

UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**FERMENTAÇÃO SECUNDÁRIA DE KOMBUCHA COM EXTRATO DE *Inga edulis*:
EFEITOS DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DO
EXTRATO NA QUALIDADE DO PRODUTO**

KARLA TAUFNER

VILA VELHA
OUTUBRO / 2020

UNIVERSIDADE VILA VELHA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**FERMENTAÇÃO SECUNDÁRIA DE KOMBUCHA COM EXTRATO DE *Inga edulis*:
EFEITOS DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DO
EXTRATO NA QUALIDADE DO PRODUTO**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dra. Denise Coutinho Endringer.

KARLA TAUFNER

VILA VELHA

OUTUBRO / 2020

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

T222f Taufner, Karla.
Fermentação secundária de Kombucha com extrato de *inga edulis*: efeitos do tempo de fermentação e da concentração do extrato na qualidade do produto / Karla Taufner. 2020.

47 f. : il.

Orientadora: Denise Coutinho Endringer.
Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Vila Velha, 2020.
Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Bebidas fermentadas.
3. Flavonóides. I. Endringer, Denise Coutinho. II. Universidade
Vila Velha. III. Título.

CDD 615

KARLA TAUFNER

**FERMENTAÇÃO SECUNDÁRIA DE KOMBUCHA COM EXTRATO DE *Inga edulis*:
EFEITOS DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DO
EXTRATO NA QUALIDADE DO PRODUTO**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 28 de outubro de 2020.

Banca examinadora:



Henrique Poltronieri Pacheco - UFRJ



Bianca Prandi Campagnaro- UVV



Profª. Dra. Denise Coutinho Endringer – UVV

(Orientadora)

“O único lugar no qual sucesso vem antes do trabalho é o dicionário.”

Albert Einstein

Dedico este trabalho a todos aqueles que acreditaram em minha capacidade de superar os desafios enfrentados durante esta trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, em especial aos meus pais, Anésia e Idomar, por terem me ensinado a ter fé em Deus e pelo afeto e incentivo ao estudo e aprimoramento profissional. A Leandro, meu marido e melhor amigo, por seu amor e companheirismo na vida e na pesquisa.

Ao INCAPER, em especial à equipe da Fazenda Experimental de Bananal do Norte, pela solicitude com que me ajudaram na fase inicial desse trabalho.

Ao grupo de pesquisa do professor Wanderson Romão (UFES), pela prontidão em me auxiliar na condução do estudo.

A todos os professores, pelos valiosos ensinamentos, aos alunos de iniciação científica, aos colegas, funcionários (em especial a Ana Cláudia Hertel Pereira) e coordenadores da UVV, por toda sua valiosa contribuição. Aos que se tornaram meus amigos nessa trajetória, por terem me proporcionado momentos dos quais sempre me lembrarei com carinho.

A todos que contribuíram, mesmo que de forma indireta, para a minha formação, serei eternamente grata. E especialmente a minha querida orientadora, professora Denise Coutinho Endringer, pela dedicação e confiança que depositou em mim e pelas palavras encorajadoras, muito obrigada!

RESUMO

TAUFNER, Karla, M.Sc. Universidade Vila Velha – ES, outubro de 2020.
Fermentação secundária de Kombucha com extrato de *inga edulis*: efeitos do tempo de fermentação e da concentração do extrato na qualidade do produto.
Orientadora: Prof. Dra. Denise Coutinho Endringer.

A fermentação é um método tradicional usado na para a produção e na conservação de alimentos. Consiste em um processo no qual fungos e bactérias convertem açúcares em outras substâncias, com o objetivo de produzir energia para suas células. Apresenta baixo custo e permite a obtenção de produtos ricos em compostos bioativos. O Kombucha é uma bebida fermentada popular e seu consumo tem aumentado em diversos países. Tradicionalmente, utiliza-se o chá das folhas de *Camellia sinensis* adoçado para sua produção. Uma estratégia usada para melhorar sua composição química e maximizar seus efeitos benéficos à saúde é adicionar ao líquido resultante um outro substrato para que ocorra a segunda fermentação. O objetivo desse trabalho foi realizar a segunda fermentação de kombucha com extrato das folhas de *Inga edulis* e determinar a influência do tempo de fermentação e da concentração do extrato nas propriedades da bebida. Foram descritos: características organolépticas, pH, AT, SST, SST/AT, polifenóis totais, flavonóides e viabilidade celular *in vitro*. Foram utilizadas análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey ($P < 0,05$) e PCA. Tempos mais longos de fermentação e maiores concentrações do extrato de Ingá resultaram em bebidas com maior teor de compostos bioativos (polifenóis totais e flavonóides). Esse aumento foi mais pronunciado com os flavonóides. Não foi possível estabelecer relação entre o tempo de fermentação e concentração do extrato com as demais variáveis. O extrato etanólico das folhas de *I. edulis* é um potencial substrato para fermentações a base de Kombucha e merece ser estudado com mais profundidade a fim de se elucidar os mecanismos envolvidos na sua produção e em suas propriedades biológicas.

Palavras-chave: Bebidas fermentadas. Polifenóis. Flavonóides. Características organolépticas. Características físico-químicas.

ABSTRACT

TAUFNER, Karla, M.Sc. Universidade Vila Velha - ES, October 2020. **Secondary fermentation of Kombucha with *Inga edulis* extract: effects of fermentation time and extract concentration on product quality.** Advisor: Prof. Dr. Denise Coutinho Endringer.

Fermentation is a traditional method used for food production and preservation. It consists of a process in which fungi and bacteria convert sugars into other substances to produce energy for your cells. It presents a low cost and allows us to obtain products rich in bioactive compounds. Kombucha is a popular fermented drink, and its consumption has increased in several countries. Traditionally, sweetened *Camellia sinensis* leaf tea is used for its production. One strategy used to improve its chemical composition and maximize its beneficial health effects is adding another substrate to the resulting liquid for the second fermentation to occur. The objective of this work was to carry out the second fermentation of Kombucha with extract of the leaves of *Inga edulis* and determine the influence of the fermentation time and the concentration of the extract on the properties of the drink. Organoleptic characteristics, pH, AT, TSS, TSS/AT, total polyphenols, flavonoids, *in vitro* cell viability were described. Analysis of variance (ANOVA) with Tukey's test ($P < 0.05$) and PCA were used. Longer fermentation period and higher concentrations of *Inga* were associated to higher levels of bioactive compounds (polyphenols and flavonoids). This enhancement was more intense for flavonoids. No relation between fermentation time, *Inga* concentration and pH, AT, TSS, TSS/AT, total polyphenols, flavonoids, *in vitro* cell viability was found. The ethanolic extract of the leaves of *I. edulis* is a potential substrate for fermentations based on Kombucha. It deserves to be studied in more depth to elucidate the mechanisms involved in its production and its biological properties.

Keywords: Fermented beverages. Polyphenols. Flavonoids. Organoleptic characteristics. Physicochemical characteristics.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT – Acidez Titulável

BPAC – Bactérias Produtoras de Ácido Acético

BPAL – Bactérias Produtoras de Ácido Lático

FDA – Food and Drug Administration

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCA – Principal Component Analysis

SCOBY – Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast

SST – Sólidos Solúveis Totais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porção líquida e membrana de celulose em Kombucha (Paludo, 2017).....	16
Figura 2. Distribuição de <i>I. edulis</i> no território brasileiro (Lima, 2014) <i>Inga edulis</i> in: Biogeografia da Flora e dos Fungos do Brasil. INCT Herbário Virtual (http://biogeo.inct.florabrasil.net/proc/2682).....	18
Figura 3. Superfície de resposta obtida por mínimos quadrados ponderados para o teor de polifenóis em função do tempo de fermentação e da concentração do extrato de Ingá.....	30
Figura 4. Superfície de resposta obtida por um modelo polinomial quadrático ($R^2=0,75$) para o teor de flavonóides em função do tempo de fermentação e da concentração do extrato de Ingá.....	31
Figura 5. PCA para os fatores envolvidos.....	32
Figura 6. PCA para os fatores envolvidos. Cada cor representa um grupo obtido por k-means.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Delineamento da produção de Kombucha com <i>I. edulis</i>	21
Tabela 2. Características organolépticas do Kombucha (método tradicional) e do Kombucha com <i>I. edulis</i>	25
Tabela 3. pH do Kombucha (método tradicional) e do Kombucha com <i>I. edulis</i>	26
Tabela 4. Acidez titulável (AT) do Kombucha (método tradicional) e do Kombucha com <i>I. edulis</i>	27
Tabela 5. Sólidos solúveis totais (SST), expressos em °Brix, do Kombucha (método tradicional) e do Kombucha com <i>I. edulis</i>	27
Tabela 6. Relação SST/AT do Kombucha (método tradicional) e do Kombucha com <i>I. edulis</i>	28
Tabela 7. Polifenóis totais do Kombucha (método tradicional) e do Kombucha com <i>I. edulis</i>	29
Tabela 8. Flavonóides do Kombucha (método tradicional) e do Kombucha com <i>I. edulis</i>	30
Tabela 9. Atividade citotóxica in vitro do Kombucha (método tradicional) e do Kombucha com <i>I. edulis</i> . Dados apresentados como percentual de células mortas.....	32
Tabela 10. Coordenadas para os fatores projetados nos 3 PCs.....	33

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 FERMENTADOS.....	12
1.2 KOMBUCHA.....	13
1.2.1 Características e composição.....	13
1.2.2 Perfil microbiológico.....	16
1.3 FERMENTAÇÃO SECUNDÁRIA.....	17
1.4 SUBSTRATO PARA FERMENTAÇÃO SECUNDÁRIA.....	18
1.4.1 Ingá (<i>Inga edulis</i> Mart.).....	18
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
2.1 Extrato etanólico das folhas de <i>Inga edulis</i>	20
2.2 Kombucha.....	20
2.2.1 Perfil microbiológico do SCOBY.....	20
2.2.2 Primeira fermentação (método tradicional).....	20
2.2.3 Segunda fermentação.....	21
2.3 Características organolépticas.....	21
2.4 Determinação de pH, acidez titulável (AT) e sólidos solúveis totais (SST).....	21
2.5 Determinação de polifenóis totais.....	22
2.6 Determinação de flavonóides.....	22
2.7 Viabilidade celular <i>in vitro</i>	23
2.8 PCA (<i>Principal Component Analysis</i>).....	23
2.9 Análise estatística.....	23
3 RESULTADOS.....	24
3.1 Características organolépticas.....	24
3.2.1 pH.....	26
3.2.2 Acidez titulável.....	26

3.2.3 Sólidos solúveis totais (SST).....	27
3.2.4 Relação SST/AT.....	28
3.3 POLIFENÓIS TOTAIS.....	28
3.4 FLAVONÓIDES.....	30
3.5 VIABILIDADE CELULAR <i>in vitro</i>	31
3.6 PCA.....	32
4 DISCUSSÃO.....	34
5 CONCLUSÃO.....	40
6 REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 FERMENTADOS

A fermentação é um método utilizado há milhares de anos para a produção de álcool e para a conservação de alimentos e consiste em um processo no qual fungos e bactérias convertem açúcares, tais como a glicose, em outras substâncias, como o álcool, com o objetivo de produzir energia para suas células (Baschali et al., 2017). Dado o seu baixo custo, tem sido amplamente empregado pela indústria alimentícia para a obtenção de produtos ricos em compostos bioativos de vegetais (Hur et al., 2014).

