



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE ERVA MATE (*Ilex paraguariensis*)
FERMENTADOS COM A CULTURA SIMBIÓTICA KOMBUCHA

DANIELLE RUBIM LOPES

Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández

ORIENTADOR

Prof^ª. Dr^ª. Lucielen Oliveira Dos Santos

COORIENTADORA

Rio Grande, RS

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE ERVA MATE (*Ilex paraguariensis*)
FERMENTADOS COM A CULTURA SIMBIÓTICA KOMBUCHA

DANIELLE RUBIM LOPES

Engenheira de Alimentos

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do título de mestre em
Engenharia e Ciência de
Alimentos.

Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández

ORIENTADOR

Prof^ª. Dr^ª. Lucielen Oliveira Dos Santos

COORIENTADORA

Rio Grande, RS

2019

Ficha catalográfica

L864o Lopes, Danielle Rubim.
Obtenção e avaliação de extratos de erva mate (*Ilex paraguariensis*) fermentados com a cultura simbiótica kombucha /
Danielle Rubim Lopes. – 2019.
94 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2019.

Orientador: Dr. Carlos Prentice-Hernández.

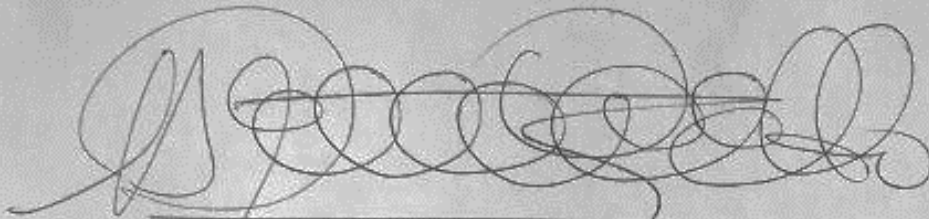
Coorientadora: Dra. Lucielen Oliveira dos Santos.

1. Bebida Funcional 2. Antibacteriano 3. Chá Fermentado
4. Bioatividade 5. Erva Mate 6. Estresse Oxidativo I. Prentice-Hernández, Carlos II. Santos, Lucielen Oliveira dos III. Título.

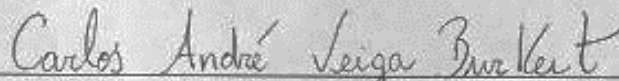
CDU 663:633.77

APROVAÇÃO

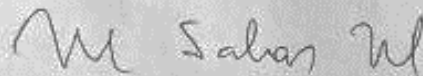
Dissertação defendida por Danielle Rubim Lopes e aprovada em 26 de março de 2019, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



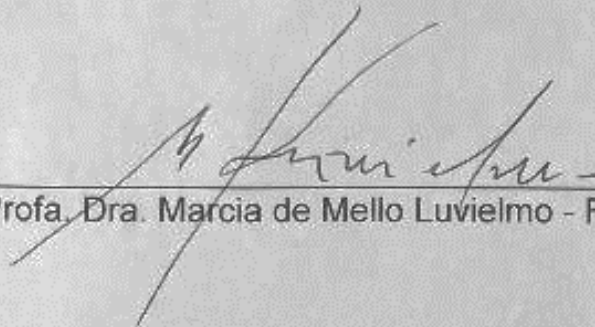
Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández - FURG



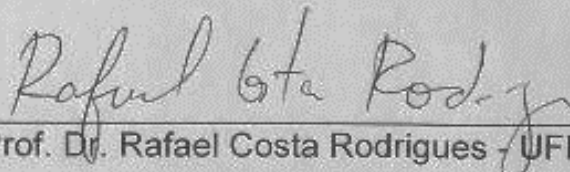
Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert - FURG



Profa. Dra. Myriam de las Mercedes Salas-Mellado - FURG



Profa. Dra. Marcia de Mello Luvielmo - FURG



Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues - UFRGS

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde, força e sabedoria para seguir em busca de meus objetivos.

Aos meus pais Denise e Joel, pelo amor, apoio, confiança, que mesmo longe, sempre se fizeram presente de diversas formas. São meus maiores exemplos de amor e determinação.

Ao César, pelo companheirismo e por me apoiar em todas as minhas decisões.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández, pela orientação, ensinamentos e por ter me fornecido a oportunidade de trabalhar com a kombucha.

À Prof^ª. Dr^ª. Lucielen Oliveira dos Santos, pela coorientação e pelas valiosas contribuições.

Aos Professores da banca Carlos André Burkert, Myriam Salas-Mellado e Rafael Costa Rodrigues pelas contribuições para o enriquecimento do trabalho.

À empresa Bá Kombucha, em especial ao Engenheiro Clayton Carvalho, pelo fornecimento da cultura utilizada para realização das fermentações.

Às amigas Evellin, Marcia, Meritaine e Silvia, que estiveram presentes nessa jornada, obrigada pelos conselhos e pela amizade.

Aos amigos e integrantes do LTA pela amizade, convivência e por me acolherem, em especial às amigas Débora e Helena, que sempre estiveram presentes, à técnica Aline Massia e a Camila Quadros por estarem sempre dispostas a auxiliar no que for preciso.

À CAPES pela concessão da bolsa de pós-graduação.

À FURG pelo ensino gratuito e de qualidade e a todos os funcionários pelos serviços prestados.

A todos, muito obrigada!

“Algo só é impossível até que alguém duvide e prove o contrário.”

Albert Einstein

RESUMO

A kombucha é uma bebida de sabor ácido e adocicado, obtida através da fermentação do chá preto ou verde adoçado. A fermentação é realizada por uma cultura simbiótica de bactérias do ácido acético e leveduras osmófilas, que utilizam a sacarose como fonte energética. Durante o processo fermentativo são formados compostos, tais como vitaminas hidrossolúveis, aminoácidos, ácidos orgânicos, álcool, entre outros, e há melhor biodisponibilidade dos compostos bioativos e minerais presentes no chá. O teor desses compostos depende das características do chá utilizado, temperatura e tempo de fermentação. A produção e comércio da kombucha têm aumentado nos últimos anos devido aos benefícios a saúde conferidos a seu consumo. No entanto, há necessidade de estudos para comprovar suas propriedades funcionais. Em face disso, os objetivos deste trabalho foram obter kombucha de erva mate (*Ilex paraguariensis*) utilizando a cultura simbiótica de bactérias e leveduras da kombucha como inóculo e avaliar suas características físico-químicas e biológicas. Foram utilizados extratos de erva mate na concentração de 0,5%, 0,75% e 1% e as temperaturas de fermentação de 20, 25 e 30 °C em um delineamento composto central com 3 repetições no ponto central após 12 dias de fermentação, tendo como resposta a concentração de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante. Para obtenção da bebida, o meio de cultivo foi preparado contendo infusão de erva-mate, sacarose e com adição de kombucha fermentada anteriormente. Durante a fermentação, foram retiradas amostras para medição de açúcares redutores totais, pH, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. Os açúcares foram quantificados pelo método de 3,5-dinitrossalicílico, os compostos fenólicos totais foram determinados por método de Folin-Ciocalteu, a atividade antioxidante foi determinada pelos métodos de capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e captura do radical 2,2-azinobus-3-3etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico (ABTS). Para a atividade antimicrobiana, foi medido o diâmetro do halo de inibição utilizando os micro-organismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e o estresse oxidativo *in vivo* foi analisado utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo. A kombucha de erva mate fermentada por 12 d, apresentou pH entre 1,8±0,1 e 2,3±0,1; acidez de 4,83±0,06 a 6,03±0,06 g/L de ácido acético; açúcares redutores totais entre 15,94±0,09 e 23,07±0,17 g/L; compostos fenólicos totais entre 444,23±3,50 e 844,78±1,13 mg/L equivalente ácido gálico. A atividade antioxidante calculada pelo método de DPPH foi menos eficaz, recebendo incremento na capacidade de eliminação de radicais inferiores a 5%. A atividade antioxidante da bebida foi determinada pelo método de ABTS, apresentou aumento entre 16,16 e 31,34%. Os ensaios que apresentaram maiores conteúdos de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foram utilizados na avaliação da atividade antibacteriana e do estresse oxidativo. Os resultados mostraram que a kombucha de erva mate apresentou atividade antibacteriana contra as cepas de *S. aureus* e *E. coli*. A kombucha de erva mate também foi efetiva na prevenção do dano oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio, sendo que a adição de kombucha resultou em uma taxa de sobrevivência da levedura *S. cerevisiae* de até 57,0%, sendo este valor superior ao encontrado na kombucha tradicional (chá verde), que foi 43,5%.

Palavras-chave: Bebida funcional. Antibacteriano. Chá fermentado. Bioatividade. Erva mate. Estresse oxidativo.

OBTAINING AND EVALUATING EXTRACTS OF MATE HERB (*Ilex paraguariensis*) FERMENTED WITH KOMBUCHA SYMBIOTIC CULTURE

ABSTRACT

Kombucha is an acid and sweet flavor drink, obtained through fermentation of sugared black or green tea. The fermentation process is undertaken by a symbiotic bacterial culture of acetic acid and osmophilic yeasts, which use sucrose as energetic source. During fermentative process, some compounds are formed, including hydrosoluble vitamins, amino acids, organic acids, alcohol, among others, improving the biodisponibility of bioactive compounds and minerals present in the tea. The content of these compounds depends on characteristics of the selected tea, temperature and time of fermentation. The production and commerce of kombucha have been increasing in the last years due the benefits to health attributed to its consumption, although more studies proving its functional properties are necessary. Therefore, the objectives of this work were to obtain the drink from mate herb (*Ilex paraguariensis*) fermented by symbiotic bacterial culture and yeasts of kombucha, and to evaluate its physical-chemical and biological characteristics. For this work, extracts of mate herb were used in the concentrations of 0.5%, 0.75% and 1% and the fermentation temperatures of 20, 25 and 30°C in an experimental delimitation with three repetitions at the central point after 12 days of fermentation, having as response the concentration of total phenolic compounds and the antioxidant activity. For obtainment of the drink, the culture medium was prepared containing mate herb infusion, sucrose and with addition of previously fermented kombucha. During the fermentation process, samples were isolated for measurement of total reducing sugars, pH, total phenolic compounds and antioxidant activity. The sugars were quantified by the 3,5-dinitrosalicylic method, the total phenolic compounds were determined by Folin-Ciocalteu method, the antioxidant activity was determined by methods of sequestration capacity of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and the capture of radical 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS). For antimicrobial activity, the inhibition zone was measured using the micro-organisms *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, and the oxidative stress *in vivo* was analyzed using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as model. The mate herb kombucha fermented for 12 days presented pH between 1.8 ± 0.1 and 2.3 ± 0.1 ; acidity of 4.83 ± 0.06 to 6.03 ± 0.06 g/L of acetic acid; total reducing sugars between 15.94 ± 0.09 and 23.07 ± 0.17 g/L; total phenolic compounds between 444.23 ± 3.50 and 844.78 ± 1.13 mg/L equivalent to gallic acid. The antioxidant activity calculated by DPPH method was less effective, receiving increase in elimination capacity of radicals less than 5%. The antioxidant activity of the drink was determined by ABTS method, and presented increase between 16.16 and 31.34%. The essays which presented higher contents of total phenolic compounds and antioxidant activity were used in the evaluation of antibacterial activity and oxidative stress. The results showed that mate herb kombucha presented antibacterial activity against strains of *S. aureus* and *E. coli*. Mate herb kombucha was also effective in the prevention of oxidative damage induced by hydrogen peroxide, since the addition of kombucha resulted in a surviving rate of the yeast *S. cerevisiae* of until 57%, being this value higher than that found in traditional kombucha (green tea), which was 43.5%.

Key words: Functional beverage. Antibacterial. Bioactivity. Fermented tea. Mate herb. Oxidative stress.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de uma porção média consumida de erva mate por pessoa (62,5 g).....	32
Tabela 2 - Matriz do delineamento experimental, com valores codificados e reais de estudo (concentração de erva mate e temperatura) na obtenção de kombucha de erva mate.....	46
Tabela 3 - Contagem de bactérias e leveduras para determinar a concentração microbiana no inóculo.....	53
Tabela 4 - Variação no pH e aumento na acidez (g/L) em kombucha de erva mate (ensaios 1 a 4) e no controle entre períodos da fermentação.....	55
Tabela 5 - Variação na concentração de açúcares redutores totais (ART) e açúcares redutores (AR) em kombucha de erva mate (ensaios 1 à 7) e no controle entre períodos da fermentação.....	58
Tabela 6 - Concentração de compostos fenólicos totais (mg/L de equivalente em ácido gálico) em kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e chá verde (controle) durante a fermentação.....	61
Tabela 7 - Análise de variância para concentração de compostos fenólicos totais em kombucha de erva mate após 12 dias de fermentação.....	61
Tabela 8 - Valores experimentais e valores estimados de compostos fenólicos totais (mg/L) em kombucha de erva mate após 12 dias de fermentação.....	62
Tabela 9 - Capacidade de sequestro de radicais livres (%) pelo método de DPPH em kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e chá verde (controle) durante a fermentação.....	64
Tabela 10 - Análise de variância para capacidade de sequestro do radical DPPH em kombucha de erva mate após 12 dias de fermentação.....	65
Tabela 11 - Valores experimentais e valores estimados de atividade antioxidante por DPPH (%) em kombucha de erva mate após 12 dias de fermentação.....	65
Tabela 12 - Capacidade de captura do radical livre ABTS+ (%) em kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e chá verde (controle) durante a fermentação.....	67
Tabela 13 - Análise de variância para atividade antioxidante pelo método de ABTS em kombucha de erva mate.....	68
Tabela 14 - Valores experimentais e valores estimados de atividade antioxidante por ABTS (%) em kombucha de erva mate.....	68
Tabela 15 - Atividade antibacteriana em kombucha de erva mate e de chá verde (controle).....	70
Tabela AP 1 - pH da kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e de chá verde (controle) durante o período de 12 dias de fermentação.....	90
Tabela AP 2 - Acidez em g/L da kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e de chá verde (controle) durante o período de 12 dias de fermentação.....	90
Tabela AP 3 - Açúcares redutores totais em g/L da kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e de chá verde (controle) durante o período de 12 dias de fermentação.....	91
Tabela AP 4 - Açúcares redutores em g/L da kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e de chá verde (controle) durante o período de 12 dias de fermentação.....	91
Tabela AP 5 - Variação na concentração de compostos fenólicos totais em kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e no controle entre períodos da fermentação.....	92
Tabela AP 6 - Coeficientes e limites de confiança para a concentração de compostos fenólicos totais nos diferentes ensaios de kombucha de erva mate.....	90

Tabela AP 7 – Coeficientes e limites de confiança para a atividade antioxidante (DPPH) nos diferentes ensaios de kombucha de erva mate.....	93
Tabela AP 8 – Coeficientes e limites de confiança para a atividade antioxidante (ABTS+) nos diferentes ensaios de kombucha de erva mate.....	93
Tabela AP 9 - Taxa de sobrevivência da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nos ensaios tratados com kombucha de erva mate e chá verde em presença e ausência de agente oxidante (H_2O_2) e no controle.....	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fermentação do meio composto por chá e sacarose para obtenção de kombucha.....	28
Figura 2 - Fluxograma da obtenção da kombucha de erva mate e avaliação da bioatividade.....	44
Figura 3 - pH da kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e de chá verde (controle) durante a fermentação.....	54
Figura 4 - Acidez (g/L de ácido acético) da kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e de chá verde durante a fermentação.....	56
Figura 5 - Teor de açúcares redutores totais (g/L) da kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e de chá verde (controle) durante a fermentação.....	57
Figura 6 - Teor de açúcares redutores (g/L) da kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e de chá verde (controle) durante a fermentação.....	59
Figura 7 - Curva de contorno para o conteúdo de compostos fenólicos totais em kombucha de erva mate.....	63
Figura 8 - Curva de contorno para capacidade de sequestro do radical livre DPPH em kombucha de erva mate.....	66
Figura 9 - Curva de contorno para o método de captura do radical ABTS ⁺ em kombucha de erva mate.....	69
Figura 10 - Taxa de sobrevivência da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nos ensaios tratados com kombucha de erva mate e chá verde em presença e ausência de agente oxidante (H ₂ O ₂) e no controle.....	72
Figura AP 1 - Curva padrão de glicose utilizada para determinação de açúcares redutores e açúcares redutores totais.....	89
Figura AP 2 - Curva padrão de ácido gálico utilizada para determinação de compostos fenólicos totais.....	89

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS – Radical 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico

ANOVA – Análise de variância

AR – Açúcar redutor

ART – Açúcar redutor total

BHI – Ágar *Brain Heart Infusion*

CFT – Compostos fenólicos totais

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DNS – 3,5-dinitrosalicílico

DPPH – Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EAG – Equivalente de ácido gálico

FDA – *Food and Drug Administration*

G⁺ – Gram positivas

G⁻ – Gram negativas

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

PCA – Ágar *plate count*

PDA – Ágar batata dextrose

pH – Potencial hidrogeniônico

TTB – *Alcohol and Tobacco Tax and Trade Bureau*

UFC – Unidades formadoras de colônias

YPD – Meio para crescimento de leveduras

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1 ALIMENTOS FERMENTADOS	27
3.2 KOMBUCHA.....	27
3.2.1 Definição	27
3.2.2 Biofilme	29
3.2.3 Composição microbiológica	29
3.2.4 Composição química	30
3.3 ERVA MATE.....	31
3.4 PROCESSO FERMENTATIVO DA KOMBUCHA.....	33
3.5 BIOATIVIDADE NA KOMBUCHA	35
3.6 LEGISLAÇÃO.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 MATERIAL	43
4.2 MÉTODOS	43
4.3 MANUTENÇÃO DA CULTURA ESTOQUE.....	43
4.4 PREPARO DO INÓCULO	43
4.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	45
4.6 PREPARO DO MEIO DE CULTIVO	45
4.7 FERMENTAÇÃO PARA O PREPARO DA KOMBUCHA	46
4.8 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	47
4.8.1 pH	47
4.8.2 Acidez	47
4.8.3 Açúcares redutores	47
4.8.4 Açúcares redutores totais	47
4.8.5 Compostos fenólicos totais	48
4.9 ANÁLISE DA BIOATIVIDADE <i>IN VITRO</i>	48
4.9.1 Atividade antioxidante	48
4.10 ANÁLISE DA BIOATIVIDADE <i>IN VIVO</i>	49
4.10.1 Atividade antibacteriana	49
4.10.2 Estresse oxidativo	49
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 CONTAGEM DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS NO INÓCULO.....	53
5.2 ACOMPANHAMENTO DO PROCESSO FERMENTATIVO.....	53
5.2.1 pH e acidez total	53
5.2.2 Teor de açúcares redutores e açúcares redutores totais	57
5.2.3 Compostos fenólicos totais (CFT)	60

5.3 BIOATIVIDADE <i>IN VITRO</i> EM KOMBUCHA.....	63
5.3.1 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> obtida pelo método de sequestro do radical livre DPPH.....	63
5.3.2 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> obtida pelo método de captura do radical 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazilina-6-ácido sulfônico (ABTS ⁺)	66
5.4 BIOATIVIDADE <i>IN VIVO</i> EM KOMBUCHA.....	69
5.4.1 Atividade antibacteriana	69
5.4.2 Atividade antioxidante <i>in vivo</i>	71
6 CONCLUSÕES	75
SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
APÊNDICES	87

1 INTRODUÇÃO

A fermentação é uma das formas mais antigas de processamento e preservação dos alimentos, é um processo eficiente, de baixo custo e tem uma diversidade de aplicações alimentícias (ADEWUMI, 2018). Além do aumento de vida útil, em especial dos alimentos *in natura* que são altamente perecíveis, a fermentação apresenta melhora na segurança alimentar, no valor nutricional e na qualidade sensorial (DE ROOS; DE VUYST, 2018). Dentre as mudanças ocorridas durante o processo, há síntese de compostos como: peptídeos, exopolissacarídeos, arabinosilanos, ácido γ -aminobutírico, ácido linoléico conjugado, vitaminas, cofatores, polióis, e aumento na biodisponibilidade de polifenóis, flavonoides e outros compostos bioativos (ANSORENA; ASTIASARÁN, 2015).

Por outro lado, a mudança no padrão de vida, nos hábitos alimentares e a crescente conscientização sobre a saúde, refletiu em maior aceitação do consumidor por alimentos mais nutritivos e saudáveis. O consumidor é mais consciente do papel da alimentação no prolongamento da vida e no bem-estar, assim como na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis como câncer, doenças cardiovasculares, doenças degenerativas, neuronais, diabetes, entre outras. Logo, o desenvolvimento de alimentos funcionais, contendo compostos bioativos, é uma tendência importante na indústria de alimentos (PANGHAL et al., 2018).

A kombucha é uma bebida fermentada milenar originada na China, de sabor ácido e adocicado, preparada a partir do chá (*Camellia sinensis*) contendo sacarose, fermentado por cultura simbiótica de bactérias e leveduras (JAYABALAN et al., 2014; VÁZQUEZ-CABRAL et al., 2017). Durante a fermentação há consumo de grande parte da sacarose adicionada (CHAKRAVORTY et al., 2016; ZUBAIDAH et al., 2017), e síntese de ácidos orgânicos (acético, láctico, glicônico, glicurônico, carbônico, fólico e úsnico), aminoácidos, enzimas, vitaminas (B1, B2, B3, B6, B12 e C), celulose, entre outros (GRUBE et al., 2016).

