchinha; ³Kombucha com 50% de chá preto e 50% de água. Os recipientes estão organizados conforme a ordem da cinética de fermentação (dia 0; 1; 3; 5; 7 e 10).

Fonte: Autoria própria (2023).

Em um comparativo das kombuchas com diferentes substratos no dia 0 (Figura 17), é possível observar que o teor de fenóis totais foi 1,6 vezes menor nas bebidas com adição de capuchinha, enquanto para flavonoides essa redução foi de 1,8 vezes. Esse cenário comprova que, nas kombuchas desenvolvidas neste estudo, o chá preto predomina como a principal fonte de polifenóis, em virtude da presença desses bioativos nas folhas de *Camellia sinensis* (Bishop *et al.*, 2022). Dessa forma, o substrato alternativo com extrato de *T. majus* não foi capaz de ultrapassar o teor de compostos na kombucha, em comparação às bebidas com 100% de chá preto. Contrastando com a literatura, Özyurt (2020) produziu kombuchas de chá preto com 1,1 vezes maior teor de compostos (227,78 µg AG/mL), em comparação às bebidas adicionadas de chá de Echinacea (209,65 µg AG/mL), também no dia 0 de fermentação. Considerando o mesmo período de experimento, Vitas *et al.* (2020) obtiveram um desfecho oposto, visto que os maiores teores de fenóis e flavonoides foram registrados em kombuchas fermentadas com substratos alternativos (segurelha-das-montanhas, folhas de hortelã, urtiga, tomilho selvagem, sabugueiro e marmelo), do que as kombuchas com chá preto. Essas divergências demonstram que grande parte dos polifenóis presentes na bebida são provenientes do material vegetal utilizado para o preparo do mosto fermentativo (Vitas *et al.*, 2020). No entanto, apesar de não atingir níveis superiores aos compostos encontrados na kombucha padrão, a kombucha com adição de capuchinha apresentou resultados mais promissores em comparação com o fermentado controle. Isso evidencia que os compostos presentes no tecido floral foram incorporados na bebida final.

Figura 17 – Efeito das variáveis tempo e substrato sobre a concentração de compostos fenólicos totais e flavonoides em kombuchas à base de chá preto e adicionadas de *Tropaeolum majus* (capuchinha).





Legenda: ■ **Kombucha padrão**: 100% de chá preto; ◆ **Kombucha com capuchinha**: 50% de chá preto e 50% de extrato de capuchinha; ▲ **Kombucha controle**: 50% de chá preto e 50% de água; AG: ácido gálico; CAT; catequina.

3.3.2.2 Análise cromatográfica de compostos fenólicos individuais

Foram identificados cinco constituintes fenólicos (ácido clorogênico; ácido gálico; cafeína; epigallocatequina; rutina) nas kombuchas à base de chá preto e adicionadas de *T. majus* utilizando o método HPLC em gradiente (Tabela 18). Nenhuma das amostras indicou a presença de ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido transferrulico, catequina, epicatequina e quercetina.

De modo geral, com exceção do ácido clorogênico, a kombucha com 100% de chá preto apresentou as maiores concentrações de compostos no início do experimento (dia 0), que foram reduzidos significativamente ($p \leq 0,05$) após a substituição do chá pelo extrato de *T. majus*. A detecção de ácido clorogênico no extrato de capuchinha pode justificar a presença desse componente fenólico em maior concentração da bebida com tecido floral, uma vez que apenas esse composto e a rutina foram detectados no material extraído. Na investigação de Česlová *et al.* (2023) outras substâncias fenólicas como ácido quínico (51 $\mu\text{g/g}$), ácido hidroxicinâmico (207 $\mu\text{g/g}$), mirecitina (21,2 $\mu\text{g/g}$), quercetina (102 $\mu\text{g/g}$) e kaempferol (626 $\mu\text{g/g}$) foram identificadas em um extrato metanólico das pétalas de capuchinha laranja. Segundo os mesmos autores, a variação de compostos na espécie parece estar intimamente associada a fatores como método de extração, local de cultivo, parte da planta caracterizada e cor das pétalas.

Comparativamente à kombucha controle (50% de chá preto e 50% de água), a bebida adicionada de *T. majus* apresentou maiores teores de compostos ao final da fermentação (dia 10) (Tabela 18). Além disso, no fermentado controle todas as substâncias fenólicas apresentaram redução com a progressão da fermentação, o que não foi observado nas demais amostras. Todos os mostos apresentaram redução no teor de ácido clorogênico e cafeína após

10 dias de fermentação. Esse fenômeno parece estar associado ao consumo desses compostos pelo complexo microbiano da kombucha (Chakravorty *et al.*, 2016). Comportamento similar em termos de cafeína e epicatequina foi observado em kombucha de chá preto fermentada por 21 dias (Villarreal-Soto *et al.*, 2019).

Além da epicatequina, a epigalocatequina também configura um tipo de flavonoide característico do chá preto (Wang *et al.*, 2019). Na pesquisa de Cardoso *et al.* (2020), a epigalocatequina-3-O-galato foi o composto predominante dentre a classe de catequinas em kombuchas à base de chá preto e chá verde. Os resultados desta investigação (Tabela 18) demonstraram que a epigalocatequina foi detectada em todas as amostras. Esse composto fenólico foi reduzido gradativamente ($p \leq 0,05$) com o avanço do processo fermentativo, exceto na kombucha adicionada de *T. majus*. Isso demonstra que o extrato floral promoveu maior estabilidade desse composto fenólico. Contrariamente, o teor de ácido gálico apresentou aumento progressivo nas bebidas, com exceção da amostra controle, possivelmente em virtude da escassez de compostos para metabolização dos microrganismos nessa amostra. A performance de redução da epigalocatequina em algumas amostras parece ter relação com seu processo de desesterificação, que por consequência tem relação direta com o ácido gálico, promovendo seu aumento (Villarreal-Soto *et al.*, 2019).

Um comportamento similar em termos de rutina foi observado na kombucha com 100% de chá preto e na bebida controle, que apresentaram redução do composto com o avanço da fermentação. Já no fermentado de capuchinha foi detectado um aumento na concentração final de rutina, o que possivelmente está associado à presença do composto no extrato. Amjadi *et al.* (2023) documentaram resultados inferiores para o teor de rutina em kombucha à base de chá preto (0,002 g/L), que quadruplicou após a adição de um substrato alternativo à base de extrato floral (*Echium amoenum*) (0,008 g/L).

Tabela 18 – Quantificação cromatográfica de compostos fenólicos individuais em kombuchas à base de chá preto e adicionadas de *Tropaeolum majus* (capuchinha).

| Composto químico (g/L) | Dia* | Kombucha | | | Extrato ⁴ |
|------------------------|------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------|
| | | Padrão ¹ | Controle ² | Capuchinha ³ | |
| Ácido clorogênico | 0 | 0,0074 ^d ± 0,01 | 0,0065 ^f ± 0,01 | 0,0089 ^a ± 0,02 | 0,0086 ^b |
| | 10 | 0,0068 ^e ± 0,01 | 0,0063 ^g ± 0,01 | 0,0078 ^c ± 0,01 | ± 0,01 |
| Ácido gálico | 0 | 0,041 ^b ± 0,02 | 0,041 ^b ± 0,01 | 0,037 ^d ± 0,01 | ND |
| | 10 | 0,048 ^a ± 0,02 | 0,039 ^c ± 0,02 | 0,048 ^a ± 0,01 | |
| Cafeína | 0 | 0,090 ^a ± 0,01 | 0,058 ^d ± 0,01 | 0,060 ^c ± 0,01 | ND |
| | 10 | 0,070 ^b ± 0,01 | 0,028 ^f ± 0,01 | 0,049 ^e ± 0,02 | |
| Epigallocatequina | 0 | 0,039 ^a ± 0,01 | 0,021 ^b ± 0,01 | 0,014 ^d ± 0,01 | ND |
| | 10 | 0,011 ^e ± 0,01 | 0,016 ^c ± 0,01 | 0,014 ^d ± 0,03 | |
| Rutina | 0 | 0,025 ^a ± 0,01 | 0,016 ^c ± 0,01 | 0,011 ^f ± 0,01 | 0,016 ^c |
| | 10 | 0,017 ^b ± 0,01 | 0,013 ^e ± 0,01 | 0,014 ^d ± 0,01 | |

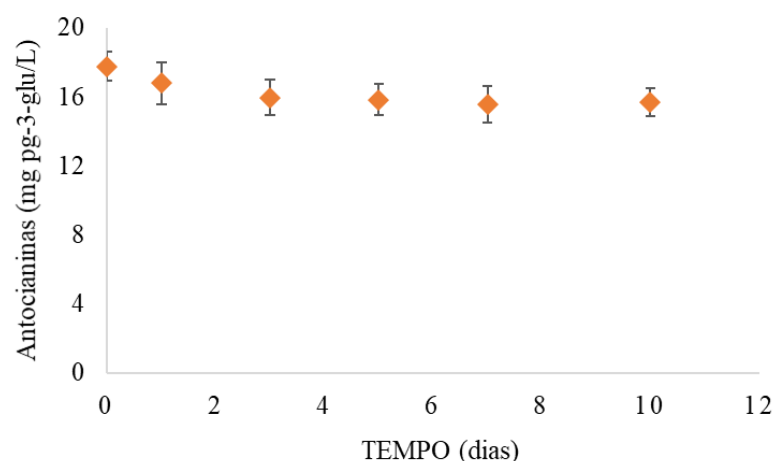
Nota: *Dia de fermentação; ¹Kombucha padrão: 100% de chá preto; ²Kombucha controle: 50% de chá preto e 50% de água; ³Kombucha com capuchinha: 50% de chá preto e 50% de extrato de capuchinha; ⁴extrato de *T. majus* obtido nas condições ótimas de extração; ND: não detectado ou valores abaixo do limite de detecção. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as amostras a nível de significância de 5% pelo teste de Fisher.

3.3.2.3 Antocianinas

As kombuchas fermentadas com extrato de *T. majus* foram avaliadas em relação ao teor de antocianinas pelo método de diferencial de pH, considerando a presença desses pigmentos nos tecidos florais (Figura 18). A concentração de antocianinas nas bebidas variou de 15,5 ± 1,4 mg pg-3-glu/L (dia 10) a 17,8 ± 0,8 mg pg-3-glu/L (dia 0). A presença de pigmentos antocianínicos foi mais evidente ($p \leq 0,05$) no ponto inicial (dia 0) e após 1 dia de fermentação (dia 1). A partir do terceiro dia de experimento a concentração de antocianinas apresentou uma queda gradativa entre as formulações, mas sem diferença estatística entre as amostras ($p > 0,05$). Assim, é possível observar que o avanço do processo fermentativo não impactou de forma negativa a concentração de antocianinas nas bebidas. Essa variação pouco significativa pode estar associada à estabilidade das antocianinas em meio ácido, o que torna a kombucha um ambiente favorável para que isso ocorra (Jayabalan *et al.*, 2008). Quanto mais ácido o pH do meio (< 3,0), maior a estabilidade das antocianinas, que por consequência assumem a tonalidade tendendo para o rosa-salmão ou vermelho intenso (Roy; Rhim, 2020).

Comportamento similar para as variações no teor de antocianinas observadas neste estudo foi documentado por Amjadi *et al.* (2023), em kombucha fermentada com chá preto e inflorescências de *Echium amoenum*. Na pesquisa a concentração de pigmentos oscilou entre 680 g cy-3-glu/L (dia 5) e 720 g cy-3-glu/L (dia 1 e 15), mas sem relevância estatística entre as variações ($p > 0,01$). Em contrapartida, Zou *et al.* (2021) desenvolveram kombuchas com chá Zijuan (*Camellia sinensis* var. *assamica* cv. Zijuan) e observaram uma queda de 51% no teor de antocianinas após 14 dias de fermentação. Essas oscilações nos teores de antocianinas da kombucha, bem como a tendência à uma redução da concentração inicial, são fatores relacionados à ação microbiana e às interações desses pigmentos com outros compostos. O metabolismo microbiano pode levar à produção de enzimas capazes de metabolizar ou quebrar as antocianinas durante a fermentação (Rocha-Guzmán *et al.*, 2023). Além disso, as antocianinas podem interagir com os flavonóis, flavonas e outros polifenóis, formando complexos que resultam no efeito de copigmentação. Essa interação proporciona maior proteção e estabilidade às antocianinas em relação a alterações de pH, exposição à luz e processos oxidativos (Sendri *et al.*, 2023).

Figura 18 – Efeito do tempo de fermentação sobre a concentração de antocianinas em kombuchas adicionadas de *Tropaeolum majus* (capuchinha).



Nota – pg-3-glu: pelargonidina-3-glucosídeo.

3.3.2.4 Detecção e quantificação de antocianinas por cromatografia líquida

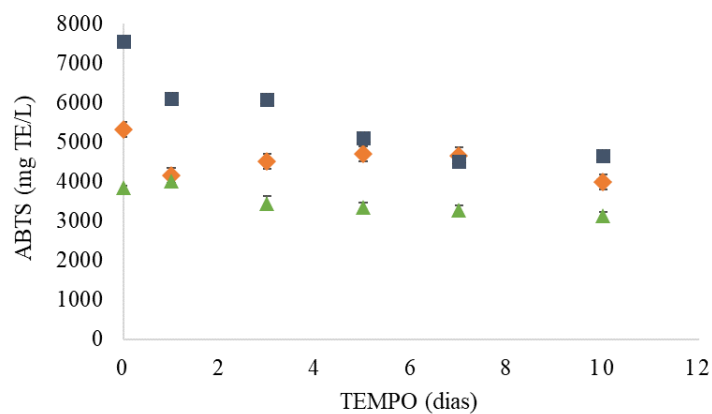
As antocianinas também foram avaliadas sob a perspectiva cromatográfica. A cianidina-3-glicosídeo foi detectada no extrato de capuchinha ($1,28^a \pm 0,01$ mg ci-3-glu/L), o qual, após ser incorporado ao mosto de fermentação manteve-se constante (kombucha dia zero: $1,25^a \pm$

0,01 mg ci-3-glu/L) e estável (kombucha décimo dia: $1,10^a \pm 0,01$ mg ci-3-glu/L) com a progressão da fermentação. Os pigmentos antociânicos são suscetíveis à degradação quando expostos a condições como incidência de luz, pH extremo, temperaturas elevadas (> 50 a 60 °C) e oxidação pela presença de oxigênio (Sousa *et al.*, 2022). Apesar das possíveis intercorrências, o extrato e as kombuchas enriquecidas com tecido floral demonstraram notável estabilidade das antocianinas, conferindo assim um maior apelo funcional ao produto final. Adicionalmente, outros dois compostos antociânicos foram observados na separação cromatográfica. Embora não identificados nesta pesquisa, ao contrastar com outro estudo realizado com as pétalas de *T. majus* da cor laranja, é plausível inferir que esses pigmentos possam ser a Delfinidina-3-di-hexosídeo e a Pelargonidina-3-soforósido (Garzón *et al.*, 2015). Quando somadas, as áreas de ambos os picos resultaram em uma concentração de 12,57 mg ci-3-glu/L no extrato floral, 10,1 mg ci-3-glu/L no fermentado inicial (dia 0) e 7,71 mg ci-3-glu/L no produto final (dia 10).