Observa-se, nos últimos anos, uma tendência de resgate dos métodos tradicionais de produção de alimentos e bebidas, que culmina com a maior procura por produtos minimamente processados e preferencialmente sem aditivos (Villarreal-Soto et al., 2018). É nesse contexto que há uma crescente demanda pelo consumo de alimentos e bebidas com ação probiótica.

Várias espécies de microrganismos apresentam enzimas específicas que atuam nas reações do processo de fermentação, sendo que as substâncias formadas durante a fermentação conferem diferentes sabores e texturas (Gomes et al., 2018), além de alterarem as atividades biológicas e a digestibilidade do produto final. Fungos e bactérias que apresentam tais características são denominados de probióticos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) define probióticos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (Chilton, Burton, Reid, 2015).

Muitos produtos são resultantes do processo de fermentação e podem ser de ocorrência natural ou resultantes da adição de uma cultura inicial, denominada *starter* (Roos & Vuyst, 2018), apresentando baixo teor alcóolico ou não. Uma ampla variedade de substratos, tais como leite, cereais, frutas e vegetais, são utilizados na elaboração desses produtos (Baschali et al., 2017).

São exemplos conhecidos de fermentados o iogurte, o vinho, o *stilton*, (um tipo de queijo inglês), o *Cortido* (fermentado de legumes de El Salvador), (Chilton, Burton, Reid, 2015), o Kefir (de água adoçada ou de leite) e o Kombucha (de chá verde ou preto adoçado) (Baschali et al., 2017; Roos & Vuyst, 2018), que será descrito a seguir.

1.2 KOMBUCHA

1.2.1 Características e composição

O Kombucha é uma bebida popular na Ásia há mais de dois milênios e seu consumo tem aumentado em diversos países (Jayabalan, Marimuthu, Swaminathan, 2007). É uma bebida probiótica ácida, não alcoólica, levemente adocicada e gaseificada, obtida por meio da fermentação de chá açucarado com uma cultura simbiótica de fungos acidófilos e bactérias (Chakravory et al., 2016).

Tradicionalmente, utiliza-se o chá das folhas de *Camellia sinensis*, planta popularmente conhecida como “chá verde” ou “chá preto”. Suas nomenclaturas variam de acordo com o processamento da planta: o chá verde é preparado a partir das folhas escaldadas e fervidas (a fim de se conservar sua cor) e o chá preto é obtido mediante a fermentação das folhas (Hur et al., 2014).

O preparo do Kombucha é simples: adiciona-se ao chá um açúcar (geralmente sacarose) e em seguida a cultura inicial (*starter*). A cultura inicial é comumente chamada de SCOBY (*Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast*) que é a associação de bactérias e fungos em simbiose (Vitas et al., 2013). As bactérias produtoras de ácido acético (BPAC), as bactérias produtoras de ácido láctico (BPAL) e várias espécies fúngicas integram um consórcio simbiótico de microrganismos do Kombucha (Roos & Vuyst, 2018).

Esse consórcio simbiótico de microrganismos converte o chá açucarado em um líquido ácido, levemente gaseificado e refrescante, composto especialmente por vários ácidos. Estão presentes em maior concentração o ácido acético e o ácido glicônico (Czaja et al., 2006). Estão também presentes o ácido glicurônico (Loncar et

al., 2006), os ácidos tartárico e málico e, em menor proporção, o ácido cítrico. Todos esses compostos são responsáveis pelo sabor azedo característico da bebida (Jayabalan, Marimuthu, Swaminathan, 2007).

Polifenóis, além de aminoácidos, vitaminas e algumas enzimas hidrolíticas também constituem o líquido resultante da fermentação do chá (Malbasa et al., 2011). Os polifenóis (Yang, Lambert, Sang, 2009) e o ácido glicurônico são os que provavelmente apresentam maior atividade biológica (Kumar & Joshi, 2016; Jayabalan et al, 2014). Dentre os achados sobre o Kombucha, destacam-se seus efeitos antioxidante (Kumar & Rizvi, 2015; Amarasingh; Weerakkody; Waisundara, 2018), e anticarcinogênico *in vitro* e *in vivo* (Jayabalan et al., 2011).

Os compostos fenólicos constituem o principal grupo de substâncias antioxidantes presentes no Kombucha (Dimidi E et al., 2019). Diversos polifenóis já foram identificados, com destaque para os flavonóides, particularmente as catequinas (Jayabalan, Marimuthu, Swaminathan, 2007).

Há ainda uma pequena porção de gás carbônico, o que confere a sensação refrescante, e de etanol (Malbasa et al, 2011). É importante lembrar que a quantidade de etanol é mínima, o que classifica o Kombucha como bebida não alcoólica (Chilton, Burton, Reid, 2015). Os principais constituintes do Kombucha estão elencados abaixo no **Quadro 1**.

CLASSES DE COMPOSTOS	COMPOSTO	COMPOSIÇÃO MÉDIA	TEMP O	REFERÊNCIAS
Ácidos Orgânicos	Ácido Acético	5,6 g/L	15 d	Blanc (1996)
	Ácido Acético	8,36 g/L	18 d	Jayabalan et al (2007)
	Ácido Acético	11 g/L	30 d	Chen; Liu (2000)
	Ácido Glicônico	39 g/L	60 d	Chen; Liu (2000)
	Ácido Glicurônico	0,0160 g/L	21 d	Loncar et al (2006)
	Ácido Láctico	0,18 g/L	18 d	Jayabalan et al (2007)
Vitaminas	Vitamina B1	0,74 mg/mL	15 d	Bauer-Petrovska & Petruskevaska-Tozi

CLASSES DE COMPOSTOS	COMPOSTO	COMPOSIÇÃO MÉDIA	TEMPO	REFERÊNCIAS
				(2000)
	Vitamina B2	8 mg/100 mL	10 d	Petrushevska-Tozi (2000)
	Vitamina B6	0,52 mg/mL	15 d	Malbasa et al (2011)
	Vitamina B12	0,84 ng/mL	15 d	Bauer-Petrovska & Petrushevska-Tozi (2000)
	Vitamina C	25 mg/L	10 d	Bauer-Petrovska & Petrushevska-Tozi (2000) Malbasa et al (2011)
Compostos Gerais	Etanol	5,5 g/L	20 d	Chen; Liu (2000)
	Proteínas	3 mg/mL	12 d	Jayabalan et al (2007)
	Polifenóis	7,8 Mm EAG	15 d	Chu; Chen (2006)
Minerais	Cu, Fe, Mn, Ni, Zn	0,1 a 0,4 µg/mL	15 d	Bauer-Petrovska & Petrushevska-Tozi (2000)
Ânions	Cl ⁻ , Br ⁻ , I ⁻ , NO ₃ ⁻ HPO ₄ ⁻ , SO ₄ ⁻	0,04 a 3,20 mg/g	7 d	Kumar; Narayan; Hassarajani (2008)

Quadro 1. Composição química do Kombucha (traduzido e adaptado de Vilarreal-Soto et al, 2018)

A composição do Kombucha pode ser alterada por diversos fatores, tais como temperatura, pH, quantidade de oxigênio, o gás carbônico dissolvido, o sistema operacional utilizado (Marsh et al., 2014), a concentração inicial de açúcar, a composição do chá e o tempo de fermentação. Qualquer variação desses fatores resulta em diferentes características organolépticas, físico-químicas e nutricionais do produto obtido (Wolfe & Dunton, 2015).

Das variáveis acima, o tempo de fermentação parece ser um dos pontos mais relevantes para a produção de uma bebida de alta qualidade e segura para o consumo. Na literatura, o tempo de fermentação usado no preparo do Kombucha oscila de 7 a 60 dias (Vilarreal-Soto et al., 2018). Entretanto, segundo o *Food and*

Drug Administration (FDA) o processo não deve ultrapassar 10 dias (Nunmer, 2013).

Durante o processo de fermentação, a atividade de algumas cepas bacterianas resulta na formação de uma membrana flutuante de celulose. O Kombucha é, então, formado por duas fases: a membrana de celulose e a porção líquida (**Figura 1**). Os microrganismos, assim como a maior parte das suas substâncias constituintes, encontram-se no líquido (Czaja et al., 2006). Atualmente, somente a parte líquida é destinada ao consumo (Roos & Vuyst, 2018).



Figura 1. Porção líquida e membrana de celulose em Kombucha (Paludo, 2017).

1.2.2 Perfil microbiológico

As bactérias produtoras de ácido acético (BPAC), as bactérias produtoras de ácido láctico (BPAL) e várias espécies fúngicas integram um consórcio simbiótico de microrganismos do Kombucha (Roos & Vuyst, 2018). Em condições ambientais favoráveis, essa simbiose é estável a ponto de inibir o crescimento de microrganismos contaminantes (Vitas et al., 2013).

Foram identificadas no Kombucha espécies de BPAC pertencentes aos gêneros *Komagataeibacter*, *Gluconobacter* e *Acetobacter* (Roos & Vuyst, 2018) e algumas das espécies encontradas foram *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* e *Gluconobacter oxydans* (Marsh et al., 2014). São as bactérias presentes em maior contagem e são responsáveis pela produção da maior parte dos ácidos presentes no

Kombucha (Roos & Vuyst, 2018). As espécies de BPAL pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus* (Marsh et al., 2014). Determinadas cepas de BPAC são as responsáveis pela formação da membrana de celulose durante o processo de fermentação (Watawana et al., 2016).