Além do chá preparado através da infusão das folhas da *Camellia sinensis*, vários estudos demonstraram a possibilidade da obtenção de bebidas análogas à kombucha, utilizando diferentes substratos como suco de uva (AYED; ABID; HAMDI, 2017), mil-folhas (VITAS et al., 2018), gengibre (SALAFZON; MAHMOODZADEH HOSSEINI; HALABIAN, 2018), carvalho (VÁZQUEZ-CABRAL et al., 2017) e leite (HRNJEZ et al., 2014).

A erva mate (*Ilex paraguariensis*) se apresenta como potencial matéria-prima para elaboração deste tipo de bebida. É uma planta nativa de países da América do Sul, como Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai. As folhas secas e moídas são consumidas na forma de chimarrão

(infusão em água quente), tererê (adicionando água fria) ou na forma de chá mate, feito através da infusão das folhas torradas com água fervente. A erva mate é conhecida por ter efeitos estimulantes, anticonvulsivantes e neuroprotetores no sistema nervoso central, atribuído principalmente ao seu elevado conteúdo de compostos bioativos, como ácidos fenólicos, flavonoides e saponinas (RIACHI; DE MARIA, 2017).

A kombucha tem ganhado muita popularidade nos últimos anos. Nos EUA, a expectativa é de que movimente U\$S 1,8 bilhões até 2029 (EBERSOLE et al., 2017). Em 2017, as vendas no varejo de kombucha e de outras bebidas fermentadas aumentaram em 37,4%, o mesmo ritmo de crescimento foi observado em 2018, tornando a kombucha popular em vários países (KAPP; SUMNER, 2018). No Brasil, a bebida também teve aumento no consumo. Devido a utilização de ingredientes naturais, vem substituindo o consumo de refrigerantes e bebidas alcoólicas, sendo que em 21 de junho de 2018, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento abriu para consulta pública a proposta de criação de padrões de identidade e qualidade para a bebida (BRASIL, 2018).

Tendo em vista que a fermentação da kombucha tem a capacidade de aumentar o conteúdo de compostos bioativos e a atividade antioxidante (LOBO; DIAS; SHENOY, 2017), submeter os extratos de erva mate à fermentação pela cultura simbiótica iniciadora da kombucha poderá ser uma boa alternativa para o aproveitamento de matérias-primas regionais e o desenvolvimento de uma bebida funcional. A proposta do presente trabalho foi estudar as condições de fermentação na obtenção de kombucha de erva mate, avaliar sua bioatividade *in vitro* através da determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante e realizar a avaliação *in vivo* das atividades antibacteriana e inibidora do estresse oxidativo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter bebida funcional proveniente da infusão de erva mate (*Ilex paraguariensis*) fermentada pela cultura simbiótica de bactérias e leveduras da kombucha e avaliar suas características físico-químicas e biológicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as propriedades físico-químicas da kombucha de erva mate durante a fermentação.
- Avaliar o efeito das condições de fermentação no conteúdo de compostos fenólicos totais e na atividade antioxidante *in vitro* da kombucha.
- Determinar a atividade antibacteriana e antioxidante da kombucha de erva mate.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ALIMENTOS FERMENTADOS

Os alimentos fermentados são utilizados para aumentar a vida útil de matérias-primas perecíveis. Durante os bioprocessos, as enzimas microbianas hidrolisam compostos complexos em outros mais simples, como ácidos, álcool, aminoácidos, agregando características agradáveis sensorialmente (DE ROOS; DE VUYST, 2018).

As combinações de substratos e micro-organismos fazem com que existam diferentes tipos de alimentos fermentados, podendo ser categorizados pelos principais metabólitos e micro-organismos envolvidos: álcool e dióxido de carbono (leveduras), ácido acético (bactérias acéticas), ácido lático (bactérias lácticas), ácido propiônico (*Propionibacterium freudenreichii*), amônia e ácidos graxos (*Bacillus* e bolores) (MARCO et al., 2017).

Apesar de serem amplamente conhecidos e apresentarem importância na alimentação humana, no último século houve redução da diversidade de alimentos fermentados. No entanto, recentemente, estes alimentos recuperaram a popularidade como parte das dietas que enfatizam os processos artesanais. Uma das razões para o crescente interesse é o potencial efeito promotor da saúde (MARCO et al., 2017).

Entre as mudanças ocorridas no alimento durante a fermentação ocorre a liberação e/ou síntese de diferentes compostos bioativos que são responsáveis por alguns dos benefícios à saúde atribuídos ao seu consumo, como anti-hipertensivos, antioxidantes, antidiabéticos, antimutagênicos, anticancerígenos, antitumorais e fibrinolíticos (ANSORENA; ASTIASARÁN, 2015).

3.2 KOMBUCHA

3.2.1 Definição

A kombucha é uma bebida de sabor ácido e adocicado, obtida pela fermentação do chá verde ou preto com sacarose, por uma cultura simbiótica de bactérias acéticas e leveduras, formando um biofilme celulósico na superfície do chá (Figura 1) (JAYABALAN et al., 2014). Ganhou visibilidade devido ao seu potencial terapêutico, associado à presença de compostos com propriedades antioxidantes, desintoxicantes do fígado e estimulantes do sistema imunológico (LOBO; DIAS; SHENOY, 2017).

A bebida é tradicionalmente preparada a partir de chá preto contendo sacarose, sendo o inóculo formado por biofilme e parte de kombucha obtida da fermentação anterior. O processo é conduzido pelo período entre 10 a 14 dias em temperaturas entre 18 e 26 °C. Ao final da fermentação, haverá a formação de um novo biofilme na superfície do líquido e o biofilme inicial se deposita no fundo do recipiente (Figura 1) (JAYABALAN et al., 2014).

A kombucha é originária do nordeste da China, tendo surgido por volta de 220 AC, durante a Dinastia Tsin, sendo apreciada por suas propriedades desintoxicantes e energizantes. Disseminou-se no Japão em 414 DC, quando passou a ser usada para tratar problemas digestivos do Imperador Inkyo. Após a expansão das rotas comerciais, espalhou-se para Rússia e Europa Oriental (JAYABALAN et al., 2014; KAPP; SUMNER, 2018).

Figura 1 – Fermentação do meio composto por chá e sacarose para obtenção de kombucha



Fonte: Jayabalan et al. (2014)

Até a Segunda Guerra Mundial, o hábito de beber o chá fermentado havia se tornado comum na Europa, ocasionando a escassez de folhas de chá e açúcar. Na década de 1950, chegou à França e também na África do Norte, tornando o consumo bastante popular (JAYABALAN et al., 2014).

Nas últimas décadas, a kombucha apresentou rápido crescimento no mercado de bebidas funcionais e uma das bebidas fermentadas de baixo teor alcoólico (até 1,5%) mais populares do mundo. Reconhecendo esse crescente mercado, em 2016, a PepsiCo comprou a KeVita, conhecida fabricante norte-americana de bebidas funcionais. Nos Estados Unidos, em 2017, as vendas de kombucha e outras bebidas fermentadas aumentaram 37,4% e, em 2018, a kombucha mostrou crescimento superior a 49% nos últimos meses do ano (KAPP; SUMNER, 2018).

3.2.2 Biofilme

Na superfície do meio fermentado, forma-se um biofilme, como pode ser observado na Figura 1, que recebeu o nome botânico *Medusomyces gisevii*. Esse biofilme contém os micro-organismos que fazem a fermentação (JAYABALAN et al., 2014). Apresenta o formato de um disco gelatinoso e rígido que se forma sobre a superfície do meio o qual fermenta, sendo um indicativo do sucesso da fermentação (VITAS et al., 2018).

O biofilme é constituído por celulose, sintetizada por algumas espécies de bactérias acéticas. A bactéria *Komagataeibacter xylinus*, anteriormente conhecida como *Gluconacetobacter xylinus* ou *Acetobacter xylinum*, é uma das espécies que apresenta maior rendimento na produção do polissacarídeo (SAICHANA et al., 2015).

A celulose é produzida pelas bactérias acéticas como forma de permitir sua permanência na interface líquido - ar, facilitando a captação de oxigênio, o que favorece sua sobrevivência, pois são estritamente aeróbicas, também protegendo de condições adversas ao micro-organismo, como elevada acidez e altas temperaturas (DE ROOS; DE VUYST, 2018; SAICHANA et al., 2015).

O biofilme é formado por várias camadas, entre as quais os micro-organismos se alocam, em especial, nas microfibrilas celulósicas, que tem elevada pureza e cristalinidade (GRUBE et al., 2016). A partir da síntese de uridina difosfato glicose, as células microbianas polimerizam a glicose em cadeias de β -1,4-glicana. A celulose microbiana é produzida extracelularmente na forma de fibrilas liberadas através de poros ou terminais complexos localizados na membrana. As bactérias acéticas produzem duas formas de celulose, celulose I, que é composto por feixes de microfibrilas, e a celulose II, uma estrutura amorfa e mais estável que a primeira (VILLARREAL-SOTO et al., 2018).

3.2.3 Composição microbiológica

A composição microbiológica da kombucha varia no decorrer da fermentação e de acordo com a origem da cultura no biofilme e no chá. É constituída por uma cultura mista, composta basicamente por leveduras e bactérias acéticas. Bactérias lácticas estão presentes em pequenas quantidades (AYED; ABID; HAMDI, 2017). Por determinação através de sequenciamento genético, Marsh et al. (2014) analisaram amostras de kombucha provenientes de diferentes locais (Canadá, Reino Unido, Estados Unidos e Irlanda). Foram identificadas bactérias, sendo 90% destas pertencentes aos filos Actinobacteria, Deinococcus-Thermus,

Firmicutes e Proteobactéria. As proteobactérias eram representadas principalmente pelo gênero *Gluconacetobacter*, e os demais, aos gêneros de *Acetobacter* e *Lactobacillus*. Quanto a composição fúngica, estavam presentes leveduras dos gêneros *Dekkera*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Davidiella* e, em maior proporção, *Zygosaccharomyces*.

Chakravorty et al. (2016) obtiveram a composição taxonômica de amostras de kombucha (chá e biofilme). A nível de filo, Ascomycota foi predominante entre os três métodos de sequenciamento aplicados. No nível de família, Saccharomycetaceae representou, pelo menos, 90%. Entre os gêneros identificados, estavam presentes *Candida* (em maior proporção), *Lachancea*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Waitea*, entre outros. Foram também, identificadas bactérias dos filos Proteobactérias, Firmicutes, Cianobactérias e Actinobactérias. Entre os gêneros, houve predominância de *Komagataeibacter* (50,3% no biofilme e 49,9% no chá fermentado) e também, de *Gluconobacter*, *Lyngbya*, *Bifidobacterium*, *Collinsella*, *Enterobacter*, *Weissella*, *Lactobacillus*, em menor proporção, entre outros não avaliados.

3.2.4 Composição química

Na composição química da kombucha estão presentes açúcares, como sacarose, glicose e frutose (GAMBOA-GÓMEZ et al., 2017; VÁZQUEZ-CABRAL et al., 2017); ácidos orgânicos, tais como acético, glicônico, glicurônico, cítrico, L-lático, málico, oxálico, fórmico, succínico (COTON et al., 2017; VITAS et al., 2018; ZUBAIDAH et al., 2017); vitaminas B1, B2, B6, B12 e C; proteínas, etanol, polifenóis e minerais (VILLARREAL-SOTO et al., 2018).

As infusões da planta *Camellia sinensis* apresentam propriedades bioativas, quando submetidas a fermentação, é verificada melhora na bioatividade. Durante a fermentação, há transformação dos compostos fenólicos (LOBO; DIAS; SHENOY, 2017), aumentando a capacidade antioxidante, conforme verificado utilizando métodos *in vitro*, tais como DPPH, ABTS, poder redutor e peroxidação lipídica (AYED; ABID; HAMDI, 2017; CHAKRAVORTY et al., 2016; LOBO; DIAS; SHENOY, 2017).

Como a composição da kombucha é dependente do meio utilizado, o conteúdo de compostos bioativos varia. Em kombucha de chá verde, foram encontrados os flavonoides: epicatequinas (3,89 mg/L), epigalocatequinas (8,62 mg/L), epigalocatequinagalato (5,32 mg/L), epicatequinagalato (5,32 mg/L), galocatequina (2,29 mg/L) e galocatequinagalato (1,85 mg/L) (LOBO; DIAS; SHENOY, 2017). Tu et al. (2019) identificaram isoflavonas totais (197,77 mg/L), glucosídeos totais (47,65 mg/L), agliconas totais (150,11 mg/L) e compostos fenólicos totais (264,44 mg/L) em bebida de soro do tofu fermentado com kombucha. A

kombucha de suco de uva apresentou concentração de compostos fenólicos de 400 mg/L eq. ácido gálico e de 300 mg/L de antocianinas (AYED; ABID; HAMDI, 2017). Em kombucha obtida pela fermentação do suco de fruta da serpente, a concentração de compostos fenólicos foi de 535,59 mg/L eq. ácido gálico, e 619,0 mg/L de taninos (ZUBAIDAH et al., 2018).

3.3 ERVA MATE

A erva mate é uma planta que cresce naturalmente no Paraguai, no Uruguai, na Argentina e no Brasil. Suas folhas e hastes são usadas para a preparação de várias bebidas estimulantes. As principais formas de consumo são o chimarrão (extração a quente utilizando folhas secas verdes), o tererê (extração a frio utilizando folhas secas verdes) e o chá mate (extração a quente utilizado folhas torradas) (CORREA et al., 2017).

O processamento da erva mate para chimarrão consiste nas etapas de sapeco, secagem e cancheamento. O sapeco é realizado junto ao fogo direto e consiste na passagem rápida dos ramos com folhas sobre as chamas do sapecador. Este equipamento constitui-se de um cilindro metálico, perfurado e inclinado através do qual a erva passa recebendo as chamas. A etapa de sapeco tem por função a retirada da umidade superficial e inativação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase que ocasionam a oxidação do produto. A temperatura média da erva mate na entrada do sapecador é de 400 °C e na saída é de 65 °C. O tempo de residência nesta etapa é em torno de 8 min (ESMELINDRO et al., 2002).

A diferença entre a erva mate utilizada para chimarrão e o chá mate está na etapa de torrefação, a qual as folhas da planta são submetidas para produção de chá mate. A temperatura de consumo, frequência e volume ingeridos do chá mate são menores que do chimarrão (BASTOS; TORRES, 2003). Entre os compostos encontrados na erva mate, estão: proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas, minerais, celulose, aminoácidos, enzimas, ligninas, ácidos orgânicos, polifenóis, metilxantinas, saponinas e flavonoides. As bebidas à base de erva mate contêm como compostos bioativos as metilxantinas, saponinas e os polifenóis (RIACHI; DE MARIA, 2017). A composição proximal da erva mate pode ser observada na Tabela 1, que considera a quantidade média consumida diariamente por pessoa.

Correa et al. (2017) avaliaram extratos liofilizados de chimarrão, tererê e chá mate através de simulação da digestão gastrointestinal seguida de fermentação pela microbiota intestinal *in vitro* para obter a possível estimativa dos compostos bioativos que efetivamente atingiram a circulação e os tecidos. Foram identificados 13 compostos fenólicos, 10 ácidos fenólicos e 3 flavonoides. O chimarrão apresentou o maior número de compostos fenólicos

totais e flavonoides (111,46 mg/g e 5,61 mg/g) que o tererê (69,01 mg/g e 1,00 mg/g), seguido do chá mate (64,35 mg/g e 0,02 mg/g). Após a digestão, os conteúdos finais desses compostos apresentaram reduções de 33%, 24% e 20%, respectivamente. Os autores ainda comprovaram as bioatividades antioxidante, antitumoral e antibacteriana.

Tabela 1 – Composição de uma porção média consumida de erva mate por pessoa (62,5 g)

Constituintes	Conteúdo
Nutrientes (g)	
Proteínas	0,8
Carboidratos	6,5
Gordura Total	0,5
Minerais (mg)	
Potássio	679 ± 58
Magnésio	185 ± 16
Enxofre	59 ± 9
Cálcio	44 ± 13
Fósforo	41 ± 8
Manganês	4 ± 3
Zinco	2,26 ± 0,12
Ferro	0,33 ± 0,02
Cobre	0,29 ± 0,14
Vitaminas (mg)	
Vit. C	15,0
Vit. B1	3,60
Vit. B2	1,20
Vit. B6	0,47
Fitoquímicos (mg)	
Polifenóis	3767-4085
Metilxantinas	303-962
Saponinas	50-146

Fonte: CARDOSO JÚNIO; MORAND (2016)

Em chimarrão extraído em duas temperaturas distintas, apresentou 222,5 µg/L de cafeína, 36,45 µg/L de teobromina, 47,8 µg/L de compostos fenólicos totais e 43,67 µg/L de

flavonoides a 65 °C. Na temperatura de 75 °C houve apenas pequena redução destes valores, demonstrando que a temperatura não influenciou de maneira significativa. Os autores também avaliaram o efeito do extrato na tolerância à toxicidade do alumínio utilizando *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental para doença de *Alzheimer*, sendo este metal associado ao desenvolvimento da doença, mostrando que a infusão protege da sua toxicidade (BORTOLI et al., 2018).

Vários efeitos fisiológicos são associados ao consumo de erva mate, destacando-se a atividade antioxidante, efeito vasodilatador, capacidade de controle da glicemia e propriedades hipolipemiantes (KUNGEL et al., 2018). Sendo assim, infusões preparadas com a erva mate também podem ser utilizadas como meio alternativo para produção de bebidas funcionais utilizando a kombucha como cultura iniciadora. Em bebida fermentada por levedura utilizando erva mate, após o período de armazenamento de 180 dias, apresentou elevados teores de compostos fenólicos totais (1225 a 1522 mg/L), flavonoides (513 a 517 mg/L) e atividade antioxidante (92,2 a 92,6%) (NASCIMENTO, 2013).

3.4 PROCESSO FERMENTATIVO DA KOMBUCHA

O processo fermentativo da kombucha assemelha-se à produção de vinagre, uma vez que na kombucha ocorre a fermentação do açúcar em álcool pelas leveduras, seguido da bioconversão bacteriana do álcool em ácido acético. No entanto, na kombucha ambos os processos ocorrem simultaneamente (CHAKRAVORTY et al., 2016). As leveduras metabolizam a sacarose em glicose e frutose, em seguida, em etanol e dióxido de carbono. O etanol é então oxidado pelas bactérias, em presença de ar, em acetaldeído, e após em ácido acético (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). Normalmente, o teor de álcool é baixo, inferior a 1% após o envase, desde que mantido sob temperatura de refrigeração. Do contrário, pode aumentar para cerca de 3%, pois em ausência de oxigênio, ocorre inibição da conversão do álcool em ácido acético. As bactérias do ácido acético também utilizam glicose para produzir ácido glicônico. A frutose é usada em menor grau e permanece após a fermentação. Parte da glicose permanece não metabolizada e, juntamente com a frutose restante, proporciona à bebida o sabor doce (NUMMER, 2013).

Espécies como *Acetobacter* e *Gluconobacter* estão entre os gêneros responsáveis pela acetificação. Algumas espécies acéticas podem oxidar o álcool à ácido acético, e este, a gás carbônico e água. Em geral, as bactérias acéticas começam a decompor o ácido acético quando o teor alcoólico se aproxima de 0,2% (GAVA, 2009). A espécie *Acetobacter xylinus* é

responsável pela formação da biomassa celulósica sintetizada a partir de glicose e frutose obtidas na hidrólise da sacarose. A biossíntese de celulose ocorre a partir da união da glicose uridina-difosfato (GUDP) obtida a partir da glicose (VILLARREAL-SOTO et al., 2018).

O preparo tradicional da kombucha foi descrito por Jayabalan et al. (2014). Uma infusão preparada com 5 g/L de folhas de chá preto ou verde e adicionada de 50 g/L de sacarose. Após arrefecido é inoculado com 24 g/L de biomassa celulósica e 20% de kombucha previamente fermentada, que tem por função também reduzir o pH inicial. A incubação é realizada à temperatura ambiente, acima de 20 °C, em condições aeróbias. Após o período entre 10 a 14 dias, a bebida fermentada é filtrada e armazenada sob refrigeração.

Vitas et al. (2018) produziram kombucha a partir de chá de mil-folhas (*Achillea millefolium* L.). Foram preparados extratos obtidos por maceração em água quente (0,56 g/L e 1,13 g/L), e por extração com água subcrítica a 115 °C e 140 °C, a 45 bar, nas mesmas concentrações. Aos extratos foram adicionados sacarose (7%) e kombucha (10%), sendo fermentados por 7 d a 25 °C. A kombucha de mil-folhas apresentou maior conteúdo de compostos fenólicos totais (entre 0,14 e 0,34 mg/mL eq. ácido clorogênico) que nos extratos iniciais entre (0,12 e 0,25 mg/mL eq. ácido clorogênico) e menor conteúdo de flavonoides (entre 0,04 e 0,17 mg/mL eq. rutina) em relação aos extratos não fermentados (entre 0,09 e 0,20 mg/mL eq. rutina). Os extratos fermentados extraídos utilizando água subcrítica tiveram maior formação de biomassa (entre 0,69 e 1,69% m/v) comparados com a extração com água quente (0,46 e 0,52% m/v) e maior aceitação na análise sensorial, apresentando valores de pontuação entre 4 e 5 em uma escala hedônica de 5 pontos, superior as demais amostras que tiveram pontuações entre 2 e 3.

