

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Amanda Rafaela dos Santos

**Avaliação cinética da fermentação de chá de erva-mate tostada por SCOBY de
kombucha**

Florianópolis

2020

Amanda Rafaela dos Santos

Avaliação cinética da fermentação de chá de erva-mate tostada por SCOBY de kombucha

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dra. Patrícia Poletto

Coorientadores: Dra. Karina Cesca e

Eng. Eduardo Leonarski

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Amanda Rafaela

Avaliação cinética da fermentação de chá de erva-mate
tostada por SCOBY de kombucha / Amanda Rafaela Santos ;
orientador, Patrícia Poletto, coorientador, Karina Cesca,
coorientador, Eduardo Leonarski, 2020.
50 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico,
Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. fermentação. 3. kombucha.
4. chá mate. 5. erva-mate tostada. I. Poletto, Patrícia .
II. Cesca, Karina . III. Leonarski, Eduardo IV.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Engenharia de Alimentos. V. Título.

Amanda Rafaela dos Santos

**Avaliação cinética da fermentação de chá de erva-mate tostada por SCOBY de
kombucha**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Engenharia de Alimentos” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Engenharia de Alimentos

Florianópolis, 30 de novembro de 2020.

Prof. Dr. João Borges Laurindo
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.(a) Dra. Patrícia Poletto
Orientadora
Instituição UFSC

Prof. Dr. Marco Di Luccio
Avaliador
Instituição UFSC

Dra. Rosana O. Henriques
Avaliador(a)
Instituição UFSC

Este trabalho é dedicado a todos aqueles que me apoiaram, ajudaram e que contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a UFSC, aos professores da graduação e colegas de laboratório. Principalmente a orientação da Prof. Patrícia Poletto e da Dra. Karina Cesca, sou muito grata pelos ensinamentos, suporte e correções. Um obrigado especial também ao Eduardo Leonarski por todo ensinamento, ajuda e pela colaboração com as análises deste trabalho.

À banca, pelas sugestões e contribuição a melhoria deste trabalho.

À minha família, que sempre me apoiou e se preocupou comigo. Principalmente aos meus pais, que me ensinaram a “estudar para aprender e não decorar” e que me incentivaram desde pequena a cursar o ensino superior.

Às minhas amigas de longa data, Carol, Gabi T. e Julia D., que são como se fossem da família e que continuam torcendo por mim de perto ou de longe.

Aos meus amigos que estiveram desde o começo do curso comigo, Amandinha, Hágata, Isadora e Piluski. Nós aprendemos juntos, compartilhamos momentos de alegria, dores e conquistas. Tenho orgulho de ter dividido essa jornada ao lado de vocês e da amizade que construímos.

Aos meus amigos, que me acolheram alguma vez (ou muitas) em suas casas quando eu precisei. Bruna C., Djaíni, Julia M. e Leandros, a graduação não teria sido a mesma sem vocês. Obrigada pela parceria.

Ao Gustavo, não somente por ter me emprestado o computador para a apresentação deste trabalho, mas principalmente por todo amor, carinho, risadas, parceria, ajuda, confiança, respeito, por me motivar e inspirar a cada dia.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma com o meu desenvolvimento pessoal e profissional. À minha psicóloga. Aos meus amigos “internacionais”. Aos meus colegas e amigos da SAEQA 2019 e do CALEQA 2019. À equipe da Biogummy. Tenho um grande carinho por todos aqui contemplados e sou grata por ter aprendido com cada um de vocês.

“Só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos.”

(SAINT-EXUPÉRY, 1943)

RESUMO

Kombucha é uma bebida fermentada a partir de chás de *Camellia sinensis* adoçados e de uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras chamada SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*), que ficou conhecida popularmente como benéfica à saúde. Outras matérias-primas vem sendo estudadas como substitutas de *Camellia sinensis*. Por possuir compostos fenólicos, capacidade antioxidante, ter baixo custo e grande relevância socioeconômica no Sul do Brasil, os chás de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) podem ser substitutos viáveis aos chás tradicionais utilizados na fabricação de kombucha. O objetivo deste trabalho foi produzir uma bebida fermentada utilizando chá mate tostado como alternativa ao chá preto (*Camellia sinensis*), comparando seus compostos ao longo da fermentação. Foi utilizado 10% de inóculo líquido para a formulação dos ensaios e os chás foram adoçados com 80 g/L de uma mistura de glicose:frutose (1:1). A cinética de fermentação foi avaliada durante 15 dias, com triplicatas coletadas a cada 3 dias. Avaliou-se o pH, concentração de ácidos orgânicos (acético e láctico) formados, concentração de açúcares (glicose e frutose) consumidos e variação na concentração de compostos fenólicos totais durante este período. Além disso, a quantidade final de biofilme celulósico formado foi medida. Os resultados ao final de 15 dias foram similares para ambos os ensaios, confirmando o potencial do chá mate. O pH de ambos decresceram, chegando a aproximadamente 2,2 neste período, enquanto os açúcares foram consumidos até a metade das concentrações iniciais. Os valores de concentração dos ácidos orgânicos obtidos foram pouco expressivos e os maiores ocorreram no terceiro dia de fermentação para ambos os ensaios. A quantidade de compostos fenólicos da bebida de chá mate apresentou maior aumento (87%), apresentando ao final 554,43 mg EAG/L. Este resultado pode ser um atrativo para o uso do chá mate como alternativa ao chá preto. Por fim, as bactérias presentes no inóculo foram capazes de sintetizar biofilmes celulósicos com produtividade de 92 mg/L.dia no ensaio de chá preto e 75 mg/L.dia no de chá mate.

