

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**FERMENTAÇÃO SECUNDÁRIA DO KOMBUCHA COM A POLPA DE FRUTOS  
DO PALMITO JUÇARA (*Euterpe edulis* Martius): EFEITOS DO TEMPO E DA  
CONCENTRAÇÃO NA QUALIDADE DO PRODUTO**

**LEANDRO NUNES AZEVEDO**

**VILA VELHA**  
**OUTUBRO / 2020**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**FERMENTAÇÃO SECUNDÁRIA DO KOMBUCHA COM A POLPA DE FRUTOS  
DO PALMITO JUÇARA (*Euterpe edulis* Martius): EFEITOS DO TEMPO E DA  
CONCENTRAÇÃO 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.<sup>a</sup> Dra. Denise Coutinho Endringer.

**LEANDRO NUNES AZEVEDO**

**VILA VELHA**

**OUTUBRO / 2020**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

A994f Azevedo, Leandro Nunes.  
Fermentação secundária do Kombucha com a polpa de frutos do palmito juçara (*Euterpe edulis Martius*) : efeitos do tempo e da concentração na qualidade do produto / Leandro Nunes Azevedo. – 2020.

44 f. : il.

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

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Alimentos. 3. Fermentação. 4. Probióticos. I. Endringer, Denise Coutinho. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

LEANDRO NUNES AZEVEDO

**FERMENTAÇÃO SECUNDÁRIA DO KOMBUCHA COM A POLPA DE FRUTOS  
DO PALMITO JUÇARA (*Euterpe edulis* Martius): EFEITOS DO TEMPO E DA  
CONCENTRAÇÃO 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*

---

**Henrique Poltronieri Pacheco - UFRJ**

*Bianca Prandi*

---

**Bianca Prandi Campagnaro- UVV**

*Denise Coutinho*

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Denise Coutinho Endringer – UVV**

**(Orientadora)**

“The important thing in Science is not so much to obtain new facts as to discover new ways of thinking about them.”

Sir William Henry Bragg

Dedico esse trabalho aos meus pais, Roger e Roselene, que me serviram de exemplo de vida e de estudo, aos meus irmãos, Vinícius e Fabrício, que sempre me apoiaram e incentivaram na realização desse mestrado, a minha sogra, Anésia, pela paciência e incentivo e, finalmente, à minha esposa, Karla Taufner, pelo apoio constante durante a execução das pesquisas, pela inteligência, companheirismo e paciência.

## AGRADECIMENTOS

Esta dissertação é resultado da colaboração preciosa de diversas pessoas.

Aos professores e colegas da Universidade, o meu agradecimento. Que a fé e a coragem que depositam na pesquisa e na ciência brasileira sirvam de inspiração a muitos outros pesquisadores.

À minha orientadora Dra. Denise Coutinho Endringer e co-orientadora Girlândia Alexandre Brasil pela paciência, pelos ensinamentos, pelo rigor, pela disponibilidade, pelos exemplos e por todas as oportunidades de crescimento, meu muito obrigado.

Aos colegas dos laboratórios de Produtos Naturais e Estudos Animais, agradeço a disponibilidade e paciência em explicar os métodos e dispor de finais de semana para auxiliar nos experimentos.

À minha companheira de pesquisa e esposa, Karla Taufner, pela disponibilidade, pelo companheirismo e paciência, sem contar a mão firme e auxiliadora no manejo de tantas pipetas, buretas, Erlenmeyer, que sem esse apoio não teria sido possível um médico realizar experimentos laboratoriais tão distantes de sua formação primária.

Á Ana Cláudia Hertel Pereira pela ajuda nos experimentos e análises, por estar sempre disponível quando precisávamos de suporte técnico e apoio.

Ao grupo de Pesquisa do Professor Wanderson Romão da UFES/IFES pelas contribuições e colaborações.

E ao Sítio dos Palmitos de Pedra Azul, Domingos Martins/ES, que nos cedeu, tão gentilmente, os frutos.

Enfim, o meu agradecimento a todos aqueles que contribuíram, direta e indiretamente, na construção desse trabalho!

## RESUMO

AZEVEDO, Leandro Nunes, M.Sc. Universidade Vila Velha – ES, outubro de 2020.  
**Fermentação secundária do Kombucha com a polpa de frutos do palmito juçara (*Euterpe edulis* Martius): efeitos do tempo e da concentração na qualidade do produto.** Orientadora: Prof. Dra. Denise Coutinho Endringer.

O Kombucha é uma bebida que tem recebido ampla atenção publicitária e demanda comercial. Ela apresenta uma sensação ácida, carbonada e levemente adocicada ao paladar e é composta por uma simbiose de fungos, bactérias, açúcar e, tradicionalmente, o chá preto (*Camellia sinensis*), muito embora outros extratos tenham sido fermentados. O objetivo desse estudo foi investigar a composição química e as características sensoriais da fermentação secundária do Kombucha com a polpa de frutos do palmito juçara (*Euterpe edulis* Martius). Foram feitas fermentações com a adição de 50, 100, 200, 300 e 400mg da polpa do fruto da juçara e recolhidas amostras no início, 7<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias de fermentação. A seguir foram conduzidas a análise organoléptica, de pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais, determinação de polifenóis e flavonóides, ensaio de citotoxicidade *in vitro*, a Análise de Componentes Principais (PCA) e das superfícies de resposta. Foram constatadas a redução de pH, dos sólidos solúveis totais e dos flavonóides, o aumento da acidez titulável, da quantidade de polifenóis com o tempo de fermentação. Além disso, a fermentação não prejudicou a viabilidade celular nos ensaios de MTT e a superfície de resposta demonstrou maior concentração de polifenóis em tempos de fermentação e concentrações maiores da polpa dos frutos da Juçara.

**Palavras-chaves:** Probióticos; Alimento fermentado; Características Físico-químicas

## ABSTRACT

AZEVEDO, Leandro Nunes, M.Sc. Vila Velha University - ES, October 2020.  
**Secondary fermentation of Kombucha with the pulp of the juçara palm fruit (*Euterpe edulis* Martius): effects of time and concentration on product quality.**  
Advisor: Prof. Dra. Denise Coutinho Endringer.

Kombucha is a beverage with wide marketing and commercial demand. It has an acidic, carbonated and slightly sweet taste and is composed of an association of fungi, bacteria, sugar and traditionally black tea (*Camellia sinensis*), although other extracts have been fermented. The objective of this study was investigating the chemical composition and sensory characteristics of secondary fermentation of Kombucha with the fruit pulp of Juçara palm (*Euterpe edulis* Martius). Fermentations were made with 50, 100, 200, 300 and 400 mg of Juçara fruit pulp, and samples were collected at the beginning, 7th, 10th, 14th and 21st days of fermentation. Organoleptic analysis, pH, titratable acidity, total soluble solids, determination of polyphenols and flavonoids, *in vitro* cytotoxicity assay, principal component analysis (PCA) and response surfaces analysis were performed. There was a decrease in pH, total soluble solids and flavonoids, an increase in titratable acidity and in polyphenols with fermentation time. In addition, fermentation did not impair cell viability in MTT assays and response surface analysis showed a higher concentration of polyphenols in higher fermentation times and concentrations of the pulp of Juçara's fruits.

**Key words:** Probiotics; Fermented food; Physicochemical characteristics

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de Variância

AT – Acidez Titulável

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

FDA – Food and Drug Administration

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

PC – Componente Principal

PCA – Análise de Componente Principal

pH – Potencial Hidrogeniônico

SCOBY - Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast

SST – Sólidos Solúveis Totais

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estruturas dos constituintes químicos presentes no Kombucha.....	14
<b>Figura 2.</b> PCA para os casos envolvidos.....	28
<b>Figura 3.</b> Superfície de resposta obtida por mínimos quadrados ponderados para o conteúdo de polifenóis em função do tempo de fermentação e da massa de juçara. ....	29
<b>Figura 4.</b> Superfície de resposta obtida por mínimos quadrados ponderados para o conteúdo de flavonóides em função do tempo de fermentação e da massa de juçara. ....	30
<b>Figura 5.</b> Superfície de resposta obtida por ajuste polinomial biquadrático para SST em função do tempo de fermentação e da massa de juçara.....	31
<b>Figura 6.</b> Superfície de resposta obtida por ajuste polinomial biquadrático para o pH em função do tempo de fermentação e da massa de juçara.....	32
<b>Figura 7.</b> Superfície de resposta obtida por mínimos quadrados ponderados para AT em função do tempo de fermentação e da massa de juçara.....	33
<b>Figura 8.</b> Superfície de resposta obtida por mínimos quadrados ponderados para SST/AT em função do tempo de fermentação e da massa de juçara.....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Delineamento da produção de Kombucha com <i>Euterpe edulis</i> Martius....	17
Tabela 2. Características Organolépticas de Kombucha e <i>Euterpe edulis</i> .....	22
Tabela 3 – Valores de pH de Kombucha ao longo do tempo de fermentação e de diferentes concentrações.....	23
Tabela 4 - Acidez Titulável das amostras do Kombucha (g/100 ml).....	24
Tabela 5 - Sólidos Solúveis Totais das amostras de Kombucha.....	24
Tabela 6 - Comportamento de polifenóis (mg/mL) para as diferentes massas de juçara no sétimo e décimo quarto dias.....	24
Tabela 7 - Comportamento de flavonóides (mg/mL) para as diferentes massas de juçara, para 7 e 14 dias de fermentação.....	26
Tabela 8 - Citotoxicidade in vitro das amostras de Kombucha (%).....	27
Tabela 9 - Coordenadas para os fatores projetadas nos 3 PCs.....	27

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FLUXOGRAMAS

LISTA DE TABELAS

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
2.1 Polpa dos frutos de <i>Euterpe edulis</i> Martius.....	16
2.2 Kombucha.....	17
2.2.1 Primeira fermentação (método tradicional).....	17
2.2.2 Segunda fermentação.....	17
2.3 Características organolépticas.....	18
2.4 Determinação de pH, acidez titulável (AT) e sólidos solúveis totais (SST).....	18
2.5 Determinação de polifenóis totais.....	18
2.6 Determinação de flavonóides.....	19
2.7 Citotoxicidade <i>in vitro</i> - MTT.....	19
2.8 Análise de Componentes Principais (PCA).....	20
2.6 Análise estatística e matemática.....	20
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
3.1 Características Organolépticas do Kombucha de Juçara.....	20
3.2 pH, Acidez Titulável (AT) e Sólidos Solúveis Totais (SST).....	23
3.2.1 pH.....	23
3.2.2 Acidez Titulável.....	23
3.2.3 Sólidos Solúveis Totais (SST).....	24
3.3 Polifenóis totais.....	24
3.4 Flavonóides Totais.....	26
3.5 Citotoxicidade <i>in vitro</i> – MTT.....	27
3.6 Análise de Componentes Principais (PCA).....	27

3.7 Superfícies de resposta em função do tempo de fermentação e da massa de juçara..	28
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>37</b>