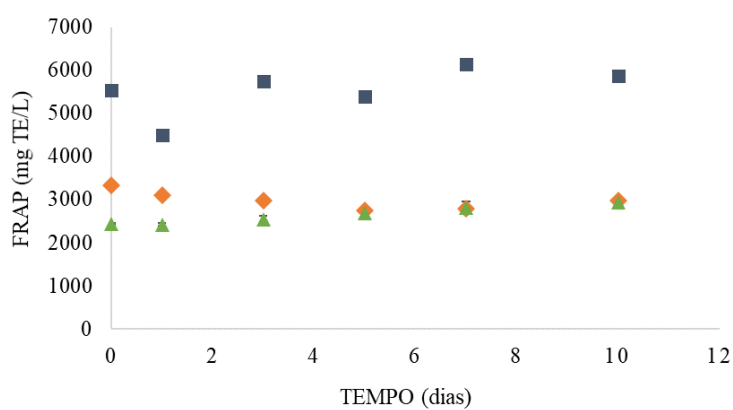
3.3.2.5 Atividade antioxidante

As bebidas produzidas na cinética de fermentação foram avaliadas por diferentes métodos de atividade antioxidante (Figura 19). Em termos de eliminação do radical ABTS, a maior atividade foi obtida no tempo zero de experimento, tanto para a kombucha à base de chá preto ($7555,5 \pm 35,3$ $\mu\text{mol TE/L}$), quanto para as bebidas adicionadas de *T. majus* ($4257,6 \pm 23,6$ $\mu\text{mol TE/L}$). No fermentado controle, a máxima foi obtida no dia 1 ($4002,4 \pm 13,2$ $\mu\text{mol TE/L}$). Pelo método FRAP o potencial antioxidante da kombucha padrão variou entre $4493,1 \pm 15,2$ $\mu\text{mol TE/L}$ (dia 1) e $6142,5 \pm 14,2$ $\mu\text{mol TE/L}$ (dia 7). Na kombucha com extrato floral o intervalo obtido ($2757 \pm 18,4$ $\mu\text{mol TE/L}$ a $3337,8 \pm 14,4$ $\mu\text{mol TE/L}$), foi bem próximo aos valores observados no fermentado controle ($2426,41 \pm 22,3$ $\mu\text{mol TE/L}$ a $2930,14 \pm 20,7$ $\mu\text{mol TE/L}$). A maior capacidade de neutralização do radical DPPH foi registrada no terceiro dia para a kombucha de chá preto ($11541,1 \pm 34,3$ $\mu\text{mol TE/L}$), no décimo dia para a bebida com substrato alternativo ($8652,3 \pm 38,5$ $\mu\text{mol TE/L}$), e quinto dia na bebida controle ($5358,6 \pm 20,1$ $\mu\text{mol TE/L}$).

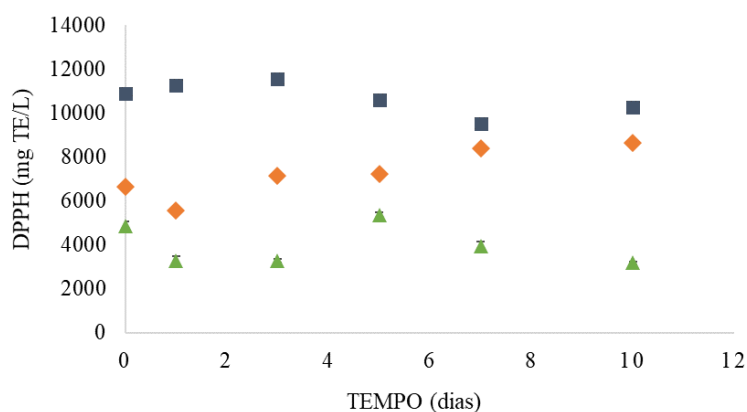
Figura 19 – Efeito das variáveis tempo e substrato sobre a atividade antioxidante pelos métodos ABTS, FRAP e DPPH das kombuchas à base de chá preto e adicionadas de *Tropaeolum majus* (capuchinha).



(A)



(B)



(C)

Legenda: ■ **Kombucha padrão**: 100% de chá preto; ◆ **Kombucha com capuchinha**: 50% de chá preto e 50% de extrato de capuchinha; ▲ **Kombucha controle**: 50% de chá preto e 50% de água; TE: equivalentes de Trolox.

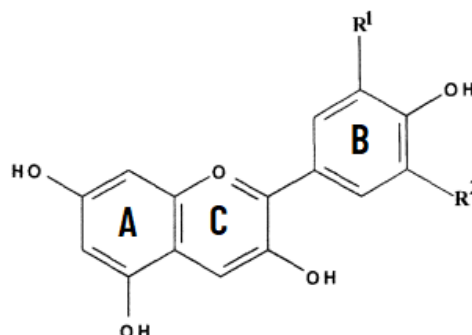
Com base na representação gráfica dos resultados, é evidente que a kombucha padrão exibiu maiores atividades antioxidantes em ambos os métodos testados. Ao final do experimento (dia 10), essa formulação demonstrou atividade ABTS 1,5 vezes mais potente do que a bebida adicionada de capuchinha. Para os métodos FRAP e DPPH essas proporções foram de aproximadamente 7 e 2,4 vezes, respectivamente. A bioatividade mais elevada na kombucha de chá preto está associada à maior concentração de compostos antioxidantes nessas amostras, conforme discutido no tópico anterior. Dessa forma, a redução desses compostos com a progressão da fermentação desencadeou o mesmo efeito sobre as atividades antioxidantes, que demonstraram uma redução sutil até o final do experimento, com exceção das bebidas adicionadas de tecido floral, que pelo método DPPH apresentaram um aumento gradativo da bioatividade com o avanço da fermentação.

Assim, objetivando analisar essas hipóteses, o teste de correlação de Pearson (r) foi executado, a fim de medir o grau de interação entre os compostos bioativos e o potencial antioxidante das bebidas. Pautando-se nos produtos de Pearson (r) associados à kombucha padrão, os compostos fenólicos apresentaram uma forte correlação positiva com a atividade antioxidante pelo método ABTS ($r = 0,8828$). A concentração de flavonoides demonstrou a mesma interação em ABTS ($r = 0,9125$) e DPPH ($r = 0,8980$), o que justifica a redução simultânea de compostos e atividades antioxidantes nas bebidas. Contudo, apesar de contribuir significativamente no poder antioxidante de uma amostra, os polifenóis não são os únicos compostos com essa bioatividade. Além disso, os polifenóis podem gerar efeitos antioxidantes em sinergia com outras substâncias (Qi-Zhuang *et al.*, 2021).

No fermentado controle, apenas os compostos fenólicos demonstraram correlação significativa com ABTS ($r = 0,9144$). Contrariamente, nas bebidas com extrato de capuchinha, o teor de fenóis totais não apresentou correlação significativa ($p > 0,05$) com as atividades antioxidantes, o que possivelmente está relacionado à menor concentração desses compostos nas amostras em questão. Já para flavonoides a interação com ABTS ($r = 0,8552$) e FRAP ($r = 0,8794$) foi forte e positiva na kombucha com infusão floral. A concentração de antocianinas também demonstrou forte correlação ($r = 0,9214$) com o ensaio DPPH. A correlação positiva dos pigmentos antocianínicos com DPPH demonstra a contribuição desses compostos na eliminação do radical *2,2-difenil-1-picrilhidrazilo*, conforme evidenciado na Figura 19 (C). Esse potencial antioxidante das antocianinas está relacionado aos processos de hidroxilação e metoxilação no anel B, conforme pode ser observado na estrutura química representada na

Figura 20. Essa configuração estrutural, confere às antocianinas maior estabilidade e eficiência, otimizando a captura de radicais livres (Chaves *et al.*, 2018).

Figura 20 – Estrutura química das antocianinas.



Fonte: adaptado de Vargas; Jiménez; López (2000).

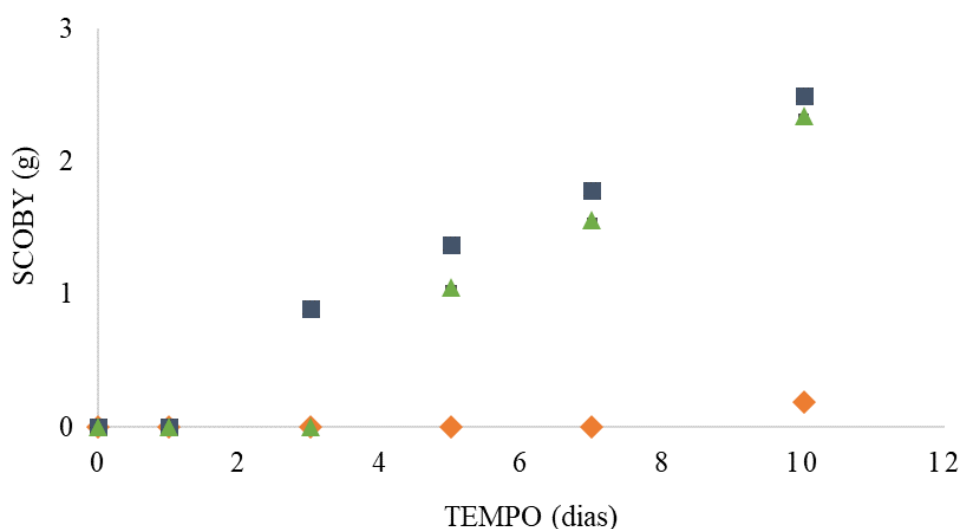
Em um comparativo com os achados científicos, na pesquisa de Jakubczyk *et al.* (2020), amostras de kombucha à base de chá preto apresentaram menor percentual de eliminação do radical DPPH e redução do íon férrico (ou íon Fe^{3+}), após 14 dias de fermentação, em comparação ao início do experimento. Em kombuchas fermentadas com chá preto e infusão de Echinacea, as atividades antioxidantes pelos métodos ABTS e DPPH tiveram uma redução dos valores com o avanço da fermentação (9 dias), enquanto para FRAP o inverso ocorreu (Özyurt, 2020). Contrariamente, no estudo de Wongthai *et al.* (2021) a capacidade antioxidante (DPPH e ABTS) de kombuchas fermentadas com chá *oolong* (*Camellia sinensis*) e infusão das flores de *Clitoria ternatea*, apresentou aumento significativo ($p \leq 0,05$) durante todo período de fermentação (20 dias). De posse das informações discutidas, observa-se que as atividades antioxidantes de kombuchas fermentadas em diferentes substratos configura um processo complexo. Isso porque, além dos diversos comportamentos da bebida frente aos métodos analíticos empregados (ABTS, FRAP, DPPH), a heterogeneidade de compostos presentes em substratos alternativos, torna os resultados do processo fermentativo pouco previsíveis.

3.3.2.6 Ganho de massa da placa celulósica

O ganho de massa do SCOBY foi utilizado como métrica para avaliar a capacidade de adaptação das colônias microbianas presentes nas kombuchas, ao longo do tempo e em diferentes substratos de fermentação (Figura 21). A nova placa celulósica formada na kombucha de chá preto foi observada já no terceiro dia de fermentação. Na bebida controle o desprendimento da nova película ocorreu no quinto dia, enquanto nas kombuchas adicionadas

de *T. majus* a formação e separação de uma nova membrana ocorreu somente no décimo dia de experimento. Ao final do processo fermentativo, o SCOBY formado na kombucha padrão apresentou maior quantidade de massa (2,5 g), sendo 13x mais robusta do que a película formada na kombucha de capuchinha (0,19 g).

Figura 21 – Efeito das variáveis tempo e substrato sobre o ganho de massa microbiana produzida nas kombuchas à base de chá preto e adicionadas de *Tropaeolum majus* (capuchinha).



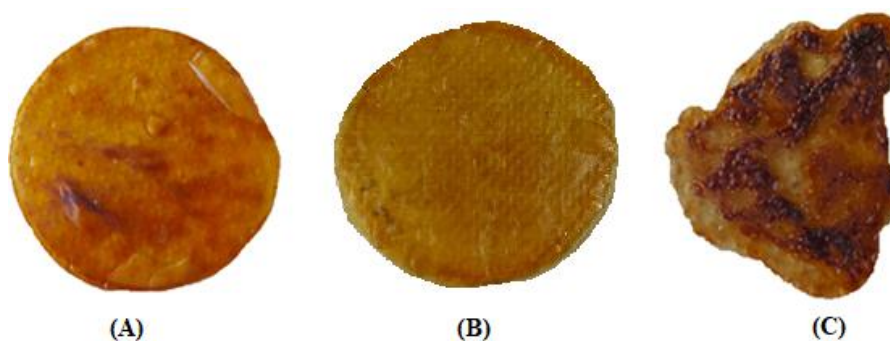
Legenda: SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*): massa expressa em base seca; ■ **Kombucha padrão**: 100% de chá preto; ♦ **Kombucha com capuchinha**: 50% de chá preto e 50% de extrato de capuchinha; ▲ **Kombucha controle**: 50% de chá preto e 50% de água.

Além da síntese mais lenta, a massa microbiana formada na kombucha com tecido floral não apresentou formato arredondado e textura gelatinosa, como foi observado nas kombuchas padrão e controle, no décimo dia de fermentação (Figura 22). Esse comportamento atípico no processo de formação de um novo SCOBY pode sugerir que a planta atuou como agente antimicrobiano no mosto fermentativo. Isso porque, a dinâmica das populações microbianas é influenciada pelos componentes químicos presentes no meio fermentativo (Rocha-Guzmán *et al.*, 2023). Portanto, o aparecimento de uma nova placa microbiana indica que houve adaptação das bactérias acéticas ao substrato, e consumo do mesmo para formação das fibrilas da rede do SCOBY (Bishop *et al.*, 2022; Morales, 2020). Assim, considerando que as kombuchas foram produzidas com a mesma quantidade de sacarose, que foi utilizado como substrato fonte de carbono, a substituição de 50% do chá preto pelo extrato de capuchinha, pode ser o fator plausível para justificar o comportamento dos microrganismos na síntese do SCOBY (Rocha-Guzmán *et al.*, 2023).

As propriedades antimicrobianas de *T. majus* estão intimamente associadas à presença de glucotropaeolina no tecido vegetal. A glucotropaeolina configura um tipo de metabólito secundário da classe dos glucosinolatos, encontrada exclusivamente em plantas do gênero *Tropaeolum* (Česlová *et al.*, 2023). Esses metabólitos são precursores do composto isotiocianato de benzila, que é sintetizado frente a um estresse mecânico dos tecidos vegetais, como a maceração ou mastigação, por exemplo. O isotiocianato é reconhecido por suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anticancerígenas. Por isso, além de ser utilizada para guarnecer pratos na alta gastronomia, a capuchinha também é utilizada como um potente recurso natural antibacteriano (Barros *et al.*, 2020; Garzón *et al.*, 2015; Valsalam *et al.*, 2019). A espécie já foi documentada como uma planta com propriedades bactericidas sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella tifo*; e ação antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Peniillum notatum*, *Trichoderma viridiae* e *Mucor* spp. (Valsalam *et al.*, 2019).

Pautando-se nessa discussão, possivelmente o estresse mecânico gerado durante o processo de extração das pétalas de *T. majus*, conferiu ao extrato a presença do composto com propriedades antimicrobianas (isotiocianato de benzila). Durante a fermentação, o isotiocianato pode ter desempenhado ação antibacteriana e antifúngica sobre os organismos presentes no conjunto fermentativo, principalmente as bactérias acéticas (*Acetobacter*), o que retardou a formação do SCOBY. Contudo, esse desfecho não necessariamente resultou em um processo fermentativo prejudicado, ou em uma bebida com perfil físico-químico e propriedades bioativas menos favoráveis para consumo. Ademais, o isotiocianato de benzila é um composto de interesse para a saúde humana, e, portanto, sua presença na kombucha pode agregar valor funcional à bebida, quando consumida em doses moderadas.

Figura 22 – Placa celulósica (SCOBY) desidratada obtida no décimo dia de fermentação de kombuchas à base de chá preto e adicionadas de *Tropaeolum majus* (capuchinha).



Nota – A: SCOBY formado na kombucha padrão; B: SCOBY formado na kombucha controle; C: SCOBY formado na kombucha com capuchinha.

Fonte: Autoria própria (2023).