Palavras-chave: fermentação; kombucha; chá mate; erva-mate tostada.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fermentação de kombucha (celulose formada na superfície do líquido)	19
Figura 2 - Atividade metabólica em kombucha.....	20
Figura 3 - Área de ocorrência natural da erva-mate	23
Figura 4 - Produtos de erva-mate: chá mate verde [A], chá mate tostado [B], chimarrão [C] e tererê [D].....	25
Figura 5 - Fluxograma do processamento de erva-mate.....	26
Figura 6 – Sistema de fermentação usado. Falcons contendo o meio de fermentação, cobertos com tecido poroso.....	30
Figura 7 – Redução do pH ao longo da fermentação	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos benéficos da kombucha relatados por consumidores (a: Furhuson e Estelle, 1998; b: Full Circle Press, 1998; c: Allen, 1998)	18
Tabela 2 - Componentes predominantes em kombucha à base de chá preto adoçado	21
Tabela 3 - Composição de chá preto após infusão de 3 minutos.....	22
Tabela 4 - Principais catequinas presentes em chá preto e na kombucha do mesmo chá	22
Tabela 5 - Composição físico-química da erva-mate pronta para consumo.....	27
Tabela 6 - Formulação do meio de cultivo das fermentações de chá mate (M) e chá preto (P)	29
Tabela 7 – Ácidos orgânicos ao longo da fermentação	34
Tabela 8 - Resultados de produção de biofilme para chá mate (M) e de chá preto (P).....	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	OBJETIVOS	16
1.1.1	Objetivo Geral.....	16
1.1.2	Objetivos Específicos	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	KOMBUCHA	17
2.1.1	Micro-organismos responsáveis pela fermentação em kombucha.....	18
2.1.2	Metabólitos da fermentação e composição da kombucha.....	20
2.2	ERVA-MATE.....	23
2.2.1	Processamento de erva-mate	25
2.2.2	Composição e propriedades da erva-mate e seus derivados.....	27
3	MATERIAS E MÉTODOS.....	29
3.1	MATERIAIS.....	29
3.1.1	Chás.....	29
3.1.2	Inóculo	29
3.2	PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE FERMENTAÇÃO	29
3.3	MÉTODOLOGIA ANALÍTICA	30
3.3.1	Análise de pH	30
3.3.2	Análises Cromatográficas	30
3.3.2.1	<i>Determinação da concentração de ácidos e açúcares</i>	<i>30</i>
3.3.3	Análise de compostos fenólicos totais.....	31
3.3.4	Determinação da concentração de celulose formada	31
4	RESULTADOS	32
4.1	AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO.....	32
4.1.1	Variação do pH ao longo da fermentação	32

4.1.2	Variação na concentração de ácidos orgânicos.....	33
4.1.3	Consumo de açúcares	35
4.1.4	Variação na concentração de compostos fenólicos totais.....	37
4.2	PRODUÇÃO DE BIOFILME	39
5	CONCLUSÃO.....	42
	REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

A Kombucha é uma bebida refrescante, gasosa, com moderada acidez e sabor levemente adocicado. Trata-se de um chá que passou por um processo de fermentação tendo açúcar adicionado como substrato. Originalmente, na China, utilizou-se a planta *Camellia sinensis* para o seu preparo. Essa bebida milenar, datada de 221 a.C, ficou conhecida por diversos nomes ao longo de sua história, entre eles o de “elixir da vida” e também “chá da imortalidade” indicando sua relação com a saudabilidade (Crum and LaGory, 2016; Santos, 2016).

Popularizada como sendo uma bebida com efeitos benéficos à saúde, ela pode ser considerada probiótica por possuir bactérias com esta funcionalidade, desde que estejam presentes no produto numa concentração adequada de modo que sua contribuição ao equilíbrio do intestino seja garantida (FAO, 2002; Santos, 2016; Brasil, 2018).

Sabe-se que não somente bactérias estão presentes na kombucha, o que fermenta o chá é na verdade uma zooglia chamada de SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts). Trata-se de uma associação simbiótica de bactérias e leveduras que se desenvolve formando um biofilme celulósico. Ocorre também a produção de diversos ácidos durante a fermentação, como por exemplo: ácido acético, láctico, glucônico e glucurônico, que diminuem o pH e protegem a bebida de contaminações. A bebida pode apresentar efeito desintoxicante devido ao ácido glucurônico, além de efeito antioxidante possivelmente proveniente de compostos fenólicos dos chás utilizados, os quais já são reconhecidos por este efeito proveniente de seus polifenóis (Dufresne & Farnworth, 2000; Jayabalan et al. 2014; Vīna et al. 2013; Lobo et al. 2017; Villarreal-Soto et al., 2018).

O chá de *Camellia sinensis*, tradicionalmente usado na fabricação de kombucha, apresenta elevada atividade antioxidante. Essa atividade se assemelha aos extratos aquosos de erva-mate verde e tostada, sendo que a tostada se destaca por apresentar valores um pouco superiores em determinação analítica (Saldanha, 2015) e o chá mate, proveniente da infusão de erva-mate tostada, tem eficácia clínica comprovada no aumento da capacidade antioxidante de seus consumidores (Matsumoto, 2008).

Considerando as propriedades benéficas de chá mate e sabendo que apresenta um valor de mercado inferior aos chás de *Camellia sinensis*, o presente trabalho o utiliza como substrato alternativo para a fermentação com SCOBY de kombucha. Outra vantagem da substituição do

chá é a valorização da produção regional (Sul do Brasil) de erva-mate, dando a ela uma nova aplicação, podendo aumentar seu consumo e seu mercado (Paludo, 2017).

Há poucos estudos sobre chá mate tostado fermentado por essa associação simbiótica. Alguns mostraram que a bebida apresenta efeito antimicrobiano contra determinados patógenos (Santos Júnior et. al, 2009) e que agrada ligeiramente os consumidores, em avaliação sensorial (Rossoni, 2019).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a cinética de fermentação de uma bebida preparada a partir de chá mate tostado fermentado por SCOBY de kombucha.