## 1 INTRODUÇÃO

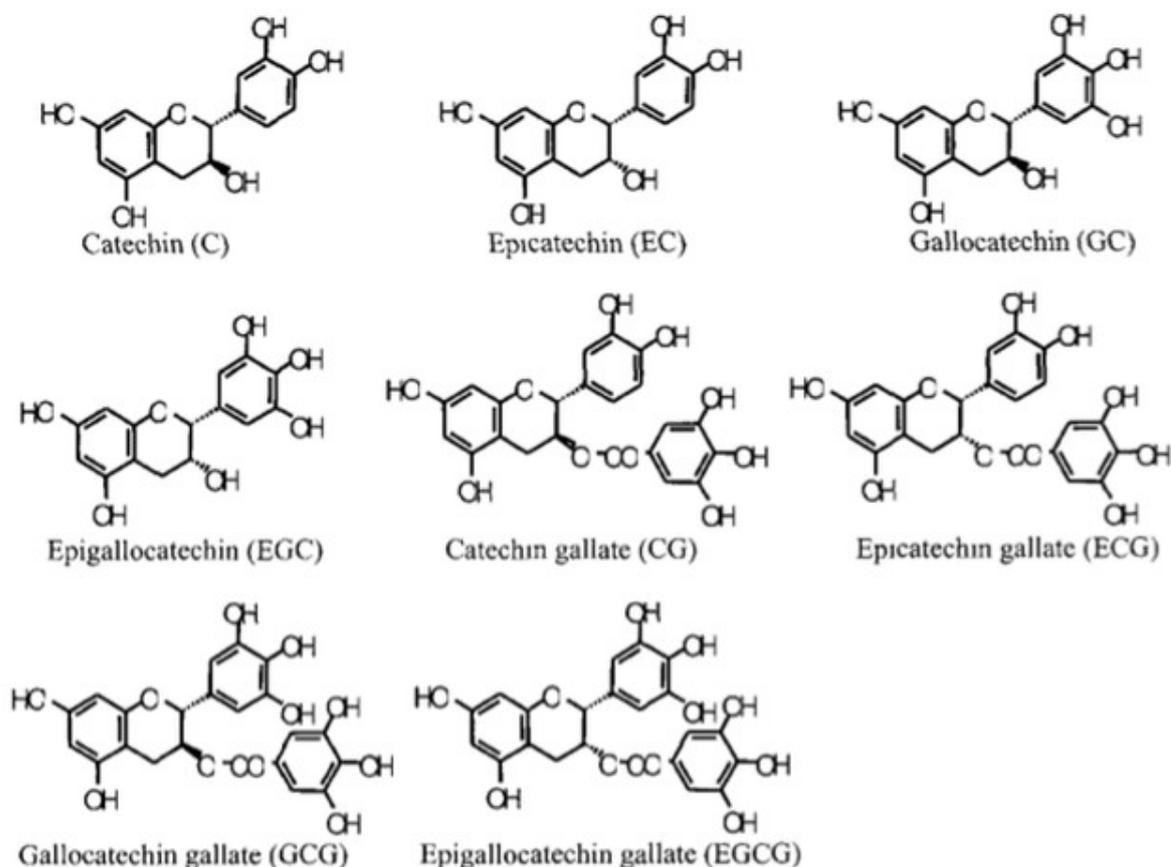
A fermentação é um método milenar de conservação alimentar e ultimamente tem atraído os consumidores devido às suas propriedades probióticas e efeitos benéficos para a saúde humana (MARCO e colab., 2017). Dentro desse escopo estão os probióticos que são alimentos, produtos ou preparações que contêm microrganismos viáveis que modulam a microbiota hospedeira e têm efeitos biológicos positivos conhecidos, tais como competição com bactérias patogênicas (DERRIEN e VAN HYLCKAMA VLIEG, 2015), produção de peptídeos bioativos e poliamidas com potencial efeito cardiovascular, imunitário e metabólico (PESSIONE e CIRRINCIONE, 2016).

Uma das bebidas fermentadas mais tradicionais é o Kombucha, cuja origem remonta ao período de 220 a.C na região da Manchúria, noroeste da China, tendo se disseminado para o Japão em 414 d.C. como um elixir (KALLEL e colab., 2012) e, posteriormente, para as rotas de comércio com a Rússia e a Europa Oriental (JAYABALAN, Rasu e colab., 2014) . Sua disseminação mundial ocorreu após a Segunda Grande Guerra e nos dias atuais têm ganhado grande popularidade (BASCHALI e colab., 2017).

O Kombucha é uma bebida ácida, carbonada e levemente adocicada formada por uma mistura de bactérias, fungos, chá (*Camellia sinensis*) e açúcar (LIU e colab., 1996), sendo composta por uma película de celulose contendo uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras denominada SCOBY e o caldo líquido fermentado (HAUSER, 1990). O substrato tradicional para o cultivo é o chá-verde ou chá preto adoçado com 5-8% de sacarose, ao qual o SCOBY é adicionado e deixado fermentar por 7 dias (KANURIĆ e colab., 2018) . Ao caldo resultante da fermentação tradicional, também podem ser adicionados outros substratos para uma fermentação secundária.

A composição microbiológica do SCOBY é variada, alguns autores demonstram a presença de diversas bactérias, destacando-se as dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, *Oenococcus* e *Lactobacillus* (COTON e colab., 2017) e por

leveduras, predominando as *Dekkera bruxellensis*, *Dekkera anomala* e *Hanseniaspora valbyensis*; e outras secundárias: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* e *Torulapsora delbrueckii* (COTON e colab., 2017). Em relação à composição química diversas substâncias com propriedades bioativas foram identificadas, com ênfase em compostos fenólicos. Estes representam o principal grupo de antioxidantes presentes no Kombucha e são responsáveis por algumas das propriedades terapêuticas da bebida. Entre os compostos fenólicos presentes no Kombucha do chá da *Camellia sinensis* estão os flavonóides, especialmente as catequinas (Figura 1) (JAYABALAN, R. e colab., 2007). No entanto, a bebida ainda apresenta outros compostos fundamentais como o ácido glucurônico e o ácido acético. O ácido glucurônico tem sido estudado por suas propriedades destoxicantes e de proteção hepática (HYUN e colab., 2016), e o ácido acético pela sua atividade antimicrobiana (LEAL e colab., 2018).



**Figura 1.** Estruturas dos constituintes químicos presentes no Kombucha

Fonte: Imagem retirada do site Catequinas (<https://catequinas.weebly.com/>)

Muitos outros estudos também investigaram os efeitos benéficos do Kombucha, como a hepatoproteção (BHATTACHARYA e colab., 2011), o efeito hipoglicemiante (ZUBAIDAH e colab., 2019), atividade antioxidante (BHATTACHARYA e colab., 2013), o efeito antidislipidêmico (YANG, Zhi-Wei e colab., 2009), o tratamento das úlceras gástricas (BANERJEE e colab., 2010), a melhora da resposta imune (SAI RAM e colab., 2000), destoxicante hepático (LONČAR e colab., 2000), a redução da artrite, aterosclerose, distúrbios metabólicos e problemas inflamatórios (JAYABALAN, Rasu e colab., 2014), além de efeitos terapêuticos no tratamento do câncer (JAYABALAN, Rasu e colab., 2014).

A fermentação secundária também tem sido utilizada como forma de modificar a composição e a atividade terapêutica de alguns extratos, como a *Salacca zalacca*, uma palmeira nativa de Java e Sumatra na Indonésia, que resultou no aumento de quantidade do ácido acético com atividade inibitória de bactérias Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativa (*Escherichia coli*), no aumento da atividade antioxidante mensurada pelo teste de atividade de *scavenging* do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e no aumento de conteúdo fenólico, de taninos e flavonóides (ZUBAIDAH e colab., 2018b).

A *Euterpe edulis* Martius é uma palmeira nativa da floresta Atlântica, distribuída ao longo da costa atlântica brasileira até a Argentina, conhecida popularmente como juçara (ou jussara). O palmito da palmeira juçara é visto economicamente como uma iguaria, tendo se tornado o segundo produto não-madeireiro mais exportado da Floresta Atlântica (SCHULZ e colab., 2016). Essa exploração contribuiu com a degradação ambiental e a quase destruição da espécie (SCHULZ e colab., 2016). Por essa razão, o consumo alternativo do fruto da juçara, com adição de valor nutricional, ambiental e econômico, tornaria a exploração sustentável, já que preservaria a planta (DA SILVA CAMPELO BORGES e colab., 2011; SCHULZ e colab., 2016).

O fruto dessa palmeira contém compostos bioativos como antocianinas, flavonoides e ácidos fenólicos relacionados a uma potente atividade antioxidante (YANG, Chung S. e colab., 2009), até melhor do que aquela da *E. oleracea* (SCHULZ e colab.,

2016). Diversos estudos das frutas da juçara têm demonstrado os efeitos antioxidantes *in vitro* (BICUDO e colab., 2014; SCHULZ e colab., 2015, 2016) e *in vivo* (CARDOSO, Alyne Lizane e colab., 2015). Estudos do nosso grupo demonstraram atividade nefroprotetora (CARDOSO, Priscylla Maria Martins e colab., 2020) de frutos de *E. edulis*, e quimiopreventiva de câncer (BARROSO e colab., 2019) e atividade anti-oxidante (MAZUCO e colab., 2018).

A procura por bebidas fermentadas está aumentando entre os consumidores na medida em que esses as percebem como um método importante de conservação dos alimentos que pode, também, trazer benefícios à saúde (CARDOSO, Rodrigo Rezende e colab., 2020; IVANIŠOVÁ e colab., 2020). O Kombucha, como bebida de chá fermentada, é consumido não só na Ásia, mas em outros países cuja ingestão se torna cada vez mais frequente. Seu preparo se dá principalmente a partir do chá preto, mas outras formas de fermentação secundária estão cada vez mais disponíveis. Apesar de encontrarmos referências na literatura sobre a composição físico-química e atividade antioxidante de preparo tradicional, não existem estudos suficientes sobre outros tipos de preparações secundárias. É por esse motivo que o nosso estudo incluiu uma fermentação com um fruto rico em polifenóis, cujo composição e potencial antioxidante pode variar segundo a quantidade da polpa adicionada e o tempo de fermentação.

Esse estudo tem por objetivo investigar a possibilidade de aplicação de diferentes quantidades da polpa dos frutos da *Euterpe edulis* Martius na produção de bebidas Kombucha com diferentes tempos de fermentação com o objetivo de adquirir conhecimentos sobre a composição físico-química e as características sensoriais.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Polpa dos frutos de *Euterpe edulis* Martius**

Os frutos de *E. edulis* Martius foram doados pelo Sítio dos Palmitos, propriedade situada no município de Domingos Martins, Espírito Santo, Brasil. A polpa foi produzida segundo método descrito pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (MATTA e colab., 2005). Os frutos foram prensados manualmente com

o mínimo de água (cerca de 3 mL para cada g de fruto), separados das sementes e a pasta obtida foi filtrada para remoção de resíduos de fibra e casca. Número de cadastro no Sisgen Nº AF1F18D.

## 2.2 Kombucha

### 2.2.1 Primeira fermentação (método tradicional)

O produto fermentado foi produzido segundo as especificações do *Food and Drug Administration (FDA)* (NUMMER, 2013). A infusão foi obtida a partir da mistura do chá preto (*Camelia sinensis*) obtido de um mercado local (15g/L) e a sacarose (5% p/v). Após o completo resfriamento, o chá foi inoculado com o Kombucha adquirido da Fermentare Produção e Comércio de Produtos Naturais Ltda, São Paulo, SP, Brasil, e o processo ocorreu ao longo de 7 (sete) dias em temperatura de  $25\pm 2$  °C em um pote de vidro sem tampa, envolto por um tecido de algodão.