Quanto aos fungos, foram identificadas diferentes espécies dos gêneros *Brettanomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Mycoderma*, *Mycotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Pichia* e *Zygosaccharomyces* (Ayed, Abid, Hamdi, 2017). As espécies fúngicas encontradas em amostras de Kombucha foram *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulaspora delbrueckii* e *Brettanomyces bruxellensis*. (Coton et al., 2017)

Os fungos convertem a sacarose em ácidos orgânicos, gás carbônico e etanol. O etanol é posteriormente oxidado pelas espécies de BPAC, resultando na produção de ácido acético. As BPAC também utilizam a d-glicose na síntese de celulose e do ácido glicônico (Marsh et al., 2014).

1.3 FERMENTAÇÃO SECUNDÁRIA

A fermentação secundária é uma estratégia popularmente utilizada para agregar sabor às bebidas fermentadas. Consiste em adicionar ao líquido obtido na primeira fermentação outro substrato para que ocorra a segunda fermentação. No entanto, uma segunda fermentação parece não apenas alterar o sabor, mas também melhorar a composição química do fermentado e possivelmente maximizar seus efeitos benéficos à saúde (Ayed, Abid, Hamdi, 2017). Portanto, é de suma importância estudar essa técnica.

Diversos benefícios foram obtidos com a fermentação secundária. Em um estudo que utilizou o gérmen de trigo, verificou-se o aumento da atividade antioxidante do fermentado, possivelmente devido ao incremento de antocianinas, flavonoides e compostos fenólicos na composição (Sun, Li, Chen, 2015). A adição de água de coco também contribuiu para o aumento da atividade antioxidante do fermentado,

além da inibição da α -amilase e da α -glicosidase em estudo *in vitro* (Watawan et al., 2016).

Isso também ocorreu na fermentação de vários outros substratos, como o pólen (Utoiu et al., 2018), o chá da figueira da Índia (Ayed e Hamdi, 2015), os derivados do leite (Kanuric, 2012; Kanuric et al., 2018; Malbasa et al., 2009), o suco de romã, uva vermelha, ginjeira e maçã (Akbarirad et al., 2017), as plantas da família Lamiaceae (Velićanski, Cvetković, Markov, 2013), e o café (Watawana, Jayawardena, Waisundara, 2015). Esses resultados favoráveis encorajam a análise de outros substratos.

1.4 SUBSTRATO PARA FERMENTAÇÃO SECUNDÁRIA

Foi selecionada para esse estudo uma matéria prima vegetal nativa. Isso representa um menor custo e maior disponibilidade de material para a execução das análises, além da valorização da cultura local.

1.4.1 Ingá (*Inga edulis* Mart.)

Para a fermentação secundária do Kombucha no presente estudo, foi utilizada a espécie *Inga edulis* Mart. Popularmente conhecida como ingazeiro, é amplamente distribuída nas florestas tropicais da Américas Central e do Sul (Pompeu et al., 2012; Dias, Souza, Rogez, 2010). A **Figura 2** mostra a distribuição no território brasileiro.

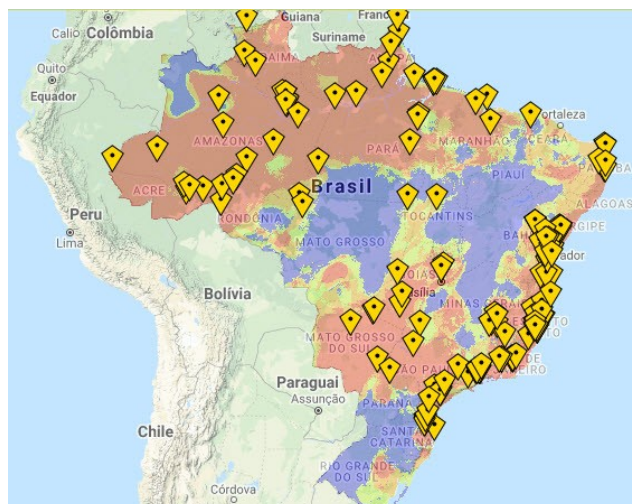


Figura 2. Distribuição de *I. edulis* no território brasileiro (Lima, 2014) *Inga edulis* in: Biogeografia da Flora e dos Fungos do Brasil. INCT Herbário Virtual (<http://biogeo.inct.florabrasil.net/proc/2682>).

As folhas do ingazeiro são ricas em compostos fenólicos e estudos apontaram que o extrato das folhas de *I. edulis* apresenta elevada capacidade antioxidante *in vitro* (Pompeu et al., 2012; Dias, Souza, Rogez, 2010). Os poucos dados já publicados sobre a espécie apontam um potencial de uso terapêutico, em especial devido a atividade anti-ulcerogênica observada em modelo de indução de úlcera por etanol em ratos (Pompeu et al., 2012).

Não foram identificados até o momento estudos acerca da utilização do extrato das folhas de Inga no preparo de bebidas ou de fermentados, o que torna o estudo inédito. O objetivo desse trabalho foi determinar a influência do tempo de fermentação e da concentração do extrato das folhas de *I. edulis* nas propriedades da bebida, bem como verificar alterações na composição em comparação ao Kombucha tradicional.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Extrato etanólico das folhas de *Inga edulis*

As folhas de *Inga edulis* (SISGEN A293F7A), coletadas na Fazenda Experimental de Bananal do Norte (FEBN) - INCAPER, localizada no município de Cacheiro do Itapemirim, ES, foram selecionadas, limpas e secas a 40°C em estufa com circulação de ar (Tecnal® TE 394/2). Em seguida, foram trituradas em moinho de facas (Marconi® MA680) até a obtenção de um pó fino. Antes da extração, o pó foi desengordurado com hexano na proporção de 1:20 em banho ultrassônico (Elma® Elmasonic P) por 2 ciclos de 30 minutos. O extrato foi obtido utilizando-se etanol a 75% (1:20) no mesmo equipamento em 2 ciclos de 50 minutos a 40°C (Ciğeroğlu et al, 2018). O extrato foi concentrado em rotaevaporador Buchi® R-100 a 40° C para ser utilizado na segunda fermentação do Kombucha.

2.2 Kombucha

2.2.1 Perfil microbiológico do SCOBY

O SCOBY de Kombucha utilizado foi adquirido na Fementare®. Segundo o fabricante, nele foram identificadas as BPAC *Acetobacter* spp e *Bacterium gluconicum* e as espécies fúngicas *Dekkera bruxellensis*, *Pichia membranaefaciens*, *Zygosaccharomyces bisporus* e *Kluyveromyces marxianus*.

2.2.2 Primeira fermentação (método tradicional)

O Kombucha foi produzido de acordo com as especificações de protocolo estabelecido pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (Nummer, 2013). Todos os instrumentos e vasilhames foram submetidos à assepsia com ácido peracético 1% antes do uso. Foi preparada infusão de chá preto (*Camelia sinensis*) adquirido no mercado local (15 g/L) adoçado com sacarose (5% p/v). Após o resfriamento da infusão (temperatura inferior a 30 °C), foi inoculado o SCOBY de Kombucha. A fermentação ocorreu sob a temperatura de 25 (+/- 2) °C durante 7 dias em frasco de vidro sem tampa protegido por tecido de algodão.

2.2.3 Segunda fermentação

A segunda fermentação foi realizada utilizando-se 50 a 400 mg (Pompeu et al., 2012) do extrato etanólico de *I. edulis* conforme a Tabela 1. O método empregado foi o de Vita et al (2020), incluindo 10%(v/v) do fermentado produzido através pelo método tradicional. A proporção de sacarose foi mantida (5% p/v).

Tabela 1. Delineamento da produção de Kombucha com *I. edulis*

	Caldo método tradicional (mL)	Extrato de <i>I. edulis</i> (mg)	Sacarose (g)	Volume final (mL)
Kombucha (K)	1	0	0,5	10
K + <i>I. edulis</i> 50	1	50	0,5	10
K + <i>I. edulis</i> 100	1	100	0,5	10
K + <i>I. edulis</i> 200	1	200	0,5	10
K + <i>I. edulis</i> 300	1	300	0,5	10
K + <i>I. edulis</i> 400	1	400	0,5	10

Nota. Volume final completado com água

O processo de fermentação foi interrompido mediante congelamento a -20 °C (Kallel et al., 2012) nos dias 0, 7, 10, 14 e 21 para a realização dos experimentos. Todos os fermentados foram produzidos em triplicata biológica, totalizando 90 amostras analisadas (6 concentrações x 5 períodos de fermentação x 3 replicatas). Somente a parte líquida de cada amostra foi submetida às análises descritas nos itens subsequentes.

2.3 Características organolépticas

Foram descritas as características de cor, odor, sabor e aspecto (limpidez, turbidez e presença ou ausência de membrana de celulose) dos fermentados obtidos segundo o Instituto Adolfo Lutz (Zenebon, Pacuet, Tiglia, 2008).

2.4 Determinação de pH, acidez titulável (AT) e sólidos solúveis totais (SST)

As análises de pH e sólidos solúveis totais foram realizadas utilizando-se, respectivamente, pHmetro (Metron® modelo 827 pH Lab) e refratômetro de bancada (Abbé® com escala de refração de 1,300-1,72 nD de 0-95 °Brix modelo 2 WAJ). A acidez titulável (AT) foi determinada através de titulação com NaOH 0,01 M (Sigma®) e expressa em g de ácido acético por 100 mL de amostra. A razão SST/AT foi calculada dividindo-se o valor da leitura de SST pelos valores de AT. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as técnicas descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (Zenebon, Pacuet, Tiglia, 2008).

2.5 Determinação de polifenóis totais

Foi utilizado método descrito por Krepsky et al (2012) adaptado. Em microplacas de 96 poços e fundo transparente, foram transferidos 25 µL de amostra (diluída a 1:4) e em seguida, nesta ordem, 10 µL de Reagente de Folin-Ciocalteu 10% e 215 µL de Na₂CO₃ 10,6%. Após 3 minutos, as leituras foram realizadas com o aplicativo PhotoMetrix® em smartphone (Böck et al, 2020), utilizando a água como branco. Todo o experimento foi realizado a temperatura ambiente e em baixa luminosidade. A curva de calibração foi elaborada com ácido gálico (Sigma Aldrich®) (0,0015 -0,05 mg.mL⁻¹). Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (mg.mL⁻¹).