3.3.2.7 Potencial hidrogeniônico (ph) e quantificação de ácidos orgânicos

Considerando o pH como um parâmetro crucial para atestar a qualidade e inocuidade da kombucha, as bebidas produzidas durante a cinética de fermentação foram avaliadas sobre esse aspecto (Figura 23). A variável tempo de fermentação impactou no comportamento das bebidas, de forma a reduzir os valores de pH com a progressão da fermentação, em ambos os substratos. Na kombucha padrão, os valores de pH oscilaram entre $2,6 \pm 0,02$ (dia 10) e $3,8 \pm 0,02$ (dia 0). Esses valores se assemelharam aos obtidos no fermentado controle ($2,6 \pm 0,01$ a $3,1 \pm 0,01$) e naqueles enriquecidos de tecido floral ($3,2 \pm 0,02$ a $3,7 \pm 0,02$). Todas as formulações apresentaram medidas de pH em conformidade com as legislações vigentes para kombuchas, que estabelecem valor mínimo de 2,5 e máximo de 4,2 (Brasil, 2019; Nummer, 2013). A inocuidade da bebida torna-se mais evidente com valores de pH entre esses pontos de corte, uma vez que microrganismos patogênicos não se desenvolvem em meio de cultivo mais ácido como o da kombucha (Cardoso *et al.*, 2020). Alterações semelhantes nos valores de pH foram documentadas em kombucha de chá preto (8 g/L), que apresentou redução nos valores de 3,54 (dia 1) para 2,53 (dia 14) (Jakubczyk *et al.*, 2020). Similarmente, os valores de pH de kombuchas fermentadas por 10 dias com substratos alternativos de hortelã-pimenta, urtiga, tomilho silvestre e sabugueiro, também apresentaram redução gradativa (Vitas *et al.*, 2020). Wongthai *et al.* (2021) obtiveram um comportamento de pH similar em kombucha com adição de tecido floral (*Clitoria ternatea*) fermentada por 20 dias.

O declínio gradativo dos valores de pH da kombucha é um fenômeno esperado, frente à síntese de produtos da fermentação microbiana, como os ácidos acético e glucurônico (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). O ácido acético é sintetizado pelas bactérias acéticas, a partir do

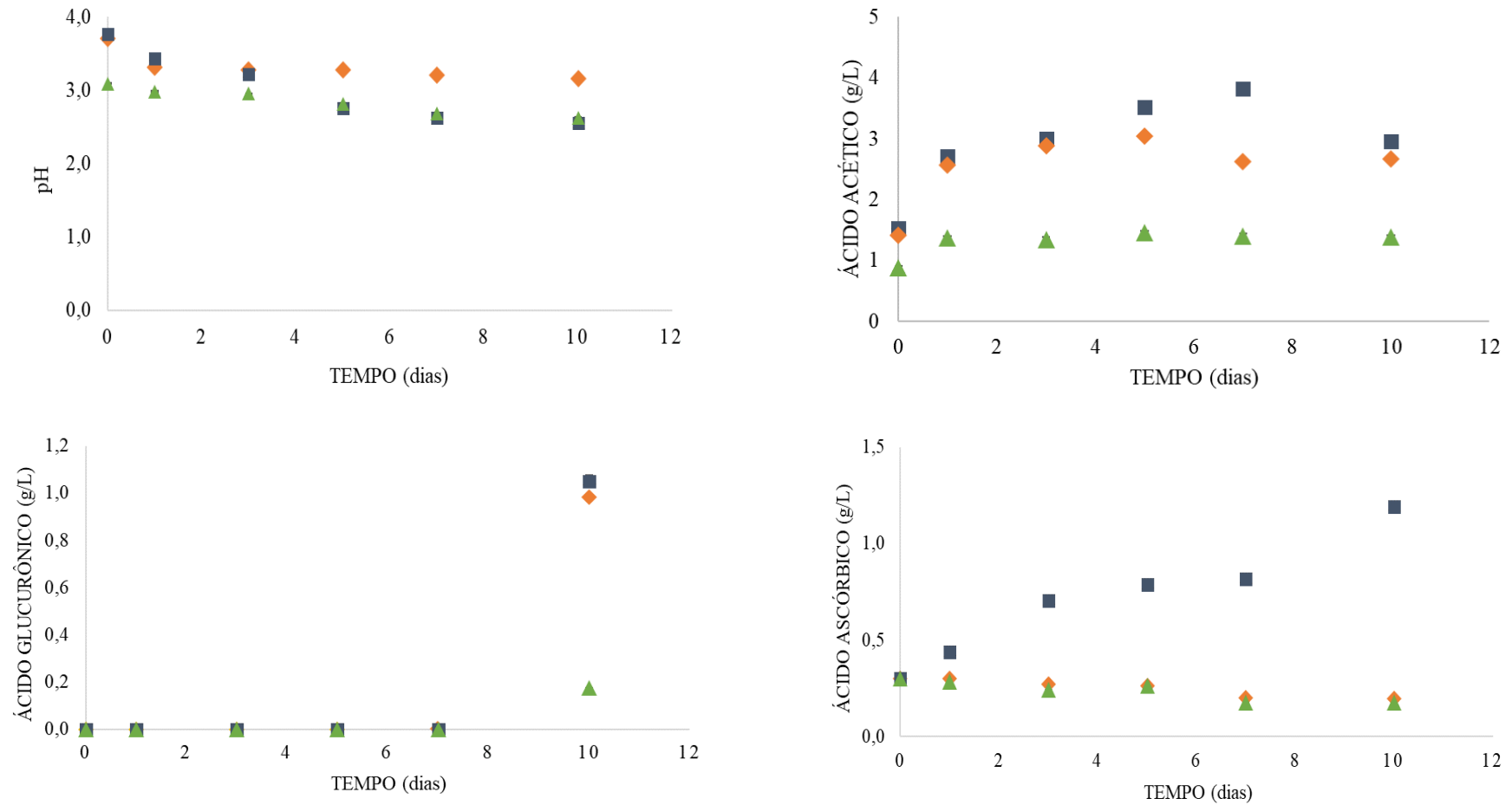
etanol proveniente do metabolismo das leveduras, enquanto o glucurônico deriva da glicose (Bishop *et al.*, 2022). Nas kombuchas produzidas, o comportamento das amostras padrão e adicionada de capuchinha foi muito similar em termos de ácido acético. A concentração máxima foi obtida no sétimo dia para o fermentado padrão ($3,82 \pm 0,01$ g/L) e no quinto dia para a bebida com extrato floral ($3,05 \pm 0,01$ g/L), seguida de um declínio subsequente até o final do experimento. Esse declínio pode estar relacionado ao uso do composto como fonte de carbono, à medida que as reservas de sacarose e etanol foram esgotadas no mosto (Bishop *et al.*, 2022). A escassez de substrato energético ficou evidente na kombucha controle, refletindo-se nos menores teores de ácido acético (variando de 0,89 a $1,46 \pm 0,01$ g/L). Nessa amostra, 50% do mosto era composto por água, o que pode ter influenciado na disponibilidade de nutrientes para a atividade microbiana.

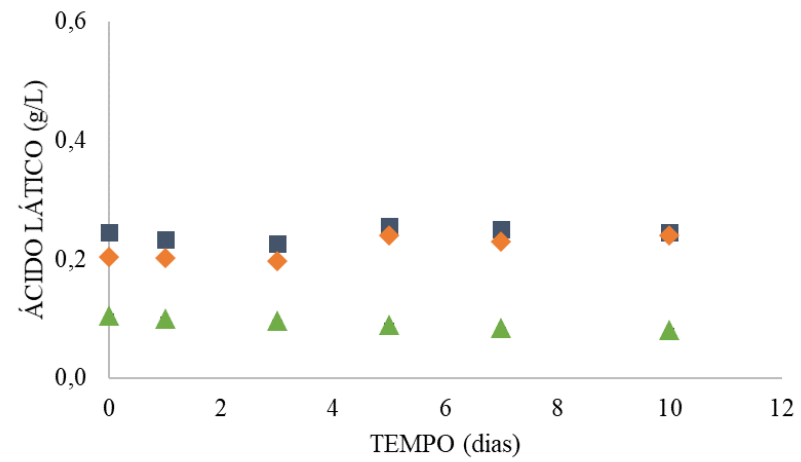
O ácido glucurônico representa um dos componentes de interesse significativo na produção de kombucha. Este ácido é endogenamente sintetizado no fígado humano, participando dos processos de desintoxicação do organismo. Seu mecanismo principal consiste na conjugação com substâncias tóxicas, resultando na formação de complexos hidrossolúveis para excreção renal (Leal *et al.*, 2018). Portanto, sua ingestão dietética é considerada benéfica, uma vez que está associado à otimização dos mecanismos de desintoxicação do organismo. Nesta investigação (Figura 23), o extrato de *T. majus* mostrou-se um substrato alternativo capaz de estimular a síntese de ácido glucurônico na kombucha. A bebida enriquecida com esse componente floral apresentou um comportamento semelhante ao fermentado padrão, manifestando a produção de ácido glucurônico no décimo dia de fermentação ($0,98 \pm 0,01$ g/L; $1,05 \pm 0,03$ g/L, respectivamente). Já no experimento controle, a síntese do composto foi menos satisfatória ($0,17 \pm 0,01$ g/L – dia 10).

Segundo Bishop *et al.* (2022), o mosto preparado com chá preto ou chá verde favorece a síntese de ácido ascórbico na kombucha, confirmando as observações feitas neste estudo (Figura 23). A bebida padrão fermentada exclusivamente com chá preto, não apenas exibiu os mais altos teores desse composto ($0,30 \pm 0,02$ g/L a $1,19 \pm 0,01$ g/L), mas também demonstrou um aumento progressivo ao longo da fermentação. Em contrapartida, concentrações inferiores foram registradas para as amostras controle ($0,17 \pm 0,03$ g/L a $0,30 \pm 0,01$ g/L) e adicionada de infusão floral ($0,20 \pm 0,01$ g/L a $0,30 \pm 0,03$ g/L), sem diferença entre ambas ($p > 0,05$). Apesar desse panorama, todas as amostras iniciaram a fermentação com o mesmo teor inicial de vitamina C ($0,30$ g/L), que provavelmente era derivada do ácido ascórbico presente no *starter* fermentado anteriormente.

O extrato de capuchinha revelou-se uma adição promissora para a fermentação de kombucha em termos de ácido láctico, considerando que sua performance foi muito semelhante ao da bebida padrão ($p > 0,05$). O teor desse composto oscilou entre $0,226 \pm 0,01$ g/L e $0,255 \pm 0,02$ g/L no fermentado padrão, e entre $0,197 \pm 0,01$ g/L e $0,240 \pm 0,03$ g/L na bebida contendo o extrato floral. No fermentado controle o intervalo obtido variou de $0,082 \pm 0,03$ g/L a $0,105 \pm 0,01$ g/L. A detecção do ácido láctico nas amostras indica a presença de bactérias lácticas metabolicamente ativas (Jakubczyk *et al.*, 2020). Segundo Nguyen *et al.* (2014), essas bactérias têm o potencial de aumentar a sobrevivência das bactérias acéticas, que são as principais colônias responsáveis pela síntese de ácido glucurônico. Pautando-se nessas teorias, é plausível sugerir que a baixa produção de ácido glucurônico na kombucha controle pode estar relacionada à menor quantidade de bactérias lácticas, possivelmente insuficientes para potencializar a atividade das bactérias acéticas.

Figura 23 – Efeito das variáveis tempo e substrato sobre o potencial hidrogeniônico (pH) e concentração de ácidos orgânicos de kombuchas à base de chá preto e adicionadas de *Tropaeolum majus* (capuchinha).





Legenda – ■ **Kombucha padrão:** 100% de chá preto; ◆ **Kombucha com capuchinha:** 50% de chá preto e 50% de extrato de capuchinha; ▲ **Kombucha controle:** 50% de chá preto e 50% de água.

3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A incorporação das pétalas de *T. majus* como substrato alternativo na fermentação da kombucha mostrou-se uma opção viável para produzir uma bebida com propriedades bioativas e funcionais distintas do fermentado tradicional, oferecendo benefícios para consumo humano. Embora não tenha apresentado potencial hipoglicemiante, o extrato das pétalas de capuchinha agregou pigmentos antocianínicos à bebida, aprimorando sua atividade antioxidante. Ademais, a síntese de ácidos orgânicos no substrato alternativo foi comparável à bebida padrão. Portanto, os resultados estudo estabelecem uma base promissora para novas pesquisas, visando aprimorar as propriedades do extrato de *T. majus* e sua aplicação em produtos alimentícios. Além disso, a síntese de ácidos orgânicos no substrato alternativo foi comparável à bebida padrão. Portanto, os resultados deste estudo estabelecem uma base promissora para novas pesquisas, visando aprimorar as propriedades do extrato de *T. majus* e sua aplicação em produtos alimentícios.

CAPÍTULO 4 – OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DAS FOLHAS DE CAPUCHINHA (*Tropaeolum majus*)

O conteúdo deste capítulo foi apresentado na categoria de *trabalho completo* no III Web Encontro Nacional de Engenharia Química (III WENDEQ), realizado em julho de 2023 (Anexo C)

RESUMO: As folhas da capuchinha (*Tropaeolum majus*) são uma fonte de compostos bioativos favoráveis para consumo humano. Assim, o presente estudo objetivou otimizar a extração de compostos das folhas de *T. majus*. A pesquisa foi norteadada por um planejamento experimental Box-Behnken. A otimização dos extratos indicou que o melhor rendimento de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante (ABTS) pode ser obtido com 0,4g de massa de folha (liofilizada) infundidas a 70 °C, com etanol 50%.

Palavras-chave: Compostos Fitoquímicos. Ação Antioxidante. Caracterização Físico-química. Tecnologia de Alimentos. Tropaeolaceae.

4.1 INTRODUÇÃO

A espécie *Tropaeolum majus* caracteriza-se como uma planta herbácea perene, popularmente conhecida como capuchinha (Valsalam *et al.*, 2019). As partes aéreas da planta como folhas, flores, talos e sementes apresentam potencial alimentício (Akinmoladun *et al.*, 2022). As flores têm se popularizado na alta gastronomia, porque são utilizadas para guarnecer pratos mais sofisticados. As inflorescências também apresentam características físico-químicas e perfil nutricional favorável para consumo humano, e já foram caracterizadas por diversos autores (Barros *et al.*, 2020; Chensom *et al.*, 2019; Garzón *et al.*, 2015).

Compostos bioativos como flavonoides, vitamina C, luteína e ácidos graxos essenciais podem ser encontrados nas partes comestíveis da espécie *T. majus*. Esses compostos apresentam potencial antioxidante e capacidade de neutralizar as espécies reativas de oxigênio (Valsalam *et al.*, 2019). Por isso, a capuchinha também é reconhecida por seu potencial de ação antiproliferativa contra células tumorais, além de melhora do prognóstico em quadros inflamatórios e hipertensivos (Fernandes *et al.*, 2017). As folhas já foram documentadas como um recurso natural eficiente no tratamento de infecções do trato urinário, feridas e doença pulmonar obstrutiva (Valsalam *et al.*, 2019), o que também está intimamente associado à presença de fitoquímicos na matriz vegetal (Česlová *et al.*, 2023).

Apesar das comprovações já documentadas, as folhas da capuchinha ainda são uma parte subutilizada e pouco explorada pela comunidade científica. Esse material vegetal

configura um recurso natural em potencial para novas investigações, principalmente no que tange à composição físico-química e parâmetros para otimizar a extração de compostos bioativos. Os conhecimentos acerca da composição das folhas podem proporcionar sua aplicação em produtos alimentícios, fármacos ou cosméticos para fins estéticos. Diante desse contexto, o presente estudo tem por objetivo otimizar a extração de compostos bioativos das folhas de *Tropaeolum majus*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material Vegetal

As folhas de *T. majus* foram coletadas no campus da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) (25°05'23.0"S 50°06'03 0"W), Ponta Grossa, Paraná, Brasil. O material vegetal foi liofilizado (LD 1500, Terroni[®], São Paulo, Brasil) e em seguida acondicionado em dessecador até o momento das análises. A planta foi autenticada pelo herbário da UEPG e encontra-se tombada sob o espécime de código HU-2280.