Segundo o fabricante, foram identificados alguns microrganismos na colônia de Kombucha, dentre as bactérias: *Acetobacter spp* e *Bacterium gluconicum*, e as espécies fúngicas: *Dekkera bruxellensis*, *Pichia membranaefaciens*, *Zygosaccharomyces bisporus* e *Kluyveromyces marxianus*.

### 2.2.2 Segunda fermentação

A fermentação secundária foi obtida a partir da mistura de 50 a 400 mg da polpa de *E. edulis*, conforme a Tabela 1. Foi empregado o método proposto por Zubaidah et al. (ZUBAIDAH e colab., 2018a), que inclui 10% (v/v) do fermentado do Kombucha tradicional e 5% (p/v) da sacarose.

**Tabela 1.** Delineamento da produção de Kombucha com *Euterpe edulis* Martius

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

<b>K + E. edulis 300</b>	1	300	0,5	10
<b>K + E. edulis 400</b>	1	400	0,5	10

A fermentação foi interrompida através do congelamento (-20°C) das amostras nos dias 0, 7, 10, 14 e 21 (KALLEL e colab., 2012). Todas as amostras foram produzidas em triplicata biológica e submetida às análises organolépticas e físico-químicas, totalizando 90 unidades amostrais. Em todas essas análises foi utilizada a fração líquida do produto fermentado.

### 2.3 Características organolépticas

A cor, odor e consistência dos fermentados foram avaliadas e descritas segundo o teste de características sensoriais para Análise de Alimentos do Instituto Adolf Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

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

Empregando-se um pHmetro (Metron® modelo 827 pH Lab) foram realizadas as análises de pH e um refratômetro de bancada (Abbé® com escala de refração de 1,300-1,72 nD de 0-95 °Brix modelo 2 WAJ), o teor de sólidos solúveis totais (SST). A acidez titulável (AT) foi determinada por meio da titulação com NaOH 0,01 M (Sigma®) e expressa em g de ácido acético por 100 mL de amostra. Também foi calculada a razão SST/AT pela divisão do valor da leitura de SST pelo valor de AT. Os procedimentos foram executados segundo o Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

### 2.5 Determinação de polifenóis totais

O método aplicado foi descrito por Krepsky et al (2012) adaptado (KREPSKY e colab., 2012), que consiste em transferir 25 µL de amostra (diluída a 1:4) para microplacas de 96 poços e fundo transparente e logo a seguir, nesta ordem, 10 µL de Reagente de Folin-Ciocalteu 10% e 215 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10,6%. Após aguardar 3

minutos as leituras foram feitas pelo aplicativo PhotoMetrix® em smartphone (BÖCK e colab., 2020). A água deionizada foi utilizada como branco.

Todo o experimento foi conduzido em temperatura ambiente e em baixa luminosidade. A curva de calibração foi obtida através do ácido gálico (Sigma Aldrich®) em diferentes concentrações (0,15 – 0,50 mg.mL<sup>-1</sup>). Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (mg.mL<sup>-1</sup>).

## 2.6 Determinação de flavonóides

O teor de flavonóides foi determinado segundo método descrito por Xu e Chang (2007) (XU e CHANG, 2007). Foi utilizado um espectrofotômetro FilterMax-5 Multi-Mode Microplate Reader® utilizando-se de microplacas de 96 poços e fundo transparente. A cada poço foram transferidos 180 µL de amostra (diluída a 1:30) e 15 µL de NaNO<sub>2</sub> 2,5 %. Após aguardar 6 minutos, foram adicionados, em cada poço, 15 µL de AlCl<sub>3</sub> 10 % e logo após 5 minutos, 50 µL de NaOH 1M. Ao final de 10 minutos, realizou-se leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 415 nm, descontando-se os valores do branco (água) e do branco da amostra.

O experimento foi realizado a temperatura ambiente e em baixa luminosidade.

A curva de calibração foi obtida através da quercetina em diferentes concentrações (0,015 – 0,050 mg.mL<sup>-1</sup>). Os resultados foram expressos em equivalentes de quercetina (EQ) (mg.mL<sup>-1</sup>).

## 2.7 Citotoxicidade *in vitro* - MTT

A citotoxicidade *in vitro* dos fermentados foi avaliada por meio de um ensaio colorimétrico MTT, segundo descrito por Mosmann (1983)(MOSMANN, 1983). Nesse método foram transferidos para incubação os fibroblastos 3T3 ou HEPA h1c1c7 para uma microplaca de 96 poços na concentração final de 7 x 10<sup>5</sup> células/ml. No dia subsequente, as células foram expostas aos fermentados e submetidas a 24 horas de incubação. Logo em seguida foram titulados 100 µL de MTT (1 mg/mL) em cada poço e a placa foi incubada por 2 horas. Após este tempo foram adicionados 100 µL de DMSO em cada poço 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 Análise de Componentes Principais (PCA)

O modelo PCA foi produzido a partir dos dados quantitativos das propriedades físico-químicas das amostras de Kombucha. As informações foram implementadas no software Statistica v.10. Dessa análise, por meio de autovalores e autovetores foram obtidas novas coordenadas compostas das componentes principais (PCs). Essas foram submetidas a um algoritmo k-means de *clustering*. Os hiperparâmetros do algoritmo foram preservados nos valores padrão do pacote Scikit-learn (Pedrogosa et al., 2011), escrito em Python. Foram escolhidos 5 clusters para essa análise.

## 2.6 Análise estatística e matemática

Em relação às variáveis pH, acidez titulável e sólidos solúveis totais, todas as médias e desvio-padrões das triplicatas das amostras foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% ( $p < 0,05$ ) por meio do software GraphPad Prism versão 8.3.

Para o teor de polifenóis totais e flavonóides, a comparação estatística foi realizada através da construção de intervalo de confiança pelo teste t de Student com 95% de confiança, realizado pelo software Excel. Os valores sobrepostos de intervalos de confiança denotam conjuntos estatisticamente iguais, enquanto os valores disjuntos, conjuntos estatisticamente diferentes.

As superfícies de resposta foram obtidas com o software Statistica v.10. Os métodos de regressão próprios do programa foram utilizados tanto para obtenção das superfícies de resposta por mínimos quadrados ponderados, quanto para o modelo polinomial biquadrático para o teor de flavonoides.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Características Organolépticas do Kombucha de Juçara

O fermentado de Kombucha de chá preto apresentou, no início, aparência líquida com a presença de uma fina película acastanhada, quase transparente. A partir do

sétimo dia, uma cor marrom-avermelhado, odor acético, sabor levemente ácido e agradável. Com o decorrer do tempo de fermentação, foi notada uma intensificação do odor e do sabor avinagrado, além do espessamento da película e coloração mais acastanhada do líquido (Tabela 2).

As amostras do Kombucha com *E. edulis* apresentaram cor violeta clara (Tabela 2). Também foi identificado odor aromático a partir do sétimo dia de fermentação, que se intensificou na medida em que o tempo progrediu. O sabor foi acético (7º e 10º dia), até avinagrado nos tempos de fermentação maiores (14º e 21º dia). Notou-se a formação de uma película em todas as amostras, apresentando cor avermelhada, diferente daquela dos fermentados do Kombucha de chá preto. Essa também se espessou conforme o tempo de fermentação progrediu, compostas de várias camadas sobrepostas (Tabela 2).

**Tabela 2. Características Organolépticas de Kombucha e Euterpe edulis**

	0	7	10	14	21	Parâmetros
<b>Kombucha (K)</b>	Marrom-avermelhada	Marrom-avermelhada	Marrom avermelhada	Marrom avermelhada	Marrom avermelhada	Cor
	Aromático	Acético	Acético	Acético	Acético	Odor
	Neutro	Ácido	Ácido	Ácido	Muito ácido	Sabor
	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	Película
<b>K + I. edulis 50</b>	Violeta claro	Cor				
	Aromático	Aromático	Aromático	Acético	Acético	Odor
	Neutro	Levemente ácido	Levemente Ácido	Ácido	Muito ácido	Sabor
	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	Película
<b>K + I. edulis 100</b>	Violeta claro	Cor				
	Aromático	Aromático	Aromático	Acético	Acético	Odor
	Neutro	Levemente ácido	Levemente ácido	Ácido	Ácido	Sabor
	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	Película
<b>K + I. edulis 200</b>	Violeta claro	Cor				
	Aromático	Aromático	Aromático	Acético	Acético	Odor
	Neutro	Levemente ácido	Levemente ácido	Ácido	Ácido	Sabor
	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	Película
<b>K + I. edulis 300</b>	Violeta escuro	Violeta claro	Violeta claro	Violeta claro	Violeta claro	Cor
	Aromático	Aromático	Aromático	Acético	Acético	Odor
	Neutro	Levemente ácido	Levemente ácido	Ácido	Ácido	Sabor
	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	Película
<b>K + I. edulis 400</b>	Violeta escuro	Violeta claro	Violeta claro	Violeta claro	Violeta claro	Cor
	Aromático	Aromático	Aromático	Acético	Acético	Odor
	Neutro	Levemente ácido	Levemente ácido	Ácido	Ácido	Sabor
	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	Película

## 3.2 pH, Acidez Titulável (AT) e Sólidos Solúveis Totais (SST)

### 3.2.1 pH

A análise dos valores de pH evidenciou uma redução em todas as amostras conforme o tempo da fermentação avançou. A diminuição máxima desse parâmetro foi observada no 7º dia do Kombucha da Juçara 400, com o valor de 2,88 (Tabela 3). Conforme o tempo de fermentação aumentou os valores de pH reduziram de modo estatisticamente significativo nas diversas formulações, quando comparamos o 7º dia ao 21º dia de fermentação, exceto o Kombucha de Juçara 400 (Tabela 3).

**Tabela 3** - Valores de pH de Kombucha ao longo do tempo de fermentação e de diferentes concentrações

	Dia 0	Dia 7	Dia 10	Dia 14	Dia 21
K Chá Preto	4,36±0,03 <sub>a</sub>	3,91±0,03 <sub>b</sub>	3,14±0,15 <sub>c</sub>	3,20±0,02 <sub>c</sub>	3,24±0,01 <sub>c</sub>
K Juçara 50	3,93±0,11 <sub>a</sub>	3,96±0,05 <sub>a</sub>	2,74±0,20 <sub>b</sub>	2,91±0,03 <sub>b</sub>	2,97±0,02 <sub>b</sub>
K Juçara 100	4,06±0,04 <sub>a</sub>	3,98±0,02 <sub>a</sub>	2,85±0,06 <sub>b</sub>	2,95±0,05 <sub>b</sub>	2,95±0,04 <sub>b</sub>
K Juçara 200	3,43±0,12 <sub>a</sub>	3,19±0,10 <sub>b</sub>	2,90±0,02 <sub>c</sub>	2,91±0,05 <sub>c</sub>	2,91±0,02 <sub>c</sub>
K Juçara 300	3,52±0,08 <sub>a</sub>	3,21±0,02 <sub>b</sub>	2,80±0,05 <sub>c</sub>	2,87±0,04 <sub>c</sub>	2,82±0,02 <sub>c</sub>
K Juçara 400	3,70±0,02 <sub>a</sub>	2,88±0,01 <sub>b</sub>	2,75±0,05 <sub>d</sub>	2,79±0,00 <sub>c</sub>	2,79±0,03 <sub>c</sub>

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

### 3.2.2 Acidez Titulável

Neste estudo, o Kombucha de chá preto (tradicional) apresentou um aumento do conteúdo de ácidos totais do dia zero de fermentação para o dia 7, em seguida uma redução do 7º para o 10º dia e um aumento progressivo nos tempos posteriores (14 e 21 dias). A quantidade de ácidos totais no 21º dia de fermentação foi maior do que a do dia 0, porém menor do que a do dia 7 (Tabela 4).