2.6 Determinação de flavonóides

O teor de flavonóides foi determinado segundo Xu e Chang (2007) em espectrofotômetro FilterMax-5 Multi-Mode Microplate Reader® utilizando microplacas de 96 poços e fundo transparente. A cada poço foram transferidos 180 µL de amostra (diluída a 1:30 e 1:60) e 15 µL de NaNO₂ 2,5 %. Após seis minutos, foram adicionados 15 µL de AlCl₃ 10 % e, decorridos cinco minutos, foram adicionados 50 µL de NaOH 1M. Após 10 minutos, realizou-se leitura no comprimento de onda de 415 nm, descontando os valores do branco (água) e do branco da amostra. Todo o experimento foi realizado a temperatura ambiente e em baixa luminosidade. A curva de calibração foi elaborada com quercetina (Sigma Aldrich®) (0,005-0,15 mg.mL⁻¹). Os resultados foram expressos em equivalentes de quercetina (mg.mL⁻¹).

2.7 Viabilidade celular *in vitro*

A atividade citotóxica dos fermentados foi determinada por meio do ensaio colorimétrico MTT (Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) segundo Mosmann (1983). Foram transferidos fibroblastos L929 para a microplaca de 96 poços na concentração final de 7×10^5 células/mL para incubação. No dia seguinte, as células foram expostas aos fermentados e submetidas a 24 horas de incubação. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de MTT (1 mg/mL) a cada poço e a placa foi incubada por 2 horas adicionais. Decorrido este tempo, foram adicionados 100 μ L de DMSO para a dissolução dos cristais de formasana. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Sunnyvale, CA).

2.8 PCA (*Principal Component Analysis*)

PCA foi implementada no software Statistica v.10. Dessa análise, autovalores e autovetores relacionados às novas coordenadas compostas dos PCs foram obtidas. As novas coordenadas dos casos foram submetidas a um algoritmo k-means de *clustering*. Os hiperparâmetros do algoritmo foram mantidos nos valores padrão do pacote Scikit-learn (Pedregosa *et al.*, 2011).

As superfícies de resposta também foram obtidas com o auxílio do software Statistica v.10. Os métodos de regressão próprios do programa foram usados para obter tanto as superfícies de resposta por mínimos quadrados ponderados quanto o modelo polinomial biquadrático para o teor de flavonoides.

2.9 Análise estatística

Os dados obtidos (com exceção das características organolépticas) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) mediante o teste de Tukey a 5% ($P < 0,05$) de significância para comparação das médias no software GraphPad Prism versão 8.3.

3 RESULTADOS

3.1 Características organolépticas

O fermentado de Kombucha obtido pelo método tradicional apresentou coloração marrom clara ligeiramente avermelhada, aspecto turvo, odor acético, sabor ácido e presença de membrana clara e homogênea a partir do dia 7. Com o decorrer do tempo, foi perceptível a intensificação do odor, da turbidez e do sabor ácido, além de maior espessura da membrana. Não houve alteração de cor perceptível a olho desprovido de equipamento (**Tabela 2**).

Os fermentados de Kombucha com *I. edulis* apresentaram cor amarela ligeiramente esverdeada (concentrações menores) e mais inclinadas ao castanho (nas duas maiores concentrações). Também foi identificado odor acético, porém mais forte que o dos fermentados do método tradicional (**Tabela 2**). O odor e o sabor também se intensificaram com o passar do tempo e a cor não apresentou variações perceptíveis a olho desprovido de equipamento. A membrana também se formou em todos os fermentados com *I. edulis* a partir do dia 7. Apresentou-se um pouco mais amarelada do que as dos fermentados tradicionais, de formato um pouco mais irregular, mostrando-se mais espessa com o decorrer do tempo. As características organolépticas encontram-se sumarizadas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Características organolépticas do Kombucha (método tradicional) e do Kombucha com *I. edulis*

	Dia 0	Dia 7	Dia 10	Dia 14	Dia 21	Parâmetros
Kombucha (K)	Marrom	Marrom	Marrom	Marrom	Marrom	Cor
	avermelhada	avermelhada	avermelhada	avermelhada	avermelhada	Aspecto
	Límpido	Pouco turvo	Turvo	Turvo	Turvo	Odor
	Aromático	Acético	Acético	Acético	Acético	Sabor
	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido	Membrana
	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	
K + <i>I. edulis</i> 50	Amarela	Amarela	Amarela	Amarela	Amarela	Cor
	esverdeada	esverdeada	esverdeada	esverdeada	esverdeada	Aspecto
	Límpido	Pouco turvo	Turvo	Turvo	Turvo	Odor
	Aromático	Acético	Acético	Acético	Acético	Sabor
	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido	Membrana
	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	
K + <i>I. edulis</i> 100	Amarela escura	Amarela escura	Amarela escura	Amarela escura	Amarela escura	Cor
	Límpido	Turvo	Turvo	Turvo	Turvo	Aspecto
	Aromático	Acético	Acético	Acético	Acético	Odor
	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido	Sabor
	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	Membrana
K + <i>I. edulis</i> 200	Amarela escura	Amarela escura	Amarela escura	Amarela escura	Amarela escura	Cor
	Límpido	Turvo	Turvo	Turvo	Turvo	Aspecto
	Aromático	Acético	Acético	Acético	Acético	Odor
	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido	Sabor
	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	Membrana
K + <i>I. edulis</i> 300	Amarela acastanhada	Amarela	Amarela acastanhada	Amarela acastanhada	Amarela	Cor
	Límpido	acastanhada/Turvo	Turvo	Turvo	acastanhada /Turvo	Aspecto
	Aromático	Acético	Acético	Acético	Acético	Odor
	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido	Sabor
	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	Membrana
K + <i>I. edulis</i> 400	Amarela acastanhada	Amarela	Amarela acastanhada	Amarela acastanhada	Amarela	Cor
	Límpido	acastanhada/Turvo	Turvo	Turvo	acastanhada/Turvo	Aspecto
	Aromático	Acético	Acético	Acético	Acético	Odor
	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido	Sabor
	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	Membrana

3.2 pH, ACIDEZ TITULÁVEL (AT) e SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS (SST)

3.2.1 pH

O maior valor de pH registrado foi 4,36 (K no dia 0) e o menor, 2,85 (K Ingá 50 no dia 10). No Kombucha (K) o pH inicial (dia 0) e final (dia 21) foram de 4,36 e 3,24, respectivamente. Em K Ingá 50, foram 3,43 (dia 0) e 2,98 (dia 21); em K Ingá 100, 3,25 (dia 0) e 3,09 (dia 21); em K Ingá 200, 3,36 (dia 0) e 3,24 (dia 21); em K Ingá 300, 3,52 (dia 0) e 3,36 (dia 21) e em K Ingá 400, 3,47 (dia 0) e 3,23 (dia 21) (**Tabela 3**).

Em todos os fermentados analisados, o pH sofre redução no sétimo dia. A partir do décimo dia de fermentação o comportamento foi diferente para cada fermentado obtido. No Kombucha tradicional (K), houve redução progressiva no dia 10, seguida de estabilização até o final do experimento. No Kombucha de Ingá (K Ingá 50, 100) foi observada redução progressiva até o dia 14 seguida de estabilização no dia 21. No K Ingá 200 ocorreu aumento progressivo do pH a partir do dia 10. No K Ingá 300 e 400, ocorreu aumento do pH nos dias 10 e 14 e queda no dia 21 (**Tabela 3**).

Tabela 3. pH do Kombucha (método tradicional) e do Kombucha com *I. edulis*

	pH				
	Dia 0	Dia 7	Dia 10	Dia 14	Dia 21
Kombucha (K)	4,36±0,02a	3,91±0,03b	3,14±0,15c	3,20±0,02c	3,24±0,01c
K Ingá 50	3,43±0,12a	3,36±0,01b	2,85±0,03d	2,97±0,02c	2,98±0,01c
K Ingá 100	3,25±0,03a	3,14±0,01b	2,96±0,04d	3,09±0,01c	3,09±0,01c
K Ingá 200	3,36±0,02a	3,04±0,01c	3,20±0,09b	3,09±0,11a	3,24±0,1b
K Ingá 300	3,52±0,04a	3,03±0,07c	3,34±0,02b	3,36±0,02b	3,36±0,03b
K Ingá 400	3,47±0,01a	3,07±0,04d	3,34±0,02b	3,35±0,08b	3,23±0,07c

Nota. Dentro de cada linha, as médias com letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

3.2.2 Acidez titulável

O maior nível de acidez titulável foi atingido no dia 7 em todos os fermentados. Houve declínio no dia 10 e novo aumento a partir do dia 14 para todos com exceção do K Ingá 300, cuja acidez também sofreu redução no dia 14 e só aumentou

novamente no dia 21. Dentre os fermentados produzidos, K Ingá 400 apresentou os maiores valores de acidez nos dias 7 e 21 (**Tabela 4**).

Tabela 4. Acidez titulável (AT) do Kombucha (método tradicional) e do Kombucha com *I. edulis*

	Acidez Titulável				
	Dia 0	Dia 7	Dia 10	Dia 14	Dia 21
Kombucha (K)	0,039±0,01c	0,085±0,02a	0,032±0,02d	0,040±0,01c	0,072±0,01b
K Ingá 50	0,029±0,01c	0,097±0,04a	0,019±0,01d	0,032±0,01bc	0,037±0,01b
K Ingá 100	0,034±0,01c	0,101±0,01a	0,016±0,01d	0,033±0,01c	0,044±0,01b
K Ingá 200	0,045±0,02c	0,133±0,01a	0,015±0,01d	0,033±0,04c	0,063±0,01b
K Ingá 300	0,058±0,01b	0,102±0,01a	0,032±0,02c	0,019±0,01d	0,059±0,01b
K Ingá 400	0,070±0,01b	0,182±0,01a	0,033±0,01c	0,065±0,01b	0,074±0,01b

Nota. Dentro de cada linha, as médias com letras diferentes diferem entre si (p < 0,05).

3.2.3 Sólidos solúveis totais (SST)

As variações de SST no decorrer do tempo foram distintas para cada fermentado analisado. No Kombucha (K) houve queda até o dia 10, aumento no dia 14 e nova queda no dia 21. K Ingá 50 e K Ingá 300 apresentaram oscilações de SST até o dia 10, com queda progressiva a partir do dia 14. Em K Ingá 100, ocorreu queda gradativa do SST, mantendo-se igual nos dias 7 e 10, caindo mais no dia 14 e permaneceu o mesmo no dia 21. K Ingá 200 somente apresentou redução de SST a partir do dia 14, mantendo-se estável no dia 21. Por sua vez, em K Ingá 400, houve aumento no dia 7 e redução progressiva nos tempos subsequentes (**Tabela 5**).