1.1.2 Objetivos Específicos

Para que o objetivo geral fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- comparar a cinética de fermentação da kombucha tradicional produzida a partir de chá preto com a bebida desenvolvida a partir de chá mate;
- avaliar o pH, a formação de ácido acético, ácido lático e consumo de açúcares durante a fermentação;
- verificar a variação dos compostos fenólicos totais provenientes dos chás durante fermentação;
- quantificar a produção de biofilme celulósico ao final da fermentação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 KOMBUCHA

A kombucha é uma bebida gasosa refrescante de sabor levemente ácido e adocicado, trata-se de um chá adoçado que foi fermentado pela chamada “mãe da kombucha”, uma associação simbiótica de bactérias e leveduras desenvolvida em um biofilme celulósico (Santos, 2016), podendo ser saborizada com suco de frutas, especiarias, café, entre outros (Lee e Koopman, 2014).

Uma lenda datada de 221 a.C. pode ser um indicativo de que a bebida teria sido originada na China, na região da Manchúria, durante a dinastia Qin, reportada como “chá da imortalidade”. A lenda conta que o imperador Qin Shi Huang queria prolongar sua vida e tornar-se imortal. Com este objetivo, alquimistas prepararam um chá fermentado, a partir do que eles chamavam de “lingzhi”, em chinês. Este termo indica que eles acreditavam se tratar de um cogumelo, portanto não se sabe ao certo se a lenda se refere ao kombucha. Apesar de teoricamente existir desde esta dinastia a bebida só se popularizou na dinastia Tang, mil anos depois (Crum and LaGory, 2016).

Em 414 d.C. um médico coreano chamado Komu-ha teria levado para o Japão o chá fermentado com o objetivo de curar o Imperador In-giyo (Inkyo). Com o tempo o nome do médico sofrera alterações tornando-se mais popular como Dr. Kombu e então a bebida ficara conhecida como “chá de Kombu” ou “Kombu chá”, dando origem à denominação de kombucha, sendo ela a mais empregada atualmente (Crum and LaGory, 2016).

A Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019, define kombucha como:

“Bebida fermentada obtida através da respiração aeróbia e fermentação anaeróbia do mosto obtido pela infusão ou extrato de *Camellia sinensis* e açúcares por cultura simbiótica de bactérias e leveduras microbiologicamente ativas (SCOBY).”

E denomina kombucha original:

“A kombucha não alcoólica elaborada somente com os ingredientes obrigatórios, ou seja, isenta de quaisquer ingredientes opcionais.”

Popularmente conhecida como sendo uma bebida probiótica, ela pode ser comercializada com essa alegação de propriedade funcional desde que seja aprovado pela ANVISA, de acordo com as normas estabelecidas na Resolução nº 241, de 26 de julho de 2018. Ou seja, quando suas bactérias probióticas ainda estiverem presentes no produto numa

concentração adequada de modo que sua contribuição ao equilíbrio do intestino seja garantida (FAO, 2002; Santos, 2016; Brasil, 2018).

Diversos estudos apontam atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória de kombuchas, e muitos são os relatos de efeitos benéficos à saúde por consumidores de kombucha (Dufresne & Farnworth, 2000; Jayabalan et al. 2014; Villarreal-Soto et al. 2018). Os dados mostrados na Tabela 1 são do ano de 1998 mostrando que os efeitos da kombucha são relatados já há bastante tempo (Dufresne & Farnworth, 2000). Porém ainda não há estudos clínicos em seres humanos suficientes para comprovar sua eficácia (Ernst, 2003; Kapp & Sumner, 2019; Morales, 2020).

Tabela 1 - Efeitos benéficos da kombucha relatados por consumidores (a: Furhuson e Estelle, 1998; b: Full Circle Press, 1998; c: Allen, 1998)

Efeitos benéficos	Fonte
Desintoxicação do corpo	a, b
Redução de colesterol	c
Redução de aterosclerose	c
Redução da pressão sanguínea	a, c
Redução de problemas inflamatórios	c
Alívio de artrite, reumatismo e sintomas de gota	a, b, c
Estimula funções do fígado	c
Normalização da atividade intestinal, equilíbrio da flora intestinal e cura de hemorroidas	b, c
Regulação de apetite e redução de obesidade	b, c
Prevenção de infecções urinárias e pedra nos rins	b, c
Estimula sistema endócrino	c
Proteção a diabetes	c
Prevenção de câncer	c
Efeito antibiótico contra bactérias, vírus e fungos	a, b, c
Reforça sistema imunológico e produção de interferon	c
Alívio de bronquite e asma	a, b
Redução de problemas relativos à menstruação e menopausa	a, b
Melhoria na saúde de cabelo, pele e unhas	a, b, c
Redução de desejo por álcool em alcoólatras	a, b
Redução de estresse, insônia e distúrbios nervosos	a, b, c
Redução de enxaqueca	b, c
Melhoria de visão	a, b
Melhoria do metabolismo	c

Fonte: Adaptado de Dufresne & Farnworth, 2000

2.1.1 Micro-organismos responsáveis pela fermentação em kombucha

O termo em inglês SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast), traduzido em português como CSDBL (Cultura Simbiótica de Bactérias e Leveduras), foi criado em 1996

pelo entusiasta Len Porzio para referir-se à “mãe da kombucha”. Atualmente este termo é bem aceito pela comunidade científica (Crum & LaGory, 2016).

A Figura 1 apresenta uma fermentação de kombucha típica (Crum & LaGory 2016). É possível observar o biofilme celulósico em formação na superfície do líquido, abaixo nota-se o crescimento de leveduras e entre eles bolhas de CO₂, indicando uma cultura saudável, onde estão ocorrendo as reações metabólicas deste SCOBY.