4.2.2 Otimização Da Extração De Compostos Das Folhas De *Tropaeolum majus*

Os extratos foram obtidos por meio da infusão das folhas liofilizadas em uma solução hidroalcolica (50 mL), mantida sob aquecimento constante, seguindo as quantidades específicas de material vegetal, temperaturas e concentrações de solvente detalhadas na Tabela 19. Após, as infusões foram filtradas em papel filtro qualitativo Whatman n° 1 (Sigma Aldrich[®], St Louis, MO, USA) para retenção das folhas e partículas sólidas.

Os parâmetros para otimização dos extratos foram determinados conforme planejamento experimental proposto por Box e Behnken (1960). Os efeitos das variáveis independentes Concentração de folha (X_1), Temperatura (X_2) e Concentração de solvente (X_3) (etanol) foram avaliados com três níveis (Tabela 19). Dessa forma, o desenho experimental consistiu em 15 combinações de tratamento (EFC1 a EFC15) com três pontos centrais, e distribuição em ordem aleatória para minimizar possíveis variações inesperadas. Os níveis das variáveis independentes foram determinados em testes prévios, com base na concentração de compostos fenólicos totais. O planejamento foi executado com o objetivo de determinar modelos capazes de maximizar a extração de compostos fenólicos totais, flavonoides e potencial antioxidante dos extratos das folhas de capuchinha.

Tabela 19 – Planejamento fatorial Box-Behnken aplicado para a extração de compostos das folhas de *Tropaeolum majus* (capuchinha).

| Experimento | Concentração de folha (g/L); X ₁ | | Temperatura (°C); X ₂ | | Solvente* (%); X ₃ | |
|-------------|--|---------------|-------------------------------------|---------------|-------------------------------|---------------|
| | Fatores | Valores reais | Fatores | Valores reais | Fatores | Valores reais |
| EFC1 | -1 | 16 | -1 | 30 | 0 | 70 |
| EFC2 | +1 | 48 | -1 | 30 | 0 | 70 |
| EFC3 | -1 | 16 | +1 | 70 | 0 | 70 |
| EFC4 | +1 | 48 | +1 | 70 | 0 | 70 |
| EFC5 | -1 | 16 | 0 | 50 | -1 | 50 |
| EFC6 | +1 | 48 | 0 | 50 | -1 | 50 |
| EFC7 | -1 | 16 | 0 | 50 | +1 | 90 |
| EFC8 | +1 | 48 | 0 | 50 | +1 | 90 |
| EFC9 | 0 | 32 | -1 | 30 | -1 | 50 |
| EFC10 | 0 | 32 | +1 | 70 | -1 | 50 |
| EFC11 | 0 | 32 | -1 | 30 | +1 | 90 |
| EFC12 | 0 | 32 | +1 | 70 | +1 | 90 |
| EFC13 | 0 | 32 | 0 | 50 | 0 | 50 |
| EFC14 | 0 | 32 | 0 | 50 | 0 | 50 |
| EFC15 | 0 | 32 | 0 | 50 | 0 | 70 |

Nota – X₁; X₂; X₃: codificações das variáveis Concentração de folha, Temperatura e Solvente respectivamente, aplicadas em três níveis no planejamento experimental. *Etanol (v/v).

4.2.3 Compostos Fenólicos Totais

O teor de compostos fenólicos totais dos extratos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (Singleton; Rossi, 1965). A leitura da absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Epoch, Synergy-BioTek®, Winooski, EUA), em comprimento de onda de 765 nm. O padrão ácido gálico (20 a 200 mg/L) foi utilizado para a curva de quantificação do composto ($y = 0,000772x + 0,001610$; $R^2 = 0,989$).

4.2.4 Flavonoides Totais

Os extratos foram caracterizados quanto ao teor de flavonoides segundo método descrito por Zhishen e Mengcheng (1999). A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro de

microplaca (Epoch, Synergy-BioTek[®], Winooski, EUA), no comprimento de onda de 510 nm. A catequina (10 a 200 mg/L) foi utilizada como composto padrão para a curva de calibração ($y = 0,003430x - 0,001032$; $R^2 = 0,999$).

4.2.5 Atividade Antioxidante Abts

As amostras foram avaliadas quanto à capacidade de captura do cátion *2,2-azino-bis (3-ethylbenzot hiazoline-6-sulfonic acid)* (Re *et al.*, 1999). A leitura das amostras foi realizada no mesmo equipamento utilizado para determinação de fenóis e flavonoides, em comprimento de onda de 734 nm. O padrão Trolox (50 a 350 $\mu\text{mol/L}$) foi utilizado para a curva de calibração ($y = 0,241560x - 1,937984$; $R^2 = 0,999$).

4.2.6 Atividade Antioxidante Frap

O potencial de redução do íon ferro presente no complexo *2,4,6-tripiridil-s-triazina* (TPTZ), dos extratos das folhas de capuchinha também foi avaliado (Benzie; Strain, 1996). A leitura das absorbâncias foi realizada em 595 nm (Epoch, Synergy-BioTek[®], Winooski, EUA). A curva de calibração ($y = 0,001205x + 0,030751$; $R^2 = 0,989$) foi padronizada com o composto Trolox (100 a 1000 $\mu\text{mol/L}$).

4.2.7 Atividade Antioxidante Dpph

A capacidade de captura do radical nitrogenado *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* foi realizada pelo método proposto por Brand-Williams, Couvelier e Berset (1995). A leitura das amostras foi realizada em 517 nm (Epoch, Synergy-BioTek[®], Winooski, EUA), e o padrão Trolox (100 a 700 $\mu\text{mol/L}$) foi utilizada para a curva de quantificação ($y = 0,039985x - 2,071918$; $R^2 = 0,991$).

4.2.8 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Com o intuito de avaliar a diferença entre as amostras, o conjunto de dados foi submetido à análise de variância (ANOVA) e teste de médias de Fisher LSD (*Fisher Least Significance Difference*). O software STATISTICA versão 7.1 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) foi utilizado para todas as análises estatísticas e planejamento experimental *Box-Behnken*.

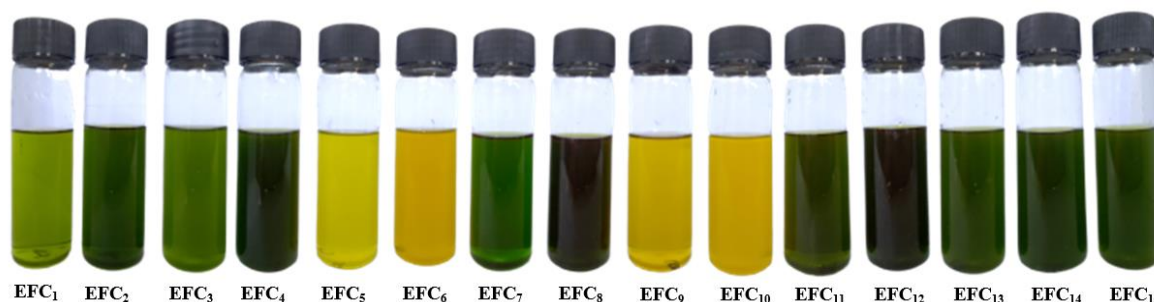
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Planejamento Experimental

Os extratos das folhas de *T. majus* obtidos no planejamento experimental estão ilustrados na Figura 24. Esse material foi caracterizado quanto ao teor de compostos fenólicos

totais, flavonoides e atividade antioxidante por diferentes métodos (Tabela 20). As amostras apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) em todos os parâmetros avaliados, o que demonstra que as variáveis testadas (Concentração de folha; Temperatura; Concentração de solvente) influenciaram no rendimento da extração.

Figura 24 – Extratos das folhas de *Tropaeolum majus* obtidos a partir do planejamento fatorial Box-Behnken



Nota – **EFC₁** (16 g/L; 30 °C; 70%); **EFC₂** (48 g/L; 30 °C; 70%); **EFC₃** (16 g/L; 70 °C; 70%); **EFC₄** (48 g/L; 70 °C; 70%); **EFC₅** (16 g/L; 50 °C; 50%); **EFC₆** (48 g/L; 50 °C; 50%); **EFC₇** (16 g/L; 50 °C; 90%); **EFC₈** (48 g/L; 50 °C; 90%); **EFC₉** (32 g/L; 30 °C; 50%); **EFC₁₀** (32 g/L; 70 °C; 50%); **EFC₁₁** (32 g/L; 30 °C; 90%); **EFC₁₂** (32 g/L; 70 °C; 90%); **EFC₁₃** (32 g/L; 50 °C; 50%); **EFC₁₄** (32 g/L; 50 °C; 50%); **EFC₁₅** (32 g/L; 50 °C; 50%).

Fonte: Autoria própria (2023).

Em termos de fenóis totais a amostra EFC3 apresentou a maior concentração, enquanto o menor teor foi observado no experimento EFC11. Esse resultado demonstra que o aumento da quantidade de folha, não necessariamente implica em maior extração de compostos. Isso porque, o extrato com menor teor de fenóis (EFC11) foi desenvolvido utilizando o dobro da quantidade de folha (32 g/L), quando comparado à amostra EFC3 (16 g/L). O mesmo cenário foi observado em relação à concentração de flavonoides, no qual o maior teor foi detectado no extrato EFC12 (32 g/L de Concentração de folha), e o menor em EFC2 (48 g/L de Concentração de folha). Esses resultados podem estar associados à saturação do solvente devido ao excesso de amostra no meio (Ozturk; Parkinson; Gonzalez-Miquel *et al.*, 2018).

Ademais, o aumento da temperatura de extração demonstrou melhores resultados em termos de compostos, uma vez que as amostras com maiores concentrações (EFC3 e EFC12) foram extraídas com o maior fator testado (70 °C). O emprego de temperaturas mais elevadas implica em maior difusão de compostos no meio, em virtude da maior permeabilidade da parede vegetal (Prabawati *et al.*, 2021). Zannou, Kelebek e Selli (2020) obtiveram maior extração de compostos fenólicos em flores frescas de *Hibiscus sabdariffa* a 98 °C (2201 mg AG/L), do que o experimento a 25 °C (1556 mg AG/L).

Em complemento, a concentração de solvente demonstrou ser um fator influente na extração, uma vez que para compostos fenólicos o ponto máximo de extração foi obtido com etanol 70% (EFC3), enquanto flavonoides com 90% (EFC12). Essa variabilidade está associada à interação do solvente com os demais parâmetros testados (Concentração de folha e Temperatura), bem como à polaridade desse solvente e dos compostos alvos da extração. A maioria dos compostos bioativos é polar, sendo compatíveis com a polaridade da água e do etanol (Takahashi *et al.*, 2020). Contudo, alguns compostos são apolares, o que torna sua extração limitada quando realizada em solvente não compatível (Akinmoladun *et al.*, 2022). Além disso, em temperaturas mais altas a polaridade do solvente reduz, o que potencializa a extração de compostos de média polaridade, em virtude do enfraquecimento das ligações de hidrogênio, conforme documentado por Rodrigues *et al.* (2020). Nessa pesquisa, os autores observaram maior extração de compostos fenólicos das folhas de *Cnidocolus aconitifolius* com etanol (99,8%) em 140 °C (57 mg AG/100g), do que a 80 °C (47 mg AG/100g).

A atividade antioxidante de uma amostra está intimamente associada à presença de compostos bioativos em sua matriz, especialmente fenóis e flavonoides (Katarzyna *et al.*, 2021). Essas substâncias apresentam diferentes níveis de reatividade aos radicais livres e demais espécies reativas de oxigênio (Rumpf; Burger; Schulze, 2023). Corroborando com os resultados obtidos, dentre os quais as amostras com maiores teores de bioativos como a EFC3, também apresentou os melhores desfechos em relação ao potencial antioxidante, pelos métodos ABTS, FRAP e DPPH. Já a amostra EFC11 demonstrou menor bioatividade, possivelmente em função do reduzido teor de compostos.

Tabela 20 – Concentração de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos ABTS, FRAP e DPPH dos extratos das folhas de *Tropaeolum majus*.

| Amostra | Fenóis totais (mg AG/L) | Flavonoides totais (mg CAT/L) | ABTS (μmol TE/L) | FRAP (μmol TE/L) | DPPH (μmol TE/L) |
|----------------|------------------------------------|--|--|--|--|
| EFC1 | 45238 ^c \pm 186 | 13553,1 ^e \pm 137 | 143082,34 ^b \pm 685,84 | 189018,3 ^d \pm 596,8 | 207570 ^h \pm 553,2 |
| EFC2 | 30950,63 ^k \pm 62,32 | 11473,1 ⁱ \pm 67 | 79071,51 ^l \pm 601,25 | 109356,7 ^l \pm 380,92 | 143234,5 ^m \pm 288,2 |
| EFC3 | 53010,6 ^a \pm 93,5 | 17859 ^b \pm 206 | 147540,3 ^a \pm 970 | 222140,1 ^a \pm 689,1 | 266219 ^b \pm 864 |
| EFC4 | 38363 ^f \pm 165 | 15473,7 ^d \pm 291,12 | 106654 ⁱ \pm 849,3 | 151828,1 ^j \pm 325 | 159407 ^l \pm 159 |
| EFC5 | 43349 ^d \pm 186 | 13055,1 ^f \pm 265,52 | 127650,84 ^e \pm 685,84 | 152912,7 ⁱ \pm 689,1 | 213804,3 ^g \pm 432,3 |
| EFC6 | 27503,9 ^l \pm 168,5 | 13218,3 ^{ef} \pm 190,92 | 100999,5 ^k \pm 734,9 | 157796 ^h \pm 325 | 171189,1 ^k \pm 288,2 |
| EFC7 | 46911,7 ^b \pm 247,3 | 15581,8 ^d \pm 79,43 | 126793,53 ^e \pm 342,92 | 164848,42 ^g \pm 689,1 | 186348 ^j \pm 864 |
| EFC8 | 25769,3 ^m \pm 62,32 | 11764,6 ^{hi} \pm 211,2 | 74442,1 ^m \pm 544,21 | 108660,41 ^l \pm 513,63 | 73381,2 ⁿ \pm 184,4 |
| EFC9 | 36564 ^h \pm 379,2 | 12326,2 ^g \pm 42,1 | 119378,83 ^e \pm 342,92 | 133151,2 ^k \pm 770,5 | 206490,4 ⁱ \pm 216,2 |
| EFC10 | 42270,1 ^e \pm 280,5 | 17780,52 ^b \pm 37,93 | 139725 ^c \pm 198 | 216850,8 ^b \pm 571,4 | 276127 ^a \pm 571 |
| EFC11 | 13039,2 ⁿ \pm 81 | 11994 ^{gh} \pm 182,52 | 74798,93 ^m \pm 342,92 | 91226,8 ^m \pm 571,4 | 171422,3 ^k \pm 216,2 |
| EFC12 | 36980 ^g \pm 186 | 19317,2 ^a \pm 280,52 | 103604,41 ^j \pm 740,8 | 203273,83 ^c \pm 487 | 236940 ^f \pm 864 |
| EFC13 | 35631,5 ^j \pm 161,92 | 16869,44 ^c \pm 276 | 109548,4 ^h \pm 523,82 | 179253,1 ^e \pm 571,4 | 256034,9 ^d \pm 779,4 |
| EFC14 | 36225,2 ⁱ \pm 247,3 | 16875,51 ^c \pm 272,1 | 137810,9 ^d \pm 585,65 | 173732,8 ^f \pm 770,5 | 250918,2 ^e \pm 374,4 |
| EFC15 | 36333,1 ^{hi} \pm 93,5 | 16748 ^c \pm 258,34 | 110805 ^g \pm 593 | 173882 ^f \pm 751 | 258655,7 ^c \pm 779,4 |

Nota: Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão; AG: ácido gálico; CAT: catequina; TE: equivalentes de Trolox. **EFC**₁ (16 g/L; 30 °C; 70%); **EFC**₂ (48 g/L; 30 °C; 70%); **EFC**₃ (16 g/L; 70 °C; 70%); **EFC**₄ (48 g/L; 70 °C; 70%); **EFC**₅ (16 g/L; 50 °C; 50%); **EFC**₆ (48 g/L; 50 °C; 50%); **EFC**₇ (16 g/L; 50 °C; 90%); **EFC**₈ (48 g/L; 50 °C; 90%); **EFC**₉ (32 g/L; 30 °C; 50%); **EFC**₁₀ (32 g/L; 70 °C; 50%); **EFC**₁₁ (32 g/L; 30 °C; 90%); **EFC**₁₂ (32 g/L; 70 °C; 90%); **EFC**₁₃ (32 g/L; 50 °C; 50%); **EFC**₁₄ (32 g/L; 50 °C; 50%); **EFC**₁₅ (32 g/L; 50 °C; 50%). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras a nível de significância de 5% pelo teste de Fisher.