Foi utilizada kombucha para fermentar leite e sendo acompanhada a cinética da hidrólise da lactose (KANURIĆ et al., 2018). O inóculo foi preparado em meio formulado com chá preto (1,5 g/L), sacarose (70 g/L) e 10% (v/v) de kombucha, durante 7 d a 25 °C. O leite foi adicionado de 10% de kombucha e incubado a 37 e 42 °C. Amostras coletadas nos pH 5,8; 5,4; 5,1; 4,8 e 4,6 foram retiradas para análise de lactose, galactose e formação de ácido láctico. O tempo de fermentação foi 13,7 h a 37 °C e 8,2 h a 42 °C, com redução no teor de lactose de 0,7 e 0,6 g/L respectivamente. Os produtos formados que não estavam presentes no início da fermentação atingiram concentrações de 0,4 g/L (37 °C) e 0,3 g/L (42 °C) para a galactose e 0,2 g/L (37 °C) e 0,16 g/L (42 °C) para o ácido láctico.

De Filippis et al. (2018) fermentaram chá preto e chá verde com kombucha utilizando duas temperaturas com o objetivo de caracterizar a microbiota envolvida na fermentação e avaliar o efeito da mesma na produção de ácido glicônico e glicurônico. Soluções

contendo 10% de sacarose foram autoclavadas e adicionadas de 1% de chá. Kombucha na proporção de 3% foi adicionada para acidificação inicial do meio e inoculadas com biofilme gerado na fermentação anterior. As temperaturas estudadas foram 20 e 30 °C por 21 dias. Os resultados mostraram que a fermentação a 30 °C foi determinante para selecionar bactérias da espécie *Gluconacetobacter saccharivorans* que otimizaram a produção dos ácidos desejados. O conteúdo de ácido glicônico a 30 °C foi 90,9 mg/L e de ácido glicurônico de 54,5 mg/L.

Vázquez-Cabral et al. (2017) obtiveram kombucha de carvalho utilizando três variedades: *Quercus resinosa*, *Quercus arizonica* e *Quercus convallata*. Os meios foram preparados após a extração de 1% das folhas de carvalho trituradas em água a 80 °C pelo período de 10 min, centrifugadas (4.500 rpm/10 min) e filtradas em filtro com poros de 0,5 mm. Foi utilizado 10% de sacarose, 10% de kombucha e 2,5% de biofilme, a solução foi incubada a 25 °C por 7 d. Foram avaliados compostos fenólicos, dentre os quais destacam-se, ácido gálico (entre 16,64 e 19,57 mg/L), galocatequina (entre 8,48 e 34,47 mg/L), catequina (entre 9,22 e 33,48 mg/L) e epicatequina (8,14 e 14,42 mg/L). Os extratos liofilizados foram testados em monócitos humanos e apresentaram atividade na prevenção do estresse oxidativo e processos inflamatórios.

3.5 BIOATIVIDADE NA KOMBUCHA

Vários compostos bioativos foram obtidos a partir de fontes naturais e classificados em diferentes categorias com base na sua estrutura e funções químicas: compostos fenólicos, vitaminas, carotenoides, alcaloides e compostos organo-sulfurados (RECHARLA et al., 2017). Os compostos bioativos estão presentes nos chamados alimentos funcionais. Estes, além de seus nutrientes, possuem componentes adicionais que atuam no metabolismo e fisiologia humana, promovendo efeitos benéficos à saúde, além de retardar o aparecimento de doenças crônico-degenerativas e que possam melhorar a qualidade e a expectativa de vida (COSTA; JORGE, 2011).

Entre os diferentes componentes funcionais nos alimentos, podemos citar as fibras dietéticas, os antioxidantes e os probióticos (ABUJAH; OGBONNA; OSUJI, 2015). Muitos dos componentes bioativos foram identificados e isolados de vegetais, frutas, legumes, óleos, nozes e grãos integrais e demonstraram inúmeros efeitos benéficos na saúde humana, incluindo atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas e imuno-moduladoras (RECHARLA et al., 2017).

Os polifenóis são os principais componentes bioativos da kombucha (LOBO; DIAS; SHENOY, 2017), são compostos importantes na dieta humana, solúveis em água e principalmente de origem natural. Os compostos com cerca de 5-7 anéis aromáticos e mais de 12 grupos hidroxilo fenólicos são classificados como polifenóis. Segundo Recharla et al. (2017), atuam como antioxidantes na prevenção do estresse oxidativo. Nas plantas, são os metabólitos secundários produzidos como mecanismo de defesa contra fatores de estresse.

Diferentes bioatividades foram observadas na kombucha como atividade antioxidante (LOBO; DIAS; SHENOY, 2017), antimicrobiana (AYED; ABID; HAMDI, 2017), hepatoprotetora (BHATTACHARYA; GACHHUI; SIL, 2011), anti-hiperglicêmica (SRIHARI et al., 2013a) e anti-inflamatória (VÁZQUEZ-CABRAL et al., 2017).

As propriedades hepatoprotetoras da kombucha foram avaliadas *in vivo*, através da inibição do estresse oxidativo induzido por hidroperóxido de t-butila. Quando a bebida foi combinada com a toxina, o estado antioxidante se manteve igual ao dos hepatócitos normais, impedindo a interrupção do potencial da membrana mitocondrial e bloqueou a ativação de caminhos de sinalização apoptótica dependentes das mitocôndrias (BHATTACHARYA; GACHHUI; SIL, 2011).

Atividade anti-hiperglicêmica foi comprovada em ensaios *in vivo* utilizando extrato de kombucha liofilizado. Estreptozocina foi utilizada como indutor da diabetes, devido à ação citotóxica sobre as células B pancreáticas que ocasionam dano oxidativo e consequente apoptose celular e supressão da síntese de insulina. Após o período experimental, observou-se que a suplementação diminuiu significativamente a hemoglobina glicosilada e aumentou os níveis de insulina plasmática, hemoglobina e glicogênio do tecido que foi diminuído no tratamento com estreptozotocina e também reverteu significativamente as atividades alteradas de enzimas gliconeogênicas, como glicose-6-fosfatase, frutose-1,6-bisfosfatase e enzimas glicolíticas tais como hexoquinase nos tecidos de ratos experimentais (SRIHARI et al., 2013a).

A kombucha de carvalho obtida por Vázquez-Cabral et al. (2017) foi liofilizada para avaliar a atividade anti-inflamatória em macrófagos. Foi comprovado que o extrato apresentou propriedade antioxidante devido aos compostos fenólicos. O principal efeito foi detectado na sua capacidade de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa e IL-6) induzida por lipopolissacarídeos e de espécies reativas de nitrogênio, mostrando importante atividade anti-inflamatória.

Extratos a partir de kombucha liofilizada foram testados em células de câncer de próstata humanas e apresentaram efeito anti-angiogênico. Nos ensaios, foram testados os efeitos da kombucha na viabilidade e migração nas células de câncer de próstata, na expressão gênica

de estimuladores angiogênicos e proteínas que atuam no crescimento primário e metastático do tumor. Os resultados comprovaram que o extrato atua na inibição de crescimento de tumores e da metástase (SRIHARI et al., 2013b).

3.5.1.1 Atividade antioxidante

As espécies reativas de oxigênio (ERO), que englobam principalmente uma variedade de espécies altamente reativas contendo oxigênio, tais como radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são geralmente moléculas instáveis, pequenas e altamente reativas. Existem duas fontes principais para a produção de ERO nas células: as mitocôndrias, que geram EROS como subproduto da respiração, e a NADPH oxidase, que produz ativamente superóxido através das membranas de neutrófilos e fagossomas (SCHERZ-SHOVAL et al., 2007).

Além disso, ERO como superóxido e peroxinitrito também estão ligados à geração e à propagação da resposta inflamatória. As mitocôndrias são organelas essenciais para células eucarióticas na produção de lipídios, ácidos nucleicos e de precursores de aminoácidos. As ERO podem oxidar e danificar esses produtos induzindo a disfunção mitocondrial, que pode ser considerada como uma condição chamada estresse oxidativo (LI et al., 2015).

As células desenvolvem vários agentes antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, tais como glutatona, superóxido dismutase e catalase para prevenir a formação de ERO e seus efeitos adversos nas mitocôndrias. No entanto, quando há ocorrência de estressores ambientais, como a carência de nutrientes, lesões traumáticas, isquemia / hipoxia, existe desequilíbrio na homeostase refletindo na capacidade antioxidante inadequada das células e na produção excessiva de ERO. Neste caso, seu acúmulo induz ao dano oxidativo, o que leva a disfunção mitocondrial e lesão celular (LI et al., 2015).

Os antioxidantes exercem funções importantes nos alimentos e no corpo humano, neutralizam processos de oxidação e previnem o aparecimento de doenças crônicas relacionadas ao estresse oxidativo. Estes compostos exercem a sua atividade através de vários mecanismos, como supressão de radicais livres, captação de oxigênio singlete ou quelantes de íons metálicos que catalisam reações oxidativas (CÖMERT; GÖKMEN, 2018).

A atividade antioxidante de compostos biologicamente ativos pode ser mensurada “*in vitro*” e “*in vivo*” por diferentes métodos colorimétricos, biológicos, eletroquímico, entre outros instrumentais. A capacidade antioxidante determinada “*in vitro*” não será necessariamente a mesma obtida quando mensurada “*in vivo*”. Entre os métodos “*in vitro*” estão

o método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), o método de sequestro do radical ABTS⁺ ((2,2-azinobis) 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), inibição da peroxidação lipídica, poder redutor e técnicas eletroquímicas; e “*in vivo*” por meio de células animais, micro-organismos ou em testes utilizando modelo animal (CÖMERT; GÖKMEN, 2018; WANG et al., 2016).

A atividade antioxidante *in vitro* da kombucha foi comprovada por Zubaidah et al. (2017) utilizando suco de fruta da serpente (*Salacca zalacca*) como meio de cultivo, foram testados cinco cultivares *Salak doyong*, *Salak madu*, *Salak pondoh*, *Salak segaran* e *Salak suwaru*. Entre os tratamentos testados, o cultivar *Salak suwaru* apresentou as melhores características bioativas. Os resultados mostraram que a kombucha de fruta da serpente teve aumento na quantidade de compostos fenólicos totais (275,0 para 623,0 mg/L eq. ác. gálico), taninos (332,9 para 365,42 mg/L eq. ác. tânico), flavonoides (2307,14 para 3041,46 mg/L eq. quercetina) e a atividade antioxidante pelo método de DPPH (de 10,2% para 18,0%).

Kombucha obtida a partir da fermentação de infusão de mil-folhas foram analisadas para determinar o potencial antioxidante pelos métodos de DPPH e poder redutor, que apresentaram valores entre 0,02 e 1,12 mg/mL (IC₅₀) e 0,29 a 10 mg/mL (EC₅₀), respectivamente (VITAS et al., 2018). Em kombucha de suco de uva, Ayed, Abid e Hamdi (2017) obtiveram aumento na atividade antioxidante pelos métodos de DPPH e ABTS de 55,7% e 38,1%, respectivamente, após 6 d de fermentação.

Em kombucha de soro do tofu, Vitas et al. (2018) obtiveram aumento na atividade antioxidante de 25,0% e 30,0% pelos métodos de ABTS e DPPH, respectivamente, após 10 dias de fermentação. Zubaidah et al. (2018) obtiveram aumento na capacidade antioxidante de 8,0% em kombucha de suco de fruta da serpente fermentado por 14 dias e Chakravorty et al. (2016), após fermentar chá preto por 21 dias, registraram aumento na atividade antioxidante pelos métodos de ABTS e DPPH de 39,7% e 38,4%, respectivamente.

3.5.1.2 Atividade antimicrobiana

A fermentação é amplamente conhecida como um método biológico de preservação dos alimentos, através da formação de produtos que exercem atividade antimicrobiana, como ácidos orgânicos, álcool e bacteriocinas (MARCO et al., 2017). Pesquisas sobre kombucha demonstraram sua eficácia antimicrobiana contra micro-organismos patogênicos. Essa atividade é atribuída principalmente ao ácido acético, proteínas e catequinas. O ácido acético e

as catequinas tem a propriedade de inibir uma série de bactérias Gram positivas e Gram negativas (JAYABALAN et al., 2014).

A atividade antimicrobiana e antifúngica da kombucha cultivada em chá preto foi testada, assim como de mais cinco bebidas fermentadas à partir de infusões herbais com propriedades medicinais diferentes: *Thymus vulgaris* L., *Lippia citriodora*, *Rosmarinus officinalis*, *Foeniculum vulgare* e *Mentha piperita* (BATTIKH; BAKHROUF; AMMAR, 2012). Os micro-organismos avaliados foram os patógenos humanos *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e sete leveduras do gênero *Candida*. No estudo, as bebidas fermentadas testadas apresentaram atividade antimicrobiana, o que não foi verificado nas infusões antes da fermentação.

Em kombucha de suco de fruta da serpente do cultivar *Salak suwaru* obtidos por Zubaidah et al. (2017), além da melhora na atividade antioxidante, também apresentou atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os halos de inibição foram de 8,43 mm antes e 21,60 mm após a fermentação para *S. aureus* e 6,91 mm e 15,40 mm para *E. coli*.

Os extratos de mil-folhas fermentados obtidos por Vitas et al. (2018) foram utilizados para calcular a concentração mínima inibitória (MIC) frente a 6 bactérias e 2 fungos. Para os extratos obtidos por extração com água quente, as MIC ficaram entre 9,77 e 312,50 µg/mL e, para os extratos obtidos por extração subcrítica, entre 19,53 e 156,25 µg/mL.

Ensaio antimicrobianos utilizando kombucha de suco de uva foram testados por Ayed, Abid e Hamdi (2017) para 7 micro-organismos. Também foram utilizados suco de uva não fermentado, kombucha neutralizada e cloranfenicol como controle. O suco de uva não fermentado e a kombucha neutralizada não apresentaram halos de inibição, demonstrando que a capacidade antimicrobiana da bebida se deve principalmente à presença de ácidos orgânicos. Em relação ao cloranfenicol (entre 2,1 e 3,4 cm), os halos de inibição formados foram menores (entre 2,2 e 3,0 cm) com exceção para o micro-organismo *Bacillus cereus*, que apresentou halo de inibição 38% maior.

3.6 LEGISLAÇÃO

Os estabelecimentos produtores de kombucha devem se adequar ao Decreto nº 6.871 de 4 de junho 2009 (BRASIL, 2009), que estabelece sobre a padronização, classificação, registro, inspeção e fiscalização da produção e do comércio de bebidas. O art. 12 propõe a

classificação de acordo com o conteúdo de álcool, que para ser categorizada como bebida fermentada não alcoólica, deve apresentar até 0,5% de álcool etílico potável a 20°C. De acordo com o art. 78 deste decreto a bebida deverá atender aos requisitos de identidade e qualidade quanto à normalidade das características sensoriais próprios de sua natureza ou composição; qualidade e quantidade dos componentes próprios de sua natureza ou composição; ausência de componentes estranhos, de alterações e de deteriorantes; limites de substância e de microorganismos nocivos à saúde. A conformidade com os padrões de identidade não é possível uma vez que a legislação brasileira não apresenta padrão de identidade e qualidade ou outra legislação específica para kombucha. A Portaria nº 64/2018 (BRASIL, 2018) apresenta a proposta de Instrução Normativa para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade de Kombucha.

Os padrões microbiológicos para bebidas são instituídos pela Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA. Considera-se a similaridade da natureza e do processamento do produto, com base em padrões estabelecidos para produtos similares. Com isso, a kombucha atende ao item 17 da legislação (sucos, refrescos, refrigerantes e outras bebidas não alcoólicas), devendo o produto apresentar ausência de coliformes a 35 °C em 50 mL e de *Salmonella* sp em 25 mL.

Para que se enquadre como alimento funcional e se apresente seguro para comercialização, deve atender aos parâmetros instituídos pelas resoluções nº 18/1999 e nº 19/1999 da ANVISA, que são o Regulamentos Técnicos de procedimentos para registro de alimentos com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde estabelecidos pelo Ministério da Saúde. Para isso, as empresas precisam enviar um Relatório Técnico Científico contendo a denominação do produto, finalidade de uso, recomendação de consumo indicada pelo fabricante, descrição científica dos ingredientes do produto (espécie de origem botânica, animal ou mineral, conforme o caso, composição química com caracterização molecular ou formulação do produto, descrição da metodologia analítica para avaliação dos componentes objetos da alegação, texto e cópia do layout dos dizeres na rotulagem do produto de acordo com os regulamentos de rotulagem e diretrizes estabelecidas pela Resolução nº18/1999 (BRASIL, 1999a), evidências científicas aplicáveis à comprovação da alegação de propriedade funcional e/ou de saúde, como através de ensaios nutricionais e/ou fisiológicos, ensaios bioquímicos, estudos epidemiológicos , ensaios clínicos, entre outros.

Nos Estados Unidos, a kombucha, quando possui um teor alcoólico de até 0,5% em volume, é fiscalizada pela FDA. Se o volume de álcool for igual ou superior a este valor, durante

qualquer etapa do processamento, desde a produção, engarrafamento ou distribuição, está sujeita a regulamentação pelo TTB (UNITED STATES CODE, 2007).

Neste caso, a bebida deve ser produzida de acordo com as normas do *Internal Revenue Code of 1986*, obtendo a licença para atuar como cervejaria. O estabelecimento produtor deve estar em conformidade com as exigências referentes à rotulagem, composição nutricional e impostos cobrados. No rótulo devem conter informações como nome comercial do produtor, volume líquido de bebida, natureza do produto e local de produção. Quando se tratar de bebida alcoólica, deve respeitar a Lei de Rotulagem de Bebidas Alcoólicas de 1988 estabelecida pelo FDA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

A cultura simbiótica composta por bactérias e leveduras foi doada pela empresa Bá Kombucha, localizada em Gravataí/RS. Erva mate (*Ilex paraguariensis*) da marca Barão de Cotegipe®, açúcar cristal orgânico da marca União® e chá verde da marca Madrugada® adquiridos em comércio local da cidade do Rio Grande/RS foram utilizados para o preparo da kombucha. Para os ensaios das bioatividades *in vivo*, foi utilizada a bactérias Gram (+) *Staphylococcus aureus* EO157:HT (ATCC43895) e Gram (-) *Escherichia coli* ATCC10832; e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (Invitrogen™, cod 95400.BY4741). Os reagentes utilizados foram todos de padrão analítico.

4.2 MÉTODOS

A Figura 2 apresenta o fluxograma do trabalho, incluindo a etapa de preparo do inóculo, a obtenção da kombucha de erva mate, caracterização física, química e biológica e avaliação das bioatividades testadas (ensaio antibacteriano e capacidade de prevenção do estresse oxidativo).

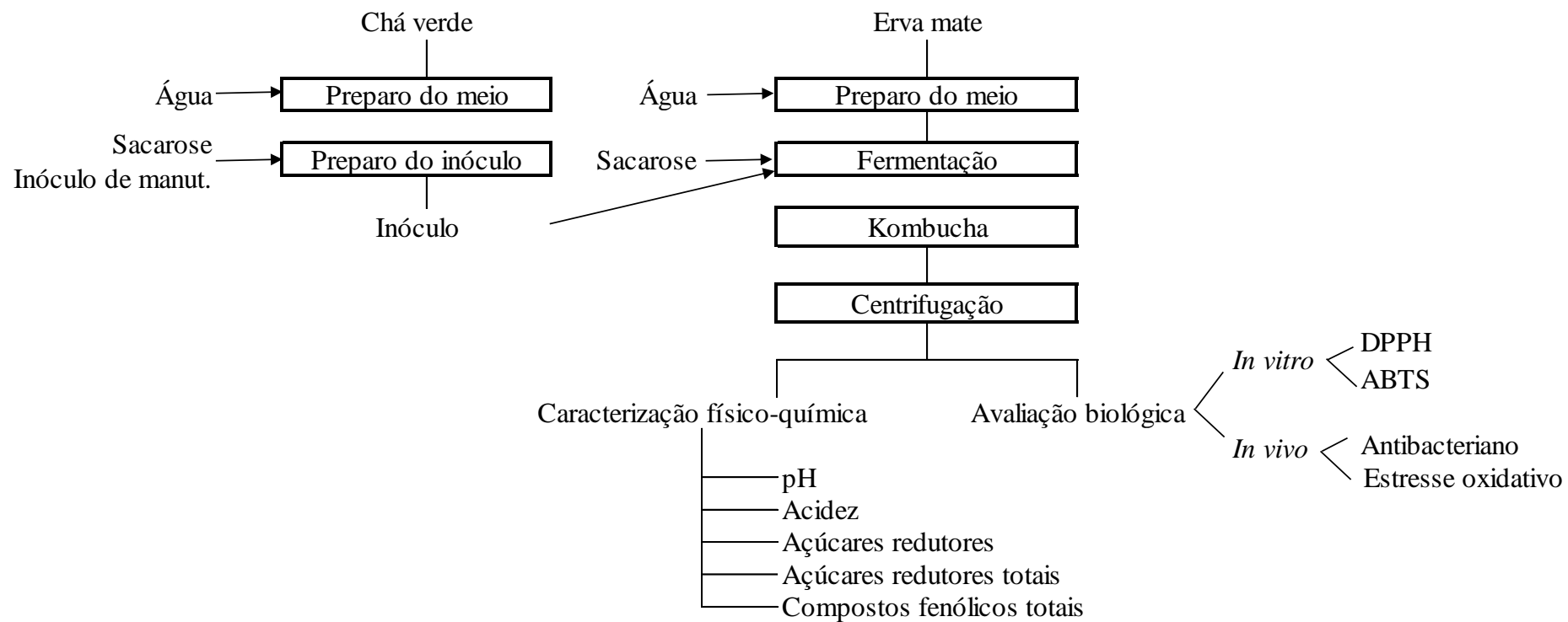
4.3 MANUTENÇÃO DA CULTURA ESTOQUE

A cultura recebida da empresa Bá Kombucha, composta por biofilme e kombucha, foi mantida sob refrigeração em meio preparado com chá verde e sacarose nas concentrações descritas no tópico 4.4. Esta cultura estoque foi utilizada para o preparo do inóculo de todas as fermentações. Sendo que a cada retirada de meio fermentado o mesmo volume de meio estéril foi adicionado.