Figura 1 - Fermentação de kombucha (celulose formada na superfície do líquido)



Fonte: Crum & LaGory (2016)

Teoh et al. (2004) afirmam que não existe um conjunto universal de micro-organismos presentes no SCOBY, mas dentre as leveduras aquelas mais frequentes são osmotolerantes, fermentativas e produtoras de ácido. Segundo Villarreal-Soto et al. (2018) diversas literaturas relataram a presença das seguintes leveduras: *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera/Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Pichia*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Saccharomyces*, *Lachancea*, *Saccharomycoides*, *Schizosaccharomyces* e *Kluyveromyces* (Chakravorty et al., 2016; Coton et al., 2017; Marsh et al., 2014). Outros autores também indicaram a presença de *Kloeckera*, *Mycotorula* e *Mycoderma* (Jayabalan et al. 2014).

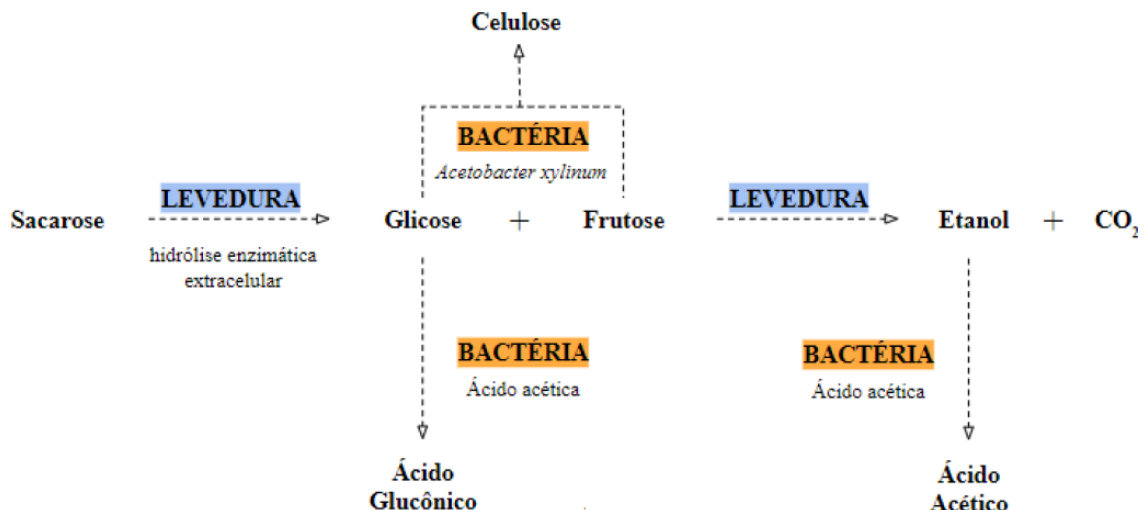
Além disso, essa zooglia também é composta por bactérias, principalmente acéticas e lácticas. Os gêneros de bactérias lácticas mais comuns são *Lactobacillus* e *Lactococcus*, sendo a espécie *Lactobacillus kefirifaciens* subsp. *kefirgranum* a que mais se destaca, segundo

Marsh et al. (2014, apud Santos, 2016). Quanto as bactérias acéticas destacam-se as *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconobacter oxydans* (Jayabalan et al. 2014) e *Komagataeibacter xylinus* (anteriormente conhecida como *Acetobacter xylinum*), sendo esta última a principal responsável pela produção de celulose (Yamada et al., 2012), outras bactérias capazes de produzir celulose em kombucha são *Komagataeibacter rhaeticus* e *Komagataeibacter intermedius* (Gomes et. al, 2018).

2.1.2 Metabólitos da fermentação e composição da kombucha

As diferentes espécies de leveduras e bactérias atuam em paralelo, fermentando o chá e formando o biofilme celulósico, como representado no esquema da Figura 2. As leveduras atuam na conversão de sacarose em glicose e frutose, e estes monossacarídeos funcionam como substrato para as fermentações alcoólica e acética, onde ocorre a formação de CO₂, que é responsável pela gaseificação da bebida. O etanol, permanece no produto final em poucas concentrações, já que é convertido em ácido acético por bactérias acéticas. Também há a formação de outros ácidos orgânicos como o glucônico e glucurônico. Devido a produção desses ácidos, ocorre a diminuição do pH da bebida e consequente proteção contra contaminantes (Villarreal-Soto et al., 2018; Dufresne and Farnworth, 2000).

Figura 2 - Atividade metabólica em kombucha



Fonte: Adaptada de Markov et al. (2003 apud Villarreal-Soto et al., 2018).

Dentre os ácidos orgânicos formados, o ácido glucurônico apresenta grande destaque devido aos seus efeitos benéficos para a saúde como desintoxicante (Lončar et al., 2000 apud Vīna et al. 2013).

Vários fatores podem influenciar na composição da kombucha, como por exemplo as condições de fermentação (tempo e temperatura), espécies presentes e concentração inicial de micro-organismos no inóculo, o chá utilizado e a concentração inicial de substrato (açúcar). Essas influências são notadas em diversos estudos. A Tabela 2 apresenta concentrações dos principais ácidos formados na fermentação de chá preto em diferentes condições de cultivo (Jayabalan et al. 2014; Kumar & Joshi, 2016, apud Villarreal-Soto et al. 2018). Vale salientar que a glicose e frutose são produtos da hidrólise da sacarose, onde é possível observar uma preferência no consumo pela glicose, devido aos menores valores presentes no meio ao final da fermentação.