Tabela 5. Sólidos solúveis totais (SST), expressos em °Brix, do Kombucha (método tradicional) e do Kombucha com *I. edulis*

	SST (°Brix)				
	Dia 0	Dia 7	Dia 10	Dia 14	Dia 21
Kombucha (K)	5,33±0,14a	4,50±0,00c	4,13±0,12d	4,75±0,00b	3,50±0,43e
K Ingá 50	4,75±0,00a	4,50±0,00b	4,70±0,17a	4,42±0,18b	4,25±0,00c
K Ingá 100	4,83±0,14a	4,58±0,14b	4,75±0,00b	4,08±0,03c	4,25±0,00c
K Ingá 200	5,33±0,29a	5,21±0,07a	5,33±0,14a	4,08±0,29b	4,70±0,52b
K Ingá 300	5,75±0,00b	6,00±0,00a	5,85±0,16a	5,75±0,00b	5,50±0,00c
K Ingá 400	6,00±0,00c	6,54±0,07a	6,33±0,14b	5,67±0,18d	4,33±0,15e

Nota. Dentro de cada linha, as médias com letras diferentes diferem entre si (p < 0,05).

3.2.4 Relação SST/AT

Esse parâmetro sofreu oscilações diferentes para cada fermentado analisado. No Kombucha (K) a relação SST/AT sofreu aumento, atingindo o ápice no dia 7, e apresentou declínio progressivo do dia 10 até o dia 21. K Ingá 50 apresentou queda progressiva de SST/AT até o dia 10, com estabilização no dia 14 e nova queda no dia 21. K Ingá 100 apresentou declínio no dia 7, seguido de aumento nos dias 10 e 14 e estabilização no dia 21. K Ingá 200 apresentou valores de SST/AT reduzidos no dia 7, com estabilização no dia 10, redução no dia 14 e estabilização no dia 21. Em K Ingá 300, a razão SST/AT só sofreu alteração no dia 10 (aumento), seguido de redução progressiva até o dia 21. K Ingá 400, por sua vez, mostrou redução progressiva de SST/AT até o dia 10, aumento no dia 14 (aproximando-se do valor do dia 7) e nova queda no dia 21, atingindo seu menor valor (**Tabela 6**).

Tabela 6. Relação SST/AT do Kombucha (método tradicional) e do Kombucha com *I. edulis*

	SST/AT				
	Dia 0	Dia 7	Dia 10	Dia 14	Dia 21
Kombucha (K)	137,10±7,75b	164,12±10,16a	142,47±9,87b	118,61±7,67c	99,19±2,91d
K Ingá 50	85,75±2,09a	52,07±1,85b	46,25±2,51c	45,38±1,23c	39,35±3,56d
K Ingá 100	58,86±1,73c	35,94±0,37d	131,75±15,08b	245,45±18,38a	286,68±71,14a
K Ingá 200	360,58±6,94a	186,32±37,01b	191,04±8,048b	121,14±14,79c	139,44±27,61c
K Ingá 300	123,32±12,35b	128,03±29,45b	300,26±18,80a	88,48±19,14c	48,91±6,28d
K Ingá 400	116,60±13,52a	97,97±8,30b	74,85±8,24c	93,06±4,71b	58,64±5,77d

Nota. Dentro de cada linha, as médias com letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

3.3 POLIFENÓIS TOTAIS

No Kombucha (K) os níveis de polifenóis totais se elevaram atingindo o ápice no dia 7 (aumento de 14,28% em relação ao dia 0). K Ingá 50 não apresentou grande oscilação no teor de polifenóis no decorrer do tempo de fermentação. K Ingá 100 apresentou níveis estáveis até o dia 14 e aumento no dia 21 (aumento de 20% em relação ao dia 0). K Ingá 200 apresentou níveis estáveis até o dia 10, com aumento significativo no dia 14 (aumento de 14,28% em relação ao dia 0). Em K Ingá 300, o valores se mantiveram estáveis no decorrer do tempo. Já em K Ingá 400, os valores

se mantiveram estáveis até o dia 14 e sofreram aumento no dia 21 (aumento de 26,67% em relação ao dia 0) (**Tabela 7**).

Tabela 7. Polifenóis totais do Kombucha (método tradicional) e do Kombucha com *I. edulis*

	Polifenóis Totais (eq ácido gálico) mg/mL				
	Dia 0	Dia 7	Dia 10	Dia 14	Dia 21
Kombucha (K)	0,12±0,01bc	0,14±0,01a	0,13±0,01ab	0,12±0,01b	0,11±0,00c
K Ingá 50	0,13±0,01a	0,13±0,01a	0,13±0,01a	0,07±0,01b	0,14±0,01a
K Ingá 100	0,12±0,01b	0,12±0,01b	0,11±0,01b	0,11±0,01b	0,15±0,00a
K Ingá 200	0,12±0,01b	0,11±0,01b	0,11±0,01b	0,14±0,00a	0,11±0,00b
K Ingá 300	0,12±0,01ab	0,13±0,01a	0,13±0,01a	0,12±0,01ab	0,11±0,00b
K Ingá 400	0,11±0,01c	0,12±0,01bc	0,13±0,01b	0,13±0,01b	0,15±0,00a

Nota. Dentro de cada linha, as médias com letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

O tempo prolongado de fermentação (21 dias) acarretou aumento dos níveis de polifenóis totais especialmente para os fermentados com maior concentração do extrato de Ingá, conforme demonstrado na **Figura 3**.

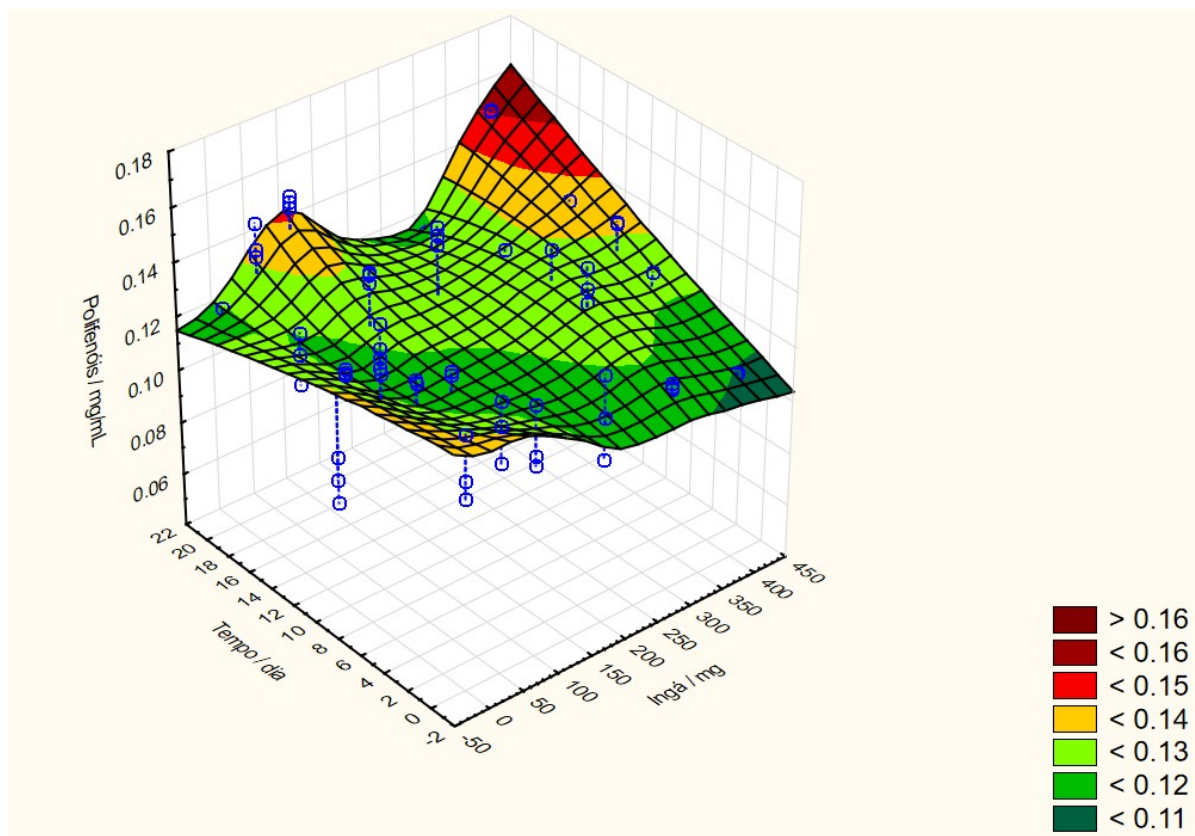


Figura 3. Superfície de resposta obtida por mínimos quadrados ponderados para o teor de polifenóis em função do tempo de fermentação e da concentração do extrato de Ingá.

3.4 FLAVONÓIDES

O incremento nos flavonóides foi superior nos fermentados com *I. edulis* em relação ao Kombucha (K). No Kombucha (K) ocorreu aumento de 14,28% entre os dias 0 e 10, ao passo que esse aumento foi de 50,88% para K Ingá 200, 59,62% para K Ingá 300 e 56,63% para K Ingá 400. De todos os fermentados analisados, os que apresentaram o maior teor de flavonóides foram K Ingá 300 e 400 (**Tabela 8**).

Tabela 8. Flavonóides do Kombucha (método tradicional) e do Kombucha com *I. edulis*

	Flavonóides (eq Quercetina) mg/mL				
	Dia 0	Dia 7	Dia 10	Dia 14	Dia 21
Kombucha (K)	0,036±0,01b	0,041±0,01a	0,042±0,00a	0,042±0,00a	0,027±0,01c
K Ingá 50	0,013±0,00c	0,013±0,00c	0,016±0,01b	0,024±0,01a	0,023±0,01a
K Ingá 100	0,035±0,01ab	0,037±0,01a	0,034±0,01b	0,023±0,00c	0,022±0,01c
K Ingá 200	0,028±0,01e	0,045±0,01c	0,057±0,00b	0,088±0,00a	0,035±0,01d
K Ingá 300	0,042±0,01d	0,059±0,01c	0,104±0,01a	0,074±0,01b	0,061±0,00e
K Ingá 400	0,049±0,02e	0,084±0,02c	0,113±0,00a	0,079±0,00d	0,098±0,00b

Nota. Dentro de cada linha, as médias com letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

Os teores de flavonóides se comportaram de forma semelhante ao que foi observado nos polifenóis totais: tempos mais longos de fermentação e concentrações maiores do extrato de Ingá resultaram em fermentados com teores de flavonóides mais pronunciados. Isto está demonstrado na **Figura 4**.