4.3.2 Otimização

Os modelos para as variáveis resposta (compostos fenólicos totais; flavonoides; ABTS) sugeridos na análise de regressão múltipla, foram significativos ($p \leq 0,05$) e não indicaram falta de ajuste ($Plack\ of\ fit > 0,05$) (Tabela 21). Contudo, os resultados obtidos nas análises antioxidantes pelos métodos FRAP e DPPH apresentaram falta de ajuste ($Plack\ of\ fit \leq 0,05$), e, portanto, não puderam ser descritos utilizando o modelo.

A variabilidade dos resultados obtidos, demonstra uma interação evidente entre as variáveis independentes (Concentração de folha; Temperatura; Concentração de solvente) e os compostos presentes na matriz vegetal. A variável X_1 apresentou coeficientes de regressão linear significativos ($p \leq 0,05$) com efeito negativo sobre o teor de fenóis, flavonoides e atividade ABTS. Para flavonoides o coeficiente de regressão quadrático também demonstrou correlação negativa na variável X_1 . Esse desfecho sinaliza que o melhor rendimento no processo de extração pode ser obtido com o menor fator testado para a Concentração de folha (16 g/L). O que foi observado na caracterização dos extratos (Tabela 20), na qual as amostras com menor quantidade de folha, em sua maioria, apresentaram uma tendência às maiores concentrações de compostos bioativos.

Tabela 21 – Efeitos das variáveis independentes (Concentração de folha; Temperatura; Concentração de solvente) sobre a concentração de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante (ABTS) dos extratos das folhas de *Tropaeolum majus*.

| (Continua) | | | | | | | |
|--------------------------------------|-----------------------------|--------------------|-------------|---------|---------|-------------------|-------------------|
| Variáveis respostas | Fatores | Coef. de Regressão | Erro padrão | t-valor | p-valor | -95% de confiança | +95% de confiança |
| Compostos Fenólicos Totais (mg AG/L) | Constante | 37274,77 | 1917,98 | 19,43 | <0,0001 | 33095,80 | 41453,70 |
| | X ₁ | -8130,28 | 2626,30 | -3,09 | <0,0092 | -13852,50 | -2408,06 |
| | X ₂ | 5785,34 | 2626,30 | 2,20 | <0,0478 | 63,10 | 11507,57 |
| | R ² ajustado | 0,470 | | | | | |
| | Plack-of-fit | 0,548 | | | | | |
| Flavonoides totais (mg CAT/L) | Constante | 17191,18 | 516,44 | 33,28 | <0,0001 | 16040,47 | 18341,90 |
| | X ₁ | -1028,64 | 380,09 | -2,70 | <0,0220 | -1875,55 | -181,74 |
| | X ₁ ² | -2545,04 | 557,82 | -4,56 | <0,0010 | -3787,96 | -1302,12 |
| | X ₂ | 2665,43 | 380,09 | 7,01 | <0,0001 | 1818,53 | 3512,34 |
| | X ₃ ² | -1561,74 | 557,82 | -2,79 | <0,0188 | -2804,66 | -318,82 |
| | R ² ajustado | 0,850 | | | | | |
| | Plack-of-fit | 0,728 | | | | | |

| Variáveis respostas | Fatores | Coef. de Regressão | Erro padrão | t-valor | p-valor | (Conclusão) | |
|-------------------------------|-------------------------|-----------------------|----------------|---------|---------|----------------------|----------------------|
| | | | | | | -95% de confiança | +95% de confiança |
| ABTS ($\mu\text{mol TE/L}$) | Constante | 111976,86 | 3972,11 | 28,19 | <0,0001 | 103234,30 | 120719,40 |
| | X ₁ | -21732,00 | 5439,04 | -3,99 | <0,0021 | -33703,30 | -9760,80 |
| | X ₂ | 13137,70 | 5439,04 | 2,41 | <0,0342 | 1166,50 | 25109,00 |
| | X ₃ | -14722,80 | 5439,04 | -2,70 | <0,0204 | -26694,00 | -2751,60 |
| | R ² ajustado | 0,651 | | | | | |
| | <i>Plack-of-fit</i> | 0,852 | | | | | |

Nota – Coef.: coeficiente; X₁: Concentração de folha (16, 32 e 48 g/L); X₂: Temperatura de infusão (30, 50 e 70 °C); X₃: Concentração de solvente (etanol) (50, 70 e 90%); AG: ácido gálico; CAT: catequina; TE: equivalentes de Trolox.

Para os compostos fenólicos, flavonoides e antioxidante ABTS, os coeficientes de regressão linear foram correlacionados positivamente com a variável temperatura (X_2), indicando que o maior fator ($70\text{ }^\circ\text{C}$) poderá resultar em melhores rendimentos. O parâmetro de temperatura considerado mais eficiente, segundo a superfície de reposta, corrobora com os resultados observados nos extratos das folhas de capuchinha. As amostras extraídas em temperaturas mais elevadas, e com menor Concentração de folha demonstraram bioatividade mais elevada. O que está intimamente associado à maior solubilização dos compostos presentes na matriz vegetal.

Já em relação ao parâmetro concentração de solvente (X_3), observa-se que os coeficientes de regressão quadrático e linear apresentaram interação negativa para flavonoides e ABTS, respectivamente. Essas interações sugerem que, o processo de extração pode ser mais eficiente com o uso de etanol na menor concentração testada (50%). Conforme discutido, esse cenário está relacionado ao tipo de composto presente na matriz vegetal estudada, bem como à polaridade dos mesmos. Além disso, a associação de etanol com temperaturas mais elevadas pode otimizar o desempenho do processo.

Assim, objetivando a maior extração de compostos fenólicos, flavonoides e atividade ABTS das folhas de capuchinha, os experimentos foram reproduzidos nas condições ótimas preditas e seus valores, bem como os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 22. Considerando que os valores experimentais estão contidos em um intervalo de 95% de confiança, os modelos podem ser considerados válidos para fins preditivos.

Tabela 22 – Valores preditos e experimentais das variáveis obtidas no ponto ótimo de extração das folhas de capuchinha *Tropaeolum majus*.

| Variável resposta | Valores | | | EXP. |
|-------------------------------|----------|-------------------|-------------------|----------|
| | Predito | -95% de confiança | +95% de confiança | |
| Fenóis Totais (mg AG/L) | 54492,5 | 34533,6 | 74451,5 | 37709,4 |
| Flavonoides Totais (mg CAT/L) | 18446,7 | 14822,7 | 22070,8 | 18322,3 |
| ABTS ($\mu\text{mol TE/L}$) | 161569,4 | 100874,3 | 222264,6 | 160290,1 |

Nota – EXP: experimental; AG: ácido gálico; CAT: catequina; TE: equivalentes de Trolox.

4.4 CONCLUSÃO

O processo otimizado para a extração de compostos bioativos das folhas de *T. majus* determinou a proporção ideal de folhas, temperatura de infusão e concentração de solvente para obter o máximo rendimento. O extrato resultante dessas condições apresentou elevada concentração de compostos bioativos e atividade antioxidante. Assim, pesquisas mais aprofundadas são recomendadas para explorar as possíveis aplicações do extrato em produtos alimentícios, fármacos e cosméticos, visando aproveitar os potenciais benefícios dos compostos presentes na matriz vegetal.

CONCLUSÃO

A otimização das condições de fermentação de kombucha com chá preto viabilizou a identificação dos parâmetros mais assertivos, para a produção de bebidas com maior concentração de compostos bioativos e potencial antioxidante. Por meio dos parâmetros determinados foi possível estabelecer um protocolo de fermentação pautado na concentração de chá, teor de sacarose e temperatura de fermentação. Essas condições poderão ser aplicadas em outros contextos, nos quais a finalidade seja a produção de kombuchas com substrato de fermentação tradicional à base de chá preto.

A adição dos extratos florais como substrato alternativo na fermentação de kombuchas, enfatizou o potencial das flores comestíveis para maximizar as propriedades bioativas e funcionais da bebida. O extrato de *Handroanthus albus* favoreceu a síntese de ácido glucurônico nas kombuchas, enquanto os pigmentos antocianicos de *Tropaeolum majus* proporcionaram aumento da atividade antioxidante da bebida. A extração otimizada das folhas de *T. majus* comprovou a robustez de compostos e a aptidão desses tecidos para aplicação em produtos alimentícios.

Portanto, até o presente, esta pesquisa evidenciou que as flores comestíveis contêm atributos que potencializam as características da kombucha fermentada com chá preto. Dessa forma, esses achados poderão ensejar novas investigações focadas no aperfeiçoamento do perfil nutricional, funcional e sensorial de kombuchas adicionadas de *H. albus* e *T. majus*.

REFERÊNCIAS

AEKUNOWO, A. K.; ASHAFI, A. O. T.; OKOH, O.; ASEKUN, O. T.; FAMILIONI, O. B. Polyphenolic constituents, antioxidant and hypoglycaemic potential of leaf extracts of *Acalypha godseffiana* from Eastern Nigeria: In vitro study. **Journal of Medicinal Plants for Economic Development**, Durbanville, v. 31, n. 1, p. 1–9, 2019.

AFSHARMANESH, M.; SADAGHI, B. Effects of dietary alternatives (probiotic, green tea powder, and kombucha tea) as antimicrobial growth promoters on growth, ileal nutrient digestibility, blood parameters, and immune response of broiler chickens. **Comparative Clinical Pathology**, Germany, v. 23, n. 3, p. 717-724, 2014.

AHMADI, R.; EBRAHIMZADEH, M. A. Resveratrol – a comprehensive review of recent advances in anticancer drug design and development. **European Journal of Medicinal Chemistry**, France, v. 200, n. 112356, p. 1-91, 2020.

AKINMOLADUN, A. C.; FALAIYE, O. E.; OJO, O. B.; ADEOTI, A.; AMOO, Z. A.; OLALEYE, M. T. Effect of extraction technique, solvent polarity, and plant matrix on the antioxidant properties of *Chrysophyllum albidum* G. Don (African Star Apple). **Bulletin of the National Research Centre**, Berlin, v. 46, n. 40, p. 1-9, 2022.

ALBERTI, A.; ZIELINSKI, A. F.; ZARDO, D. M.; DEMIATE, I. M.; NOGUEIRA, A.; MAFRA, L. I. Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 149, p. 151–158, 2014.

ALOULO, A.; HAMDEN, K.; ELLOUMI, D.; ALI, M. B.; HARGAFI, K.; JAOUADI, B.; AYADI, F.; ELFEKI, A.; AMMAR, E. Hypoglycemic and antipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, England, v. 12, n. 63, p. 1-9, 2012.

ALVES-SANTOS, A. M.; SUGIZAKI, C. S. A.; LIMA, G. C.; NAVES, M. M. V. Prebiotic effect of dietary polyphenols: A systematic review. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 74, n. 104169, p. 1-12, 2020.

AMJADI, S.; ARMANPOUR, V.; GHORBANI, M.; TABIBIAZAR, M.; SOOFI, M.; ROUFEGARINEJAD, L. Determination of phenolic composition, antioxidant activity, and cytotoxicity characteristics of kombucha beverage containing *Echium amoenum*. **Journal of Food Measurement and Characterization**, New York, v. 17, n. 3, p. 3162–3172, 2023.

AYED, L.; ABID, S. B.; HAMDI, M. Development of a beverage from red grape juice fermented with the kombucha consortium. **Annals of Microbiology**, Italy, v. 67, p. 111–121, 2017.

BAHADORI, M. B.; ZENGİN, G.; DINPARAST, L.; ESKANDANI, M. The health benefits of three Hedgenettle herbal teas (*Stachys byzantina*, *Stachys inflata*, and *Stachys lavandulifolia*) - profiling phenolic and antioxidant activities. **European Journal of Integrative Medicine**, New York, v. 36, p. 101134, 2020.

BAI, Z.; MENG, J.; HUANG, X.; WU, G.; ZUO, S.; NIE, S. Comparative study on antidiabetic function of six legume crude polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 1, n. 154, p. 25–30, 2020.

- BAILOWITZ, Z.; GRAMS, R.; TEEPLE, D.; HEW-BUTLER, T. Exercise-associated hyponatremia in a lactating female. **Clinical Journal of Sport Medicine**, Philadelphia, v. 27, n. 4, p. e55e7, 2017.
- BARBOSA-FERREIRA, M.; DAGLI, M. L. Z.; MAIORKA, P. C.; GÓRNIK, S. L. Sub-acute intoxication by *Senna occidentalis* seeds in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Netherlands, v. 43, n. 4, p. 497–503, 2005.
- BARROS, R. G. C.; ANDRADE, J. K. S.; PEREIRA, U. C.; OLIVEIRA, C. S.; REZENDE, Y. R. R. S.; SILVA, T. O. M.; NOGUEIRA, J. P.; GUALBERTO, N. C. Phytochemicals screening, antioxidant capacity and chemometric characterization of four edible flowers from Brazil. **Food Research International**, Amsterdam, v. 130, n. 108899, p. 1-10, 2020.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. T. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 239, p. 70–76, 1996.
- BISHOP, P.; PITTS, E. R.; BUDNER, D.; THOMPSON-WITRICK, K. A. Chemical composition of kombucha. **Beverages**, Switzerland, v. 8, n. 3, p. 1–17, 2022.
- BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**, Philadelphia, v. 2, n. 4, p. 455–475, 1960.
- BRAND-WILLIAMS, W.; COUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, São Paulo, v. 28, p. 25–30, 1995.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução N° 17, de 30 de abril de 1999**. Diretrizes básicas para a avaliação de risco e segurança dos alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 30 abr. 1999.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução N° 716, de 1 julho de 2022**. Dispõe sobre os requisitos sanitários do café, cevada, chás, erva-mate, especiarias, temperos e molhos. Diário Oficial da União, Brasília, 1 jul. 2022a.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa N° 159, de 1° de julho de 2022**. Estabelece as listas das partes de espécies vegetais autorizadas para o preparo de chás e para o uso como especiarias. Diário Oficial da União, Brasília, 1 jul. 2022b.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa N° 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.
- BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. 2. ed. Paris: Lavoisier, 2008.
- CARDOSO, R. R.; NETO, R. O.; D’ALMEIDA, C. T. dos. S.; NASCIMENTO, T. P.; PRESSETE, C. G.; AZEVEDO, L.; MARTINO, H. S. D.; CAMERON, L. C.; FERREIRA, M. S. L.; BARROS, 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**, Amsterdam, v. 128, n. 108782, p. 1-10, 2020.
- CARLOTTO, J.; VEIGA, A. A.; SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R. Polysaccharide fractions from *Handroanthus heptaphyllus* and *Handroanthus albus* barks: Structural characterization

and cytotoxic activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 165, p. 849–856, 2020.