Tabela 2 - Componentes predominantes em kombucha à base de chá preto adoçado

Componente	Concentração do componente (g/L)	Sacarose inicial (%)	Chá preto	Temperatura de fermentação (°C)	Tempo de fermentação (dias)	Fonte
Ácido acético	8	10	2 sachês	24 ± 3	60	a
	4,69	10	12 g/L	24 ± 3	18	b
Ácido Glucurônico	1,71	10	12 g/L	24 ± 3	18	b
	0,0031	5	1,5 g/L	28	21	c
	0,0026	7	1,5 g/L	28	21	c
	0,0034	10	1,5 g/L	28	21	c
Ácido glucônico	39	10	2 sachês	24 ± 3	60	a
Glicose	12	10	2 sachês	24 ± 3	60	a
	24,59	7	1,5 g/L	28	21	c
Frutose	55	10	2 sachês	24 ± 3	60	a
	5,4	7	1,5 g/L	28	21	c
Sacarose remanescente	11	10	2 sachês	24 ± 3	60	a
	2,09	7	1,5 g/L	28	21	c

a: Chen & Liu (2000), b: Jayabalan et al. (2007), c: Lončar et al. (2000).

Fonte: Adaptado de Jayabalan et al. 2014

Além dos componentes citados anteriormente, outros metabólitos foram identificados na kombucha como: ácido cítrico, láctico, málico, tartárico, malônico, oxálico, succínico, pirúvico e úsnico, aminoácidos livres, aminas biogênicas, purinas, pigmentos, enzimas hidrolíticas, lipídios, proteínas, vitaminas (B1, B2, B6, B12 e C), minerais (Cu, Fe, Mn, Ni, Zn), ânions (F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻, NO₃⁻, HPO₄⁻, SO₄⁻) e polifenóis, muitos deles provenientes do chá

utilizado como insumo (Dufresne & Farnworth, 2000; Jayabalan et al. 2014; Vīna et al. 2013; Lobo et al. 2017; Villarreal-Soto et al., 2018).

Os chás de *Camellia sinensis* são os principais na origem de kombucha e diversos compostos fenólicos, como flavonóis/catequinas, estão presentes em sua composição, sendo que essas quando sofrem a ação de enzimas convertem-se em teaflavinas, teasinensinas e tearubiginas (Harbowy et al. 2010; Santos, 2016; Tanaka & Kuono, 2003). A Tabela 3 mostra a composição de uma infusão de chá preto, *Camellia sinensis* que passou por esse processo de escurecimento enzimático (Haslam, 2003, apud Lima et al., 2009).

Tabela 3 - Composição de chá preto após infusão de 3 minutos

Constituintes	Porcentagem (% m/m)
Compostos fenólicos (majoritariamente flavonóis)	4,5
Compostos fenólicos oxidados (majoritariamente tearubiginas)	15
Proteínas	(vestígios)
Aminoácidos	3,5
Cafeína	3,2
Carboidratos	4
Lipídios	(vestígios)
Pigmentos (clorofila e carotenoides)	(vestígios)
Compostos voláteis	0,1
Minerais	4,5

Fonte: Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P. (2009, apud Santos, 2016)

Lobo et al. (2017) comparou as principais catequinas presentes no chá preto antes e após a fermentação de kombucha, como mostrado na Tabela 4, e comprovou que a fermentação é capaz de aumentar as concentrações dos compostos, levando conseqüentemente a maior atividade antioxidante da bebida.

Tabela 4 - Principais catequinas presentes em chá preto e na kombucha do mesmo chá

Compostos fenólicos	Concentração média em chá preto (mg/dL)	Concentração média em kombucha (mg/dL)
Epicatequinas (EC)	0,294	0,389 **
Epigalocatequinas (EGC)	0,870	0,862 NS
Galato-epigalocatequina (EGCG)	0,486	0,532 **
Galato-epicatequina (ECG)	0,196	0,055 ***
Galocatequina (GC)	-	0,229

Galato-galocatequina (GCG)	0,026	0,185 ***
----------------------------	-------	-----------

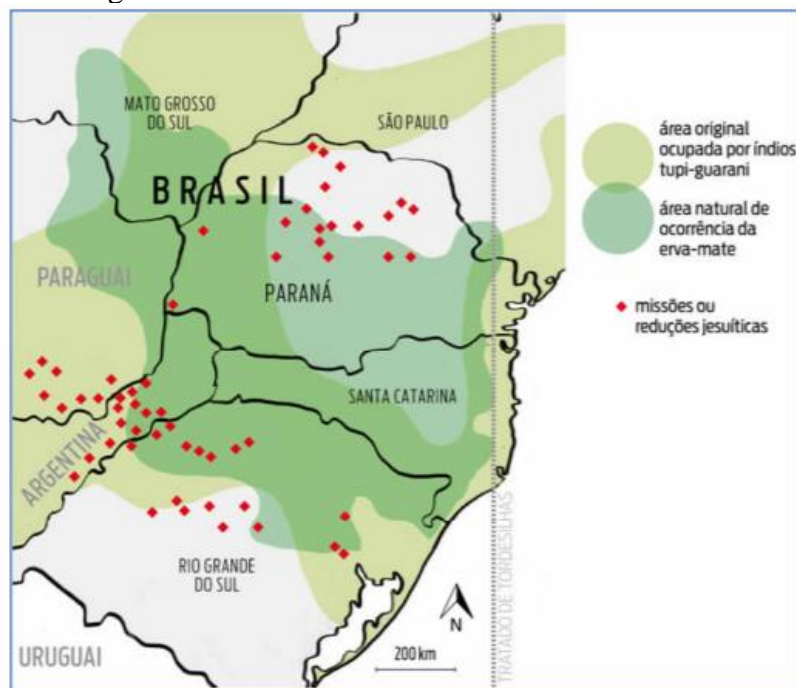
Valores de “p” em teste “t-student”: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. NS: não significativo.