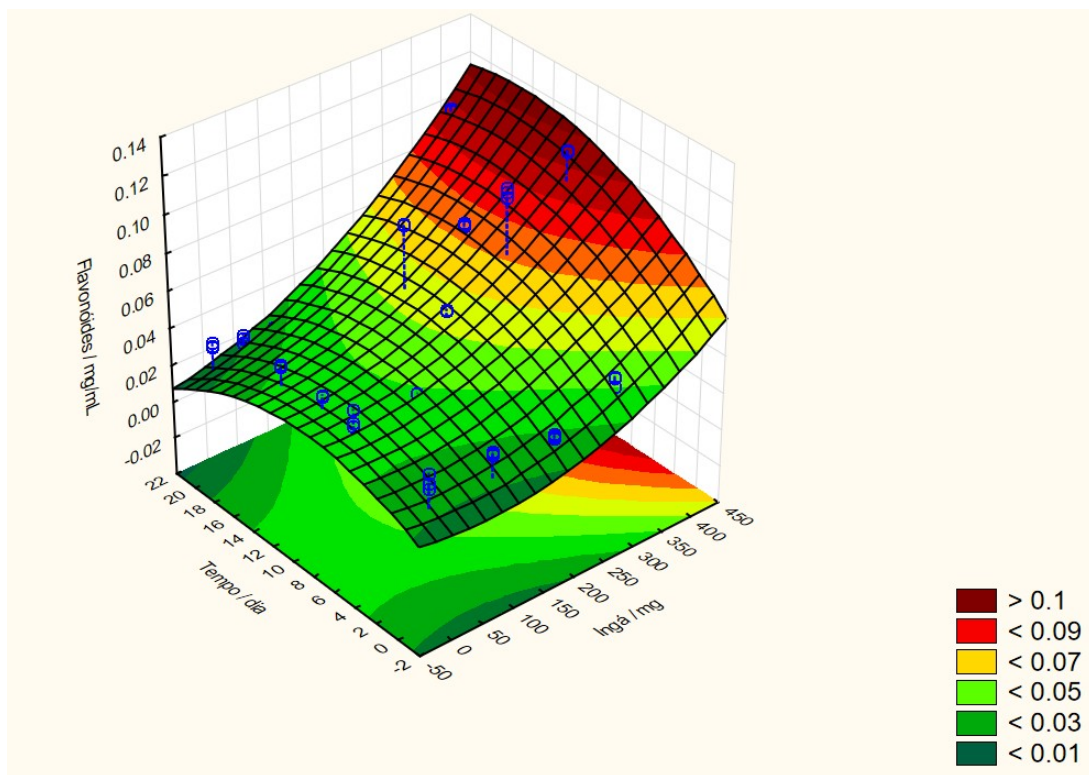


Figura 4. Superfície de resposta obtida por um modelo polinomial quadrático ($R^2=0,75$) para o teor de flavonóides em função do tempo de fermentação e da concentração do extrato de Ingá.

3.5 VIABILIDADE CELULAR *in vitro*

Os resultados encontram-se expressos na forma de percentual de células mortas. Foram considerados citotóxicos os fermentados que apresentaram resultado superior a 50%. Considerando-se a média, nenhuma amostra apresentou citotoxicidade. De forma geral, não foi observada alteração da viabilidade celular no decorrer do tempo de fermentação. A única exceção foi K Ingá 400 (**Tabela 9**).

Tabela 9. Atividade citotóxica in vitro do Kombucha (método tradicional) e do Kombucha com *I. edulis*. Dados apresentados como percentual de células mortas.

	% Citotoxicidade				
	Dia 0	Dia 7	Dia 10	Dia 14	Dia 21
Kombucha (K)	-57,59±20,81a	17,44±28,15a	13,83±4,90a	18,19±30,61a	-14,89±13,17a
Kombucha Ingá 50	28,65±39,62a	-32,48±18,19a	9,32±11,11a	12,97±21,26a	-9,85±7,63a
Kombucha Ingá 100	33,83±23,55a	-0,90±23,96a	19,85±17,56a	12,48±20,70a	-28,95±33,88a
Kombucha Ingá 200	30,15±27,23a	47,67±7,25a	13,16±17,45a	23,48±40,10a	-45,19±93,22a
Kombucha Ingá 300	-3,61±5,00a	11,58±17,28a	33,91±52,94a	10,72±18,13a	-5,64±71,33a
Kombucha Ingá 400	-45,19±64,68b	34,14±41,27ab	68,65±16,20a	21,84±37,61ab	-43,38±121,57b

Nota. Dentro de cada linha, as médias com letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

3.6 PCA

A decomposição em componentes principais (PCs) gerou um subespaço vetorial em R^3 capaz de explicar 71,6% da variância do conjunto global, originalmente com oito dimensões. Para a análise dos fatores, a **Figura 5** apresenta a representação no subespaço dos três primeiros PCs e a **Tabela 10** mostra as coordenadas de cada um separadamente.

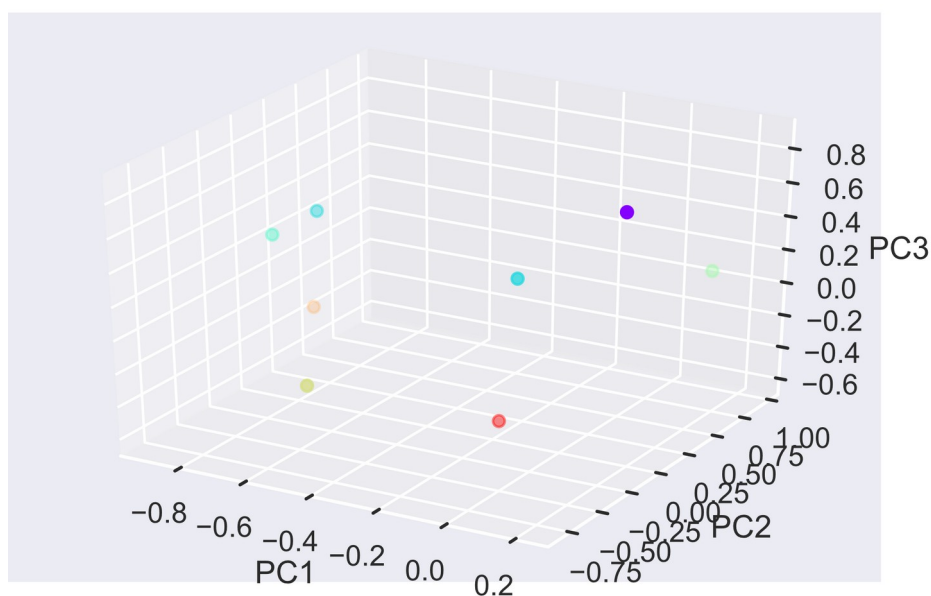


Figura 5. PCA para os fatores envolvidos.

Tabela 10. Coordenadas para os fatores projetados nos 3 PCs.

	PC1	PC2	PC3
Ingá / mg	-0.900944	0.082285	0.253677
Tempo / dia	0.216530	-0.111610	0.860880
Polifenóis / mg/mL	-0.076127	-0.150763	0.389007
Flavonóides / mg/mL	-0.805866	0.195999	0.385633
BRIX	-0.852229	0.268514	-0.249213
pH	-0.191016	0.028046	-0.595467
AT	-0.451594	-0.802765	-0.109329
SST/AT	0.122922	0.947281	0.057138

Houve a separação praticamente total de todos os fatores, exceto pelo relativo agrupamento do conteúdo de Ingá com o teor de flavonóides. Isto significa que é possível estabelecer uma relação entre a concentração do extrato de Ingá e o teor de flavonóides, o que não foi possível com os demais fatores. Para casos observados, aplicou-se a técnica de aprendizado de máquina k-means para tentar agrupar (*clustering*) os dados em cinco grupos (para observar se haveria agrupamento respeitando os cinco tempos de fermentação e/ou as cinco massas de ingá utilizadas).

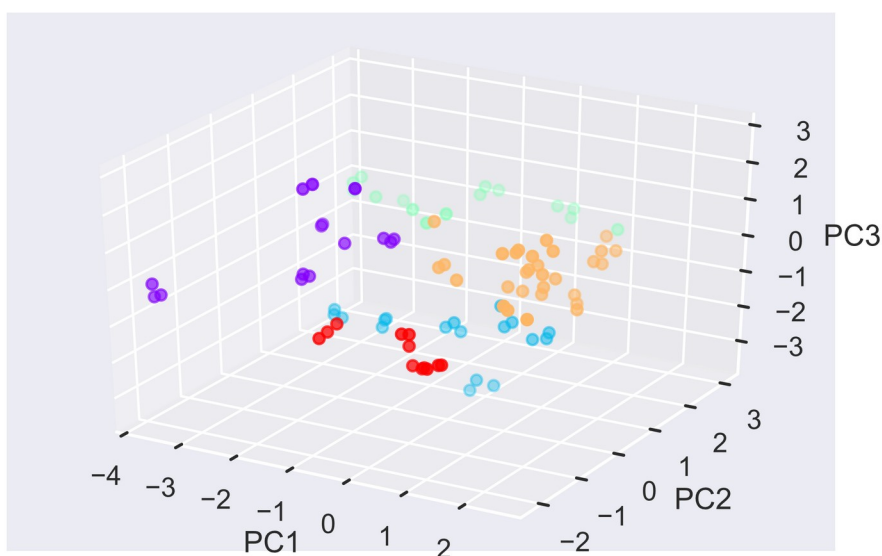


Figura 6. PCA para os fatores envolvidos. Cada cor representa um grupo obtido por k-means

A **Figura 6** demonstra que não ocorreu segregação significativa dos casos em cinco grupos homogêneos (por exemplo, os grupos em vermelho e verde-claro são menos populosos que o em bege), como seria o esperado caso houvesse separação por tempo de fermentação e/ou por conteúdo de Ingá.