CARNEIRO, A. **Vegetação ruderal da Vila de Santo Amaro, município de General Câmara, RS, Brasil**: ruas, muros, terrenos baldios e passeios públicos. 1998. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

CARNEIRO, A. **Espécies ruderais com potencial alimentício em quatro municípios do Rio Grande do Sul**. 2004. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

ČESLOVÁ, L.; KLIKAROVÁ, J.; ŠALOMOUNOVÁ, T. The content and profile of biologically active compounds present in individual parts of nasturtium (*Tropaeolum majus* L.): comprehensive study. **European Food Research and Technology**, New York, v. 249, n. 2, p. 413–428, 2023.

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

CHANDRA, K. S.; DIMPLE, G.; GAUTAM, K. H.; HANDIQUE, A. K. Nutritive values of some non-conventional leafy vegetables and scarcity food plants of north east India. **African Journal of Food Science**, Nigeria, v. 10, n. 11, p. 340–343, 2016.

CHAUDHARY, N.; SABIKHI, L.; HUSSAIN, S. A.; KUMAR, S. A comparative study of the antioxidant and ACE inhibitory activities of selected herbal extracts. **Journal of Herbal Medicine**, Germany, v. 22, p. 100343, 2020.

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**, New Jersey, v. 98, p. 4331–4338, 2018.

CHEN, Y.; ZHANG, X.; GUO, Q.; LIU, L.; LI, C.; CAO, L.; QIN, Q.; ZHAO, M.; WANG, W. Effects of UV-B radiation on the content of bioactive components and the antioxidant activity of *Prunella vulgaris* L. Spica during development. **Molecules**, Switzerland, v. 23, n. 5, p. 1–11, 2018.

CHENSOM, S.; OKUMURA, H.; MISHIMA, T. Primary screening of antioxidant activity, total polyphenol content, carotenoid content, and nutritional composition of 13 edible flowers from Japan. **Preventive Nutrition and Food Science**, South Korea, v. 24, n. 2, p. 171–178, 2019.

CHOI, E. J.; KIM, H.; HONG, K. B.; SUH, H. J.; AHN, Y. Hangover-relieving effect of ginseng berry kombucha fermented by *Saccharomyces cerevisiae* and *Gluconobacter oxydans* in ethanol-treated cells and mice model. **Antioxidants**, Switzerland, v. 12, n. 3, p. 774, 2023.

COTON, M.; PAWTOWSKI, A.; TAMINIAU, B.; BURGAUD, G.; DENIEL, F. Unravelling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 1, n. 93, p. 1–41, 2017.

- DAMPC, A.; LUCZKIEWICZ, M. Labrador tea – the aromatic beverage and spice: A review of origin, processing and safety. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Hoboken, v. 95, n. 8, p. 1577–1583, 2015.
- DÍAZ-BETTANCOURT, M.; GHERMANDI, L.; LADIO, A.; LÓPEZ-MORENO, I.R. Weeds as a source for human consumption. A comparison between tropical and temperate Latin America. **Revista Biología Tropical**, Costa Rica, v. 47, n. 3, p. 329–338, 1999.
- DIPTI, P.; YOGESH, B.; KAIN, A. K.; PAULINE, T.; ANJU, B.; SAIRAM, M.; SINGH, B.; MONGIA, S. S.; KUMAR, G. I. D.; SELVAMURTHY, W. Lead induced oxidative stress: beneficial effects of Kombucha tea. **Biomedical and Environmental Sciences**, China, v. 16, n. 3, p. 276–282, 2003.
- DOUDI, M.; HOOSMANDI, Z.; SAEDI, S.; SETORKI, M. Effects of kombucha tea on side effects of high cholesterol diet in rabbits. **Pharmaceutical and Biomedical Research**, Iran, v. 6, n. 2, p. 123–132, 2020.
- DWIPUTRI, M. D.; FERONIASANTI, Y. M. L. Effect of fermentation to total titrable acids, flavonoid and antioxidant activity of butterfly pea kombucha. **Journal of Physics: Conference Series**, Philadelphia, v. 1241, p. 012014, 2019.
- EBERT, E. F.; SIVINSKI, E. A.; PELISSER, C.; ENDRES, C. M.; MATTIA, J. L. Capuchinha (*Tropaeolum majus*) compostos bioativos e sua funcionalidade no organismo. **Research, Society and Development**, Brasil, v. 10, n. 16, p. 1–10, 2021.
- ERHIRHIE, E. O.; ILODIGWE, E. E. Sub-chronic toxicity evaluation of *Dryopteris filix-mas* (L.) schott, leaf extract in albino rats. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Brazil, v. 55, p. 1–14, 2019.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Productos forestales no madereros: posibilidades futuras**. 97^o ed. Roma: Estudio FAO Montes, 1992.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Food and agriculture data**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 15 de setembro de 2020.
- FAOSTAT. **Food and agriculture data**. 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 15 de setembro de 2020.
- FERNANDES, L.; CASAL, S.; PEREIRA, J. A.; SARAIVA, J. A.; RAMALHOSA, E. Edible flowers: A review of the nutritional, antioxidant, antimicrobial properties and effects on human health. **Journal of Food Composition and Analysis**, California, v. 60, p. 38–50, 2017.
- FERNANDES, A. W. C.; SANTOS, V. L. A.; ARAÚJO, C. R. M.; OLIVEIRA, H. P.; COSTA, M. M. Anti-biofilm effect of β -lapachone and lapachol oxime against isolates of *Staphylococcus aureus*. **Current Microbiology**, New York, v. 77, p. 204–209, 2020.
- FERNANDES, Â.; BANCESSI, A.; PINELA, J.; DIAS, M. I.; LIBERAL, Â.; CALHELHA, R. C.; CIRIC, A.; SOKOVIC, M.; CATARINO, L.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARROS, L. Nutritional and phytochemical profiles and biological activities of *Moringa oleifera* Lam. edible parts from Guinea-Bissau (West Africa). **Food Chemistry**, Oxford, v. 341, n. 128229, 2021.

- FERREIRA, D. M.; CARLOTTO, J.; DALLAZEN, J. L.; LUZ, B. B.; SOUZA, L. M.; WERNER, M. F. P.; CIRPRIANI, T. R. A polysaccharide fraction from *Handroanthus albus* (yellow ipê) leaves with antinociceptive and anti-inflammatory activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 159, p. 1004–1012, 2020.
- FU, N.; WU, J.; LV, L. V.; HE, J.; JIANG, S. Anti-foot-and-mouth disease virus effects of Chinese herbal kombucha in vivo. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brazil, v. 46, n. 4, p. 1245-1255, 2015.
- GAMBOA-GÓMEZ, C. I.; GONZÁLEZ-LAREDO, R.; GALLEGOS-INFANTE, J. A.; PÉREZ, M. D. M. L.; MORENO-JIMÉNEZ, M. R.; FLORES-RUEDA, A. G.; ROCHA-GUZMÁN, N. E. Antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of *Eucalyptus camaldulensis* and *Litsea glaucescens* infusions fermented with kombucha consortium. **Food Technology and Biotechnology**, Croatia, v. 54, n. 3, p. 1–22, 2016.
- GAMBOA-GÓMEZ, C. I.; SIMENTAL-MENDÍA, L. E.; GONZÁLEZ-LAREDO, R. F.; ALCANTAR-OROZCO, E. J.; MONSERRAT-JUAREZ, V. H.; RAMÍREZ-ESPAÑA, J. C.; GALLEGOS-INFANTE, J. A.; MORENO-JIMÉNEZ, M. R.; ROCHA-GUZMÁN, N. E. In vitro and in vivo assessment of anti-hyperglycemic and antioxidant effects of Oak leaves (*Quercus convallata* and *Quercus arizonica*) infusions and fermented beverages. **Food Research International**, Amsterdam, v. 102, p. 690–699, 2017.
- GARZÓN, G. A.; MANNS, D. C.; RIEDL, K.; SCHWARTZ, S. J.; PADILLA-ZAKOUR, O. Identification of phenolic compounds in petals of nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*) by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry and determination of oxygen radical absorbance capacity (ORAC). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 63, n. 6, p. 1803–1811, 2015.
- GARZÓN-CASTAÑO, S. C.; LOPERA-CASTRILLÓN, I. A.; JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, F. J.; SILLER-LÓPEZ, F.; VELOZA, L. A.; SEPÚLVEDA-ARIAS, J. C. Nrf2-mediated antioxidant activity of the inner bark extracts obtained from *Tabebuia rosea* (Bertol) DC and *Tabebuia chrysantha* (JACQ) G. Nicholson. **F1000 Research**, United Kingdom, v. 7, p. 1937, 2018.
- GIL-RAMÍREZ, A.; MORALES, D.; SOLER-RIVAS, C. Molecular actions of hypocholesterolaemic compounds from edible mushrooms. **Food & Function**, Cambridge, v. 24, n. 9, p. 53–69, 2018.
- GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins: characterization and measurement with uv-visible spectroscopy. In: WROLSTAD, R. E. **Current protocols in food analytical chemistry**. New York: John Wiley and Sons, 2001.
- GONZÁLEZ-BARRIO, R.; PERIAGO, M. J.; LUNA-RECIO, C.; GARCIA-ALONSO, F. J.; NAVARRO-GONZÁLEZ, I. Chemical composition of the edible flowers, pansy (*Viola wittrockiana*) and snapdragon (*Antirrhinum majus*) as new sources of bioactive compounds. **Food Chemistry**, Oxford, v. 252, p. 373–380, 2018.
- GREENWALT, C. K.; STEINKRAUS, K. H.; LEDFORD, R. A. Kombucha, the fermented tea: Microbiology, composition, and claimed health effects. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 63, n. 7, p. 976–981, 2000.
- GROSE, S. O.; OLMSTEAD, R. G. Taxonomic revisions in the polyphyletic genus *Tabebuia* s.l. (Bignoniaceae). **Systematic Botany**, Laramie, v. 32, n. 3, p. 660–670, 2007.

- GOOGLE TRENDS. **Kombucha 2023**. Disponível em: <<https://trends.google.com.br/trends/explore?date=all&q=kombucha&hl=pt-BR>>. Acesso em: 5 de março de 2023.
- HAMED, A. N. E.; MAHMOUD, B. K.; SAMY, M. N.; KAMEL, M. S. An extensive review on genus “*Tabebuia*”, family bignoniaceae: Phytochemistry and biological activities (1967 to 2018). **Journal of Herbal Medicine**, Munich, v. 24, p. 100410, 2020.
- HAN, A. R.; NAM, B.; KIM, B. R.; LEE, K. C.; SONG, B. S.; KIM, S. H.; KIM, J. B.; JIN, C. H. Phytochemical composition and antioxidant activities of two different color *Chrysanthemum* flower teas. **Molecules**, Switzerland, v. 24, n. 2, p. 1–14, 2019.
- HARDOKO, H.; HARISMAN, E. K.; PUSPITASARI, Y. E. The kombucha from *Rhizophora mucronata* Lam. herbal tea: Characteristics and the potential as an antidiabetic beverage. **Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research**, Chile, v. 8, n. 5, p. 410–421, 2020.
- HERNANDES, P. T.; OLIVEIRA, M. L. S.; GEORGIN, J.; FRANCO, D. S. P.; ALLASIA, D.; DOTTO, G. L. Adsorptive decontamination of wastewater containing methylene blue dye using golden trumpet tree bark (*Handroanthus albus*). **Environmental Science and Pollution Research**, Germany, v. 26, p. 31924–31933, 2019.
- HOLBOURN, A.; HURDMAN, J. Kombucha: is a cup of tea good for you? **BMJ Case Reports**, London, v. 2017, p. 1–2, 2017.
- HUNTER, D.; BORELLI, T.; BELTRAME, D. M. O.; OLIVEIRA, C. N. S.; CORADIN, L.; WASIKE, V. W.; WASILWA, L.; MWAI, J.; MANJELLA, A.; SAMARASINGHE, G. W. L.; MADHUJITH, T.; NADEESHANI, H. V. H.; TAN, A.; AY, S. T.; GUZELSOY, N.; LAURIDSEN, N.; GEE, E.; TARTANAC, F. The potential of neglected and underutilized species for improving diets and nutrition. **Planta**, New York, v. 250, n. 3, p. 709–729, 2019.
- ITO, V. C.; DEMIANTE, I. M.; 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**, Brasil, v.62, 2019.
- IWAMOTO, K.; FUKUDA, Y.; TOKIKURA, C.; NODA, M.; YAMAMOTO, A.; YAMAMOTO, M.; YAMASHITA, M.; ZAIMA, N.; LIDA, A.; MORIYAMA, T. The anti-obesity effect of Taheebo (*Tabebuia avellanadae* Lorentz ex Griseb) extract in ovariectomized mice and the identification of a potential anti-obesity compound. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, California, v. 478, n. 3, p. 1136–1140, 2016.
- 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**, Amsterdam, v. 29, p. 101789, 2020.
- JAKUBCZYK, K.; KAŁDUŃSKA, J.; KOCHMAN, J.; JANDA, K. Chemical profile and antioxidant activity of the kombucha beverage derived from white, green, black and red tea. **Antioxidants**, Switzerland, v. 9, n. 5, p. 1-15, 2020.
- JARRELL, J.; CAL, T.; BENNETT, J. The Kombucha consortia of yeasts and bacteria. **Mycologist**, United Kingdom, v. 14, n. 1, p. 166–170, 2000.

JAYABALAN, R.; SUBATHRADEVI, P.; MARIMUTHU, S.; SATHISHKUMAR, M.; SWAMINATHAN, K. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. **Food Chemistry**, England, v. 109, n. 1, p. 227–234, 2008.

JAYABALAN, R.; MALBASA, R. V.; LONCAR, 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**, Hoboken, v. 13, n. 4, p. 538–550, 2014.

KALLEL, L.; DESSEAUX, V.; HAMDY, M.; STOCKER, P.; AJANDOUZ, E. H. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. **Food Research International**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 226–232, 2012.

KAPP, J. M.; SUMMER, W. Kombucha: A systematic review of the empirical evidence of human health benefit. **Annals of Epidemiology**, New York, v. 30, p. 66–70, 2019.

KATARZYNA, J.; KAROLINA, J.; PATRYCJA, K.; MATEUSZ, B.; IZABELA, G. Mineral composition and antioxidant potential in the common poppy (*Papaver rhoeas* L.) petal infusions. **Biological Trace Element Research**, England, v. 199, n. 1, p. 371–381, 2021.

KATO-NOGUCHI, H.; KURNIADIE, D. Allelopathy and allelopathic substances of mango (*Mangifera indica* L.). **Weed Biology and Management**, Hoboken, v. 20, p. 131–138, 2020.

KEENAN, D. F.; BRUNTON, N. P.; GORMLEY, T. R.; BUTLER, F.; TIWARI, B. K.; PATRAS, A. Effect of thermal and high hydrostatic pressure processing on antioxidant activity and colour of fruit smoothies. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, England, v. 11, n. 4, p. 551–556, 2010.

KIM, K. H.; PARK, S. H.; ADHIKARY, P.; CHO, J. H.; KANG, N. G.; JEONG, S. H. Stability of β -lapachone upon exposure to various stress conditions: Resultant efficacy and cytotoxicity. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 64, n. 5, p. 381–389, 2016.

KINUPP, V. **Plantas Alimentícias Não-Convencionais da região metropolitana de Porto Alegre, RS**, 2007. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.

KINUPP, V.F, LORENZI, H. **Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**. 1. ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2014.

KRISTANC, L.; KREFT, S. European medicinal and edible plants associated with subacute and chronic toxicity part I: Plants with carcinogenic, teratogenic and endocrine-disrupting effects. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 92, p. 150–164, 2016.

KULKARNI, Y.; VEERANJANEYULU, A. Toxicological studies on aqueous extract of *Gmelina arborea* in rodents. **Pharmaceutical Biology**, Oxon, v. 48, n. 12, p. 1413–1420, 2010.

LATHA, L. Y.; DARAH, I.; JAIN, K.; SASIDHARAN, S. Toxicity study of *Vernonia cinerea*. **Pharmaceutical Biology**, Oxon, v. 48, n. 1, p. 101–104, 2010.