O mesmo comportamento ocorreu com os diferentes grupos do Kombucha de Juçara, sendo encontrada a maior acidez no sétimo dia de fermentação do Kombucha de Juçara 200 e no vigésimo primeiro dia do Kombucha de Juçara 400 (Tabela 4).

**Tabela 4 - Acidez Titulável das amostras do Kombucha (g/100 ml)**

	Dia 0	Dia 7	Dia 10	Dia 14	Dia 21
<b>K Chá Preto</b>	0,039±0,003 <sub>c</sub>	0,087±0,003 <sub>a</sub>	0,032±0,003 <sub>c</sub>	0,040±0,005 <sub>c</sub>	0,072±0,000 <sub>b</sub>
<b>K Juçara 50</b>	0,026±0,002 <sub>a</sub>	0,029±0,002 <sub>a</sub>	0,010±0,001 <sub>c</sub>	0,018±0,003 <sub>b</sub>	0,026±0,003 <sub>a</sub>
<b>K Juçara 100</b>	0,024±0,001 <sub>b</sub>	0,035±0,002 <sub>a</sub>	0,013±0,001 <sub>d</sub>	0,018±0,002 <sub>c</sub>	0,023±0,002 <sub>b</sub>
<b>K Juçara 200</b>	0,028±0,002 <sub>b</sub>	0,052±0,001 <sub>a</sub>	0,014±0,001 <sub>c</sub>	0,024±0,0005 <sub>b</sub>	0,028±0,002 <sub>b</sub>
<b>K Juçara 300</b>	0,023±0,002 <sub>d</sub>	0,062±0,004 <sub>a</sub>	0,017±0,002 <sub>e</sub>	0,032±0,001 <sub>c</sub>	0,036±0,000 <sub>b</sub>
<b>K Juçara 400</b>	0,030±0,003 <sub>c</sub>	0,097±0,005 <sub>a</sub>	0,022±0,001 <sub>d</sub>	0,036±0,003 <sub>b</sub>	0,041±0,004 <sub>b</sub>

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

### 3.2.3 Sólidos Solúveis Totais (SST)

A análise refratométrica dos sólidos solúveis totais apresentou uma redução dos graus Brix ao longo do tempo na fermentação em todas as amostras entre os dias 0-14 (Tabela 5), exceto o Kombucha de Juçara 200, e uma elevação entre o dia 14-21 de fermentação, exceto o Kombucha de Chá Preto.

**Tabela 5 - Sólidos Solúveis Totais das amostras de Kombucha**

	Dia 0	Dia 7	Dia 10	Dia 14	Dia 21
<b>K Chá Preto</b>	5,33±0,140 <sub>a</sub>	4,50±0,001 <sub>b</sub>	4,50±0,001 <sub>b</sub>	4,50±0,001 <sub>b</sub>	3,50±0,001 <sub>c</sub>
<b>K Juçara 50</b>	4,25±0,001 <sub>a</sub>	4,00±0,001 <sub>b</sub>	4,00±0,001 <sub>b</sub>	4,00±0,001 <sub>c</sub>	3,50±0,001 <sub>c</sub>
<b>K Juçara 100</b>	4,25±0,001 <sub>a</sub>	4,00±0,001 <sub>a</sub>	4,00±0,001 <sub>a</sub>	3,50±0,001 <sub>c</sub>	3,83±0,29 <sub>b</sub>
<b>K Juçara 200</b>	4,23±0,015 <sub>a</sub>	4,00±0,001 <sub>a</sub>	4,00±0,001 <sub>a</sub>	3,25±0,050 <sub>c,a</sub>	3,67±0,14 <sub>b</sub>
<b>K Juçara 300</b>	4,24±0,001 <sub>a</sub>	4,00±0,001 <sub>b</sub>	4,00±0,001 <sub>b</sub>	3,50±0,001 <sub>c</sub>	4,00±0,001 <sub>b</sub>
<b>K Juçara 400</b>	4,23±0,015 <sub>a</sub>	4,00±0,001 <sub>b</sub>	4,00±0,001 <sub>b</sub>	3,50±0,001 <sub>d</sub>	3,83±0,140 <sub>c</sub>

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

### 3.3 Polifenóis totais

Uma vez que as características organolépticas das amostras para os tempos de fermentação acima de 14 dias as tornaram pouco palatáveis para consumo humano, compararam-se os teores de polifenóis para diferentes massas de juçara nos tempos 7 e 14 dias. A tabela 6 demonstra os intervalos de confiança para polifenóis.

**Tabela 6 - Comportamento de polifenóis (mg/mL) para as diferentes massas de juçara no sétimo e décimo quarto dias**

Massa de juçara / mg	7 dias		14 dias	
	Valor inferior do intervalo	Valor superior do intervalo	Valor inferior do intervalo	Valor superior do intervalo

0	0,092	0,151	0,098	0,145
50	0,113	0,123	0,130	0,133
100	0,129	0,135	0,118	0,186
200	0,130	0,137	0,149	0,156
300	0,139	0,147	0,152	0,159
400	0,124	0,155	0,168	0,181

Os teores de polifenóis dentro do mesmo tempo de fermentação apresentaram difícil discriminação pela grande variância dos dados, especialmente das fermentações com o chá tradicional e com 400 mg de juçara em 7 e 14 dias, e da fermentação com 100 mg de juçara em 14 dias.

Se fixado o tempo de fermentação em 7 dias, o chá com 50 mg de juçara apresentou um conteúdo de polifenóis inferior aos demais. Além disso, o chá com 300 mg de Juçara evidenciou um teor de polifenóis estatisticamente superior aos daqueles com 100 mg e 200 mg. Não foi possível segregar as fermentações com chá tradicional e com 400 mg de juçara dos demais, pela grande dispersão de dados observada.

Se fixado o tempo de fermentação para 14 dias, o chá com 50 mg de juçara apresentou o menor teor de polifenóis, quando comparado aos demais. A fermentação com 400 mg de juçara apresentou, estatisticamente, o melhor conteúdo de polifenóis, mas não pode ser diferenciado do chá com 100 mg, já que o intervalo de confiança desse é muito amplo e estatisticamente indiferenciável de todos os outros.

Quando analisado dentro das mesmas massas de juçara, mas com tempos de fermentação diferentes, houve uma tendência de todos os chás de Juçara a apresentarem um maior teor de polifenóis após 14 dias de fermentação. A exceção foi o chá com 100 mg de juçara que evidenciou dados muito dispersos, dificultando a análise estatística rigorosa.

### 3.4. Flavonóides Totais

Da mesma forma que para os polifenóis, em que os tempos de fermentação acima de 14 dias tornam o produto pouco palatável para consumo humano, compararam-se os teores de flavonóides para diferentes massas de juçara nos tempos 7 e 14 dias. A tabela 7 demonstra os intervalos de confiança para flavonóides.

**Tabela 7 - Comportamento de flavonóides (mg/mL) para as diferentes massas de juçara, para 7 e 14 dias de fermentação.**

Massa de juçara / mg	7 dias		14 dias	
	Valor inferior do intervalo	Valor superior do intervalo	Valor inferior do intervalo	Valor superior do intervalo
0	0,026	0,046	0,041	0,044
50	0,008	0,013	0,010	0,014
100	0,021	0,034	0,013	0,013
200	0,029	0,032	0,014	0,015
300	0,019	0,034	0,016	0,018
400	0,015	0,017	0,021	0,024

O conteúdo de flavonóides não foi beneficiado com a adição de polpa dos frutos da juçara, uma vez que no sétimo de fermentação não houve diferença estatística entre o chá tradicional (controle) e os chás com adição de 100mg, 200 mg e 300 mg de Juçara. Inclusive houve a redução do teor de flavonóides nos chás com 50 mg e 400 mg de Juçara. Para os 14 dias de fermentação, o chá tradicional foi estatisticamente superior aos demais, confirmando a tendência de que a adição de juçara surtiu com efeitos negativos sobre o conteúdo de flavonóides na bebida.

Já quando olhamos para os diferentes tempos de fermentação com as massas de juçara fixas, os valores para o sétimo dia são estatisticamente superiores aos dos 14 dias pra os chás com 100 mg, 200 mg e 300 mg. Para o chá tradicional e com 50 mg

de Juçara não há diferença estatística entre os tempos de fermentação. Para o chá com 400 mg, o valor de flavonóides para 14 dias foi superior ao do sétimo dia.

### 3.5 Citotoxicidade *in vitro* – MTT

Os resultados obtidos após incubação de 24 horas com as diferentes amostras de Kombucha com a polpa da Juçara indicam que o produto possui boa biocompatibilidade em todas as concentrações estudadas. No Kombucha de Juçara 400 e demais dias de fermentação das demais concentrações houve viabilidade celular acima de 63%. Essa última corresponde a leitura obtida do Kombucha de Juçara 400 no 21º dia de fermentação.

**Tabela 8 - Citotoxicidade *in vitro* das amostras de Kombucha (%)**

	Dia 0	Dia 7	Dia 10	Dia 14	Dia 21
<b>Kombucha Chá Preto</b>	0,00±0,00 <sub>b</sub>	0,00±0,00 <sub>b</sub>	0,00±0,00 <sub>b</sub>	0,00±0,00 <sub>b</sub>	4,53±1,05 <sub>a</sub>
<b>K Juçara 50</b>	0,00±0,00 <sub>c</sub>	0,85±1,47 <sub>c</sub>	0,62±0,62 <sub>c</sub>	2,85±0,00 <sub>b</sub>	16,97±3,14 <sub>a</sub>
<b>Kombucha Juçara 100</b>	0,00±0,00 <sub>c</sub>	0,21±0,37 <sub>c</sub>	4,39±4,39 <sub>c</sub>	6,34±0,00 <sub>b</sub>	23,06±2,85 <sub>a</sub>
<b>Kombucha Juçara 200</b>	0,00±0,00 <sub>c</sub>	11,27±6,67 <sub>b</sub>	8,74±8,74 <sub>b</sub>	5,84±0,00 <sub>b</sub>	30,7±1,19 <sub>a</sub>
<b>Kombucha Juçara 300</b>	0,00±0,00 <sub>d</sub>	16,62±1,40 <sub>c</sub>	26,47±2,47 <sub>a</sub>	20,82±0,00 <sub>b</sub>	24,16±4,04 <sub>ab</sub>
<b>Kombucha Juçara 400</b>	0,98±0,85 <sub>d</sub>	11,28±1,74 <sub>c</sub>	22,2±2,20 <sub>ab</sub>	11,83±0,00 <sub>c</sub>	36,34±0,65 <sub>a</sub>