Fonte: Adaptado de Lobo et al. (2017).

2.2 ERVA-MATE

A erva-mate, denominada cientificamente de *Ilex paraguariensis* St. Hil, é uma espécie nativa da América do Sul pertencente à família Aquifoliaceae e ao gênero *Ilex*. Seu cultivo foi praticado pelos povos indígenas que habitavam as regiões banhadas pelos rios Paraná, Uruguai e Paraguai antes mesmo da chegada dos espanhóis e portugueses às Américas; e também por jesuítas da Companhia de Jesus no século XVII (Ferraz, 1995). A Figura 3 mostra a sua área de ocorrência natural, área em que habitavam os índios e indica onde ocorreram as missões jesuítas.

Figura 3 - Área de ocorrência natural da erva-mate



Fonte: Dallabrida et al. (2014, apud Aquino et al., 2017)

O cultivo da erva-mate ocorre principalmente no Noroeste da Argentina, Leste do Paraguai, Uruguai e Brasil, abrangendo os três Estados da Região Sul, sendo essa a região brasileira que mais produz, e ainda parte de Mato Grosso do Sul, São Paulo e Minas Gerais. (Oliveira & Rotta, 1985).

A Resolução RDC nº. 302, de 07 de novembro de 2002, define erva-mate como

Produto constituído, exclusivamente, pelas folhas e ramos, das variedades de *Ilex paraguariensis*, na forma inteira ou moída obtido através de processo de secagem e fragmentação, o qual constitui matéria-prima para chimarrão e tererê. Não é considerada erva-mate, a matéria-prima que teve, parcial ou totalmente, retirados os princípios ativos, por qualquer processo tecnológico.

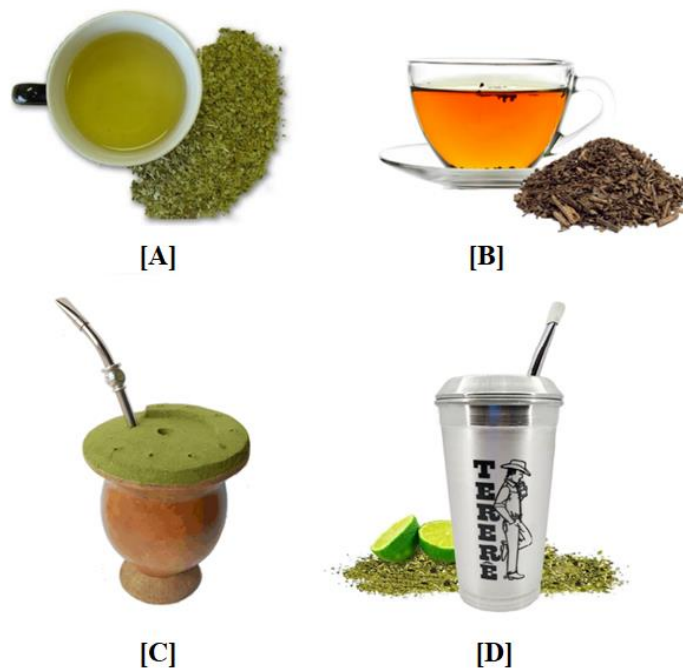
Sendo que, segundo a Portaria Normativa nº 118, de 12 de novembro de 1992:

- Chimarrão é produto beneficiado, caracterizando-se pela composição de paus, folhas, pó e goma, em percentuais variáveis destinado a degustação em cuia, conservando o paladar amargo.
- Tererê é a denominação dada tradicionalmente a erva-mate triturada e socada com grande percentagem de palitos/paus, servida, degustada com água fria.

Além de muito utilizado para produzir chimarrão e tererê, pode-se utilizar a erva-mate para produção de chás. Segundo a Portaria nº 519, de 26 de junho de 1998, chá é um produto preparado por infusão ou decocção em água potável de partes vegetais obtidas por processos tecnológicos adequados, sendo os produtos da espécie *Ilex paraguariensis* chamados de “chá mate verde”, “chá mate tostado” ou “chá mate queimado”, dependendo do grau de torrefação (Brasil, 1998). Essas partes vegetais que constituem os chás de erva-mate podem ser somente folhas ou folhas e talinhos, triturados, de acordo com a Portaria Normativa nº 118, de 12 de novembro de 1992 (Brasil, 1992).

A Figura 4 permite a comparação visual dos produtos de erva-mate. Em [A] encontra-se o chá mate verde antes e após infusão; em [B] o chá mate tostado antes e após infusão; em [C] a erva-mate beneficiada de menor granulometria servida em uma cuia para consumo como chimarrão; e em [D] um copo para preparação de tererê com seus insumos ao fundo, erva-mate beneficiada e limão, que são consumidos juntamente com água fria.

Figura 4 - Produtos de erva-mate: chá mate verde [A], chá mate tostado [B], chimarrão [C] e tererê [D]



Fonte: Elaborada pelo autor.