4.4 PREPARO DO INÓCULO

O inóculo foi preparado em meio contendo 5% de sacarose e 0,5% de folhas de chá verde (JAYABALAN et al., 2014). Para o preparo da infusão, as folhas de chá verde foram adicionadas em água (80 °C) e, após 10 min, foram removidas por filtração.

Figura 2 – Fluxograma da obtenção da kombucha de erva mate e avaliação da bioatividade



DPPH: capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila; ABTS: captura do radical 2,2-azinobis-3-3 etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico

A sacarose foi adicionada e a infusão foi esterilizada por microfiltração (filtros Millipore® de 0,2 µm de diâmetro) em câmara de fluxo laminar e transferida para frasco Erlenmeyer. Após o arrefecimento da infusão, a parte líquida da cultura estoque foi utilizada para inocular o meio na proporção de 10% (v/v) (NUMMER, 2013).

Após o preparo foram transferidas assepticamente alíquotas de 30 mL para frascos Erlenmeyer de 50 mL e estes, incubados em estufa a 20 °C por 12 d. Sendo utilizados como inóculo da fermentação dos extratos de erva mate.

Uma parte do meio preparado nesta etapa era utilizado para repor o volume retirado do inóculo de manutenção.

4.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

A contagem do número de bactérias e leveduras no inóculo (tópico 4.4) foi realizada no 1º e no 12º dia de fermentação. O número de bactérias foi determinado em triplicata por plaqueamento (SILVA et al., 2010). Como amostra foi utilizado 1 mL de kombucha diluída em série em água peptonada (0,1%). Em cada placa foi adicionado 0,1 mL de cada diluição e espalhado com alça de Drigalski em meio contendo 20 mL de ágar PCA (5% de tripton, 2,5% de extrato de levedura, 1% de dextrose, 15% de ágar) diluído em água destilada. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 h e após contadas em contador de colônias. Foram consideradas as placas nas diluições que apresentaram valor de unidade formadora de colônia (UFC) entre 30 e 300. Os resultados foram expressos em UFC/mL.

O número de leveduras foi determinado em triplicata em placas utilizando meio PDA (4% de amido de batata, 20% de dextrose e 15% de ágar) diluído em água destilada e acidificado com ácido tartárico 10% até pH 3,5 (SILVA et al., 2010). O volume de 1 mL de kombucha foi diluída em série e 0,1 mL foi adicionado nas placas e espalhado com alça de Drigalski. As placas foram incubadas por 48 h a 30 °C (LEHNHARDT et al., 2017). Após incubação, as colônias foram contadas em contador de colônias e o resultado expresso em UFC/mL.

4.6 PREPARO DO MEIO DE CULTIVO

O meio foi preparado utilizando erva mate nas concentrações de 0,5%, 0,75% e 1,0% (m/v), e sacarose a 0,5% (m/v). Para o preparo da infusão, a erva mate foi adicionada em

água (80 °C), a temperatura foi controlada em banho e após 10 min, a erva mate foi removida por filtração. A sacarose foi adicionada e a infusão foi esterilizada por microfiltração (filtros Millipore® de 0,2 µm de diâmetro) em câmara de fluxo laminar, e transferidos para frasco Erlenmeyer de 500 mL. O meio foi inoculado com inóculo preparado no item 4.4.

4.7 FERMENTAÇÃO PARA O PREPARO DA KOMBUCHA

As fermentações foram realizadas em incubadora sem agitação e com temperatura controlada por 12 d, como recomendado por Ayed, Abid e Hamdy (2017) e Sun, Li e Chen (2015). Para tal, em frasco Erlenmeyer (500 mL) foram adicionados 270 mL do meio de cultivo preparado na concentração de erva mate estabelecida para cada ensaio, conforme Tabela 2, e 30 mL de inóculo.

Para avaliar o efeito da concentração de erva mate no meio e da temperatura de fermentação, foi utilizado um delineamento completo com três pontos centrais. A matriz do delineamento com os níveis reais e codificados é mostrada na Tabela 2. Os resultados obtidos nas determinações do conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante no 12º dia de fermentação foram utilizados no delineamento experimental.

Como controle foi utilizada kombucha de chá verde preparada nas mesmas condições do inóculo, 5% (m/v) de sacarose e 0,5% (m/v) de folhas de chá verde, inoculado a 20 °C por 12 d.

Tabela 2 - Matriz do delineamento experimental, com valores codificados e reais de estudo (concentração de erva mate e temperatura) na obtenção de kombucha de erva mate

Ensaio	Concentração de erva mate (%)	Temperatura (°C)	Concentração de erva mate (%)	Temperatura (°C)
1	-1	-1	0,5	20
2	+1	-1	1,0	20
3	-1	+1	0,5	30
4	+1	+1	1,0	30
5	0	0	0,75	25
6	0	0	0,75	25
7	0	0	0,75	25

As fermentações foram realizadas triplicata, sendo os extratos de erva mate fermentados por até 12 d e amostras foram retiradas nos dias 0, 4, 8 e 12, estas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min e o sobrenadante avaliado quanto ao pH, acidez, açúcares redutores, açúcares redutores totais, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. As determinações foram realizadas em triplicata.

Para determinação da atividade biológica *in vivo*, foram utilizados os ensaios que apresentaram melhor conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante *in vitro*.

4.8 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.8.1 pH

Para determinação do pH, foram utilizadas alíquotas de 10 mL de kombucha. A leitura foi realizada em triplicata com pHmetro digital (Even, PHS-3E).

4.8.2 Acidez

A acidez foi determinada por volumetria utilizando solução de fenolftaleína como indicador, 10 mL de kombucha, foram diluídos em 100 mL de água destilada e titulados com solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 M. A acidez foi expressa em % de ácido acético.

4.8.3 Açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores foi determinada por método de Miller (1959), utilizando o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) como agente oxidante. Foi adicionado 1 mL de reagente DNS (1% de ácido 3,5-dinitrosalicílico) a 1 mL da amostra. Após a homogeneização, a mistura foi aquecida em banho. A absorvância foi medida a 540 nm em leitor de microplacas (EE. Polaris. Celer. Brasil) utilizando glicose para a curva de calibração.

4.8.4 Açúcares redutores totais

A concentração de açúcares redutores totais foi determinada após hidrólise ácida da sacarose (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008). Para tal, 1 mL de amostra diluída foi acidificada com 1 mL de ácido clorídrico P.A. (37%), essa solução foi aquecida em banho maria

a $100 \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 min. Após resfriamento a solução foi neutralizada com solução de hidróxido de sódio 40%. Os açúcares redutores totais foram determinados conforme item 4.8.3.

4.8.5 Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais (CFT) foram determinados usando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SUN; LI; CHEN, 2015). O volume de 0,1 mL de amostra foi misturado com 2 mL de carbonato de sódio a 2%. Após 2 min, 0,1 mL de reagente Folin-Ciocalteu a 50% foram adicionados, e a solução foi deixada em repouso durante 30 min a temperatura ambiente. As absorvâncias das amostras foram medidas a 734 nm usando leitor de microplacas (EE. Polaris. Celer. Brasil). Os resultados foram expressos como mg de equivalente de ácido gálico (GAE) / L de amostra.

4.9 ANÁLISE DA BIOATIVIDADE *IN VITRO*

4.9.1 Atividade antioxidante

4.9.1.1 Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

O ensaio DPPH, que mede a atividade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazilo, foi conduzido de acordo com método utilizado por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com modificações. As amostras previamente diluídas foram misturadas com solução etanólica (7,4 mg / 100 mL) de DPPH estável. Após o tempo de reação de 30 min, foi feita a leitura da absorvância a 515 nm. As leituras foram utilizadas para o cálculo da capacidade de eliminação do radical DPPH (Equação 1), onde A_{controle} se refere a absorvância dos reagentes, sem a amostra, e A_{amostra} , a absorvância com amostra.

$$\text{Atividade de eliminação (\%)} = \left[\frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right] \times 100 \quad (1)$$

4.9.1.2 Captura do radical 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico (ABTS⁺)

O radical ABTS⁺ foi produzido pela reação da solução de reserva de ABTS e persulfato de potássio no escuro na concentração de 7 mM, em temperatura ambiente durante 16 h antes da utilização. A solução do ABTS⁺ foi diluída com etanol até absorvância de $0,70 \pm$

0,10 a 734 nm, e as alíquotas das amostras diluídas foram misturadas com a solução ABTS⁺. A mistura foi deixada em repouso durante 6 min e a absorbância medida em leitor de microplacas (EE. Polaris. Celer. Brasil) (RE et al., 1999).

Os resultados foram expressos com base na capacidade de eliminação do radical ABTS⁺, conforme Equação 2, onde A_{controle} se refere a absorbância dos reagentes, sem a amostra, e A_{amostra}, a absorbância com amostra.

$$\text{Atividade de eliminação (\%)} = \left[\frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right] \times 100 \quad (2)$$

4.10 ANÁLISE DA BIOATIVIDADE *IN VIVO*

Os ensaios que apresentaram o melhor conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelas metodologias *in vitro*, foram utilizados para avaliação da atividade antibacteriana e estresse oxidativo.

4.10.1 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi testada contra cepas das bactérias patogênicas Gram positivas *Staphylococcus aureus* EO157:HT (ATCC43895) e Gram negativas *Escherichia coli* ATCC10832, utilizando a técnica de disco difusão em disco de acordo com o protocolo proposto pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2003).

A solução salina contendo o inóculo (3×10^8 UFC mL⁻¹) foi semeada com auxílio de um *swab* estéril na superfície das placas contendo ágar *Brain Heart Infusion* (BHI). Foram colocados discos de papel filtro estéreis com 5 mm de diâmetro. Sobre cada disco, foram adicionados 20 µL de kombucha. As placas foram incubadas por 48 h a 37°C. A atividade antibacteriana foi avaliada considerando o diâmetro do halo de inibição, medido com uma régua.

4.10.2 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi utilizado para medição da atividade antioxidante *in vivo* da kombucha, sendo empregada a levedura

Saccharomyces cerevisiae como modelo de acordo com metodologia utilizada por Naranjo et al. (2016).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi mantida refrigerada (4°C) em ágar YPD inclinado (1% extrato de levedura, 2% dextrose, 2% de peptona e 2% de ágar).

Para o cultivo das leveduras utilizadas no ensaio de resistência ao estresse oxidativo foi preparado meio YPD (1% extrato de levedura, 2% dextrose, 2% de peptona). Uma alçada do micro-organismo cultivado em ágar inclinado foi inoculada em 100 mL do meio em frascos Erlenmeyer de 500 mL e incubada a 28°C e 160 rpm. A absorbância foi determinada a 600 nm a intervalos de 2 h por espectrofotometria, até que o micro-organismo atingisse a fase exponencial, apresentando valores entre 0,5 e 0,7, sendo então diluídas em meio YPD até absorbância de 0,2.

O estresse oxidativo foi induzido por solução de peróxido de hidrogênio na concentração de 0,75 mM. Foram preparados 6 tubos contendo 10 mL de meio com leveduras em frasco de vidro, sendo adicionado em cada um deles: 1) o controle (contendo apenas o micro-organismo); 2) 50 µL de peróxido de hidrogênio; 3) 100 µL de kombucha de erva-mate; 4) 100 µL de kombucha de erva-mate e 50 µL de peróxido de hidrogênio; 5) 100 µL de kombucha de chá verde (controle) e 6) 100 µL de kombucha de chá verde e 50 µL de peróxido de hidrogênio. Os frascos foram incubados a 28 °C por 1 h e 160 rpm em agitador orbital (Tecnal, TE-424, Brasil).

Após o período, foi determinada a taxa de sobrevivência. Para isso, foi feito o plaqueamento em ágar YPD. Onde uma alíquota de 100 µL de amostra foi diluída em série, 100 µL de cada diluição foram espalhados com alça de Drigalski em placas contendo 20 mL de ágar. As placas foram incubadas a 28°C por 48 h e a leitura foi realizada em contador de colônias. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC). A taxa de sobrevivência foi calculada em relação ao controle de acordo com a Equação 3, onde UFC_{amostra} refere-se ao número de unidade formadoras de colônia da levedura *Saccharomyces cerevisiae* nos ensaios 2 à 6, e UFC_{controle} é o número de unidades formadoras de colônia no ensaio 1, referente ao controle, onde a suspensão de leveduras não sofreu influência dos agentes antioxidante ou estressor (H₂O₂).

$$\text{Taxa de sobrevivência (\%)} = \left[\frac{\text{UFC amostra}}{\text{UFC controle}} \right] \times 100 \quad (3)$$

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as determinações analíticas foram realizadas em triplicata. Os resultados obtidos nas determinações de acidez, pH, açúcares redutores, açúcares redutores totais, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foram tratados estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA) e comparados através do Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Para obter o efeito das condições de fermentação no conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, foi realizada a análise estatística dos resultados obtidos no 12º d de fermentação, utilizando o software *Statistica 7* (Statsoft, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONTAGEM DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS NO INÓCULO

A Tabela 3 mostra os resultados de contagem do número total de bactérias e de leveduras no inóculo, nos dias 0 (zero) e 12, em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) de kombucha.

Tabela 3 - Contagem de bactérias e leveduras para determinar a concentração microbiana no inóculo

Micro-organismos	Tempo (dias)	
	0	12
Bactérias totais (UFC/mL)	$3,8 \times 10^2 \pm 0,15 \times 10^2$	$6400,0 \times 10^2 \pm 30,0 \times 10^2$
Leveduras (UFC/mL)	$4,0 \times 10^1 \pm 0,2 \times 10^1$	$540,0 \times 10^1 \pm 47,0 \times 10^1$

Os resultados da contagem de bactérias e leveduras são expressos como média e desvio padrão. UFC: unidades formadoras de colônia.

Os resultados obtidos foram superiores aos achados por Ayed, Abid e Hamdi (2017), que encontraram $120,0 \times 10^2$ UFC/mL de bactérias e $65,0 \times 10^1$ UFC/mL de leveduras em kombucha de chá preto fermentada por 15 dias para inocular suco de uva.

Diferenças na contagem do número total de bactérias e leveduras ocorrem devido a diferenças na origem da cultura, por apresentar diferentes composições microbiológicas (JAYABALAN et al., 2014) e períodos de fermentação (DE FILIPPIS et al., 2018; ZUBAIDAH et al., 2017).

Este ensaio foi realizado para estimar a quantidade de bactérias e leveduras presentes no inóculo utilizando infusão de chá verde (0,5%) e fermentada a 20°C. A etapa de preparo do inóculo era realizada anterior as fermentações para obtenção da kombucha de erva mate, considerando que foram realizados sete ensaios, estes valores podem ter apresentado variação na concentração microbiana a cada fermentação.

5.2 ACOMPANHAMENTO DO PROCESSO FERMENTATIVO

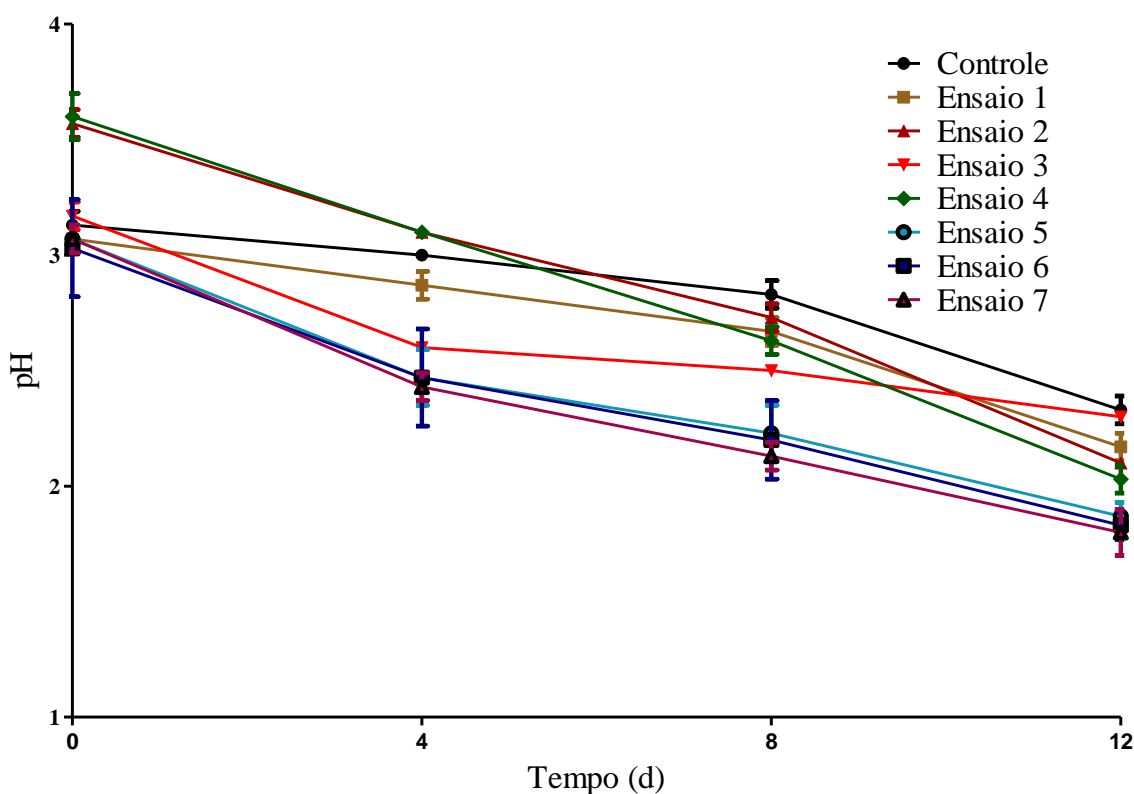
5.2.1 pH e acidez total

O declínio dos valores do pH e aumento da acidez durante a fermentação da erva mate e do chá verde (controle) podem ser observados acompanhando as Figuras 3 e 4. O valor

do pH final (APÊNDICE – Tabela AP 1), verificado no dia 12 foi inferior ao pH inicial, demonstrando a presença de atividade metabólica microbiana. A redução dos valores do pH se deve a presença de ácidos orgânicos.

No tempo zero, as amostras apresentaram valores de pH estatisticamente iguais aos do controle, com exceção na concentração de 1% (ensaios 2 e 4), onde valor foi superior. O mesmo não foi observado na acidez, pois os valores obtidos não diferiram estatisticamente entre si. Efeito semelhante foi observado por Sun, Li e Chen (2015), em diferentes meios formulados variando as proporções de extrato de grama de trigo e chá preto, observaram que o pH era mais elevado nas maiores concentrações de extrato de grama de trigo, sendo esta diferença associada à composição química do substrato utilizado. Vitas et al. (2018) também verificaram que a concentração do extrato afeta o pH inicial do meio, utilizando extratos de mil-folhas.

Figura 3 - pH da kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e de chá verde (controle) durante a fermentação



Controle: Chá verde (0,5% m/v)/20°C. Ensaio 1: Extrato de erva mate (0,5% m/v)/20°C. Ensaio 2: Extrato de erva mate (1,0% m/v)/20°C. Ensaio 3: Extrato de erva mate (0,5% m/v)/30°C. Ensaio 4: Extrato de erva mate (1,0% m/v)/30°C. Ensaio 5: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C. Ensaio 6: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C. Ensaio 7: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C.

Tendo em vista que extratos de erva mate apresentam valores de pH entre $7,08 \pm 0,03$ e $7,18 \pm 0,02$, segundo autores como Braghini et al. (2014), o pH inicial inferior ao valor 4 está associado a adição do inóculo. De acordo com autores como Nummer (2013) e Pereira et al. (2017), além da função de inocular o meio, é utilizado para reduzir o pH a valores menores que 4,2, inibindo assim, o crescimento de micro-organismos patogênicos e esporogênicos (NUMMER, 2013; PEREIRA et al., 2017).