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

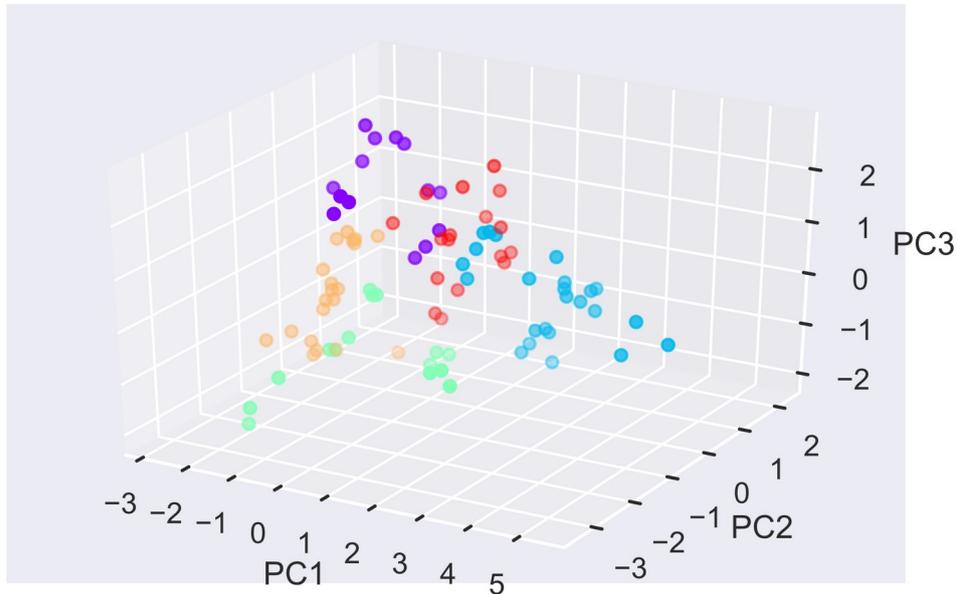
### 3.6 Análise de Componentes Principais (PCA)

Foi conduzida a decomposição em componentes principais (PCs) gerando um subespaço vetorial  $R^3$  capaz de explicar 75,3% da variância do conjunto global. Para os casos observados, foi aplicada a técnica de aprendizado de máquina k-means para tentar agrupar os dados (clustering) em cinco grupos. Os resultados foram ilustrados na Figura 2. A tabela 9 listou as coordenadas de cada um, separadamente.

**Tabela 9 - Coordenadas para os fatores projetadas nos 3 PCs**

	PC1	PC2	PC3
<b>Juçara / mg</b>	-0.523964	-0.109269	-0.718743
<b>Tempo / dia</b>	-0.706112	-0.017241	0.372667
<b>Polifenóis / mg/mL</b>	-0.574963	-0.025924	-0.636287
<b>Flavonóides /</b>	0.673148	-0.145775	-0.314039

mg/mL			
<b>BRIX</b>	0.865770	-0.012675	-0.211379
<b>pH</b>	0.799355	-0.266465	0.064819
<b>AT</b>	0.112584	-0.925547	-0.111274
<b>SST/AT</b>	0.436592	0.783274	-0.284425



**Figura 2.** PCA para os casos envolvidos.  
Cada cor representa um grupo obtido por k-means.

Como ilustrado na figura 2, pudemos observar que houve a separação quase total dos fatores, exceto pelo relativo agrupamento do conteúdo de juçara com o teor de polifenóis. Essa observação indica que as fontes de variância dos dados foram suficientemente distintas, exceto pelos dois fatores, dentro do rigor da variância explicada pelas três primeiras PCs.

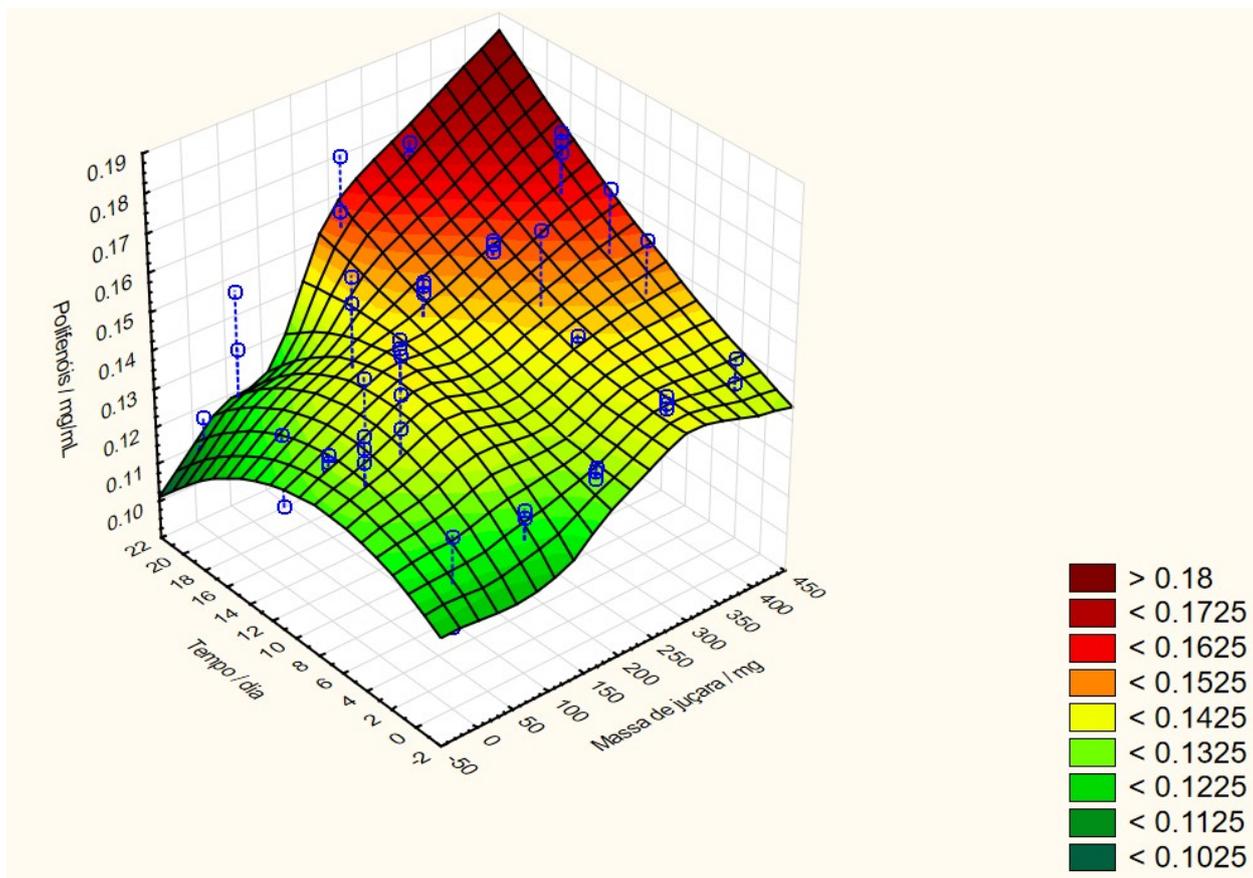
### 3.7 Superfícies de resposta em função do tempo de fermentação e da massa de juçara

Foram analisadas as superfícies de respostas em  $R^3$  para os efeitos do tempo de fermentação e da massa de juçara em cada um dos seis fatores (teor de polifenóis, teor de flavonóides, BRIX, pH, AT e SST/AT). Para o comportamento dos sólidos solúveis totais (SST) e pH foram obtidos ajustes razoáveis de  $R^2=0,64$  e  $R^2=0,76$ , respectivamente, com um polinômio de segundo grau nas variáveis independentes. Para os demais fatores, as superfícies foram obtidas por meio da suavização por

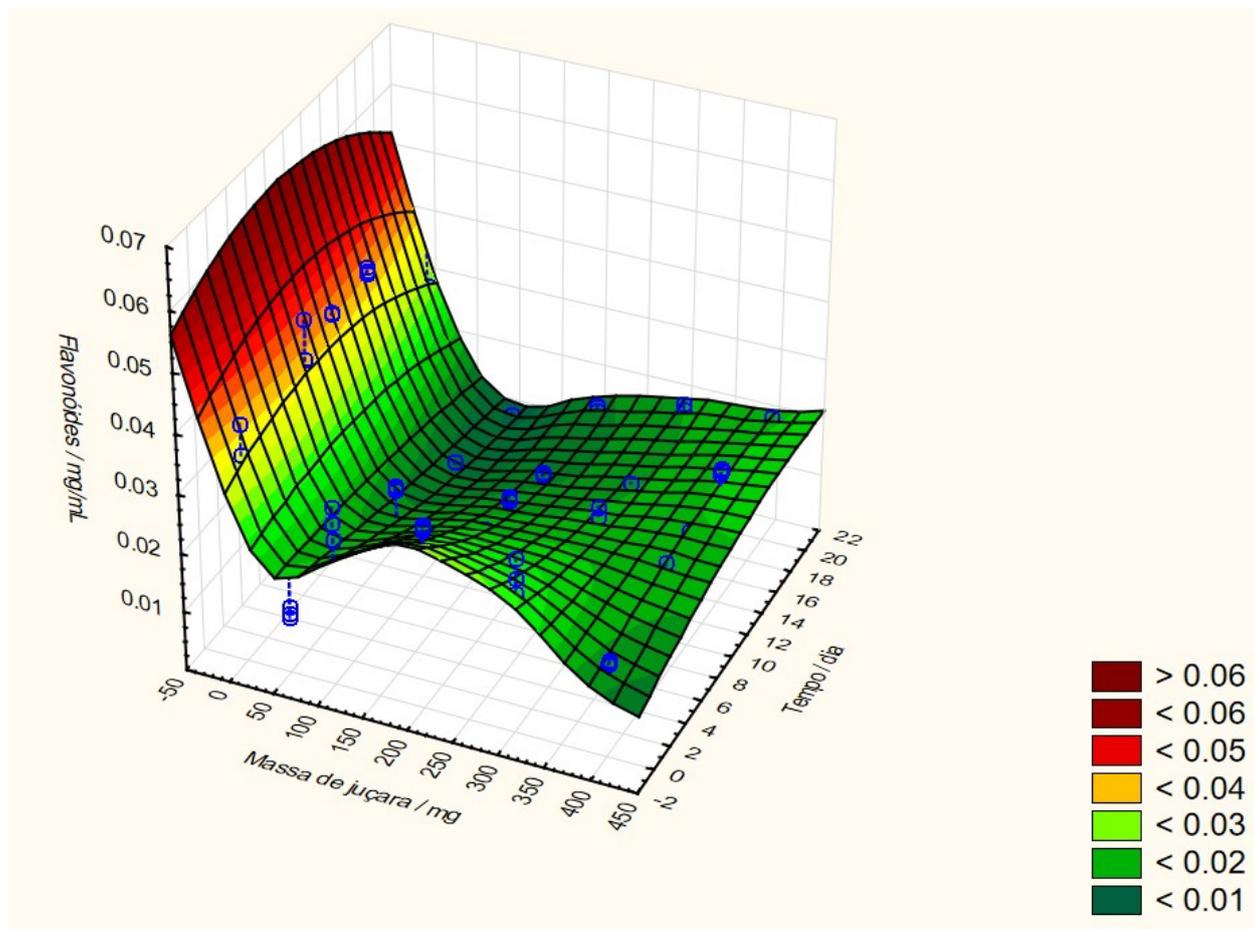
mínimos quadrados ponderados, no entanto sem valor funcional interpretativo, apenas visual. As superfícies de resposta foram apresentadas nas figuras 3-8.

Para as variáveis com atividade biológica (polifenóis e flavonóides), o comportamento foi distinto. O teor de polifenóis cresce com a massa de polpa de frutos da juçara e com o tempo de fermentação, ao passo que para os flavonóides, o conteúdo praticamente independe da massa e decresce com o tempo de fermentação.