2.2.1 Processamento de erva-mate

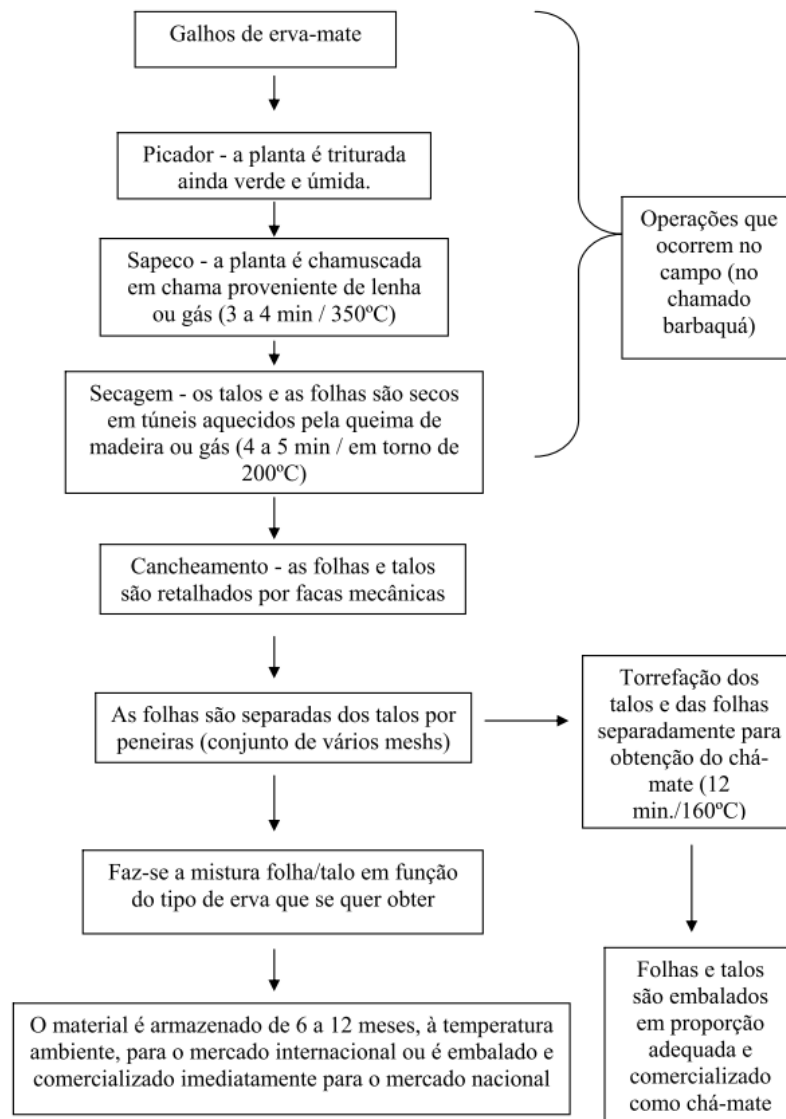
O processamento da erva-mate inicia-se no campo com o objetivo de desidratá-la. Logo após a colheita faz-se o chamado sapeco da erva picada, que ocorre rapidamente pelas labaredas de uma fogueira. Sabe-se que tanto o excesso de calor quanto a falta podem reduzir a qualidade do produto nesse processo. Para finalizar a desidratação dos talos e folhas podem ser utilizados quatro tipos diferentes de secagem, são eles: processo de carijo (não mais utilizado atualmente), furna, barbacué e desidratador rotativo, sendo este último o mais empregado no Brasil. Ele consiste em um cilindro rotativo com palhetas helicoidais no qual a alimentação é constante e a saída é feita por meio de turbinas, sendo a temperatura de operação em torno de 300 °C e o tempo de retenção de aproximadamente 5 minutos, para as folhas, ou 15 minutos, no caso dos talos. Para evitar o preenchimento em excesso deste sistema é necessário fazer previamente a fragmentação da erva, também chamada de cancheamento, esta pode ser feita com facas, manual ou mecanicamente, e com cunhas rotacionadas em canchas, por movimento animal. Então ocorre a etapa de classificação, que pode ser feita por meio de peneiras vibratórias ou rotativas, a fim de separar a erva-mate por granulometria para os diferentes fins de consumo (Omar, 2009). A Portaria Normativa nº 118, de 12 de novembro de

1992, define padrões e as peneiras que devem ser utilizadas para cada um nessa etapa, por exemplo:

- Para chimarrão: peneiras de Tela nº 10 a 50 (padrão nacional).
- Para chá: peneiras de Tela nº 08 a 14 ou nº 08 a 20, quando se trata apenas de folhas (padrão exportação).

Em seguida, quando se deseja a fabricação de chá mate tostado, faz-se a torrefação, que acontece à 160 °C por 12 minutos. A Figura 5, apresenta o fluxograma do processamento em uma ordem diferente da apresentada, nele a secagem ocorre antes da fragmentação devido ao uso do secador barbaquá (Kormann, 2003, apud Saldanha, 2005).

Figura 5 - Fluxograma do processamento de erva-mate



Fonte: Kormann (2003, apud Saldanha, 2005)

2.2.2 Composição e propriedades da erva-mate e seus derivados

O processamento não influencia apenas nas características sensoriais do produto, mas também na sua composição, a Tabela 5 mostra uma faixa possível de teores dos componentes em erva-mate processada (Esmelindro, 2002). Outro fator importante é a origem e localização do plantio. Cardozo Jr. et al. (2007) ao avaliar a concentração de fenólicos totais em erva-mate de diferentes regiões do Paraná encontrou um teor mínimo de 7,9% em Ivaí e máximo de 9,6% em Guarapuava.

Tabela 5 - Composição físico-química da erva-mate pronta para consumo

Análise físico-química	Teor mínimo	Teor máximo
	(% em base seca)	
Cinzas	5,07	6,60
Fibras	14,96	19,95
Gorduras	5,57	9,10
Proteínas	8,30	13,45
Glicose	1,30	6,14
Sacarose	3,60	6,90
Cafeína	0,97	1,79

Fonte: Burgstaller (1994, apud Esmelindro, 2002)

Presentes em *Ilex paraguariensis*, as xantinas (cafeína e teobromina) apresentam ação estimulante; as saponinas (agliconas, ácido ursólico e ácido oleanólico) conferem espuma e sabor amargo, além de diversas propriedades como ação anti-inflamatória; os compostos fenólicos são responsáveis pela ação antioxidante, dentre eles tem-se polifenóis (ácido clorogênico), alcalóides de purina (ácido cafeico, ácido 3,4- dicico-quinílico e 3, ácido 5-dicaffeoylquinico) e flavonoides (quercetina, kaempferol e rutina); por fim é possível que outros efeitos sejam notados devido a alguns minerais (P, Fe e Ca), vitaminas (C, B1 e B2) e a associação entre os componentes (Cardozo Jr. et al. 2007; Deladino et. al, 2013; Matsumoto, 2008; Paludo, 2017).