- LEAL, J. M.; SUÁREZ, L. V.; JAYABALAN, R.; OROS, J. H.; ESCALANTE-ABURTO, A. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **CYTA - Journal of Food**, Greece, v. 16, n. 1, p. 390–399, 2018.
- LEMOS, O. A.; SANCHES, J. C. M.; SILVA, I. E. F.; SILVA, M. L. A.; VINHÓLIS, A. H. C.; FELIZ, M. A. P.; SANTOS, R. A.; CECCHI, A. O. Genotoxic effects of *Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex DC.) Standl. (Lamiales, Bignoniaceae) extract in Wistar rats. **Genetics and Molecular Biology**, Brazil, v. 35, n. 2, p. 498–502, 2012.
- LI, L.; GU, L.; CHEN, Z.; CHEN, Z.; WANG, R.; YE, J.; JIANG, H. Toxicity study of ethanolic extract of *Chrysanthemum morifolium* in rats. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 75, n. 6, p. 3–7, 2010.
- LIMA, R. B. de.; FERREIRA, R. L. C.; SILVA, J. A. A. da.; GUEDES, M. C.; SILVA, D. A. S.da.; OLIVEIRA, C. P. de.; RABELO, F. G.; SILVA, L. F. da. C. Effect of species and log diameter on the volumetric yield of lumber in northern Brazilian Amazonia: preliminary results. **Journal of sustainable forestry**, Philadelphia, v. 39, n. 3, p. 283–299, 2020.
- LIMA, J. F.; DIAS, M. I.; PEREIRA, C.; IVANOV, M.; SOKOVIC, M.; STEINMACHER, N. C.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARROS, L. Characterization of nonconventional food plants seeds *Guizotia abyssinica* (L.f.) cass., *Panicum miliaceum* L., and *Phalaris canariensis* L. for application in the bakery industry. **Agronomy**, Switzerland, v. 11, n. 9, p. 1–21, 2021.
- LÖCKEN, H.; CLAMOR, C.; MÜLLER, K. Napabucasin and related heterocycle-fused naphthoquinones as STAT3 inhibitors with antiproliferative activity against cancer cells. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 81, n. 7, p. 1636–1644, 2018.
- LOHMANN, L. G. **Handroanthus in Flora do Brasil**. 2020. Disponível em: <<https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/FB114069>>. Acesso em: 15 de junho de 2023.
- LOPES, L. da. C.; ALBANO, F.; LARANJA, G. A. T.; ALVES, L. M.; SILVA L. F. M.; SOUZA, G. P. de.; ARAUJO, I. de. M.; NOGUEIRA-NETO, J. F.; FELZENSZWALB, I.; KOVARY, K. Toxicological evaluation by *in vitro* and *in vivo* assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. **Toxicology Letters**, Ireland, v. 116, n. 3, p. 189–198, 2000.
- MATTOS, J. R. **Estudo pomológico dos frutos indígenas do Rio Grande do Sul**. 1^o ed. Porto Alegre: Imprensa Oficial, 1954.
- MATTOS, J. R. **Frutos indígenas comestíveis do Rio Grande do Sul**. 2^o ed. Porto Alegre: Publicação IPRNR, 1978.
- MATTOS, J. R. **LOEFGRENIA**: comunicações avulsas de botânica. 2^o ed. São Paulo, 1970.
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Hortaliças Não-Convencionais (Tradicionalis)**. 1^o ed. Brasília: Mapa/ACS, 2010.
- MELDRUM, G.; PADULOSI, S.; LOCHETTI, G.; ROBITAILLE, R.; DIULGHEROF, S. Issues and prospects for the sustainable use and conservation of cultivated vegetable diversity for more nutrition-sensitive agriculture. **Agriculture**, Switzerland, v. 8, n. 7, p. 112, 2018.
- MIRANDA, J. F. de.; 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**, Hoboken, v. 87, n. 2, p. 503–527, 2022.

MLCEK, J.; PLASKOVA, A.; JURIKOVA, T.; SOCHOR, J.; BARON, M.; ERCISLI, S. Chemical, nutritional and sensory characteristics of six ornamental edible flowers species. **Foods**, Switzerland, v. 10, n. 9, p. 1–19, 2021.

MOKARIZADEH, N.; KARIMI, P.; KAZEMZADEH, H.; MAROUFI, N. F.; SADIGH-ETEGHAD, S.; NIKANFAR, S.; RASHTCHIZADEH, N. An evaluation on potential anti-inflammatory effects of β -lapachone. **International Immunopharmacology**, v. 87, n. 106810, 2020.

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**, New York, v. 20, p. 1–6, 2012.

MORALES, D. Biological activities of kombucha beverages: The need of clinical evidence. **Trends in Food Science and Technology**, London, v. 105, p. 323–333, 2020.

MUCHE, B. M.; SPEERS, R. A.; RUPASINGHE, H. P. V. Storage temperature impacts on anthocyanins degradation, color changes and haze development in juice of “Merlot” and “Ruby” grapes (*Vitis vinifera*). **Frontiers in Nutrition**, Lausanne, v. 5, n. 100, p. 1–9, 2018.

MUHALDIN, B. J.; OSMAN, F. A.; MUHAMAD, R.; CHE WAN SAPAWI, C. W. N. S.; ANZIAN, A.; VOON, W. W. Y.; MEOR HUSSIN, A. S. Effects of sugar sources and fermentation time on the properties of tea fungus (kombucha) beverage. **International Food Research Journal**, Selangor, v. 26, n. 2, p. 481–487, 2019.

NEFFE-SKOCIŃSKA, K.; SIONEK, B.; ŚCIBISZ, I.; KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, D. Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. **CyTA - Journal of Food**, Oxon, v. 15, n. 4, p. 601–607, 2017.

NGUYEN, N. K.; DONG, N. T. N.; LE, P. H.; NGUYEN, H. T. Evaluation of the glucuronic acid production and other biological activities of fermented sweeten-black tea by kombucha layer and the co-culture with different *Lactobacillus* sp. strains. **International Journal of Modern Engineering Research**, Georgetown, v. 4, n. 5, p. 12–17, 2014.

NIELSEN. **No signs of fizzing out**: america’s love of sparkling water remains strong through August. 2018. Disponível em: <<https://www.nielsen.com/us/en/insights/article/2018/>>. Acesso em: 28 de fevereiro de 2021.

NIZIOŁ-ŁUKASZEWSKA, Z.; ZIEMLEWSKA, A.; BUJAK, T.; ZAGÓRSKA-DZIOK, M.; ZAREBSKA, M.; HORDYJEWICZ-BARAN, Z.; WASILEWSKI, T. Effect of fermentation time on antioxidant and anti-ageing properties of green coffee kombucha ferments. **Molecules**, Switzerland, v. 25, n. 22, p. 5394, 2020.

NOWICKA, P.; WOJDYŁO, A. Anti-hyperglycemic and anticholinergic effects of natural antioxidant contents in edible flowers. **Antioxidants**, Basel, v. 8, p. 308, 2019.

NUMMER, B. A. Special report: Kombucha brewing under the food and drug administration model food code: risk analysis and processing guidance. **Journal of Environmental Health**, Denver, v. 76, n. 4, p. 8–11, 2013.

- OGBONNAYA, E. A.; UADIA, P. O. Effect of sub acute exposure to *Telfairia occidentalis* root, pod and stem extracts on some liver and renal function parameters in rats. **British Journal of Pharmaceutical Research**, Nigeria, v. 11, n. 3, p. 1–8, 2016.
- OLIVEIRA, A. L. B.; NAVEGANTES-LIMA, K. C.; MONTEIRO, V. V. S.; QUADROS, L. B. G.; OLIVEIRA, J. P. de.; SANTOS, S. M. dos.; PONTES, A. C. A. de. A.; DORNELES, G. P.; ROMÃO, P. R. T.; JÚNIOR, L. C. R.; OLIVEIRA, A. B. de.; MONTEIRO, M. C. β -Lapachone increases survival of septic mice by regulating inflammatory and oxidative response. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, London, v. 2020, p.1-12, 2020.
- ORTIZ, A. I.; BENAYAS, J. M. R.; CAYUELA, L. Establishment and natural regeneration of native trees in agroforestry systems in the paraguayan atlantic forest. **Forests**, Switzerland, v. 13, n. 12, p. 2045, 2022.
- OTEGBAYO, B. O.; OGUNIYAN, D. J.; OLUNLADE, B. A.; ORONIRAN, O. O.; ATOBATELE, O. E. Characterizing genotypic variation in biochemical composition, anti-nutritional and mineral bioavailability of some Nigerian yam (*Dioscorea* spp.) land races. **Journal of Food Science and Technology**, India, v. 55, n. 1, p. 205–216, 2018.
- OTUNOLA, G. A.; AFOLAYAN, A. J. Assessment of oral safety profile of aqueous extract blend of three medicinal spices in wistar rats. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Nigeria, v. 16, n. 1, p. 91–99, 2017.
- OZTURK, B.; PARKINSON, C.; GONZALEZ-MIQUEL, M. Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents. **Separation and Purification Technology**, Amsterdam, v. 206, p.1-13, 2018.
- ÖZYURT, H. Changes in the content of total polyphenols and the antioxidant activity of different beverages obtained by Kombucha ‘tea fungus’. **International Journal of Agriculture, Environment and Food Sciences**, Turkey, v. 3, p. 255–261, 2020.
- PARK, J. S.; LEEM, Y. H.; PARK, J. E.; KIM, D. Y.; KIM, H. S. Neuroprotective effect of β -lapachone in MPTP-induced parkinson’s disease mouse model: Involvement of astroglial p-AMPK/Nrf2/HO-1 signaling pathways. **Biomolecules and Therapeutics**, South Korea, v. 27, n. 2, p. 178–184, 2019.
- PEREIRA, I. T.; BURCI, L. M.; SILVA, L. M.; BAGGIO, C. H.; HELLER, M.; MICKE, G. A.; PIZZOLATTI, M. G.; MARQUES, M. C. A.; WERNER, M. F. P. Antiulcer effect of bark extract of *Tabebuia avellanedae*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. **Phytotherapy Research**, Hoboken, v. 27, n. 7, p. 1067–1073, 2013.
- PERMATASARI, H. K.; NURKOLIS, F.; GUNAWAN, W. B.; YUSUF, V. M.; YSUF, M.; KUSUMA, R. J.; SABRINA, N.; MUHARRAM, F. R.; TASLIM, N. A.; MAYULU, N.; BATUBARA, S. C.; SAMTIYA, M.; HARDINSYAH, H.; TSOPMO, A. Modulation of gut microbiota and markers of metabolic syndrome in mice on cholesterol and fat enriched diet by butterfly pea flower kombucha. **Current Research in Food Science**, Amsterdam, v. 5, p. 1251–1265, 2022.
- PRABAWATI, N. B.; OKTAVIRINA, V.; PALMA, M.; SETYANINGSIH, W. Edible flowers: Antioxidant compounds and their functional properties. **Horticulturae**, Basel, v. 7, n. 4, p. 1–22, 2021.

PRIMIANI, C. N.; PUJIATI.; MUMTAHANAH, M.; ARDHI, W. Kombucha fermentation test used for various types of herbal teas. **Journal of Physics: Conference Series**, United Kingdom, v. 1025, n. 1, p. 1-10, 2018.

QI-ZHUANG, L. V.; JIN-TAO, L.; ZI-FENG, G.; KE-UI, N.; XIAO-MEI, L.; TING, Q.; WEI, H.; LEI, Y. Current state of knowledge on the antioxidant effects and mechanisms of action of polyphenolic compounds. **Natural Product Communications**, California, v. 16, n. 7, p. 1–13, 2021.

QUEIROZ, M. L. S.; VALADARES, M. C.; TORELLO, C. O.; RAMOS, A. L.; OLIVEIRA, A. B.; ROCHA, F. D.; ARRUDA, V. A.; ACCORCI, W. R. Comparative studies of the effects of *Tabebuia avellanedae* bark extract and β -lapachone on the hematopoietic response of tumour-bearing mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 117, n. 2, p. 228–235, 2008.

RAHMANI, R.; BEAUFORT, S.; VILLARREAL-SOTO, S. A.; TAILLANDIER, P.; BOUAJILA, J.; DEBOUBA, M. Kombucha fermentation of African mustard (*Brassica tournefortii*) leaves: Chemical composition and bioactivity. **Food Bioscience**, Amsterdam, v. 30, p. 100414, 2019.

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

REIS, F. C. **Componentes de produção de capuchinha (*Tropaeolum majus* L.), influenciados pela aplicação de nitrogênio e fósforo em um latossolo vermelho distrófico**. 2006. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal da Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, 2006.

REIS, F. P.; BONFA, I. M. S.; CAVALCANTE, R. B.; OKOBA, D.; VASCONCELOS, S. B. de. S.; CANDELORO, L.; FILIU, W. F. de. O.; MONREAL, A. C. D.; SILVA, V. J. da.; RITA, P. H. S.; CAROLLO, C. A.; TOFFOLI-KADRI, M. C. *Tabebuia aurea* decreases inflammatory, myotoxic and hemorrhagic activities induced by the venom of *Bothrops neuwiedi*. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 158, n. A, p. 352–357, 2014.

ROCHA-GUZMÁN, N. E.; GONZÁLEZ-LAREDO, R. F.; MORENO-JIMÉNEZ, M. R.; GALLEGOS-INFANTE, J. A.; MANCERA-RODRÍGUEZ, J.; ROSALES-VILLARREAL, M. C. Kombucha analogs from maqui juice: Consortium age and sugar concentration effects on anthocyanin stability and its relationship with antioxidant activity and digestive enzyme inhibition. **Food Chemistry**, England, v. 421, p. 136158, 2023.

RODRIGUES, L. G. G.; MAZZUTTI, S.; SIDDIQUE, I.; SILVA, M. da.; VITALI, L.; FERREIRA, S. R. S. Subcritical water extraction and microwave-assisted extraction applied for the recovery of bioactive components from Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* Mill.). **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 165, p. 104976, 2020.

ROY, J.; RHIM, W. Anthocyanin food colorant and its application in pH-responsive color change indicator films. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 3, p. 1–29, 2020.

RUMPF, J.; BURGER, R.; SCHULZE, M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and

Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 233, p. 123470, 2023.

SANTOS, J. S.; SANTOS, M. P.; AZEVEDO, A. S. Validação de um método para determinação simultânea de quatro ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência em polpas de frutas congeladas. **Química Nova**, São Paulo, v.37, n.3, p.540-544, 2014.

SANTOS, Ê. R. M.; OLIVEIRA, H. N. M.; OLIVEIRA, E. J.; AZEVEDO, S. H. G.; JESUS, A. A.; MEDEIROS, A. M.; DARIVA, C.; SOUSA, E. M. B. D. Supercritical fluid extraction of *Rumex Acetosa* L. roots: Yield, composition, kinetics, bioactive evaluation and comparison with conventional techniques. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 122, p. 1–9, 2017.

SARTORI, V. C.; THEODORO, H.; MINELO, L. V.; PANSERA, M. R.; BASSO, A.; SCUR, L. **Plantas Alimentícias Não Convencionais: Resgatando a soberania alimentar e nutricional**. 1. ed. Caixias do Sul, 2020.

SATO, R.; CILLI, L. P. L.; OLIVEIRA, B. E.; MACIEL, V. B. V.; VENTURINI, A. C.; YOSHIDAA, C. M. P. Nutritional improvement of pasta with *Pereskia aculeata* miller: A non-conventional edible vegetable. **Food Science and Technology**, Brazil, v. 39, n. 1. p. 28–34, 2019.

SENDRI, N.; SINGH, S.; SHARMA, B.; PUROHIT, R.; BHANDARI, P. Effect of co-pigments on anthocyanins of *Rhododendron arboreum* and insights into interaction mechanism. **Food Chemistry**, England, v. 426, p. 136571, 2023.