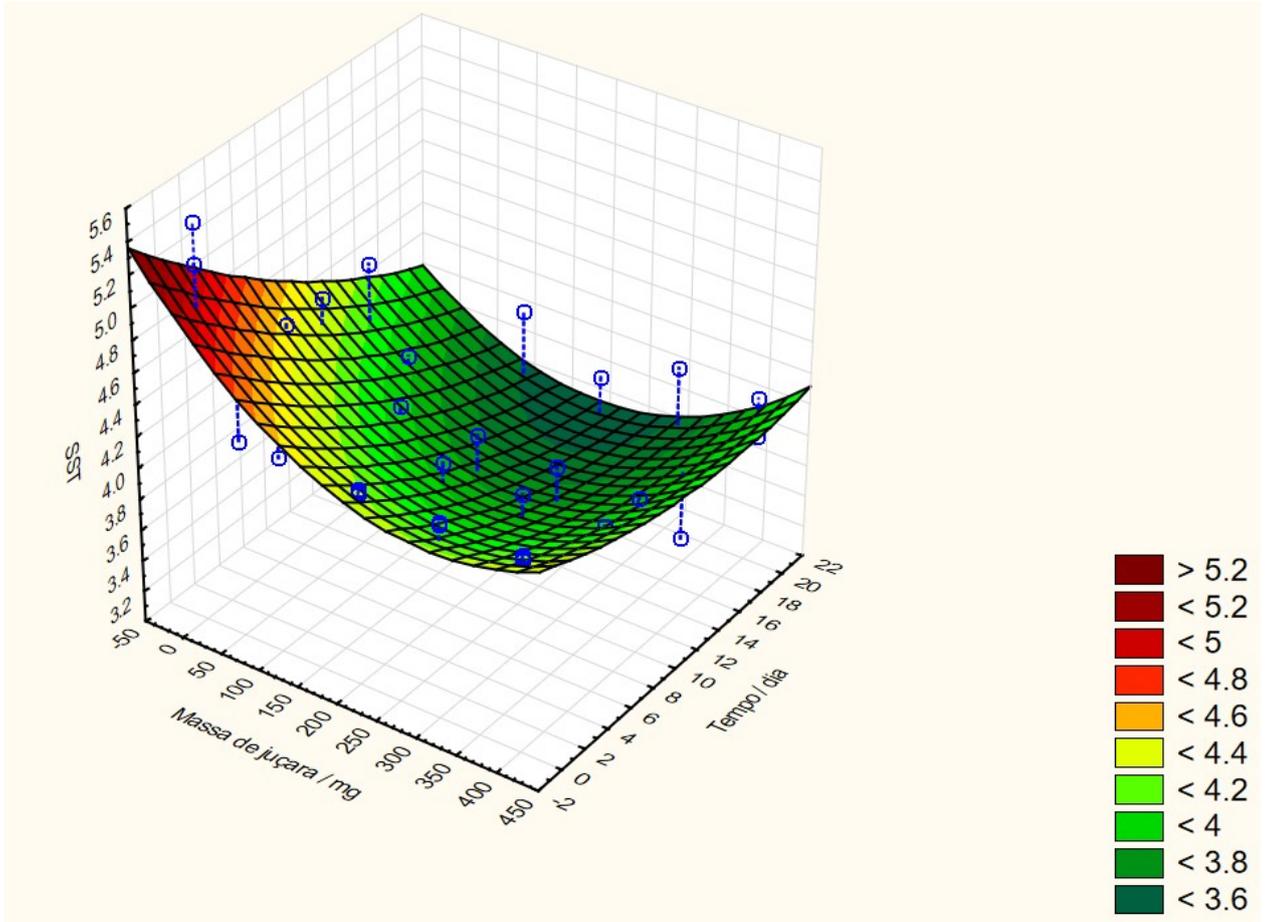
Para os valores de sólidos solúveis totais (SST), esses são concentrados em menores tempos de fermentação e menores massas de juçara (figura 5), decrescendo suavemente conforme as variáveis independentes aumentam. A característica do pH do meio acompanhou a mesma tendência (figura 6). O comportamento da acidez titulável (AT) não foi de fácil interpretação pela grande proximidade dos dados, o que inviabilizou a identificação de tendências dessa variável com os fatores independentes (figura 7). Essa incerteza na interpretação influenciou, naturalmente, em SST/AT, cuja superfície de resposta não dá margem para uma discussão dos dados experimentais.



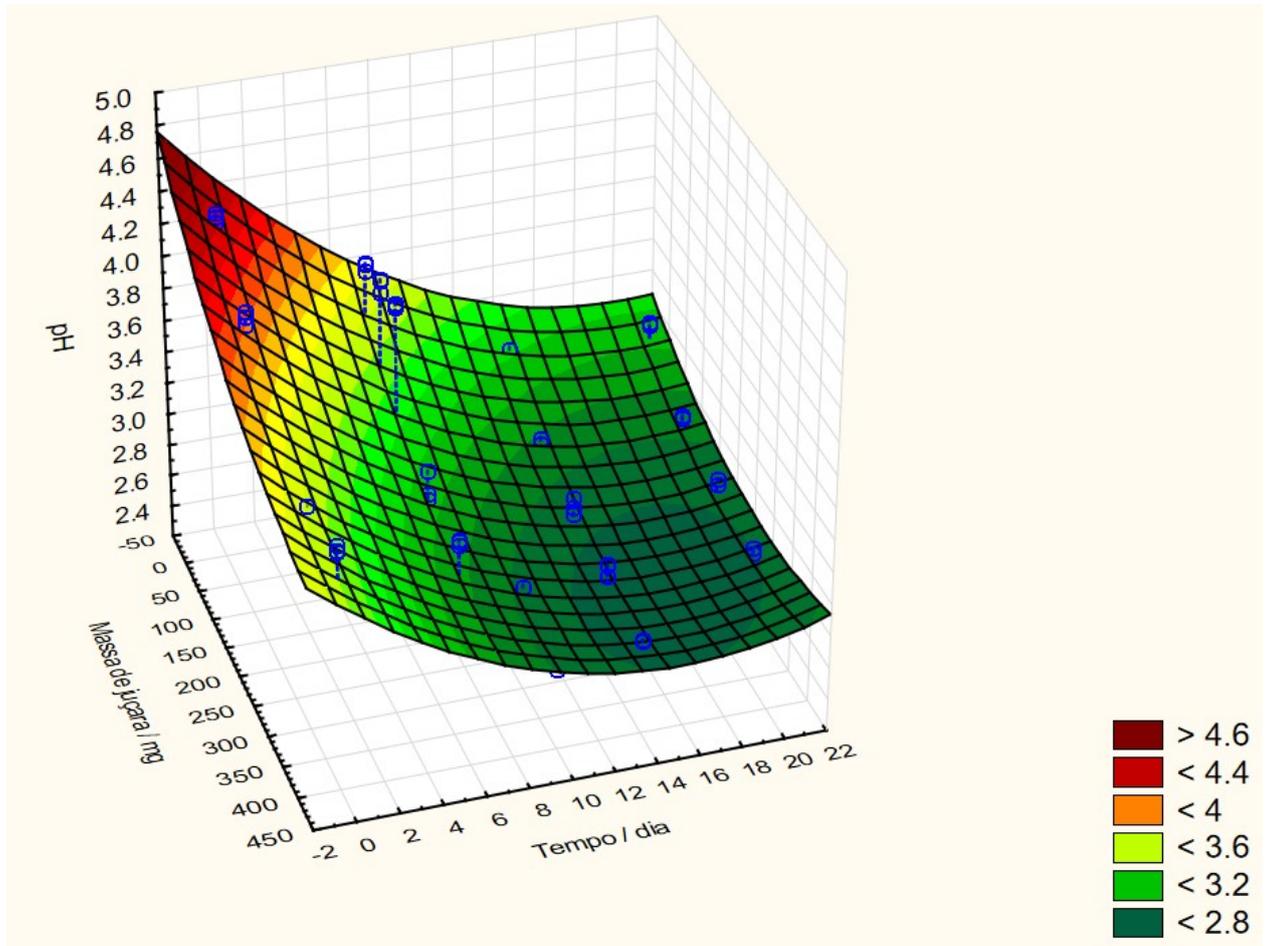
**Figura 3.** Superfície de resposta obtida por mínimos quadrados ponderados para o conteúdo de polifenóis em função do tempo de fermentação e da massa de juçara.



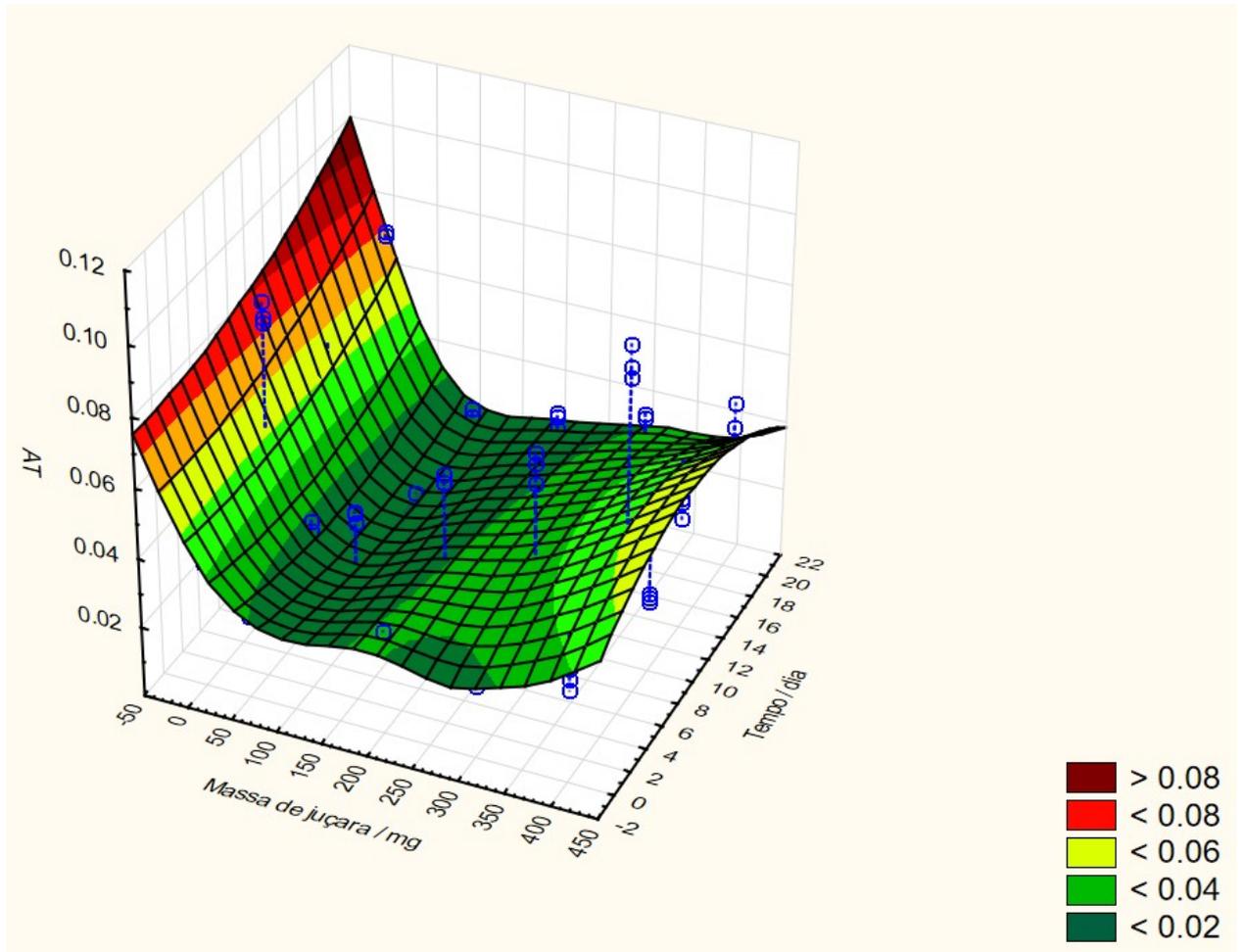
**Figura 4.** Superfície de resposta obtida por mínimos quadrados ponderados para o conteúdo de flavonóides em função do tempo de fermentação e da massa de juçara.