A partir do quarto dia de fermentação, é possível observar a redução do pH e o aumento da acidez na kombucha de erva mate e no controle (Tabela 4). Segundo Tu et al. (2019), o ácido acético é o principal composto responsável por essas alterações.

Tabela 4 - Variação no pH e aumento na acidez (g/L) em kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e no controle entre períodos da fermentação

Ensaio	pH			Acidez		
	Δ_{1-4}	Δ_{4-8}	Δ_{8-12}	Δ_{1-4}	Δ_{4-8}	Δ_{8-12}
Controle	0,1 ^{cB}	0,2 ^{cdB}	0,5 ^{abA}	0,55 ^{eC}	1,43 ^{cdB}	2,23 ^{bA}
1	0,2 ^{bcB}	0,2 ^{cdB}	0,5 ^{abA}	0,76 ^{dA}	1,94 ^{aB}	1,65 ^{cB}
2	0,5 ^{abcB}	0,4 ^{abB}	0,6 ^{aA}	1,41 ^{bB}	1,74 ^{abcA}	1,05 ^{dC}
3	0,6 ^{aA}	0,1 ^{dC}	0,2 ^{cB}	1,08 ^{cB}	0,94 ^{eC}	2,71 ^{aA}
4	0,5 ^{abA}	0,5 ^{aA}	0,6 ^{bA}	1,94 ^{aA}	1,18 ^{deB}	2,05 ^{bA}
5	0,60 ^{aA}	0,2 ^{bcdB}	0,4 ^{bcAB}	0,26 ^{fC}	1,78 ^{abB}	2,26 ^{bA}
6	0,6 ^{aA}	0,3 ^{bcB}	0,4 ^{bcA}	0,24 ^{fC}	1,58 ^{bcB}	2,26 ^{bA}
7	0,6 ^{aA}	0,3 ^{bcB}	0,3 ^{bcB}	0,40 ^{efC}	1,62 ^{bcB}	2,26 ^{bA}

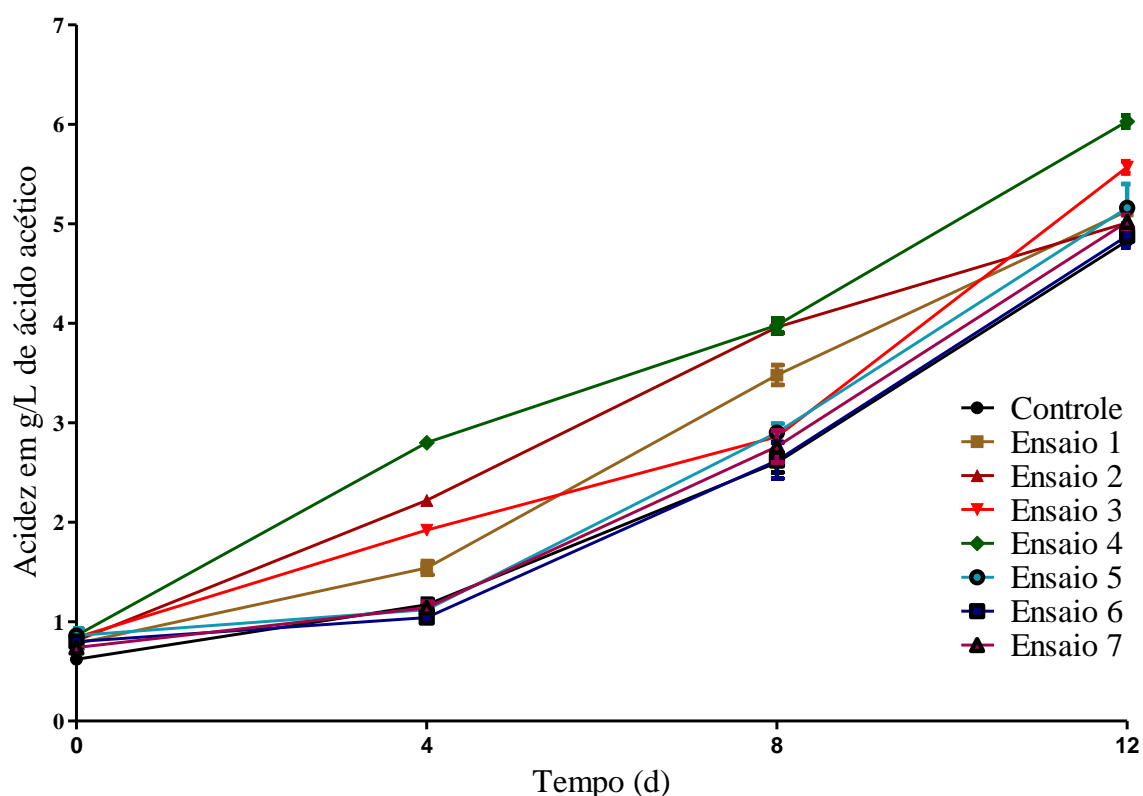
Os resultados são expressos como a diferença entre as médias do pH e da acidez nos diferentes tempos de fermentação. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre as amostras estudadas. Controle: Chá verde (0,5% m/v)/20°C. Ensaio 1: Extrato de erva mate (0,5% m/v)/20°C. Ensaio 2: Extrato de erva mate (1,0% m/v)/20°C. Ensaio 3: Extrato de erva mate (0,5% m/v)/30°C. Ensaio 4: Extrato de erva mate (1,0% m/v)/30°C. Ensaio 5: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C. Ensaio 6: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C. Ensaio 7: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C.

Entre os dias 4 e 8 da fermentação, a redução no valor do pH e aumento na acidez foram superiores nos ensaios 2 e 4, cuja concentração de erva mate era maior (Tabela 4). Isto pode estar associado aos compostos presentes na erva mate. De acordo com Riachi e De Maria (2017), a erva mate contém entre 41,5 e 55,0 mg/L de cafeína. Este composto, segundo

Četojević-Simin et al., (2012), pode estar relacionado a ação estimulante sobre a cultura. No entanto, mais estudos precisam ser realizados pois este mecanismo não está elucidado.

Nos últimos dias de fermentação dos extratos houve maior aumento da acidez titulável nos ensaios fermentados a temperaturas superiores a 25 °C. Podendo estar associado a intensa atividade metabólica. Em estudo realizado por De Filippis et al. (2018), até o 9º dia há crescimento exponencial de bactérias acéticas, o que faz com que haja maior consumo de substrato e, conseqüentemente, maior formação produtos do metabolismo microbiano.

Figura 4 – Acidez (g/L de ácido acético) da kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e de chá verde (controle) durante a fermentação



Controle: Chá verde (0,5% m/v)/20°C. Ensaio 1: Extrato de erva mate (0,5% m/v) /20°C. Ensaio 2: Extrato de erva mate (1,0% m/v)/20°C. Ensaio 3: Extrato de erva mate (0,5% m/v)/30°C. Ensaio 4: Extrato de erva mate (1,0% m/v)/30°C. Ensaio 5: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C. Ensaio 6: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C. Ensaio 7: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C.

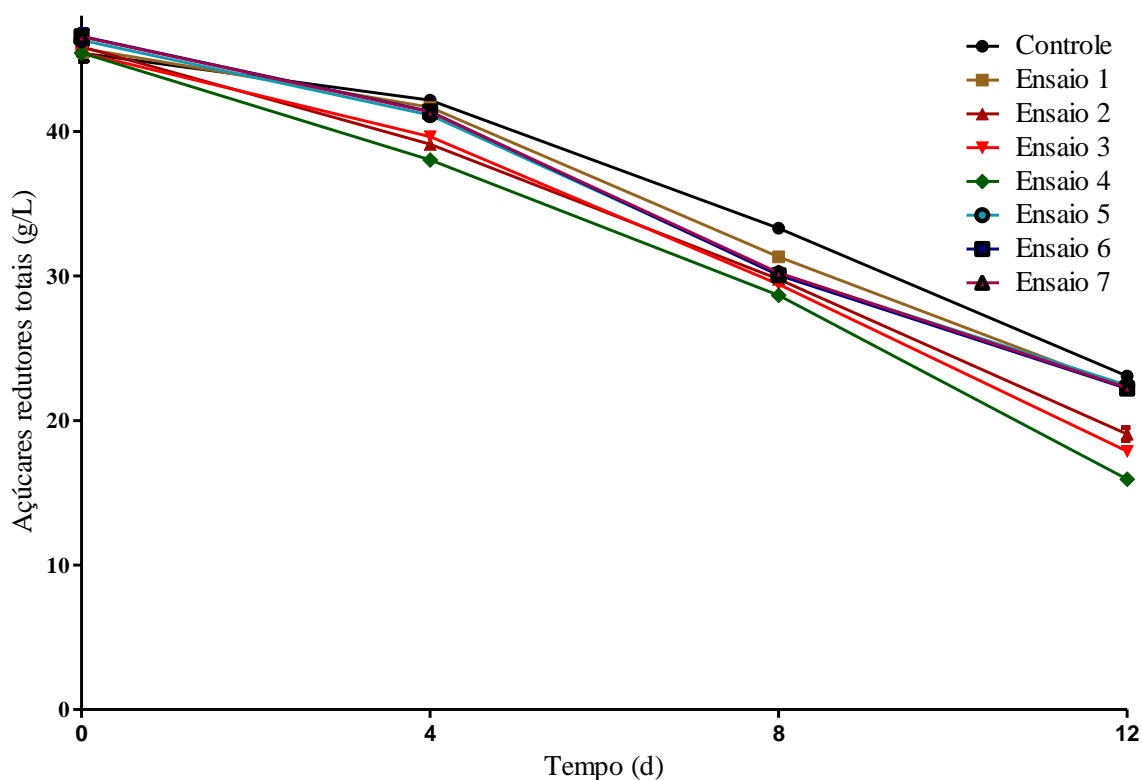
Os ensaios realizados a 30°C (ensaios 3 e 4) apresentaram maior teor de acidez (APÊNDICE - Tabela AP 2). Segundo Saichana et al. (2015), esta temperatura é ideal para crescimento de bactérias acéticas. O valor do pH final foi inferior nos ensaios 5, 6 e 7, fermentados a 25°C (APÊNDICE - Tabela AP 1). Devido às diferenças no pH inicial e

temperaturas de fermentação, os ensaios que apresentaram o menor pH final não apresentaram também maior acidez.

5.2.2 Teor de açúcares redutores e açúcares redutores totais

As Figuras 5 e 6 mostram a variação do teor de açúcares redutores totais (ART) e açúcares redutores (AR) na kombucha de erva mate e chá verde (controle) durante o período de fermentação de 12 d. Pode-se observar que houve diminuição do conteúdo de ART em todos os ensaios, ou seja, houve utilização dos carboidratos como fonte de carbono pela cultura simbiótica.

Figura 5 - Teor de açúcares redutores totais (g/L) da kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e de chá verde (controle) durante a fermentação



Controle: Chá verde (0,5% m/v)/20°C. Ensaio 1: Extrato de erva mate (0,5% m/v) /20°C. Ensaio 2: Extrato de erva mate (1,0% m/v)/20°C. Ensaio 3: Extrato de erva mate (0,5% m/v)/30°C. Ensaio 4: Extrato de erva mate (1,0% m/v)/30°C. Ensaio 5: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C. Ensaio 6: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C. Ensaio 7: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C.

Nos primeiros 4 d houve menor taxa de consumo de açúcares e conseqüentemente menor produção de ácidos orgânicos devido a concentração microbiana no meio ser baixa, conforme pode ser observado na Tabela 5. O conteúdo de açúcares redutores aumentou (Figura 6), concordando com Zubaidah et al. (2017), que afirmaram que isso se deve a ação das enzimas microbianas extracelulares (invertases), que hidrolisam a sacarose em glicose e frutose, para que possam ser utilizadas como fonte de energia, na síntese de biomassa microbiana e formação de celulose.

Tabela 5 - Variação na concentração de açúcares redutores totais (ART) e açúcares redutores (AR) em kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e no controle entre períodos da fermentação

Ensaio	ART			AR		
	Δ_{1-4}	Δ_{4-8}	Δ_{8-12}	Δ_{1-4}	Δ_{4-8}	Δ_{8-12}
Controle	3,2 ^{eC}	8,9 ^{eB}	10,2 ^{cA}	2,5 ^{dB}	3,8 ^{aA}	-3,8 ^{aC}
1	4,1 ^{deC}	10,4 ^{ba}	9,1 ^{dB}	1,7 ^{cdB}	5,3 ^{ba}	-3,2 ^{abC}
2	6,8 ^{abC}	9,3 ^{eB}	10,7 ^{cA}	0,4 ^{abB}	4,7 ^{abA}	-2,8 ^{bcC}
3	5,8 ^{bcC}	10,2 ^{bb}	11,5 ^{ba}	1,0 ^{bcB}	5,9 ^{ba}	-3,3 ^{abC}
4	7,4 ^{aC}	9,4 ^{eB}	12,7 ^{aA}	-0,3 ^{aB}	5,3 ^{ba}	-2,9 ^{bcC}
5	5,2 ^{cdC}	10,9 ^{aA}	7,7 ^{eB}	1,4 ^{cB}	5,9 ^{ba}	-3,7 ^{aC}
6	5,2 ^{cdC}	11,3 ^{aA}	7,9 ^{eB}	1,5 ^{cB}	5,2 ^{ba}	-3,3 ^{abC}
7	5,2 ^{cdB}	11,1 ^{aA}	8,0 ^{eB}	1,7 ^{cdB}	4,7 ^{abA}	-2,5 ^{cC}

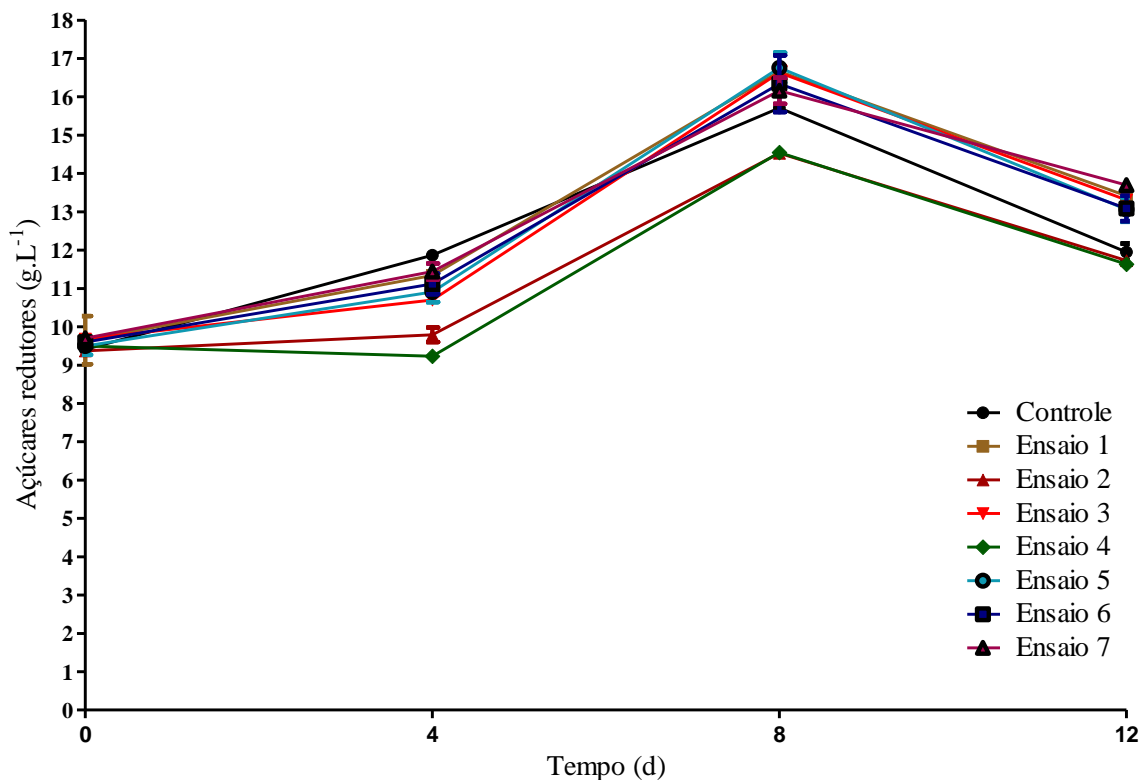
Os resultados são expressos como a diferença entre as médias da concentração de açúcares redutores totais e açúcares redutores nos diferentes tempos de fermentação. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre as amostras estudadas. Controle: Chá verde (0,5% m/v)/20°C. Ensaio 1: Extrato de erva mate (0,5% m/v) /20°C. Ensaio 2: Extrato de erva mate (1,0% m/v)/20°C. Ensaio 3: Extrato de erva mate (0,5% m/v)/30°C. Ensaio 4: Extrato de erva mate (1,0% m/v)/30°C. Ensaio 5: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C. Ensaio 6: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C. Ensaio 7: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C.

No período compreendido entre o 4º a 8º dia de fermentação, o consumo de açúcares redutores totais aumentou. A concentração de açúcares redutores atinge seu nível mais elevado (Tabelas AP 3 e 4), indicando que houve inversão da sacarose pela ação das enzimas microbianas.

De acordo com Villarreal-Soto et al. (2018), no processo fermentativo da kombucha, as leveduras oxidam açúcares simples a etanol e este, é oxidado a ácido acético pelas bactérias acéticas. Segundo Saichana et al. (2015), as bactérias acéticas, além de

utilizarem o etanol como fonte de energia, são capazes de oxidar a glicose e a frutose, liberando diferentes produtos de oxidação, como ácido glicônico. De acordo com Tu et al. (2019), as bactérias acéticas possuem a capacidade de realizar fermentação oxidativa, um processo de oxidação incompleta onde os substratos são oxidados por desidrogenases ligadas à membrana e os produtos oxidados são então liberados para o meio de cultura.

Figura 6 - Teor de açúcares redutores (g/L) da kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e de chá verde (controle) durante a fermentação



Controle: Chá verde (0,5% m/v)/20°C. Ensaio 1: Extrato de erva mate (0,5% m/v) /20°C. Ensaio 2: Extrato de erva mate (1,0% m/v)/20°C. Ensaio 3: Extrato de erva mate (0,5% m/v)/30°C. Ensaio 4: Extrato de erva mate (1,0% m/v)/30°C. Ensaio 5: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C. Ensaio 6: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C. Ensaio 7: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C.

A partir do 4º dia de fermentação, a formação de biomassa na superfície do frasco tornou-se visível. Logo, a fonte de carbono passa a ser utilizada não somente como nutriente, mas também, para síntese de celulose bacteriana. Isto foi verificado também por Vitas et al. (2018), que utilizaram como inóculo o líquido da fermentação de extratos de mil-folhas, e após 7 dias de fermentação, os cultivos apresentaram formação de biofilme com massas entre 0,93 e

3,39 g/L. Segundo autores como Saichana et al. (2015), o biofilme celulósico é formado especificamente por espécies termotolerantes como *Komagataeibacter xylinus*.

No período final da fermentação, entre os dias 8 e 12, o consumo de açúcares redutores totais se manteve elevado, o que possibilitou a grande produção de ácidos orgânicos e declínio do pH. Isto também foi verificado por autores como De Filippis et al. (2018) e Zubaidah et al. (2017), pois nessa etapa, as fontes de carbono são preferencialmente usadas para obtenção de energia e menos para a formação de células microbianas.

Em geral, o perfil do consumo de açúcares redutores totais entre as 5 diferentes condições estudadas diferiu estatisticamente do controle, a um nível de significância de 95%. Ao final do período de 12 dias pode-se constatar que as amostras fermentadas na maior temperatura (30 °C) apresentaram menor concentração final de açúcares totais, indicando que a temperatura de fermentação influenciou na atividade metabólica da cultura.

5.2.3 Compostos fenólicos totais (CFT)

As concentrações de CFT na kombucha de erva mate e de chá verde (controle) estão apresentadas na Tabela 6.

A concentração de CFT é dependente da concentração do extrato de erva mate utilizado no preparo do meio e aumenta no decorrer da fermentação (APÊNDICE - Tabela AP 5). Entre os sete ensaios realizados, houve aumento dos valores de CFT entre 7,2% e 9,6% após o período de 12 d de fermentação. Estes valores foram inferiores ao controle, que apresentou aumento no conteúdo de CFT de 13,5%.

Os maiores resultados foram observados nos ensaios com maior concentração de erva mate (ensaios 2 e 4). Isto pode estar associado a diferenças no perfil de compostos fenólicos encontrados no chá verde, como pode ser verificado em estudo realizado por Lobo, Dias e Shenoy (2017) utilizando chá verde, após 7 d de fermentação houve aumento de 4,7% na concentração de CFT. A kombucha de mil-folhas obtida por Vitas et al. (2018), apresentou aproximadamente 16% a mais de CFT, após 14 d de fermentação.

Este aumento na concentração de CFT após a fermentação era esperado. Pois de acordo com estudos realizados por Lobo, Dias e Shenoy (2017), Velicanski et al. (2014) e Zubaidah et al. (2017), a fermentação tem por característica a capacidade de aumentar o conteúdo de CFT em relação aos substratos iniciais, devido a ação das enzimas microbianas que promovem a conversão metabólica de compostos fenólicos mais complexos em outros mais simples.