4 DISCUSSÃO

As características organolépticas e o pH são indicativos de que o equilíbrio simbiótico foi mantido (Teoh, Heard, Cox, 2004; Nummer, 2013), o que foi constatado durante todo o tempo de fermentação nas amostras analisadas. Além disso, mostram que o extrato etanólico das folhas de *I. edulis* é um substrato adequado para fermentação.

A redução progressiva do pH, assim como a maior intensidade do odor avinagrado são sinais de que o processo de fermentação se manteve ativo. No início do processo de fermentação, as leveduras produzem as enzimas invertase, que clivam a sacarose em glicose e frutose (May et al., 2019). Estes são convertidos em ácidos orgânicos, gás carbônico e etanol pelas leveduras (Dimidi et al., 2019). O etanol é posteriormente oxidado pelas espécies de BPAC, resultando na produção de ácido acético. As BPAC também utilizam a D-glicose na síntese de celulose e do ácido glicurônico (Marsh et al., 2014).

O sabor azedo característico da bebida é oriundo da formação de ácidos orgânicos, em especial os ácido acético, glicurônico e glicônico. Quanto maior o teor de ácido acético mais intenso e desagradável será o sabor, ao passo que o ácido glicurônico e o ácido láctico proporcionam um sabor mais equilibrado e agradável (Jayabalan et al., 2014; Kallel et al., 2012). Um período de fermentação entre 7 a 10 dias origina uma bebida de acidez equilibrada e refrescante. Já as fermentações mais prolongadas resultam em uma bebida com sabor avinagrado (Chu & Chen, 2006), o que também foi observado em nosso estudo.

A acidez tem a função primordial de evitar o crescimento de outros microrganismos no Kombucha, sendo um importante parâmetro de qualidade da bebida (Loncar et al., 2006). No entanto, a fermentação durante períodos muito longos causa uma deterioração do Kombucha, bem como uma redução significativa do seu pH, devido ao acúmulo excessivo de ácidos. Valores de pH inferiores a 2,5 podem apresentar

efeito tóxico e tornam a bebida imprópria para o consumo (Amarasinghe, Weerakkody, Waisundara, 2018). A recomendação do FDA é de que o valor de pH seja superior a 2,5 (após 7 dias de fermentação) e igual ou inferior a 4,6 no início do processo de fermentação (Nummer, 2013). Todas as amostras analisadas no presente estudo apresentaram pH dentro dessa faixa, indicando que foram preparadas de maneira adequada e segura.

Os valores de pH inicial (dia 0) e final (dia 21) do Kombucha (K) foram de, no máximo, 4,36 e, no mínimo, 3,24, respectivamente. Houve menor variação do que a relatada por Kallel et al (2012) cujo fermentado a base de chá preto teve pH de 5,5 (dia 0) e de 2,6 ao final de 15 dias de fermentação. Os maiores e menores valores de pH dos fermentados com *I. edulis* se comportaram de forma mais semelhante aos relatados por esses autores (Kallel et al, 2012). Amarasinghe, Weerakkody, Waisundara (2018) relataram valores de 5,6 (dia 0) e 3,6 (dia 7) com pequeno aumento ao terceiro dia e queda progressiva nos dias seguintes.

A diferença referente a pH entre as amostras analisadas e outros estudos sobre Kombucha reside no fato de ter ocorrido aumento após o dia 10 e o dia 14 em algumas amostras ao invés de uma redução progressiva, o que seria esperado. O Kombucha é considerado uma matriz complexa (Dimidi et al., 2019) e a adição do extrato de *I. edulis* pode ter ocasionado mudanças na interação entre os microrganismos e entre os compostos formados. Há necessidade de mais estudos a fim de compreender tais mecanismos.

O ápice dos níveis de AT foi atingido no dia 7 em todos os fermentados. Trata-se possivelmente do momento de maior atividade das BPAC, as principais responsáveis pela produção dos ácidos orgânicos (Jayabalan et al., 2014; Soto-Villarreal et al., 2018). Resultados semelhantes foram relatados por (Chu & Chen, 2006; Jayabalan, Marimuthu, Swaminathan, 2007)

As oscilações da AT nos dias posteriores, como a queda no dia 10 e novo aumento no dia 14 (exceto para Ingá 300) e no dia 21 (Ingá 400) relatadas por esse trabalho não foram encontradas até então descritas na literatura científica. A maioria dos

estudos analisa os dias 7 e 14 ou compara o dia 0 com o dia 21, não apresentando os resultados de forma integral. Possivelmente tais variações representam ciclos de atividade dos microrganismos presentes no Kombucha ou de interações entre os compostos e merecem ser estudadas com maior profundidade.

O pH e a acidez titulável (AT) se apresentaram inversamente proporcionais. Isso pode ser explicado pelos métodos utilizados para mensurá-los. O pH consiste na medida do potencial hidrogeniônico, ou seja, dos íons H^+ livres no meio. Os ácidos orgânicos presentes nos fermentados são fracos. Já a AT foi mensurada através da titulação com NaOH, uma base forte que reage com os diversos ácidos presentes nas amostras. Daí a maior oscilação dos valores de AT em relação aos de pH (Zebebon, Pacuet, Tiglea, 2008). Outra possível razão para a menor variação de pH em relação a AT é o efeito tampão decorrente da presença dos ácidos orgânicos e seus respectivos sais (Neffe-Skocinska et al., 2017).

Os valores dos sólidos solúveis totais (SST) representam a medida indireta da quantidade de açúcares nas amostras (Zebebon, Pacuet, Tiglea, 2008). Os níveis de SST nas amostras analisadas variou de 4,13 a 6,54 °Brix, o que representa um baixo teor de açúcares. Para efeito comparativo, bebidas açucaradas como sucos industrializados prontos para o consumo apresentam em média 8 a 13 °Brix e sucos concentrados, teor de 55 a 66 °Brix (Cavalvanti AL et al., 2006). Os dados são compatíveis com o sabor do Kombucha, notavelmente mais ácido do que doce. No estudo conduzido por Amarasinghe, Weerakkody, Waisundara (2018) a variação de SST foi maior: de aproximadamente 4 para 2,1 °Brix em 7 dias de fermentação, com estabilização nos dias subsequentes até o final de 8 semanas de fermentação.

As variações de SST no decorrer dos dias de fermentação não foram pronunciadas quando comparadas a AT e a outros estudos. Isso é provavelmente relacionado com a atividade das espécies fúngicas do Kombucha, que sintetizam enzimas invertases. As invertases clivam a sacarose em glicose e frutose (May et al., 2019) utilizadas pelas BPAC na síntese da membrana de celulose (Cottet et al., 2020). Logo, valores relativamente estáveis de SST podem ser sinal de contínua atividade das leveduras, além da presença de polímeros de açúcares ainda solúveis.

A razão SST/AT é um parâmetro utilizado para avaliar a qualidade de alimentos e bebidas e monitorar o processo de produção. Representa, em termos de sabor, a razão entre dulçor e acidez (Segtowitz, Brunelli, Venturini, 2013). Quanto maior o valor de SST/AT, mais doce o produto. Quanto mais baixo, mais ácido. O Kombucha é notavelmente mais ácido do que doce, o que pode ser demonstrado por esse parâmetro. Enquanto os valores de SST não sofreram grande mudança, os valores de AT sofreram elevação atingindo o ápice no dia 7, diminuindo a razão SST/AT evidenciando um processo de fermentação ativo. Nos dias posteriores, o comportamento foi inversamente proporcional aos níveis de AT.

As diferenças nas características físico-químicas entre os fermentados desse e de outros trabalhos também podem ser decorrentes do tipo de açúcar utilizado, da qualidade do chá, do perfil microbiológico do SCOBY e das condições de fermentação, tais como tempo e temperatura (Soto-Villarreal et al., 2018; Cardoso et al., 2020).

A presença da membrana de celulose até o dia 21 é outro indicativo do bom andamento do processo de fermentação, indicando a manutenção da simbiose entre as bactérias e os fungos constituintes do Kombucha. Atribui-se a essa membrana as funções de proteção (na forma de barreira física) contra a colonização por outros microrganismos, além de impedir a evaporação do líquido (May et al., 2019). A principal espécie responsável pela produção da celulose é *Komagataeibacter xylinus* (Tan et al., 2012), além de outras BPAC tais como *Acetobacter* spp. e *Gluconacetobacter* spp. (Cottet et al., 2020; Watawana et al., 2016).

Com o passar dos dias de fermentação, ocorre depleção dos açúcares no meio e as leveduras passam a sintetizar invertase em ritmo mais intenso. Estima-se que essas leveduras consomem apenas 1% dos açúcares originários da clivagem da sacarose. Os açúcares disponíveis são, então, usados pelas bactérias na produção do filme de celulose (Celiker & Gore, 2012). O aumento da espessura da membrana continua até a síntese atingir seu limite. A partir desse momento, as bactérias apresentam queda importante de seu metabolismo em virtude da escassez de oxigênio (Czaja et

al., 2006). Assim, as bactérias que permanecerem na fase líquida do meio de cultura estarão em um estado dormente e poderão ser reativadas e usadas como inóculo em uma nova fermentação (Wolfe & Dutton, 2015).

Outra característica importante é a coloração da membrana, que tem relação com a presença de contaminantes. A coloração escura é o sinal mais comum de contaminação por microrganismos que não constituem o consórcio simbiótico do Kombucha (Malbasa et al., 2011). A falta de higiene durante o preparo do fermentado é uma das causas de reações adversas (Coton et al., 2017). Como as membranas de todas as amostras se mantiveram claras e com aspecto homogêneo, pode-se afirmar que a técnica de manejo e assepsia dos utensílios para a produção foi adequada e que não houve contaminação.

Os polifenóis são compostos que podem tratar e ou prevenir doenças em função de suas propriedades antioxidantes. A principal classe presente no Kombucha é a de flavonóides (cerca de 70% dos polifenóis totais), com destaque para as catequinas (epicatequina, epicatequinas galato, epigalocatequina e epigalocatequina galato) (Sharma et al. 2018). Durante a fermentação, os polifenóis são modificados e uma variedade de novos compostos é formada (Jayabalan, Marimuthu, Swaminathan, 2007).

Os resultados do presente estudo referentes ao Kombucha (K) foram semelhantes aos relatados por Kallel et al (2012): 0,11 mg.mL⁻¹ de polifenóis totais no Kombucha de chá preto no dia 0 e 0,12 mg.mL⁻¹ no dia 15 de fermentação. Em todos os fermentados com *S. cerevisiae* o aumento dos níveis de polifenóis e flavonóides foi superior ao verificado no Kombucha (K).