SCHLEMMER, U.; FROLICH, W.; PRIETO, R.M.; GRASES, F. Phytate in foods and significance for humans: food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. **Molecular Nutrition & Food Research**, Germany, v. 53, n. 2, p. 330–375, 2009.

SHAH, P. D.; GHAG, M.; DESHMUKH, P. B.; KULKARNI, Y. A.; JOSHI, S.; VYAS, B.; SHAH, D. Toxicity study of ethanolic extract of *Acorus calamus* rhizome. **International Journal of Green Pharmacy**, India, v. 6, n. 1, p. 29–35, 2012.

SHAHBAZI, H.; GAHRUIE, H. H.; GOLMAKANI, M. T.; ESKANDARI, M. H.; MOVAHEDI, M. Effect of medicinal plant type and concentration on physicochemical, antioxidant, antimicrobial, and sensorial properties of kombucha. **Food Science and Nutrition**, Hoboken, v. 6, n. 8, p. 2568–2577, 2018.

SHIBATA, M.; COELHO, C. M. M.; OLIVEIRA, L. M.; GUIDOLIN, A. F. Padronização metodológica para determinação de proteínas de reserva de sementes de *Handroanthus albus* (Chamiso). **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Brasil, v. 10, n. 2, p. 151–157, 2011.

SICHAEM, J.; KAENNAKAM, S.; SIRIPONG, P.; TIP-PYANG, S. Tabebuialdehydes A–C, cyclopentene dialdehyde derivatives from the roots of *Tabebuia rosea*. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 83, n. 8, p. 1456–1459, 2012.

SILVA, A. M.; SILVA, L. M. Influence of the capuchin hydroethanolic extract (*Tropaeolum majus* L.) on the stability of ketoconazole. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Brasil, v. 41, p. 1–10, 2020.

SILVA, K. A.; UEKANE, T. M.; MIRANDA, J. F.; RUIZ, L. F.; MOTTA, J. C. B. da.; SILVA, C. B.; PITANGUI, N. de. S.; GONZALEZ, A. G. M. Kombucha beverage from non-

conventional edible plant infusion and green tea: Characterization, toxicity, antioxidant activities and antimicrobial properties. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Amsterdam, v. 34, n. 102032, p. 1-9, 2021.

SINGLETON, V.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

SOUSA, D.; BASÍLIO, N.; OLIVEIRA, J.; FREITAS, V.DE.; PINA, F. A New insight into the degradation of anthocyanins: reversible versus the irreversible chemical processes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 2, p. 656–668, 2022.

SRIHARI, T.; KARTHIKESAN, K.; ASHOKKUMAR, N.; SATYANARAYANA, U. Antihyperglycaemic efficacy of kombucha in streptozotocin-induced rats. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 5, n. 4, p. 1794–1802, 2013.

SUO, M.; OHTA, T.; TAKANO, F.; JIN, S. Bioactive phenylpropanoid glycosides from *Tabebuia avellanedae*. **Molecules**, Switzerland, v. 18, n. 7, p. 7336–7345, 2013.

TAKAHASHI, J. A.; REZENDE, F. A. G. G.; MOURA, M. A. F.; DOMINGUETE, L. C. B.; SANDE, D. Edible flowers: Bioactive profile and its potential to be used in food development. **Food Research International**, Amsterdam, v. 129, p. 108868, 2020.

THONGAM, B.; KONSAM, S.; HANDIQUE, A. K. Assessment of wild leafy vegetables traditionally consumed by the ethnic communities of Manipur, northeast India. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, London, v. 12, n. 1, 2016.

TOLOUEI, S. E. L.; PALOZI, R. A. C.; TIRLONI, C. A. S.; MARQUES, A. A. M.; SCHAEDELES, M. I.; GUARNIER, L. P.; SILVA, A. O.; ALMEIDA, V. P. de.; BUDEL, J. M.; SOUZA, R. I. C.; SANTOS, A. C. dos.; SILVA, D. B.; LOURENÇO, E. L. B.; DALSENTER, P. R.; GASPAROTTO JUNIOR, A. Ethnopharmacological approaches to *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn. - Exploring cardiorenal effects from the Brazilian Cerrado. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 238, p. 111873, 2019.

TOMAZELI, E. C.; VALLADÃO, D. M. S.; ANDRIGHETTI, C. R.; MAGALHÃES, M.; BATTIROLA, L. D. B. Antimicrobial and antioxidant activity of the leaves and flowers of *Tabebuia aurea* and *Cordia glabrata*. **Scientific Electronic Archives**, Brazil, v. 13, n. 5, p. 59–68, 2020.

UTOIU, E.; MATEI, F.; TOMA, A. Bee collected pollen with enhanced health benefits, produced by fermentation with a kombucha consortium. **Nutrients**, Switzerland, v. 10, n. 10, p. 1365, 2018.

VALSALAM, S.; AGASTIAN, P.; ARASU, M. V.; AL-DHABI, N.; GHILAN, A. K. M.; KAVIYARASU, K.; RAVINDRAN, B.; CHANG, S. W.; AROKIYARAJ, S. Rapid biosynthesis and characterization of silver nanoparticles from the leaf extract of *Tropaeolum majus* L. and its enhanced in-vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and anticancer properties. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, Switzerland, v. 191, p. 65–74, 2019.

VARGAS, F. D.; JIMÉNEZ, A. R.; LÓPEZ, O. P. Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains – Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 3, p. 173–289, 2000.

VIANAL, L. M.; FREITAS, M. R.; RODRIGUES, S. V.; BAUMANN, W. Extraction of

lapachol from *Tabebuia avellanedae* wood with supercritical CO₂: an alternative to Soxhlet extraction? **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 20, n. 3, 2003.

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

VILLARREAL-SOTO, S. A.; BEAUFORT, S.; BOUAJILA, J.; SOUCHARD, J. P.; RENARD, T.; ROLLAN, S.; TAILLANDIER, P. Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. **Process Biochemistry**, Oxon, v. 83, p. 44–54, 2019.

VINA, I.; SEMJONOV, P.; LINDE, R.; DENIN, A. Current evidence on physiological activity and expected health effects of kombucha fermented beverage. **Journal of Medicinal Food**, New York, v. 17, n. 2, p. 179e88, 2014.

VITAS, J. S.; CVETANOVIĆ, A. D.; MAŠKOVIĆ, P. Z.; ŠVARC-GAJIĆ, J. V.; MALBAŠA, R. V. Chemical composition and biological activity of novel types of kombucha beverages with yarrow. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 44, p. 95–102, 2018.

VITAS, J.; VUKMANOVIĆ, S.; ČAKAREVIĆ, J.; POPOVIĆ, L.; MALBAŠA, R. Kombucha fermentation of six medicinal herbs: Chemical profile and biological activity. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, Serbia, v. 26, n. 2, p. 157–170, 2020.

WANG, Y.; KAN, Z.; THOMPSON, H. J.; LING, T.; HO, C. T.; LI, D.; WAN, X. Impact of six typical processing methods on the chemical composition of tea leaves using a single *Camellia sinensis* cultivar, Longjing 43. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 67, n. 19, p. 5423–5436, 2019.

WATAWANA, M. I.; JAYAWARDENA, N.; WAISUNDARA, V. Y. Value-added tea (*Camellia sinensis*) as a functional food using the kombucha 'tea fungus'. **Chiang Mai Journal of Science**, Thailand, v. 45, n. 1, p. 136–146, 2018.

WONGTHAI, N.; TANTICHARAKUNSIRI, W.; MANGMOOL, S.; OCHAIKUL, D. Characteristics and antioxidant activity of royal lotus pollen, butterfly pea flower, and oolong tea kombucha beverages. **Asia-Pacific Journal of Science and Technology**, Taiwan, v. 26, n. 4, p. 1–11, 2021.

YANG, Z. W.; JI, B.P.; ZHOU, F.; LI, B.; LUO, Y.; YANG, L.; LI, T. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of kombucha tea in high-cholesterol fed mice. **Journal of the science of food and agriculture**, Hoboken, v. 89, n. 1, p. 150–156, 2008.

YEN, G. C.; CHEN, H. Y.; PENG, H. H. Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 39, n. 11, p. 1045–1053, 2001.

YIKMIŞ, S.; TUĞGÜM, S. Evaluation of microbiological, physicochemical and sensorial properties of purple basil kombucha beverage. **Turkish Journal of Agriculture – Food Science and Technology**, Turkey, v. 7, n. 9, p. 1321, 2019.

YIN, Z.; ZHANG, W.; FENG, F.; ZHANG, Y.; KANG, W. α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. **Food Science and Human Wellness**, China, v. 3, n. 3–4, p. 136–174, 2014.

ZANNOU, O.; KELEBEK, H.; SELLI, S. Elucidation of key odorants in beninese roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) infusions prepared by hot and cold brewing. **Food Research International**, Amsterdam, v. 133, p. 109133, 2020.

ZHANG, L.; TATSUNO, T.; HASEGAWA, I.; TADANO, T.; OHTA, T. Furanonaphthoquinones from *Tabebuia avellanedae* induce cell cycle arrest and apoptosis in the human non-small cell lung cancer cell line A549. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v. 11, p. 9–17, 2015.

ZHENG, M.; XIA, Q.; LU, S. Study on drying methods and their influences on effective components of loquat flower tea. **LWT – Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 63, n. 1, p. 14–20, 2015.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG T. J. W. The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, Oxford, v. 64, p. 555–559, 1999.

ZHU, C.; LIU, F.; QIAN, W.; WANG, Y.; YOU, Q.; ZHANG, T.; LI, F. Esophageal replacement by hydroxylated bacterial cellulose patch in a rabbit model. **Turkish Journal of Medical Sciences**, Turkey, v. 45, n. 4, p. 762-770, 2015.

ZIEGLER, V.; UGALDE, M. L.; VEECK, I. A.; BARBOSA, F. F. Nutritional enrichment of beef burgers by adding components of non-conventional food plants. **Brazilian Journal of Food Technology**, Brazil, v. 23, p. 1–12, 2020.

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**, Amsterdam, v. 60, p. 246–254, 2014.

ZOU, C.; LI, R. Y.; CHEN, J. X.; WANG, F.; GAO, Y.; FU, Y. Q.; XU, Y. Q.; YIN, J. F. Zijuan tea- based kombucha: Physicochemical, sensorial, and antioxidant profile. **Food Chemistry**, England, v. 363, n. 130322, p. 3–10, 2021.

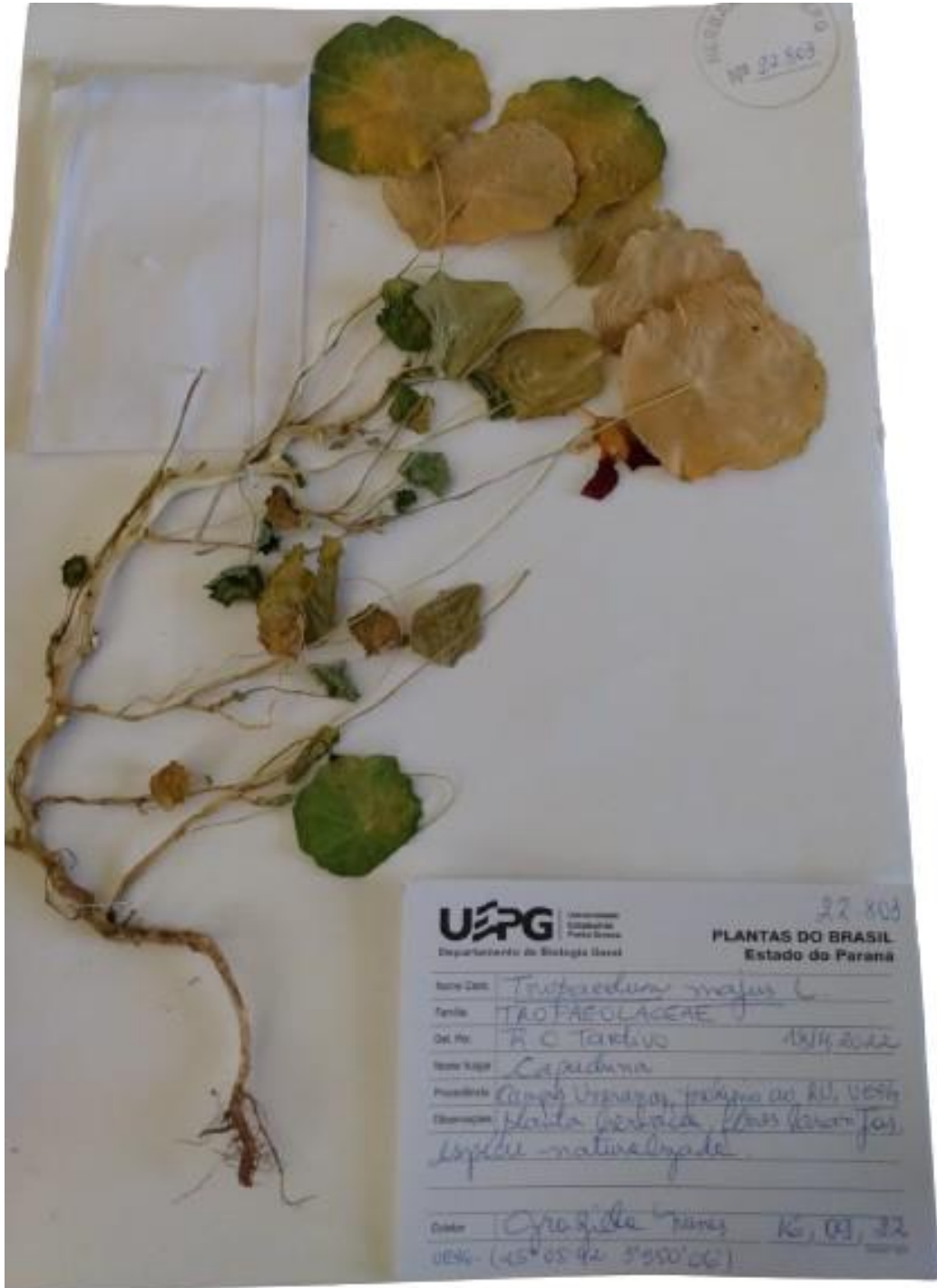
ZUBAIDAH, E.; IFADAH, R. A.; KALSUM, U.; LYRAWATI D.; PUTRI, W. D. R.; SRIANTA, I.; BLANC, P. J. Anti-diabetes activity of Kombucha prepared from different snake fruit cultivars. **Nutrition and Food Science**, England, v. 49, n. 2, p. 333–343, 2019.

ANEXOS

ANEXO A - EXSICATA DA ESPÉCIE *Handroanthus albus*



ANEXO B - EXSICATA DA ESPÉCIE *Tropaeolum majus*



ANEXO C - CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE RESUMO NA MODALIDADE TRABALHO COMPLETO

Verifique o código de autenticidade 1767762.8002697.028823.8.59559871189351877807 em <https://www.even3.com.br/documentos>

WENDEQ
III WEB ENCONTRO NACIONAL
DE ENGENHARIA QUÍMICA
EM TEMPOS DE CHATGPT: INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL E A ENGENHARIA QUÍMICA

CERTIFICADO
TRABALHO CIENTÍFICO

Certificamos que o trabalho intitulado OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DAS FOLHAS DE CAPUCHINHA (*Tropaeolum majus*), de autoria de Graziela Nunes, Isabela Maria Macedo Simon Sola, Thaís Estéfane Fischer, Elisandra Detoni, Alessandro Nogueira e ALINE ALBERTI, foi submetido no evento III Web Encontro Nacional de Engenharia Química, avaliado e aprovado por consultores *ad hoc*. O trabalho foi publicado nos Anais Online do III WENDEQ.

Online/Brasil, 21 de julho de 2023.


PROF. DR. POLIANA MENDES DE SOUZA
PRESIDENTE DO III WENDEQ


PROF. DR. CLÁUDIA CÂNDIDA SILVA
COORDENADORA DO COMITÊ CIENTÍFICO DO III WENDEQ