Tabela 6 - Concentração de compostos fenólicos totais (mg/L de equivalente em ácido gálico) em kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e chá verde (controle) durante a fermentação

Ensaio	Tempo (dias)			
	0	4	8	12
Controle	572,4±3,1 ^{dC}	592,9±5,6 ^{cB}	641,2±4,0 ^{bcA}	649,4±11,7 ^{bcA}
1	414,2±3,1 ^{eC}	419,4±1,2 ^{dC}	433,3±3,2 ^{dB}	445,9±3,5 ^{dA}
2	774,8±1,4 ^{aD}	792,3±1,4 ^{aC}	804,4±2,8 ^{aB}	831,7±7,6 ^{aA}
3	410,6±2,9 ^{eC}	423,6±4,0 ^{dB}	432,7±3,6 ^{dB}	444,2±3,5 ^{dA}
4	770,6±3,8 ^{aD}	790,2±2,9 ^{aC}	810,3±3,5 ^{aB}	844,8±1,3 ^{aA}
5	605,3±2,6 ^{bcB}	621,3±3,6 ^{baB}	648,4±3,3 ^{caB}	640,8±2,5 ^{ba}
6	598,8±2,5 ^{cD}	611,8±,6 ^{bc}	637,9±2,5 ^{cb}	646,3±3,5 ^{ca}
7	607,8±4,8 ^{bc}	619,8±4,7 ^{bb}	644,2±1,2 ^{bcA}	651,3±2,5 ^{bcA}

Os resultados de compostos fenólicos totais são expressos como média e desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre as amostras estudadas. Controle: Chá verde (0,5% m/v)/20°C. Ensaio 1: Extrato de erva mate (0,5% m/v) /20°C. Ensaio 2: Extrato de erva mate (1,0% m/v)/20°C. Ensaio 3: Extrato de erva mate (0,5% m/v)/30°C. Ensaio 4: Extrato de erva mate (1,0% m/v)/30°C. Ensaio 5: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C. Ensaio 6: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C. Ensaio 7: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C.

Para determinar as condições de fermentação que mais influenciaram na obtenção de bebida com maior concentração de CFT foi realizada a análise estatística para os resultados no 12º d de fermentação.

Os resultados desta análise (APÊNDICE - Tabela AP 6) mostraram que a temperatura de fermentação, bem como sua interação com a concentração do extrato de erva mate não foram significativas.

Tabela 7 - Análise de variância para concentração de compostos fenólicos totais em kombucha de erva mate após 12 dias de fermentação

Varição	Graus de liberdade	Soma quadrática	Quadrado das médias	F calculado
Regressão	1	154602,1	154602,1	1858,2
Resíduo	5	419,1	83,8	
Total	6	155021,2		

F tabelado = 6,61 ao nível de 5% de probabilidade

Na Tabela 7 se apresentam os resultados da análise de variância (ANOVA), como o F calculado foi maior que o F tabelado, o modelo se ajusta aos dados experimentais a um nível de significância de 95% de confiança. De acordo com Rodrigues e Iemma (2014), para que a regressão seja estatisticamente significativa e, também, útil para fins preditivos, o valor de F calculado deve ser no mínimo 4 vezes maior que o F tabelado. Logo, podemos considerar o modelo estatístico preditivo ao nível de significância de 95%.

Sendo possível construir o modelo matemático empírico para estimativa de compostos fenólicos totais, apresentado na equação a Equação 3, onde C é concentração do extrato de erva mate utilizado no meio de cultivo (%).

$$\text{CFT (mg/L eq. ác. gálico)} = 646,5 + 196,6 C \quad (3)$$

A Tabela 8 apresenta os valores de CFT dos ensaios, comparando com os valores preditos pelo modelo (Equação 3) e os desvios. É possível observar que os desvios foram baixos, ficando entre 0,03 e 2,22%.

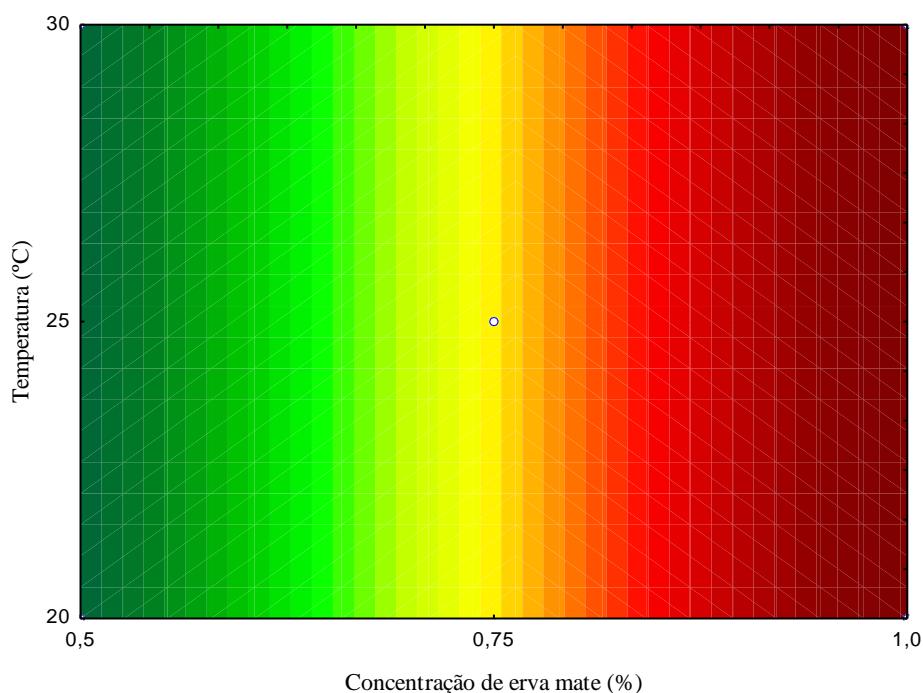
Tabela 8 - Valores experimentais e valores estimados de compostos fenólicos totais (mg/L) em kombucha de erva mate após 12 dias de fermentação

Ensaio	CFT Experimental	CFT previsto	Desvio relativo (%)
1	445,9	447,1	-0,3
2	831,7	840,3	-1,0
3	444,2	452,7	-1,9
4	844,8	845,9	-0,1
5	661,2	646,5	2,2
6	646,3	646,5	-0,0
7	651,3	646,5	0,7

CFT: compostos fenólicos totais

Sendo o modelo linear, a partir da construção da curva de contorno (Figura 7), nota-se que o aumento da concentração de CFT é proporcional à concentração do extrato de erva mate.

Figura 7 - Curva de contorno obtida para o conteúdo de compostos fenólicos totais em kombucha de erva mate



Os valores de CFT aumentam de acordo com a concentração de erva mate independentemente da temperatura. É possível observar a existência de uma região com maior concentração, localizado na faixa próxima a 1,0%. Também é possível verificar que na faixa de 20 a 30°C a temperatura não exerceu efeito significativo ($p > 0,05$) na concentração de compostos fenólicos totais.

5.3 BIOATIVIDADE *IN VITRO* EM KOMBUCHA

5.3.1 Atividade antioxidante *in vitro* obtida pelo método de sequestro do radical livre DPPH

Os resultados da atividade antioxidante medidos pela capacidade de sequestro do radical DPPH em kombucha de erva mate estão apresentados na Tabela 12.

A fermentação está associada ao aumento da atividade antioxidante pelo método de DPPH, uma vez que, de acordo com alguns estudos, há maior conteúdo de compostos bioativos liberados no meio após a fermentação (AYED; ABID; HAMDI, 2017; CHAKRAVORTY et al., 2016; VITAS et al., 2018; ZUBAIDAH et al., 2017).

Tabela 9 - Capacidade de sequestro de radicais livres (%) pelo método de DPPH em kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e chá verde (controle) durante a fermentação

Ensaio	Tempo (dias)			
	0	4	8	12
Controle	37,6±0,5 ^{cB}	38,9±0,1 ^{cA}	38,7±0,2 ^{cA}	38,9±0,0 ^{cA}
1	40,1±0,7 ^{cA}	40,0±1,3 ^{cA}	39,9±1,6 ^{cA}	40,1±1,3 ^{cA}
2	76,5±0,2 ^{aC}	78,8±0,6 ^{aA}	77,5±0,2 ^{aB}	79,3±0,0 ^{aA}
3	39,7±1,8 ^{cA}	39,4±1,8 ^{cA}	39,4±1,7 ^{cA}	39,4±1,7 ^{cA}
4	76,5±1,5 ^{aA}	78,1±1,2 ^{aA}	78,6±0,7 ^{aA}	79,2±1,2 ^{aA}
5	58,2±0,4 ^{bC}	58,7±0,3 ^{bBC}	59,5±0,2 ^{bAB}	60,4±0,6 ^{bA}
6	58,8±0,3 ^{bB}	58,9±0,5 ^{bB}	59,4±0,4 ^{bB}	60,7±0,4 ^{bA}
7	58,9±0,4 ^{bB}	58,8±0,5 ^{bB}	59,7±0,5 ^{bB}	61,1±0,2 ^{bA}

Os resultados de atividade antioxidante são expressos como média e desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre as amostras estudadas. Controle: Chá verde (0,5% m/v)/20°C. Ensaio 1: Extrato de erva mate (0,5% m/v) /20°C. Ensaio 2: Extrato de erva mate (1,0% m/v)/20°C. Ensaio 3: Extrato de erva mate (0,5% m/v)/30°C. Ensaio 4: Extrato de erva mate (1,0% m/v)/30°C. Ensaio 5: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C. Ensaio 6: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C. Ensaio 7: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C.

Na Tabela 9 podemos observar que a média da capacidade antioxidante entre os 7 ensaios, pelo método de DPPH aumentou em até 3,7% após 12 d de fermentação em comparação ao período inicial (tempo 0).

Para verificar a influência das condições de fermentação na atividade antioxidante da kombucha de erva mate, foi realizada a análise estatística utilizando os resultados no 12º dia de fermentação. Com os resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão para a resposta capacidade de sequestro do radical pelo método de DPPH (%), apresentados na Tabela 13, onde se pode observar que o coeficiente de determinação (R^2) no valor de 99,9% indicou uma resposta preditiva e satisfatória da regressão efetuada.

A partir do tratamento dos dados, pode-se concluir que o aumento na concentração do extrato de erva mate de 0,5 para 1,0% ocasionou aumento na atividade antioxidante de 39,47% (APÊNDICE - Tabela AP 7). Foi possível construir o modelo matemático empírico para estimativa da atividade antioxidante, apresentado na Equação 4, onde C é a concentração do extrato de erva mate utilizado no meio de cultivo (%).

$$\text{Atividade antioxidante (DPPH)} = 60,0286 + 19,7375 C \quad (4)$$

Tabela 10 - Análise de variância para capacidade de sequestro do radical DPPH em kombucha de erva mate após 12 dias de fermentação

Variação	Graus de liberdade	Soma quadrática	Quadrado das médias	F calculado
Regressão	3	1558,42	519,47	583,67
Resíduo	3	2,69	0,89	
Total	6	1561,12		

F tabelado = 9,28

A Tabela 10 apresenta os resultados da análise de variância (ANOVA). Como pode-se observar, o valor de F calculado foi maior que o F tabelado, demonstrando que o modelo se ajusta aos dados experimentais. Logo, podemos considerar a resposta satisfatória e o modelo estatístico preditivo.

Tabela 11 - Valores experimentais e valores estimados de atividade antioxidante por DPPH (%) em kombucha de erva mate no 12º dia de fermentação

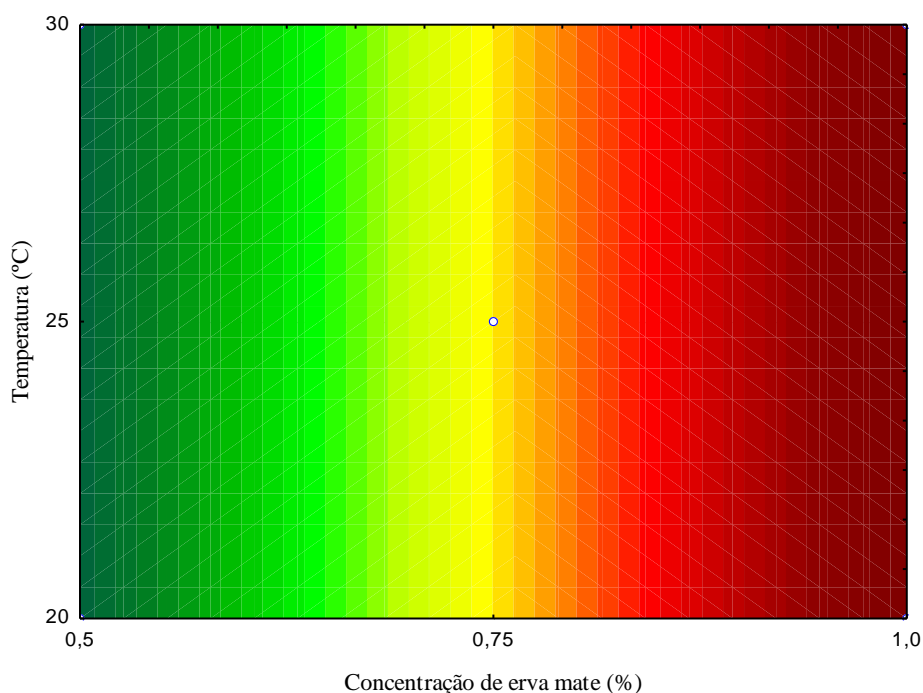
Ensaio	Experimental	Previsto	Desvio relativo (%)
1	40,1	40,5	-0,9
2	79,3	79,9	-0,8
3	39,4	40,1	-1,6
4	79,2	79,6	-0,5
5	60,4	60,0	0,6
6	60,7	60,0	1,1
7	61,1	60,0	1,7

DPPH: Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

A Tabela 11 apresenta os valores de atividade antioxidante obtidos pelo método de DPPH nos ensaios, comparando com os valores previstos pelo modelo (equação 4) e os desvios. Como observado, os desvios relativos apresentaram valores baixos, na faixa entre 0,5 e 1,7%.

Com base no modelo previsto na Equação 4, foi possível obter a superfície de resposta, conforme a Figura 8.

Figura 8 - Curva de contorno para capacidade de sequestro do radical livre DPPH em kombucha de erva mate



Analisando a superfície de resposta, podemos verificar que a capacidade de sequestro do radical DPPH é maior quanto maiores as concentrações de erva mate. Quando a concentração de erva mate é aumentada, a atividade antioxidante da kombucha de erva mate é maior. É possível observar claramente que a temperatura não exerce efeito sobre a atividade antioxidante da bebida.

5.3.2 Atividade antioxidante *in vitro* obtida pelo método de captura do radical 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazilina-6-ácido sulfônico (ABTS⁺)

Os resultados da atividade antioxidante, medidos através da capacidade de captura do radical ABTS⁺, em kombucha de erva mate fermentada a partir de diferentes concentrações de extrato e temperaturas estão apresentados na Tabela 12.

É possível observar que as capacidades de captura do radical ABTS⁺, são mais elevadas nas maiores concentrações de erva mate e que após o período de fermentação, a atividade antioxidante aumentou entre 16,2% e 31,3%. Este efeito também foi observado em outros estudos como de Ayed, Abid e Hamdi (2017) que obtiveram aumento na atividade

antioxidante de 38,1% pelo método e Chakravorty et al. (2016) de 38,4%, em kombucha de chá preto fermentado por 21 dias.

Tabela 12 - Capacidade de captura do radical livre ABTS+ (%) em kombucha de erva mate (ensaio 1 a 7) e chá verde (controle) durante a fermentação

Ensaio	Tempo (dias)			
	0	4	8	12
Controle	32,8±0,5 ^{dD}	34,3±0,3 ^{dC}	37,4±0,7 ^{cB}	39,3±0,5 ^{dA}
1	25,9±0,7 ^{eD}	27,7±0,7 ^{eC}	30,7±0,4 ^{dB}	32,8±0,7 ^{eA}
2	58,8±1,2 ^{bB}	61,9±1,4 ^{bB}	66,7±1,3 ^{aA}	68,3±1,0 ^{bA}
3	25,9±0,1 ^{eC}	27,8±0,6 ^{eC}	31,5±1,3 ^{dB}	34,0±0,3 ^{eA}
4	63,1±2,6 ^{aC}	67,4±1,5 ^{aBC}	68,7±1,1 ^{aB}	74,0±0,9 ^{aA}
5	42,4±0,8 ^{eD}	45,0±0,3 ^{eC}	49,4±0,9 ^{bB}	51,9±0,9 ^{eA}
6	41,3±1,1 ^{eD}	44,5±0,8 ^{eC}	49,4±0,6 ^{bB}	52,2±0,3 ^{eA}
7	40,9±1,0 ^{eD}	44,6±1,4 ^{eC}	49,7±0,9 ^{bB}	52,4±0,3 ^{eA}

Os resultados de atividade antioxidante são expressos como média e desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre as amostras estudadas. Controle: Chá verde (0,5% m/v)/20°C. Ensaio 1: Extrato de erva mate (0,5% m/v)/20°C. Ensaio 2: Extrato de erva mate (1,0% m/v)/20°C. Ensaio 3: Extrato de erva mate (0,5% m/v)/30°C. Ensaio 4: Extrato de erva mate (1,0% m/v)/30°C. Ensaio 5: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C. Ensaio 6: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C. Ensaio 7: Extrato de erva mate (0,75% m/v)/25°C.

A análise estatística para verificar as condições de fermentação que mais influenciaram na atividade antioxidante, foi realizada utilizando os resultados do 12º dia de fermentação.

A análise do efeito das variáveis (APÊNDICE - Tabela AP 8) mostrou que o aumento na concentração de erva mate de 0,5 para 1,0%, apresentou aumento na atividade antioxidante pelo método de captura do radical ABTS⁺ de 35,70%. A temperatura de fermentação exerceu aumento de 1,44% na faixa de 20 a 30°C, e a interação entre as variáveis concentração e temperatura foi 0,27%.

A Equação 5 descreve o modelo parametrizado da atividade antioxidante em função das variáveis codificadas. Onde C é a concentração do extrato de erva mate utilizado no meio de cultivo (%) e T, a temperatura de fermentação (°C).

$$\text{ABTS (\%)} = 52,25 + 18,85 C + 1,72 T + 1,14 C T \quad (5)$$

Tabela 13 - Análise de variância para atividade antioxidante pelo método de ABTS em kombucha de erva mate

Varição	Graus de liberdade	Soma quadrática	Quadrado das médias	F calculado
Regressão	1	1421,67	1421,67	28205,68
Resíduo	3	0,15	0,05	
Total	6	1438,79		

F tabelado = 9,28. ABTS: radical 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico

Na Tabela 13 se apresentam os resultados da análise de variância (ANOVA), onde o F calculado foi maior que o F tabelado, o modelo se ajusta aos dados experimentais. Logo, podemos considerar a resposta satisfatória e o modelo estatístico preditivo.

Tabela 14 - Valores experimentais e valores estimados de atividade antioxidante pelo método de ABTS (%) em kombucha de erva mate

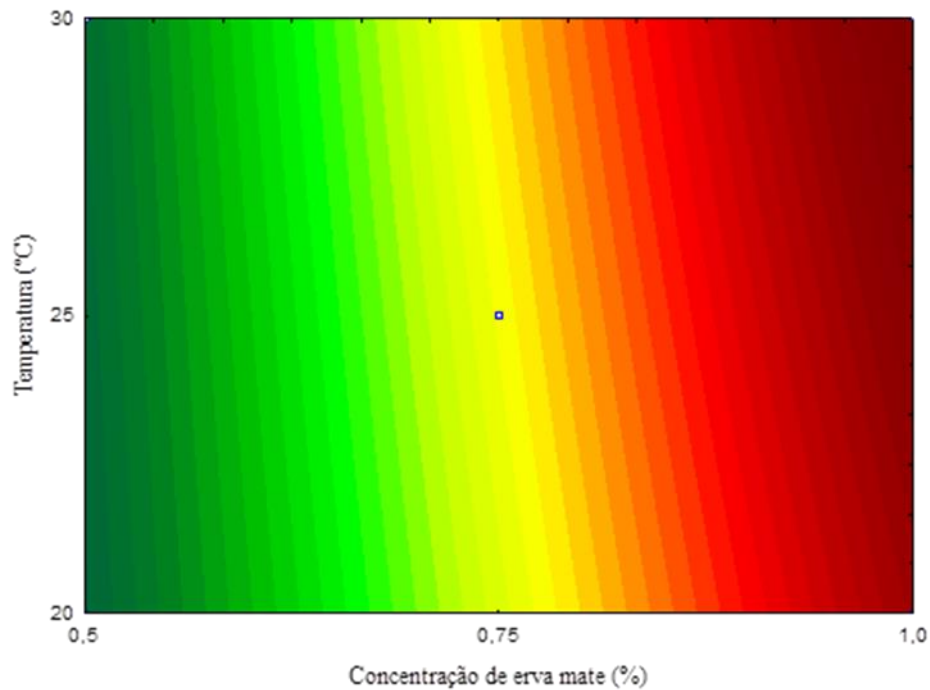
Ensaio	Experimental	Previsto	Desvio relativo (%)
1	32,9	32,8	0,1
2	68,3	68,2	0,1
3	34,0	33,9	0,1
4	74,0	73,9	0,0
5	51,9	52,2	-0,6
6	52,2	52,2	-0,1
7	52,4	52,2	0,4

ABTS: radical 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico

A Tabela 14 apresenta os valores de atividade antioxidante pelo método de ABTS dos ensaios, comparando com os valores previstos pelo modelo (equação 5) e os desvios. É possível observar que os desvios foram baixos, ficando entre 0,07 e 3,22%.