Para ambos os compostos dotados de atividades biológicas (polifenóis e flavonóide), o comportamento foi semelhante: teores maiores foram obtidos em tempos maiores de fermentação e em elevadas concentrações de Ingá. Foi identificado aumento progressivo durante todo o processo de fermentação (21 dias). Cabe ressaltar que aos 21 dias de fermentação, foi observada a deterioração das características organolépticas em especial no odor e no sabor. Isto dificulta a aceitação da bebida

fermentada. Dessa forma, o limite de tempo para manter uma bebida mais palatável parece ser 14 dias no caso de fermentados de Kombucha com adição de extrato de Ingá.

No que diz respeito ao ensaio de viabilidade celular *in vitro*, os fermentados produzidos não apresentaram efeitos citotóxicos. Assim como relatado por Cardoso et al (2019) e Gaggia et al (2019), o Kombucha produzido a partir do chá preto não mostrou efeito citotóxico. Os resultados do MTT dos fermentados com *I. edulis* foram semelhantes aos de Utoiu et al. (2018), que testou a fermentação secundária de Kombucha utilizando o pólen como substrato. Na pesquisa de Utoiu, os fermentados com menores concentrações de pólen (5 a 20 mg.mL⁻¹) resultaram em morte celular de até 20%, o que também ocorreu nos fermentados com K Ingá 50 (5 mg.mL⁻¹), 100 (10 mg.mL⁻¹), e 200 (20 mg.mL⁻¹), especialmente a partir dos dias 7 e 10. Já nas maiores concentrações de pólen (acima de 20 mg.mL⁻¹) o percentual de morte foi cerca de 63%. A única amostra de fermentados com *I. edulis* que apresentou valor próximo foi K Ingá 400 no dia 10.

Os resultados de viabilidade celular dos fermentados de *I. edulis* em concentrações mais baixas (K Ingá 50, 100 e 200) também foram próximos aos relatados por Alves (2019) que analisou o extrato das folhas dessa espécie sem fermentação. O extrato bruto de *I. edulis* em concentrações acima de 300 mostrou citotoxicidade *in vitro* o que não ocorreu nas amostras dos fermentados.

5 CONCLUSÃO

O extrato etanólico das folhas de *I. edulis* é um potencial substrato para fermentações a base de Kombucha tendo em vista que não foram observados efeitos tóxicos em análise preliminar e que o produto final apresentou características organolépticas compatíveis com boa palatabilidade e segurança. Tempos mais longos de fermentação e concentrações mais elevadas de *I. edulis* resultam em maiores teores de polifenóis e flavonóides.

Os achados desse trabalho são encorajadores para futuros estudos acerca da fermentação secundária de kombucha com extrato etanólico das folhas de *I. edulis* no intuito de compreender mais detalhadamente sua composição química, bem como elucidar os mecanismos envolvidos no processo de fermentação.

6 REFERÊNCIAS

- Alves GAD et al. Obtainment of an enriched fraction of *Inga edulis*: identification using UPLC-DAD-MS/MS and photochemopreventive screening. *Preparative Biochemistry and Biotechnolog.* 2019;, DOI: 10.1080/10826068.2019.1658118
- Amarasinghe H, Weerakkody NS, Waisundara VY. Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha "Tea Fungus" during extended periods of fermentation. *Food Sci Nutr.* 2018; 6: 659–665
- Baschali A et al. Traditional low-alcoholic and non-alcoholic fermented beverages consumed in European countries: a neglected food group. *Nutrition Research Review.* 2017; 1-14.
- Bauer-Petrovska B & Petrushevska-Tozi L. Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink. *Int J of Food Science and Technology.*2000; 35: 201–205.
- Böck FC et al. PhotoMetrix and colorimetric image analysis using smartphones. *Journal of Chemometrics.* 2020;e3251.
- Cardoso RR et al. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Research International* (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108782>
- Cavalcanti AL et al. Determinação dos Sólidos Solúveis Totais (OBrix) e pH em Bebidas Lácteas e Sucos de Frutas Industrializados. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada* [en linea]. 2006, 6(1), 57-64
- Celiker H, Gore J. 2012. Competition between species can stabilize public-goods cooperation within a species. *Molecular Systems Biology* 8(1):621 DOI 10.1038/msb.2012.54.
- Chakravorty S et al. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *Int J of Food Microbiology.* 2016; 220: 64-72.
- Chilton SN, Burton JP, Reid G. Inclusion of Fermented Foods in Food Guides around the World. *Nutrients.* 2015; 7: 390-404.
- Chu, S. C., & Chen, C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry.* 2006; 98(3), 502–507.
- Ciğeroğlu Z et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) leaves via D-optimal design and artificial neural network design with categorical and quantitative variables. *J Sci Food Agric.* 2018;98(12):4584-4596.
- Coton M et al. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *Fems Microbiology Ecology.* 2017; 93 (5): 1–16.

Cottet C et al. Biobased Materials from Microbial Biomass and Its Derivatives. *Materials* (Basel). 2020 Mar 11;13(6):1263. doi: 10.3390/ma13061263.

Czaja, W et al. Microbial cellulose - The natural power to heal wounds. *Biomaterials*. 2006; 27(2):145–151.

Dias ALS, Souza ANS, Rogez H. Enriquecimento De Compostos Fenólicos De Folhas De *Inga Edulis* Por Extração Em Fase Sólida: Quantificação De Seus Compostos Majoritários E Avaliação Da Capacidade Antioxidante. *Quim. Nova*. 2010; 33(1): 38-42.

Dimidi E et al. Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease. *Nutrients* 2019, 11, 1806; doi:10.3390/nu11081806

Gaggia F et al. Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. *Nutrients* 2019, 11, 1; doi:10.3390/nu11010001

Gomes RJ et al. Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. *FTB*. 2018; 56 (2): 139-147.

Hur SJ et al. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*. 2014; 160: 346–356.

Jayabalan R et al. Effect of solvent fractions of kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells—Characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidene) malonate and vitexin. *Indian Journal of Biotechnology*. 2011; 10: 75-82.

Jayabalan, R et al. A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2014, 13, 538–550.

Jayabalan R, Marimuthu S, Swaminathan K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*. 2007; 102: 392–398.

Kallel L et al. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. *Food Research International* 49 (2012) 226–232

Krepsky PB et al. Chemical composition and vasodilatation induced by *Cuphea carthagenensis* preparations. *Phytomedicine*. 2012;19(11):953-957.

Kumar D & Rizvi SI. Black tea extract improves anti-oxidant profile in experimental diabetic rats. *Arch Physiol Biochem*. 2015: 1-7.

Loncar E et al. Influence of working conditions upon kombucha conducted fermentation of black tea. *Food and Bioproducts Processing*. 2006; 84(3): 186-192.

Malbasa L et al. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of Kombucha beverage. *Food Chemistry*. 2011; 127(4): 1727–1731.

Marsh AJ et al. Fermented beverages with healthpromoting potential: Past and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*. 2014; 38(2): 113–124.

May A et al. Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. *PeerJ*. 2019; 7:e7565 DOI 10.7717/peerj.7565

Mosmann T.1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65:55–63.

Nummer BA. Kombucha Brewing Under the Food and Drug Administration Model Food Code: Risk Analysis and Processing Guidance. *J Env Health*. 2013; 76 (4): 8-11.

Pedregosa, F. *et al.* (2011). Scikit-learn: Machine learning in Python. *Journal of Machine Learning Research*. 2011; 12, 2825-2830.

Pompeu DR et al. Capacidade antioxidante e triagem farmacológica de extratos brutos de folhas de *Byrsonima crassifolia* e de *Inga edulis*. *Acta Amazonica*. 2012; 42(1): 165 – 172.

Roos JD & Vuyst LD. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Current Opinion in Biotechnology*. 2018; 49:115–119.

Segtowick ECS, Brunelli LT, Venturini WG. Avaliação físico-química e sensorial de fermentado de acerola. *Braz. J. Food Technol., Campinas*. v. 16, n. 2, p. 147-154, June 2013.

Sharma, P., M. K. Montes de Oca, A. R. Alkeswani, S. F. McClees, T. Das, C. A. Elmets, and F. Afaq. 2018. Tea polyphenols for the prevention of UVB-induced skin cancer. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 34 (1):50–59. doi: 10.1111/phpp.12356.

Tan LL et al. Bacterial cellulose synthesis in kombucha by *Gluconacetobacter* sp. and *Saccharomyces* sp. *Adv Mater Res* 2012, 554–556:1000-1003.

Teoh AL, Heard G, Cox J. Yeast ecology of Kombucha fermentation. *Int. J. Food Microbiol*. 2004; 95: 119–126.

Utoiu E et al. Bee Collected Pollen with Enhanced Health Benefits, Produced by Fermentation with a Kombucha Consortium. *Nutrients* 2018, 10, 1365; doi:10.3390/nu10101365

Villarreal-Soto SA et al. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *J Food Sci.* 2018; 83(3): 580-588.

Vitas J et al. The antioxidant activity of Kombucha fermented milk products with stinging nettle and winter savory. *Chem Ind and Chem Eng Quarterly.* 2013; 19(1): 129–139.

Vitas J et al. KOMBUCHA FERMENTATION OF SIX MEDICINAL HERBS: CHEMICAL PROFILE AND BIOLOGICAL ACTIVITY. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* 26 (2) 157–170 (2020)

Xu BJ, Chang SK. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J Food Sci.* 2007;72(2):S159-S166.

Zebebon O, Pacuet NS, Tiglea P. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: IV- Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 1 ed. Digital São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 2008; 85-129.

Watawan MI et al. Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. *J of Chemistry.* 2015; 1–11.

Watawan MI et al. Application of the Kombucha 'tea fungus' for the enhancement of antioxidant and starch hydrolase inhibitory properties of ten herbal teas. *Food Chem.* 2016; 1(194): 304-311.

Wold S. Principal component analysis. *Chemom Intell Lab Syst* 1987;2:37–52. <https://doi.org/10.1039/c3ay41907j>.

Wolfe BE & Dutton RJ. Fermented foods as experimentally tractable microbial ecosystems. *Cell.* 2015; 161(1): 49–55

Yang C, Lambert JD, Sang S. Antioxidative and anti-carcinogenic activities of tea polyphenols. *Arch Toxicol.* 2009; 83(1): 11.