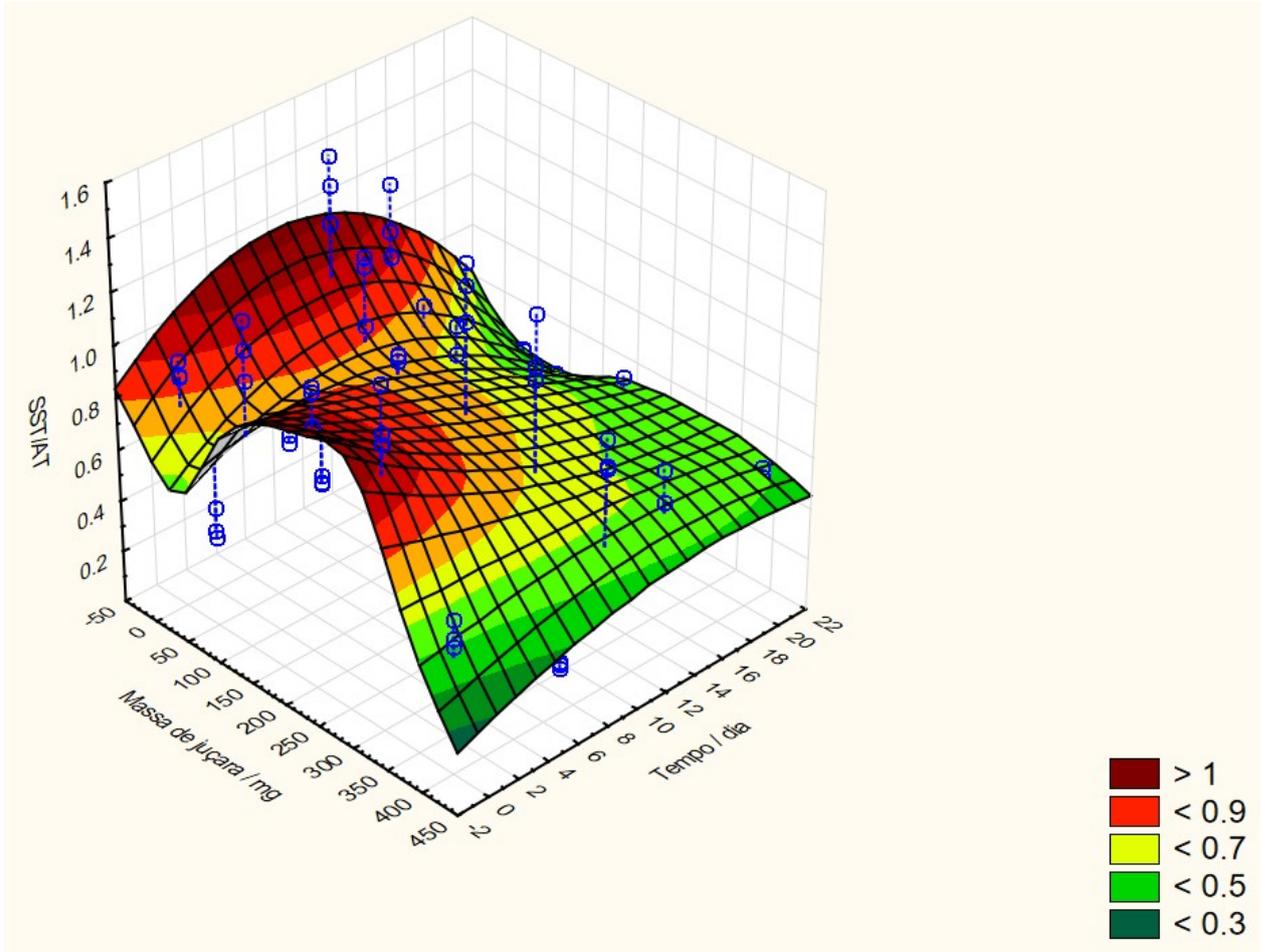
**Figura 5.** Superfície de resposta obtida por ajuste polinomial biquadrático para SST em função do tempo de fermentação e da massa de juçara.



**Figura 6.** Superfície de resposta obtida por ajuste polinomial biquadrático para o pH em função do tempo de fermentação e da massa de juçara.



**Figura 7.** Superfície de resposta obtida por mínimos quadrados ponderados para AT em função do tempo de fermentação e da massa de juçara.



**Figura 8.** Superfície de resposta obtida por mínimos quadrados ponderados para SST/AT em função do tempo de fermentação e da massa de juçara.

#### 4. DISCUSSÃO

O Kombucha é uma bebida conhecida por seu sabor levemente ácido, o que é explicado pelos diversos ácidos orgânicos em sua constituição (VILLARREAL-SOTO e colab., 2018). O pH e a acidez titulável são dois parâmetros importantes que mudam ao longo do tempo de fermentação, e isso se deve à presença dos ácidos (VILLARREAL-SOTO e colab., 2018). Os microrganismos presentes no SCOBY metabolizam o açúcar e outras substâncias presentes no chá em metabólitos intermediários, como ácido acético, glicurônico, glicônico, tartárico, málico, cítrico, láctico, succínico e malônico (JAYABALAN, Rasu e colab., 2010; VILLARREAL-SOTO e colab., 2018), e esses impactam diretamente nas variações observadas no pH e na acidez. Observou-se que o pH do Kombucha do chá preto e das várias concentrações de Kombucha de Juçara variou de 4,36 e 3,52 no tempo inicial até 3,24 e 2,79 no 21º dia de fermentação. Constatamos que esses achados foram similares aqueles encontrados por outros autores (CHAKRAVORTY e colab., 2016; JAKUBCZYK e colab., 2020; JAYABALAN, R. e colab., 2007). Além disso, um estudo publicado por Zubaidah e cols (2018) (ZUBAIDAH e colab., 2018a) encontrou uma acidez titulável que variou entre 0,92% a 1,65% após 14 dias de fermentação das frutas da palmeira *Salacca zalacca* (Gaerth) com o Kombucha. O presente estudo encontrou valores inferiores a esses, quer sejam, 0,039% e 0,022% no tempo zero e 0,072% e 0,023% no 21º dia de fermentação. As bebidas de Kombucha de longa fermentação em geral apresentam altas concentração de ácido acético e, dessa forma, um sabor avinagrado intenso (KHOSRAVI e colab., 2019), o que pode se tornar uma desvantagem comercial. Outros estudos também validam o aumento da concentração da acidez titulável ao longo do tempo (AYED e colab., 2017; CHAKRAVORTY e colab., 2016; JAKUBCZYK e colab., 2020). Assim como a acidez e o pH, as quantidades de SST acabam reduzindo ao longo do tempo da fermentação, já que as leveduras metabolizam a sacarose ao longo de todo o processo de fermentação (MAY e colab., 2019), assim como os açúcares simples são degradados a outros compostos (MAY e colab., 2019). Essas são justificativas que fundamentam os achados de SST encontrados nesse estudo.

Já os compostos fenólicos são conhecidos pela sua capacidade antioxidante (YANG, Chung S. e colab., 2009) e têm a capacidade de eliminar as espécies reativas de

oxigênio, tais como o oxigênio singlet, superóxidos e radicais hidroxil (JAYABALAN, R. e colab., 2008). Neles incluem os flavonóides, flavonóis, flavonolos, flavononas, isoflavonas, flavonas, antocianidinas, flavanalols, calconas, antocianinas, isômeros do ácido clorogênico, famílias de ácido cinâmico e benzóico, estilbenos, ligninas, lignanos, taninos, tocoferóis e tocotrienóis (SHAHIDI e NACZK, 2003). Os frutos da palmeira *E. edulis* são ricos em polifenóis totais, com quantidades que variam em  $811 \pm 16,7$  mg EAG/g na polpa liofilizada (CARDOSO, Priscylla Maria Martins e colab., 2020). O conteúdo de polifenóis totais foi, dessa forma, avaliado nesse estudo apresentando valores de até 0,181 mg EAG/ml na preparação de Kombucha de juçara 400 no 14º dia de fermentação. O mesmo comportamento não foi observado com o quantitativo de flavonóides totais.

O aumento do conteúdo total de polifenóis pode ser explicado pela degradação de polifenóis complexos a moléculas menores por algumas enzimas liberadas pelos microrganismos do Kombucha (CHAKRAVORTY e colab., 2016). Sabe-se que alguns desses, como *Candida tropicalis*, são capazes de degradar vários polifenóis (ETTAYEBI e colab., 2003). Além disso a redução dos níveis de flavonóides também poderiam ser atribuídos a dois processos diferentes: (1) as antocianinas monoméricas combinam-se com outros compostos fenólicos (CHRIS SOMERS e EVANS, 1977), e (2) as antocianinas monoméricas são adsorvidas em células de microrganismos (MORATA e colab., 2003).

A polpa dos frutos da Juçara é consumida como alimento em várias regiões do Brasil. A não toxicidade do fruto também foi verificada por autores (FELZENSZWALB e colab., 2013). O estudo atual pesquisou a toxicidade da fermentação com um ensaio de toxicidade celular *in vitro* revelando uma viabilidade acima de 63% em todas as amostras. Isso permite afirmar que há segurança para o consumo humano da bebida fermentada com a polpa de Juçara nas concentrações e tempos estudados.

A partir dos dados do estudo atual podemos inferir que o décimo quarto dia de fermentação da Juçara parece o ideal para uma produção em escala da bebida fermentada já que reúne propriedades organolépticas toleráveis, além de uma alta

concentração de polifenóis, de um teor aceitável de pH e a maior concentração dos ácidos orgânicos. Dentre as concentrações de polpa utilizadas nesse estudo, as maiores evidenciam maior concentração de polifenóis como constatado na superfície de resposta.

A baixa toxicidade do Kombucha de Juçara associado ao grande conteúdo de polifenóis totais na polpa dos frutos da Juçara poderia incentivar estudos posteriores com concentrações ainda maiores da polpa ou, quiçá, ao processo de adaptação do ecossistema do Kombucha à polpa pura dos frutos da Juçara, para que se realize a fermentação primária da mesma forma que o Kombucha do café (WATAWANA e colab., 2015) e do hibisco (JANUÁRIO e colab., 2020). Na fermentação primária não existiria a necessidade do cultivo e do uso do Kombucha de chá preto antes da adição da polpa da Juçara.

Enfim, outros estudos são necessários para se avaliar o potencial antioxidante, outros dados do perfil químico e microbiológico da fermentação com a polpa da Juçara com o Kombucha.