Analisando a curva de contorno podemos verificar que a capacidade de captura do radical ABTS⁺ é maior, conforme aumenta a concentração de erva mate, sendo a região próxima a concentração de 1% a que apresenta maior atividade antioxidante. O efeito positivo gerado pelo aumento da temperatura pode ser observado, mostrando que a variável exerce influência sobre a atividade antioxidante.

Figura 9 - Curva de contorno obtida para o método de captura do radical ABTS+ em kombucha de erva mate



5.4 BIOATIVIDADE *IN VIVO* EM KOMBUCHA

5.4.1 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana da kombucha foi investigada para os ensaios que apresentaram as melhores atividade antioxidante (Ensaio 2 e 4) e para o controle (chá verde). A Tabela 15 apresenta os resultados para atividade antibacteriana pelo teste de disco difusão.

Uma zona de inibição clara do crescimento foi observada, e os extratos fermentados apresentaram atividade frente a bactérias Gram positivas (G^+) e Gram negativas (G^-). De acordo com Bhattacharya et al. (2016) o efeito antibacteriano da kombucha se deve não somente a presença de ácidos orgânicos, mas também a outros compostos bioativos ou metabólitos sintetizados biologicamente durante a fermentação, tal como polifenóis, bacteriocinas e enzimas.

Para a atividade antibacteriana utilizando o micro-organismo *Staphylococcus aureus* (G^+), o ensaio 4 e o controle apresentaram os maiores diâmetros de halos, e não diferiram estatisticamente entre si a um nível de significância de 95%, ou seja, a kombucha de erva mate possui atividade antibacteriana igual à da kombucha de chá verde quando utilizada uma

concentração de 1% de erva mate. Apesar de a concentração de compostos fenólicos totais na kombucha de chá verde ser inferior à dos ensaios 2 e 4. Segundo autores como Bhattacharya et al. (2016) e Zubaidah et al. (2017), dentre os compostos fenólicos presentes no chá verde estão as catequinas, que são potentes agentes antimicrobianos contra bactérias patogênicas.

Tabela 15 - Atividade antibacteriana em kombucha de erva mate e de chá verde (controle)

Micro-organismos	Amostras	Diâmetro (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Controle	4,83±0,41 ^a
	Ensaio 2	2,67±0,52 ^b
	Ensaio 4	4,50±0,55 ^a
<i>Escherichia coli</i>	Controle	2,33±0,52 ^c
	Ensaio 2	4,00±0,00 ^b
	Ensaio 4	4,50±0,55 ^a

Os diâmetros dos halos de inibição são expressos como média e desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras. Ensaio 2: kombucha de erva mate (1% p/v) fermentada a 20°C. Ensaio 4: kombucha de erva mate (1% p/v) fermentada a 30°C. Controle: kombucha de chá verde (0,5% p/v) fermentada a 20°C

O ensaio 4 apresentou melhor resultado de inibição em relação a bactéria *Escherichia coli* (G⁻), seguido do controle e do ensaio 2, sendo a atividade antibacteriana proporcional a concentração de compostos fenólicos totais. Os resultados obtidos foram estatisticamente iguais aos observados na atividade antibacteriana frente a bactérias Gram positivas. Diferentemente de autores como Ayed et al. (2017) e Zubaidah et al. (2018a) que obtiveram melhor atividade antibacteriana contra cepas Gram positivas.

Ácidos orgânicos como o ácido acético, são usados na conservação de alimentos. Sua ação é multifatorial e inclui a capacidade do ácido não dissociado se difundir através de bicamadas lipídicas e liberar prótons no citoplasma, diminuindo o pH citoplasmático. A acidificação do citoplasma bacteriano pode impedir o crescimento por inibição da glicólise, redução de transporte ativo ou interferência na transdução de sinal (TU et al., 2019).

Segundo autores como Ayed, Abid e Hamdi (2017), a atividade antibacteriana da kombucha é principalmente atribuída a presença de ácido acético, no entanto, segundo Bhattacharya et al. (2018) compostos fenólicos também exercem efeito na inibição do crescimento microbiano. Em estudo realizado por Vitas et al. (2019), a kombucha de soro do tofu neutralizada apresentou atividade antibacteriana frente a bactérias Gram⁺ e Gram⁻, sendo

apenas 39,3% e 41,0%, respectivamente, menor que a kombucha não neutralizada, esses resultados mostram que o papel dos compostos bioativos não são negligenciáveis, apresentando efeito significativo na inibição do crescimento bacteriano.

De acordo com Daglia (2012), os polifenóis apresentam potente atividade antimicrobiana contra várias bactérias Gram⁻ e Gram⁺, devido a diferentes mecanismos de ação, sendo o efeito agregativo sobre as células bacterianas o mais convincente. Os agentes antibacterianos, segundo Reygaert (2014) em geral, atuam sobre os micro-organismos através de quatro principais mecanismos: inibição da síntese da parede celular, inibindo a síntese proteica, inibição da síntese de ácidos nucleicos ou inibindo processos metabólicos.

Como observado neste estudo, a atividade antibacteriana da kombucha de chá verde e de erva mate testada em duas concentrações, apresentou tamanhos de halo diferentes para bactérias Gram⁻ e Gram⁺. Isto pode ser atribuído à diferentes perfis de compostos fenólicos presentes em cada infusão, segundo Daglia (2012), flavonoides apresentam atividade antibacteriana superior à dos não flavonoides.

Lu et al. (2018) correlacionaram a composição fenólica com a atividade antibacteriana de extratos e frações da planta *Cryptaenia japônica* Hassk. Foram utilizados quatro métodos de extração (assistida por micro-ondas, assistida por enzimas, refluxo a quente e banho maria) e as frações foram obtidas utilizando diferentes solventes (éter de petróleo, acetato de etila, álcool n-butílico e água). Sendo testados frente as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e estreptococo β-hemolítico. As frações obtidas utilizando acetato de etila e álcool n-butílico apresentaram atividade antibacteriana superior quando comparada aos demais extratos e frações. Esta atividade foi associada a presença de compostos como luteolina, apigenina, ácido gálico, ácido ferúlico e ácido p-cumárico.

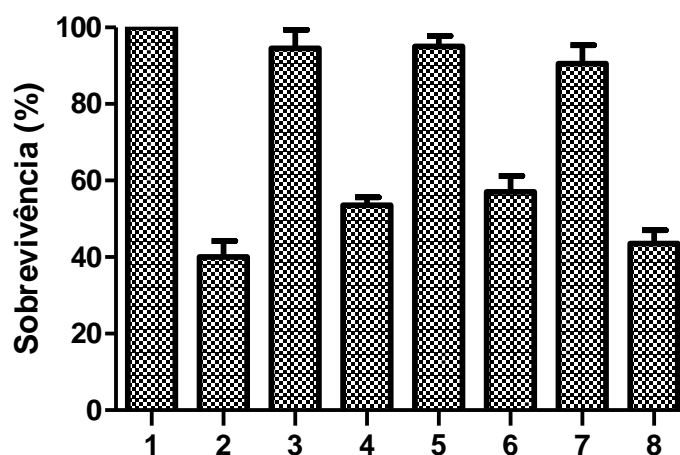
A constituição da parede celular de bactérias Gram⁺ e Gram⁻ são distintas, os flavonoides apresentam efeito menor sobre bactérias Gram⁻, pois a membrana celular superficial é carregada negativamente, concordando com o afirmado por Reygaert (2014).

5.4.2 Atividade antioxidante *in vivo*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo unicelular que pode ser usado para estudo básico da biologia celular eucariótica e ajudar a entender a resposta celular ao estresse oxidativo e sistemas de defesa antioxidantes (MENG et al., 2017). Para analisar a capacidade da kombucha de erva mate proteger as células de *S. cerevisiae* contra danos

induzidos pelo peróxido de hidrogênio - H_2O_2 (agente estressor) a taxa de sobrevivência foi determinada na presença de kombucha como quimioprotetor (antioxidante externo). A Figura 10 apresenta os resultados para as taxas de sobrevivência para os diferentes tratamentos estudados.

Figura 10 - Taxa de sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* nos ensaios tratados com kombucha de erva mate e chá verde em presença e ausência do agente oxidante (H_2O_2) e no controle



H_2O_2 : peróxido de hidrogênio. Ensaio 2: kombucha de erva mate (1% m/v) fermentada a 20 °C. Ensaio 4: kombucha de erva mate (1% m/v) fermentada a 30 °C. Controlechá verde: kombucha de chá verde (0,5% m/v) fermentada a 20 °C. 1: Controle (levedura sem agente oxidante e antioxidante. 2: Levedura e H_2O_2 . 3: Levedura e kombucha (Ensaio 2). 4: Levedura, kombucha (Ensaio 2) e H_2O_2 . 5: Levedura e kombucha (Ensaio 4). 6: Levedura, kombucha (Ensaio 4) e H_2O_2 . 7: Levedura e kombucha (Controlechá verde). 8: Levedura, kombucha (Controlechá verde) e H_2O_2 .

O aumento da taxa de sobrevivência ao tratamento sugere atividade protetora frente ao H_2O_2 , e a diminuição da taxa de sobrevivência um efeito deletério sobre a levedura. Como observado, as células de levedura apresentaram sensibilidade para H_2O_2 , uma vez que apenas 40% foram capazes de sobreviver após exposição à ação do H_2O_2 . O número de unidades formadoras de colônia do controle (1) representa 100% de sobrevivência, pois não teve influência dos agentes estressor e antioxidante. Os extratos fermentados também foram testados para verificar se apresentariam toxicidade as leveduras. Como observado na Figura 10, o mesmo não foi verificado, ou seja, a adição dos extratos fermentados não apresentou diferença estatística significativa em relação ao controle. Como observado, a kombucha preveniu o dano oxidativo ocasionado pelo peróxido de hidrogênio. Nos ensaios utilizando kombucha de erva

mate a 0,5%, 1,0% e chá verde a 0,5%, a taxa de sobrevivência foi superior ao ensaio onde foi utilizado somente o agente estressor sobre a solução microbiana. Isso se deve ao conteúdo fenólico das bebidas que apresenta atividade antioxidante, conforme determinado neste trabalho.

Estes resultados estão de acordo com Baroni et al. (2012), que testaram amostras de vinho das variedades Cabernet Sauvignon, Malbec e Syrah, obtendo aumento na taxa de sobrevivência de 26%, 16% e 13%, respectivamente, em relação à levedura exposta ao peróxido de hidrogênio. Segundo os autores, os polifenóis podem eliminar radicais livres estáveis por redução via transferência de elétrons ou por transferência de hidrogênio de grupos hidroxila em anéis aromáticos. A capacidade antioxidante observada nos sistemas vivos, resulta de interações sinérgicas e antagônicas entre os diferentes polifenóis, modificando sua capacidade antioxidante. A eficácia dos antioxidantes depende também, de fatores como a energia necessária para permitir a dissociação de ligações entre o oxigênio e o hidrogênio fenólico, do pH, do potencial de redução, da solubilidade, da estrutura estereoquímica e da deslocalização dos radicais antioxidantes.

Os resultados encontrados neste trabalho também condizem com os estudos realizados por Naranjo et al. (2016) que obtiveram aumento de 52% na taxa de sobrevivência da levedura testando extratos de tomate utilizando a mesma metodologia. A avaliação de compostos antioxidantes naturais testados por modelos biológicos ajudam na confirmação da potencial atividade antioxidante testada anteriormente por técnicas *in vitro*.

6 CONCLUSÕES

Foi obtida kombucha de erva mate (*Ilex paraguariensis*) utilizando a cultura simbiótica de bactérias e leveduras e suas características físicas, químicas e biológicas foram avaliadas nas condições propostas.

A kombucha de erva mate apresentou maior concentração de CFT e atividade antioxidante em relação ao período inicial (tempo 0). Os ensaios 2 (1% de erva mate e 20°C) e 4 (1% de erva mate e 30°C) apresentaram maior concentração de CFT e, conseqüentemente, maior atividade antioxidante.

As kombuchas de erva mate (ensaios 2 e 4) apresentaram atividade antibacteriana, sendo eficazes na inibição do crescimento das cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, bem como, inibiram o estresse oxidativo *in vivo* utilizando o micro-organismo *Saccharomyces cerevisiae*, sendo capazes de aumentar a taxa de sobrevivência da levedura frente H₂O₂ como agente estressor.

SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar o acompanhamento do teor de etanol produzido nas amostras de bebida durante a fermentação.
- Identificar ácidos orgânicos formados e perfil de compostos bioativos presentes.
- Realizar análise sensorial da bebida produzida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUJAH, C.I.; OGBONNA, A.C.; OSUJI, C.M. Functional components and medicinal properties of food: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 5, p. 2522–2529, 2015.
- ADEWUMI, G.A. Health-promoting fermented foods. **Encyclopedia of Food Chemistry**, v. 1, p. 399–418, 2018.
- ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I. Fermented foods: composition and health effects. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 649–655, 2015.
- AYED, L.; ABID, S. BEN; HAMDI, M. Development of a beverage from red grape juice fermented with the kombucha consortium. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 111–121, 2017.
- BARONI, M.V.; DI PAOLA NARANJO, R.D.; GARCÍA-FERREYRA, C.; OTAIZA, S.; WUNDERLIN, D.A. How good antioxidant is the red wine? Comparison of some *in vitro* and *in vivo* methods to assess the antioxidant capacity of Argentinean red wines. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 1–7, 2012.
- BASTOS, D. H. M.; TORRES, E. A. F. S. Bebidas a base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e saúde pública. **Nutrire**, v. 26, p. 77–89, 2003.
- BATTIKH, H.; BAKHROUF, A.; AMMAR, E. Antimicrobial effect of kombucha analogues. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 71–77, 2012.
- BHATTACHARYA, D.; BHATTACHARYA, S.; PATRA, M. M.; CHAKRAVORTY, S.; SARKAR, S.; CHAKRABORTY, W.; KOLEY, H.; GACHHUI, R. Antibacterial activity of polyphenolic fraction of kombucha against enteric bacterial pathogens. **Current Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 885–896, 2016.
- BHATTACHARYA, D.; GHOSH, D.; BHATTACHARYA, S.; SARKAR, S.; KARMAKAR, P.; KOLEY, H.; GACHHUI, R. Antibacterial activity of polyphenolic fraction of kombucha against *Vibrio cholerae*: targeting cell membrane. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 145–152, 2018.
- BHATTACHARYA, S.; GACHHUI, R.; SIL, P. C. Hepatoprotective properties of kombucha tea against TBHP-induced oxidative stress via suppression of mitochondria dependent apoptosis. **Pathophysiology**, v. 18, n. 3, p. 221–234, 2011.
- BORTOLI, P.M.; ALVES, C.; COSTA, E.; VANIN, A.P.; SOFIATTI, J. R.; SIQUEIRA, D. P.; DALLAGO, R.M.; TREICHEL, H.; VARGAS, G.D.L.P.; KAIZER, R.R. *Ilex paraguariensis*: Potential antioxidant on aluminium toxicity, in an experimental model of Alzheimer's disease. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 181, n. September 2017, p. 104–110, 2018.

BRAGHINI, F.; GIANE DE CARLI, C.; BONSAGLIA, B.; FRANCISCO, J.; SANTOS, D.; JUNIOR, S.; FRANCIELLY DE OLIVEIRA, D.; TRAMUJAS, J.; BENEDETTI, I. Composição físico-química de Erva-mate, Antes e Após Simulação do Chimarrão. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 20, n. 1/2, p. 7–15, 2014.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução n° 18, de 30 de abril de 1999. Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 03 mai. 1999, 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução n° 19, de 30 de abril de 1999. Regulamento de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 03 mai. 1999, 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n°12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan. 2001. .

BRASIL. Decreto n° 6.871 de 4 de junho 2009. Regulamenta a Lei n° 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 04 jun. 2009.

BRASIL. Portaria n° 64, de 14 de maio de 2018. **Diário oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 21 jun. 2018.

JUNIOR, E. L.C.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health - A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440–454, 2016.

ČETOJEVIĆ-SIMIN, D.D.; VELIĆANSKI, A.S.; CVETKOVIĆ, D.D.; MARKOV, S.L.; MRDANOVIĆ, J.Ž.; BOGDANOVIĆ, V.V.; ŠOLAJIĆ, S.V. Bioactivity of *Lemon Balm* Kombucha. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 5, p. 1756–1765, 2012.

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

CLSI; NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. **NCCLS: Pennsylvania**, p. 1887–1898, 2003.

CÖMERT, E.D.; GÖKMEN, V. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. **Food Research International**, v. 105, p. 76–93, 2018.

CORREA, V.G.; GONÇALVES, G.A.; DE SÁ-NAKANISHI, A.B.; FERREIRA, I.C.F.R.; BARROS, L.; DIAS, M.I.; KOEHNLEIN, E.A.; DE SOUZA, C.G.M.; BRACHT, A.; PERALTA, R.M. Effects of in vitro digestion and in vitro colonic fermentation on stability and functional properties of mate herb (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) beverages. **Food Chemistry**, v. 237, p. 453–460, 2017.

COSTA, T.; JORGE, N. Compostos bioativos benéficos presentes em castanhas e nozes beneficial bioactive compounds present in nuts and walnuts. **Ciência Biológica e da Saúde**, v. 13, n. 3, p. 195–203, 2011.

COTON, M.; PAWTOWSKI, A.; TAMINIAU, B.; BURGAUD, G.; DENIEL, F.; COULLOUMME-LABARTHE, L.; FALL, A.; DAUBE, G.; COTON, E. Unraveling microbial ecology of industrial-scale kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 5, p. 1–16, 2017.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174–181, 2012.

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

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

EBERSOLE, B.; LIU, Y.; SCHMIDT, R.; ECKERT, M.; BROWN, P.N. Determination of ethanol in Kombucha products: Single-laboratory validation. **Journal of AOAC International**, v. 100, n. 3, p. 732–736, 2017.

ESMELINDRO, M.C.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D. Caracterização físico-química da erva mate: Influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 199–204, 2002.

FDA, U. S. Labeling of Certain Beers Subject to the Labeling Jurisdiction of the Food and Drug Administration Guidance for Industry. **Food and Drug Administration**, 2014.

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**, v. 102, p. 690–699, 2017.

GAVA, A.J.; SILVA, C.A.B.; FRIAS, J.R.G. **Tecnologia de alimentos: princípios e**

aplicações. São Paulo: Nobel, 2008. 511 p. ISBN 978-85-213-1382-3.

GRUBE, M.; SHVIRKSTS, K.; DENINA, I.; RUKLISA, M.; SEMJONOV, P. Fourier-transform infrared spectroscopic analyses of cellulose from different bacterial cultivations using microspectroscopy and a high-throughput screening device. **Vibrational Spectroscopy**, v. 84, p. 53–57, 2016.

HRNJEZ, D.; VAŠTAG; MILANOVIĆ, S.; VUKIĆ, V.; ILIČIĆ, M.; POPOVIĆ, L.; KANURIĆ, K. The biological activity of fermented dairy products obtained by kombucha and conventional starter cultures during storage. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 336–345, 2014.

JAYABALAN, R.; MALBAŠA, R.V.; LONČAR, E.S.; VITAS, J.S.; SATHISHKUMAR, M. A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 538–550, 2014.

KANURIĆ, K.G.; MILANOVIĆ, S.D.; IKONIĆ, B.B.; LONČAR, E.S.; ILIČIĆ, M.D.; VUKIĆ, V.R.; VUKIĆ, D.V. Kinetics of lactose fermentation in milk with kombucha starter. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 4, p. 1229–1234, 2018.

KAPP, J.M.; SUMNER, W. Kombucha: A systematic review of the empirical evidence of human health benefit. **Annals of Epidemiology**, p. 4–8, 2018.

KUNDEL, P.T.A.N.; CORREA, V.G.; CORRÊA, R.C.G.; PERALTA, R.A.; SOKOVIĆ, M.; CALHELHA, R.C.; BRACHT, A.; FERREIRA, I.C.F.R.; PERALTA, R.M. Antioxidant and antimicrobial activities of a purified polysaccharide from mate herb (*Ilex paraguariensis*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 1161–1167, 2018.

LEHNHARDT, F.; LIANG, D.; CHEN, Q.; TOCMO, R.; RYCHLIK, M.; HUANG, D. Effects of S-allyl glutathione disulphide and vinyl-dithiin isomers from garlic on the chronological lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 650–657, 2017.

LI, L.; TAN, J.; MIAO, Y.; LEI, P.; ZHANG, Q. ROS and autophagy: Interactions and molecular regulatory mechanisms. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 35, n. 5, p. 615–621, 2015.

LOBO, R.O.; DIAS, F.O.; SHENOY, C.K. Kombucha for healthy living: Evaluation of antioxidant potential and bioactive compounds. **International Food Research Journal**, v. 24, n. 2, p. 541–546, 2017.

LU, J.; FU, X.; LIU, T.; ZHENG, Y.; CHEN, J.; LUO, F. Phenolic composition, antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory activities of leaf and stem extracts from *Cryptotaenia japonica* Hassk. **Industrial Crops & Products**, v. 122, p. 522–532, 2018.

MARCO, M.L.; HEENEY, D.; BINDA, S.; CIFELLI, C.J.; COTTER, P.D.; FOLIGNÉ, B.;

GÄNZLE, M.; KORT, R.; PASIN, G.; PIHLANTO, A.; SMID, E.J.; HUTKINS, R. Health benefits of fermented foods: Microbiota and beyond. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 44, p. 94–102, 2017.

MARSHCO, M.L.; HEENEY, D.; BINDA, S.; CIFELLI, C.J.; COTTER, P.D.; FOLIGNÉ, B.; GÄNZLE, M.; KORT, R.; PASIN, G.; PIHLANTO, A.; SMID, E.J.; HUTKINS, R. Health benefits of fermented foods: Microbiota and beyond. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 44, p. 94–102, 2017.

MENG, D.; ZHANG, P.; LI, S.; HO, C.T.; ZHAO, H. Antioxidant activity evaluation of dietary phytochemicals using *Saccharomyces cerevisiae* as a model. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 36–44, 2017.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31, n. 3, 426–428, 1959.

NARANJO, R.D.P.; OTAIZA, S.; SARAGUSTI, A.C.; BARONI, V.; CARRANZA, A.D.V.; PERALTA, I.E.; VALLE, E.M.; CARRARI, F.; ASIS, R. Hydrophilic antioxidants from *Andean tomato* landraces assessed by bioactivities *in vitro* and *in vivo*. **Food Chemistry**, v. 206, p. 146–155, 2016.

NASCIMENTO, A. A. Elaboração De Bebida Fermentada De Erva Mate (*Ilex Paraguariensis*). p. 47, 2013.

NUMMER, B.A. Kombucha brewing under the Food and Drug Administration model food code: Risk analysis and processing guidance abstract. **Journal of Environmental Health**, v. 76, n. 4, p. 8–12, 2013.

PANGHAL, A.; JANGHU, S.; VIRKAR, K.; GAT, Y.; KUMAR, V.; CHHIKARA, N. Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach. **Food Bioscience**, v. 21, n. October 2017, p. 80–89, 2018.

PEREIRA, A.L.F.; FEITOSA, W.S.C.; ABREU, V.K.G.; LEMOS, T.O.; GOMES, W.F.; NARAIN, N.; RODRIGUES, S. Impact of fermentation conditions on the quality and sensory properties of a probiotic cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) beverage. **Food Research International**, v. 100, p. 603–611, 2017.

RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231–1237, 1999.

RECHARLA, N.; RIAZ, M.; KO, S.; PARK, S. Novel technologies to enhance solubility of food-derived bioactive compounds: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 39, p. 63–73, 2017.

REYGAERT, W.C. The antimicrobial possibilities of green tea. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. August, p. 1–8, 2014.

RIACHI, L.G.; DE MARIA, C.A.B. Mate herb: An overview of physiological effects in humans. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 308–320, 2017.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 3. ed. São Paulo: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014.

SAICHANA, N.; MATSUSHITA, K.; ADACHI, O.; FRÉBORT, I.; FREBORTOVA, J. Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1260–1271, 2015.

SALAFZON, S.; MAHMOODZADEH HOSSEINI, H.; HALABIAN, R. Evaluation of the antioxidant impact of ginger-based kombucha on the murine breast cancer model. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2018.

SCHERZ-SHOVAL, R.; SHVETS, E.; FASS, E.; SHORER, H.; GIL, L.; ELAZAR, Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. **European Molecular Biology Organization**, v. 26, n. 1, p. 1749–1760, 2007.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.; SILVEIRA, N.; TNIWAKI, M.; SANTOS, R.; GOMES, R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2007. 536 p. ISBN-13: 978-8521212256 536

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

SRIHARI, T.; ARUNKUMAR, R.; ARUNAKARAN, J.; SATYANARAYANA, U. Downregulation of signalling molecules involved in angiogenesis of prostate cancer cell line (PC-3) by kombucha (lyophilized). **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 3, n. 1, p. 53–58, 2013b.

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

TU, C.; TANG, S.; AZI, F.; HU, W.; DONG, M. Use of kombucha consortium to transform soy whey into a novel functional beverage. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 81–89, 2019.

UNITED STATES CODE, U.S.C. Laws and Regulations under the Federal Alcohol Administration Act and Other Related Provisions of Title 27. **Alcohol and Tobacco Tax and Trade (TTB)**, 2007, 190 p.

VÁZQUEZ-CABRAL, B.D.; LARROSA-PÉREZ, M.; GALLEGOS-INFANTE, J.A.; MORENO-JIMÉNEZ, M.R.; GONZÁLEZ-LAREDO, R.F.; RUTIAGA-QUIÑONES, J.G.; GAMBOA-GÓMEZ, C.I.; ROCHA-GUZMÁN, N.E. Oak kombucha protects against oxidative stress and inflammatory processes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 272, p. 1–

9, 2017.

VELIĆANSKI, A.S.; CVETKOVIĆ, D.D.; MARKOV, S.L.; TUMBAS ŠAPONJAC, V.T.; VULIĆ, J.J. Antioxidant and antibacterial activity of the beverage obtained by fermentation of sweetened lemon balm (*Melissa officinalis* L.) tea with symbiotic consortium of bacteria and yeasts. **Food Technology and Biotechnology**, v. 52, n. 4, p. 420–429, 2014.

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

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**, v. 44, p. 95–102, 2018.

WANG, Q.; HUANG, Y.; QIN, C.; LIANG, M.; MAO, X.; LI, S.; ZOU, Y.; JIA, W.; LI, H.; MA, C.W.; HUANG, Z. Bioactive peptides from *Angelica sinensis* protein hydrolyzate delay denescence in *Caenorhabditis elegans* through antioxidant activities. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1–10, 2016.

ZENEON, O.; PASCUET, N.; TIGLEA, P. **Métodos físicos-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

ZUBAIDAH, E.; DEWANTARI, F.J.; NOVITASARI, F.R.; SRIANTA, I.; BLANC, P.J. Potential of snake fruit (*Salacca zalacca* (Gaerth.) Voss) for the development of a beverage through fermentation with the kombucha consortium. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, p. 198–203, 2017.

ZUBAIDAH, E.; AFGANI, C.A.; KALSUM, U.; SRIANTA, I.; BLANC, P.J. Comparison of *in vivo* antidiabetes activity of snake fruit kombucha, black tea kombucha and metformin. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 465–469, 2018.

APÊNDICES

Figura AP 1 - Curva padrão de glicose utilizada para determinação de açúcares redutores e açúcares redutores totais.

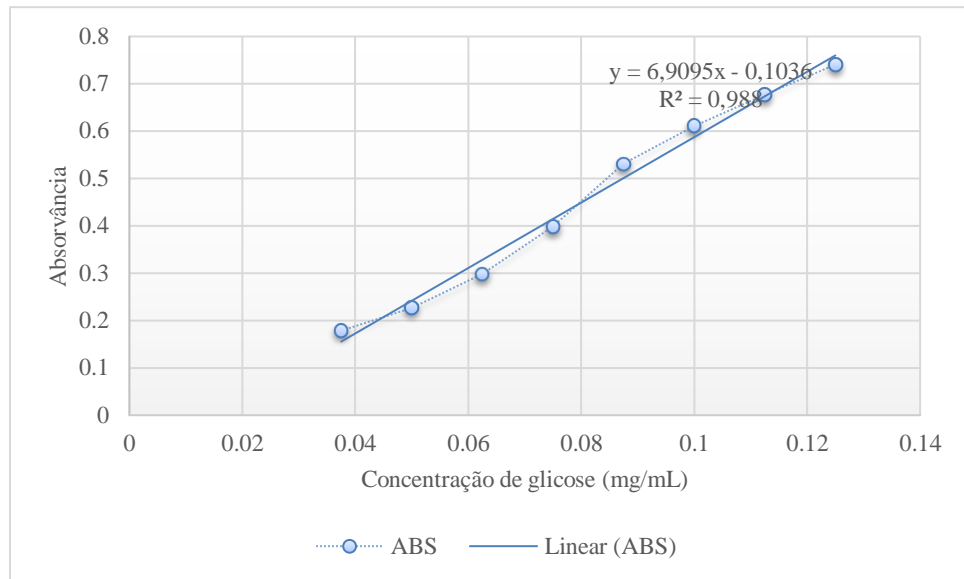


Figura AP 2 - Curva padrão de ácido gálico utilizada para determinação de compostos fenólicos totais.

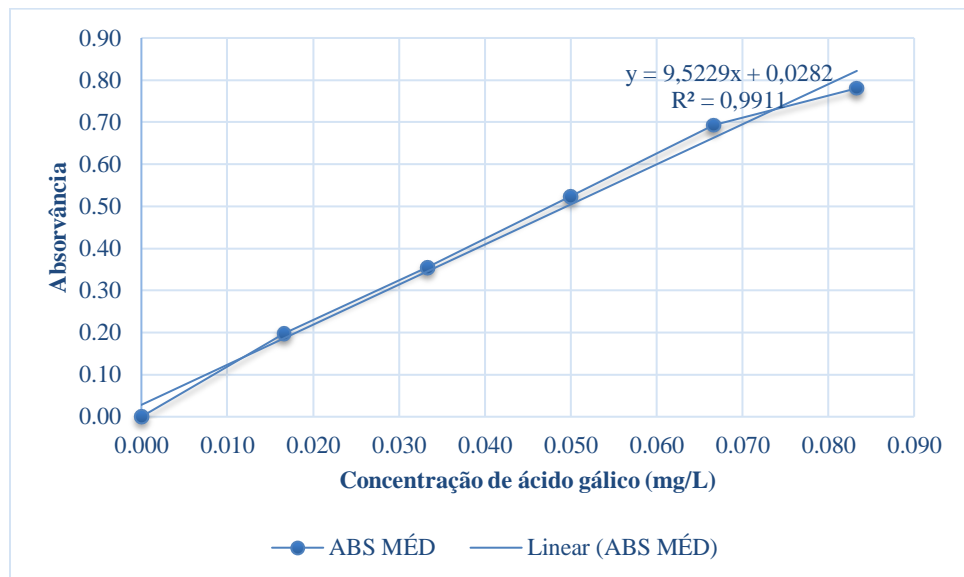


Tabela AP 1 - pH da kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e de chá verde (controle) durante o período de 12 dias de fermentação

Ensaio	Tempo (dias)			
	0	4	8	12
Controle	3,1±0,1 ^{bA}	3,0±0,1 ^{aB}	2,8±0,1 ^{aC}	2,3±0,1 ^{aD}
1	3,1±0,1 ^{bA}	2,9±0,1 ^{aB}	2,7±0,1 ^{abC}	2,2±0,1 ^{bcD}
2	3,6±0,1 ^{aA}	3,1±0,0 ^{aB}	2,7±0,1 ^{abC}	2,1±0,0 ^{cD}
3	3,2±0,1 ^{bA}	2,6±0,0 ^{bB}	2,5±0,0 ^{bC}	2,3±0,0 ^{abD}
4	3,6±0,1 ^{aA}	3,1±0,0 ^{aB}	2,6±0,1 ^{abC}	2,0±0,1 ^{cD}
5	3,1±0,1 ^{bA}	2,5±0,1 ^{bB}	2,2±0,1 ^{cB}	1,9±0,1 ^{dC}
6	3,0±0,2 ^{bA}	2,5±0,2 ^{bB}	2,2±0,2 ^{cB}	1,8±0,1 ^{dB}
7	3,1±0,1 ^{bA}	2,4±0,1 ^{bB}	2,1±0,1 ^{cC}	1,8±0,1 ^{dD}

Os resultados são expressos como média e desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre as amostras estudadas.

Tabela AP 2 - Acidez em g/L da kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e de chá verde (controle) durante o período de 12 dias de fermentação

Ensaio	Tempo (dias)			
	0	4	8	12
Controle	0,62±0,03 ^{bA}	1,17±0,06 ^{eB}	2,60±0,10 ^{cC}	4,83±0,06 ^{dD}
1	0,78±0,06 ^{aA}	1,54±0,07 ^{dB}	3,48±0,10 ^{bC}	5,13±0,03 ^{cdD}
2	0,81±0,03 ^{aA}	2,22±0,00 ^{bB}	3,96±0,06 ^{aC}	5,01±0,09 ^{cdD}
3	0,84±0,00 ^{aA}	1,92±0,00 ^{cB}	2,86±0,03 ^{cC}	5,57±0,06 ^{bD}
4	0,86±0,07 ^{aA}	2,80±0,03 ^{aB}	3,98±0,07 ^{aC}	6,03±0,06 ^{aD}
5	0,86±0,07 ^{aA}	1,12±0,03 ^{efB}	2,90±0,09 ^{cC}	5,16±0,24 ^{cC}
6	0,74±0,03 ^{abA}	1,04±0,03 ^{fB}	2,62±0,18 ^{cC}	4,88±0,12 ^{cdC}
7	0,80±0,03 ^{aA}	1,14±0,06 ^{efB}	2,76±0,16 ^{cC}	5,02±0,07 ^{cdD}

Os resultados são expressos como média e desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre as amostras estudadas.

Tabela AP 3 - Açúcares redutores totais em g/L da kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e de chá verde (controle) durante o período de 12 dias de fermentação

Ensaio	Tempo (dias)			
	0	4	8	12
Controle	45,41±0,56 ^{cA}	42,17±0,14 ^{aB}	33,30±0,07 ^{aC}	23,07±0,17 ^{aD}
1	45,75±0,57 ^{bcA}	41,67±0,05 ^{bB}	31,32±0,13 ^{bC}	22,19±0,04 ^{bD}
2	45,86±0,38 ^{bcA}	39,11±0,03 ^{fB}	29,79±0,14 ^{eC}	19,06±0,44 ^{cD}
3	45,45±0,13 ^{cA}	39,64±0,21 ^{eB}	29,42±0,07 ^{fC}	17,87±0,15 ^{dD}
4	45,43±0,30 ^{cA}	38,03±0,13 ^{gB}	28,66±0,08 ^{gC}	15,94±0,09 ^{eD}
5	46,32±0,30 ^{abA}	41,13±0,16 ^{dB}	30,18±0,07 ^{cdC}	22,43±0,18 ^{bD}
6	46,58±0,47 ^{aA}	41,38±0,04 ^{cdB}	-30,06±0,08 ^{dC}	22,21±0,13 ^{bD}
7	46,56±0,17 ^{aA}	41,36±0,19 ^{cb}	30,23±0,10 ^{cC}	22,27±0,19 ^{bD}

Os resultados são expressos como média e desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre as amostras estudadas.

Tabela AP 4 - Açúcares redutores em g/L da kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e de chá verde (controle) durante o período de 12 dias de fermentação

Ensaio	Tempo (dias)			
	0	4	8	12
Controle	9,41±0,08 ^{aB}	11,87±0,09 ^{aAB}	15,71±0,09 ^{bA}	11,95±0,22 ^{cAB}
1	9,65±0,63 ^{aD}	11,34±0,02 ^{bcC}	16,66±0,14 ^{aA}	13,42±0,03 ^{abB}
2	9,37±0,01 ^{aD}	9,79±0,19 ^{eC}	14,53±0,10 ^{cA}	11,73±0,02 ^{cb}
3	9,68±0,12 ^{aD}	10,70±0,06 ^{dC}	16,63±0,17 ^{abA}	13,31±0,13 ^{abB}
4	9,50±0,12 ^{aC}	9,23±0,11 ^{fC}	14,55±0,13 ^{cA}	11,63±0,14 ^{cb}
5	9,50±0,23 ^{aD}	10,91±0,27 ^{cdC}	16,76±0,39 ^{aA}	13,06±0,32 ^{bB}
6	9,60±0,06 ^{aD}	11,12±0,27 ^{bcdC}	16,34±0,74 ^{abA}	13,09±0,33 ^{bB}
7	9,70±0,07 ^{aD}	11,44±0,21 ^{abC}	16,16±0,34 ^{abA}	13,70±0,14 ^{ab}

Os resultados são expressos como média e desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre as amostras estudadas.

Tabela AP 5 - Variação na concentração de compostos fenólicos totais em kombucha de erva mate (ensaios 1 a 7) e no controle entre períodos da fermentação

Ensaio	Δ_{1-4}	Δ_{4-8}	Δ_{8-12}
Controle	20,58 ^{abB}	48,31 ^{aA}	8,19 ^{aB}
1	5,25 ^{baA}	13,86 ^{cdeA}	12,60 ^{aA}
2	17,43 ^{abA}	12,18 ^{deA}	27,31 ^{aA}
3	13,02 ^{abA}	9,03 ^{eA}	11,55 ^{aA}
4	19,53 ^{abB}	20,16 ^{bcdeB}	34,45 ^{aA}
5	15,96 ^{abB}	27,10 ^{baA}	12,81 ^{aB}
6	13,02 ^{abB}	26,04 ^{bcA}	8,40 ^{aB}
7	11,97 ^{abAB}	24,36 ^{bcdA}	7,14 ^{aB}

Os resultados são expressos como a diferença da média concentração de compostos fenólicos totais entre os tempos de fermentação 1 a 4, 4 a 8 e 8 a 12. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre as amostras estudadas.

Tabela AP 6 – Coeficientes e limites de confiança para a concentração de compostos fenólicos totais nos diferentes ensaios de kombucha de erva mate

Interações	p-valor	Coeficientes	Erro padrão	Limite inferior	Limite superior
Média	0,00	646,50	3,98	633,83	659,17
Concentração de erva mate	0,00	196,59	5,27	179,83	213,36
Temperatura de fermentação	0,63	2,83	5,27	-13,93	19,59
Concentração x Temperatura	0,54	3,67	5,27	-13,09	20,44

$R^2=99,8\%$. Os extratos de erva mate foram preparados nas concentrações de 0,5%, 0,75% e 1,0%. As temperaturas de fermentação estudadas foram 20 e 30°C.

Tabela AP 7 - Coeficientes e limites de confiança para a atividade antioxidante (DPPH) nos diferentes ensaios de kombucha de erva mate

Interações	p-valor	Coeficientes	Erro padrão	Limite inferior	Limite superior
Média	0,00	60,03	0,36	58,89	61,17
Concentração de erva mate	0,00	19,74	0,47	18,22	21,24
Temperatura de fermentação	0,69	-0,20	0,47	-1,71	1,30
Concentração x Temperatura	0,81	0,12	0,47	-1,38	1,63

$R^2=99,9\%$. Os extratos de erva mate foram preparados nas concentrações de 0,5%, 0,75% e 1,0%. As temperaturas de fermentação estudadas foram 20 e 30°C. DPPH: Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila.

Tabela AP 8 - Coeficientes e limites de confiança para a atividade antioxidante (ABTS+) nos diferentes ensaios de kombucha de erva mate

Interações	p-valor	Coeficientes	Erro padrão	Limite inferior	Limite superior
Média	0,00	52,25	0,08	51,98	52,52
Concentração de erva mate	0,00	18,85	0,11	18,49	19,21
Temperatura de fermentação	0,00	1,72	0,11	1,36	2,07
Concentração x Temperatura	0,00	1,13	0,11	0,78	1,49

$R^2=99,9\%$. Os extratos de erva mate foram preparados nas concentrações de 0,5%, 0,75% e 1,0%. As temperaturas de fermentação estudadas foram 20 e 30°C. ABTS: Radical 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico.

Tabela AP 9 - Taxa de sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* nos ensaios tratados com kombucha de erva mate e chá verde em presença e ausência de agente oxidante (H_2O_2) e no controle

Ensaio	% Sobrevivência
1 Controle (suspensão de leveduras)	100,0±0,0 ^a
2 Suspensão de leveduras e H_2O_2	40,0±4,2 ^d
3 Suspensão de leveduras e kombucha (Ensaio 2)	94,5±4,9 ^a
4 Suspensão de leveduras, kombucha (Ensaio 2) e H_2O_2	53,5±2,1 ^{bc}
5 Suspensão de leveduras e kombucha (Ensaio 4)	95,0±2,8 ^a
6 Suspensão de leveduras, kombucha (Ensaio 4) e H_2O_2	57,0±4,2 ^b
7 Suspensão de leveduras e kombucha (Controle _{chá verde})	90,5±4,9 ^a
8 Suspensão de leveduras, kombucha (Controle _{chá verde}) e H_2O_2	43,5±3,5 ^{cd}

H_2O_2 : peróxido de hidrogênio. Ensaio 2: kombucha de erva mate (1,0% m/v) fermentada a 20 °C. Ensaio 4: kombucha de erva mate (1% m/v) fermentada a 30 °C. Controle_{chá verde}: kombucha de chá (0,5% m/v) fermentada a 20 °C.