## 5. CONCLUSÃO

O Kombucha de Juçara é um produto com potencial comercial, reunindo baixa toxicidade e risco de contaminação, aumento dos polifenóis ao longo da fermentação e boas características organolépticas. Os achados desse estudo indicam que o 14º dia de fermentação e maiores concentrações da polpa do fruto da Juçara reúnem os atributos para uma produção em maior escala da bebida.

## 6. REFERÊNCIAS

AYED, Lamia e BEN ABID, Salwa e HAMDÍ, Moktar. **Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium**. *Annals of Microbiology*, 2017.

BANERJEE, Debashish e colab. **Comparative healing property of Kombucha tea and black tea against indomethacin-induced gastric ulceration in mice: Possible mechanism of action**. *Food and Function*, v. 1, n. 3, p. 284–293, 2010.

BARROSO, Maria E.S. e colab. **Phytochemical profile of genotypes of *Euterpe edulis* Martius – Juçara palm fruits**. *Food Research International*, v. 116, p. 985–

993, Fev 2019. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996918307579>>.

BASCHALI, Aristeia e colab. **Traditional low-alcoholic and non-alcoholic fermented beverages consumed in European countries: a neglected food group**. Nutrition Research Reviews, v. 30, n. 1, p. 1–24, 24 Jun 2017. Disponível em: <[https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0954422416000202/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0954422416000202/type/journal_article)>.

BHATTACHARYA, Semantee e GACHHUI, Ratan e SIL, Parames C. **Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats**. Food and Chemical Toxicology, 16, v. 60, p. 328–340, Out 2013. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691513005061>>.

BHATTACHARYA, Semantee e GACHHUI, Ratan e SIL, Parames 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, Jun 2011. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928468011000034>>.

BICUDO, Milene Oliveira Pereira e RIBANI, Rosemary Hoffmann e BETA, Trust.

**Anthocyanins, Phenolic Acids and Antioxidant Properties of Juçara Fruits (Euterpe edulis M.) Along the On-tree Ripening Process**. Plant Foods for Human Nutrition, v. 69, n. 2, p. 142–147, 26 Jun 2014. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1007/s11130-014-0406-0>>.

BÖCK, Fernanda Carla e colab. **PhotoMetrix and colorimetric image analysis using smartphones**. Journal of Chemometrics, 19 Jun 2020. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cem.3251>>.

CARDOSO, Alyne Lizane e colab. **Acute consumption of juçara juice (Euterpe edulis) and antioxidant activity in healthy individuals**. Journal of Functional Foods, v. 17, p. 152–162, Ago 2015. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464615002522>>.

CARDOSO, Priscylla Maria Martins e colab. **Nephroprotective activity of the enriched polyphenol extract of Euterpe edulis Martius**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 56, 2020. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-82502020000100522&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502020000100522&tlng=en)>.

CARDOSO, Rodrigo Rezende e colab. **Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities**. Food Research International, v. 128, p. 108782, Fev 2020. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996919306684>>.

CHAKRAVORTY, Somnath e colab. **Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics**. International Journal of Food Microbiology, v. 220, p. 63–72, Mar 2016. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160515301951>>.

CHRIS SOMERS, T. e EVANS, Michael E. **Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO<sub>2</sub>, “chemical age”**. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1977.

COTON, Monika e colab. **Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods**. FEMS Microbiology Ecology, v. 93, n. 5, 1 Maio 2017. Disponível em:

<<https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1093/femsec/fix048>>.

DA SILVA CAMPELO BORGES, Graciele e colab. **Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil**. Food Research International, 2011.

DERRIEN, Muriel e VAN HYLCKAMA VLIEG, Johan E.T. **Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota**. Trends in Microbiology, v. 23, n. 6, p. 354–366, Jun 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X15000566>>.

ETTAYEBI, Khalil e colab. **Biodegradation of polyphenols with immobilized *Candida tropicalis* under metabolic induction**. FEMS Microbiology Letters, v. 223, n. 2, p. 215–219, Jun 2003. Disponível em: <[https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1016/S0378-1097\(03\)00380-X](https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1016/S0378-1097(03)00380-X)>.

FELZENSZWALB, Israel e colab. **Toxicological evaluation of *Euterpe edulis*: A potential superfruit to be considered**. Food and Chemical Toxicology, 2013.

HAUSER, S P. **Dr. Sklenar's Kombucha mushroom infusion--a biological cancer therapy. Documentation No. 18**. Schweizerische Rundschau fur Medizin Praxis = Revue suisse de medecine Praxis, v. 79, n. 9, p. 243–246, 1990.

HYUN, Jeongeun e colab. **Kombucha tea prevents obese mice from developing hepatic steatosis and liver damage**. Food science and biotechnology, From Duplicate 2 (Kombucha tea prevents obese mice from developing hepatic steatosis and liver damage. - Hyun, Jeongeun; Lee, Youngjae; Wang, Sihyung; Kim, Jinnyun; Kim, Jieun; Cha, JaeHo; Seo, Young-Su; Jung, Youngmi)08, v. 25, n. 3, p. 861–866, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30263346>>.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. [S.l.: s.n.], 2008.

IVANIŠOVÁ, Eva e colab. **The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of Kombucha tea beverage**. Journal of Food Science and Technology, v. 57, n. 5, p. 1840–1846, 16 Maio 2020. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13197-019-04217-3>>.

JAKUBCZYK, Karolina e colab. **Chemical profile and antioxidant activity of the Kombucha beverage derived from white, green, black and red tea**. Antioxidants, 2020.

JANUÁRIO, Jaqueline B. e colab. **Kombucha à base de *Hibiscus sabdariffa* L: avaliação tecnológica para produção de uma nova bebida**. Brazilian Journal of Development, 2020.

JAYABALAN, R. e colab. **Changes in free-radical scavenging ability of Kombucha tea during fermentation**. Food Chemistry, 2008.

JAYABALAN, R. e MARIMUTHU, S. e SWAMINATHAN, K. **Changes in content of organic acids and tea polyphenols during Kombucha tea fermentation**. Food Chemistry, 2007.

JAYABALAN, Rasu e colab. **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, Jul 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12073>>.

JAYABALAN, Rasu e colab. **Biochemical characteristics of tea fungus produced during Kombucha fermentation**. Food Science and Biotechnology, v. 19, n. 3, p. 843–847, 30 Jun 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10068-010-0119-6>>.

KALLEL, Lina e colab. **Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion**. Food

Research International, v. 49, n. 1, p. 226–232, Nov 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996912003274>>.

KANURIĆ, Katarina Gojko e colab. **Kinetics of lactose fermentation in milk with Kombucha starter**. Journal of Food and Drug Analysis, v. 26, n. 4, p. 1229–1234, 2018.

KHOSRAVI, Shahab e colab. **Development of fermented date syrup using Kombucha starter culture**. Journal of Food Processing and Preservation, 2019.

KREPSKY, Patricia Baier e colab. **Chemical composition and vasodilatation induced by Cuphea carthagenensis preparations**. Phytomedicine, 2012.

LEAL, Jessica Martínez e colab. **A review on health benefits of Kombucha nutritional compounds and metabolites**. CYTA - Journal of Food, 2018.

LIU, C.-H. e colab. **The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation**. Food Microbiology, v. 13, n. 6, p. 407–415, Dez 1996. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002096900477>>.

LONČAR, E. S. e colab. **Biosynthesis of glucuronic acid by means of tea fungus**. Nahrung - Food, v. 44, n. 2, p. 138–139, 2000.

MARCO, Maria L e colab. **Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond**. Current Opinion in Biotechnology, v. 44, p. 94–102, Abr 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095816691630266X>>.

MATTA, V. M. da; e colab. **Polpa de fruta congelada**. [S.l.]: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2005. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/994540/polpa-de-fruta-congelada>>.

MAY, Alexander e colab. **Kombucha: A novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem**. PeerJ, 2019.

MAZUCO, Renata Alves e colab. **Maltodextrin and Gum Arabic-Based Microencapsulation Methods for Anthocyanin Preservation in Juçara Palm (Euterpe edulis Martius) Fruit Pulp**. Plant Foods for Human Nutrition, v. 73, n. 3, p. 209–215, 28 Set 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11130-018-0676-z>>.

MORATA, A. e colab. **Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003.

MOSMANN, Tim. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays**. Journal of Immunological Methods, 1983.

NUMMER, Brian A. **Kombucha brewing under the Food and Drug Administration model Food Code: risk analysis and processing guidance**. Journal of environmental health, v. 76, n. 4, p. 8–11, Nov 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24341155>>.

PESSIONE, Enrica e CIRRINCIONE, Simona. **Bioactive Molecules Released in Food by Lactic Acid Bacteria: Encrypted Peptides and Biogenic Amines**. Frontiers in Microbiology, v. 7, n. JUN, p. 876, 9 Jun 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00876/abstract>>.

SAI RAM, M. e colab. **Effect of Kombucha tea on chromate(VI)-induced oxidative stress in albino rats**. Journal of Ethnopharmacology, 17, v. 71, n. 1–2, p. 235–240, Jul 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874100001616>>.

SCHULZ, Mayara e colab. **Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (Euterpe edulis Martius) during ripening**. Food Research International, v. 77, p. 125–131, Nov 2015. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996915301423>>.  
SCHULZ, Mayara e colab. **Juçara fruit ( Euterpe edulis Mart.): Sustainable exploitation of a source of bioactive compounds**. Food Research International, v. 89, p. 14–26, Nov 2016. Disponível em:  
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996916303143>>.  
SHAHIDI, Fereidoon e NACZK, Marian. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. [S.l.]: CRC Press, 2003. Disponível em:  
<<https://www.taylorfrancis.com/books/9780203508732>>.  
VILLARREAL-SOTO, Silvia Alejandra e colab. **Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review**. Journal of Food Science. [S.l: s.n.]. , 2018  
WATAWANA, Mindani I. e JAYAWARDENA, Nilakshi e WAISUNDARA, Viduranga Y. **Enhancement of the Functional Properties of Coffee Through Fermentation by “Tea Fungus” (Kombucha)**. Journal of Food Processing and Preservation, v. 39, n. 6, p. 2596–2603, Dez 2015. Disponível em:  
<<http://doi.wiley.com/10.1111/jfpp.12509>>.  
XU, B. J. e CHANG, S. K.C. **A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents**. Journal of Food Science, 2007.  
YANG, Chung S. e LAMBERT, Joshua D. e SANG, Shengmin. **Antioxidative and anti-carcinogenic activities of tea polyphenols**. Archives of Toxicology. [S.l: s.n.]. , 2009  
YANG, Zhi-Wei e colab. **Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of Kombucha tea in high-cholesterol fed mice**. Journal of the Science of Food and Agriculture, 10, v. 89, n. 1, p. 150–156, 15 Jan 2009. Disponível em:  
<<http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.3422>>.  
ZUBAIDAH, Elok e colab. **Anti-diabetes activity of Kombucha prepared from different snake fruit cultivars**. Nutrition & Food Science, v. 49, n. 2, p. 333–343, 11 Mar 2019. Disponível em:  
<<https://www.emerald.com/insight/content/doi/10.1108/NFS-07-2018-0201/full/html>>.  
ZUBAIDAH, Elok e colab. **Potential of snake fruit (Salacca zalacca (Gaerth.) Voss) for the development of a beverage through fermentation with the Kombucha consortium**. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2018a.  
ZUBAIDAH, Elok e colab. **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, Jan 2018b. Disponível em:  
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878818117305017>>.