O chá mate, proveniente da infusão de erva-mate tostada, é reconhecido por sua atividade antioxidante. Matsumoto (2008) mostrou clinicamente que o chá mate produzido em uma empresa paranaense foi capaz de aumentar a capacidade antioxidante naqueles que o consumiram, mesmo por curto período. Saldanha (2005) comparando essa atividade em chá verde e extratos aquosos de erva-mate verde e tostada, por métodos analíticos, encontrou valores semelhantes entre eles, pouco maiores na tostada, podendo estes terem sido

originados no processo de torrefação. A autora sugere que essa atividade seja proveniente não apenas de compostos fenólicos, mas também de malanoidinas, por exemplo.

Sabendo sua composição e propriedades, e considerando que *Ilex paraguariensis* apresenta um valor de mercado inferior à *Camellia sinensis* (aproximadamente metade do valor), o chá mate pode ser uma boa alternativa de substrato para a produção de kombucha. Outra vantagem da substituição do chá é a valorização da sua produção regional (Sul do Brasil), dando a erva-mate uma nova aplicação, que pode aumentar seu consumo e seu mercado (Paludo, 2017).

Poucos estudos foram feitos com o chá mate tostado para essa finalidade. Santos Júnior et. al (2009) mostrou que a bebida fermentada de chá mate apresenta efeito antimicrobiano contra bactérias patogênicas, como *Microsporium canis*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhi*.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Chás

Foram utilizados chá preto (*Camellia sinensis*) e chá mate tostado (*Ilex paraguariensis*) de marcas locais, ambos em sachês para que a difusão em água quente fosse semelhante entre os ensaios, além de evitar o acréscimo de uma etapa no processo, que seria a filtração das folhas de chá, no caso da compra a granel.

3.1.2 Inóculo

Proveniente de uma doação local, o inóculo utilizado trata-se de kombucha de chá preto ácida, fermentada por no mínimo 21 dias em aproximadamente 30 °C, esse líquido é popularmente chamado de “chá de arranque” ou “starter”, apresenta baixo pH e elevada acidez.

3.2 PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE FERMENTAÇÃO

Foram elaborados dois meios, contendo a mesma quantidade de substrato (açúcares) e de inóculo, variando apenas o tipo de chá utilizado, sendo um de chá mate tostado (M) e outro de chá preto (P). As formulações dos meios são apresentadas na Tabela 6. Nesse trabalho, optou-se por usar uma mistura de glicose e frutose em substituição a sacarose devido a algumas dificuldades que foram encontradas na quantificação da sacarose.

Tabela 6 - Formulação do meio de cultivo das fermentações de chá mate (M) e chá preto (P)

Ensaio	Erva-mate tostada (g·L ⁻¹)	Chá preto (g·L ⁻¹)	Glicose (g·L ⁻¹)	Frutose (g·L ⁻¹)	Inóculo % (v/v)
M	6,67	-	40	40	10
P	-	6,67	40	40	10

Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Para o preparo dos chás, a água foi aquecida a 90 °C e realizada a infusão por 5 minutos. Então, foram adicionados os açúcares (glicose e frutose) e após homogeneização resfriou-se os chás adoçados em banho de gelo. Ao atingir a temperatura ambiente, foi adicionado o inóculo.

A fermentação ocorreu num período de 15 dias a 30 ± 2 °C, em condição estática, em Falcons contendo 40 mL de amostra cada, sendo cobertos com um pano poroso, como mostra a

Figura 6, de modo a possibilitar a entrada de ar, bem como evitar contaminação por agentes externos.

Para se avaliar a cinética de fermentação foram retirados pontos a cada 3 dias, sendo as amostras destrutivas e o experimento realizado em triplicada.

Figura 6 – Sistema de fermentação usado. Falcons contendo o meio de fermentação, cobertos com tecido poroso



Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

3.3 MÉTODOLOGIA ANALÍTICA

3.3.1 Análise de pH

As análises de pH foram realizadas para os ensaios antes de iniciar o processo fermentativo (tempo zero) e a cada 3 dias até o fim da fermentação. Para estas medições utilizou-se um pHmetro de bancada Kasvi modelo K39-2014B.

3.3.2 Análises Cromatográficas

3.3.2.1 Determinação da concentração de ácidos e açúcares

As análises de ácido acético, ácido lático e açúcares (glicose e frutose) foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE; em inglês: High performance liquid chromatography, HPLC). Previamente, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 5 min, diluídas e então filtradas (0,22 μm) e transferidas para os vials. A quantificação foi realizada utilizando o equipamento Shimadzu Prominence LC-20^A equipado com coluna Bio-rad Aminex HPX-87H e detector de índice de refração (RI). A injeção de 10 μL da amostra foi

eluída com 0,5 mL/min da fase móvel (H₂SO₄ 5 mM), temperatura do forno de 35 °C e tempo de corrida de 30 min. As concentrações de açúcares foram determinadas a partir de curvas padrão de ácido acético, ácido láctico, glicose e frutose.

3.3.3 Análise de compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método colorimétrico modificado de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). Sob o abrigo de luz, 20 µL de amostra (previamente diluídas quando necessário), 100 µL de solução de Folin e 1580 µL de água destilada reagiram por 8 minutos em microtubos de 2 mL. Então, adicionou-se 300 µL da solução de carbonato de sódio 20% (m/v) e reagiram a 40 °C por mais 30 minutos, após agitação. As leituras foram feitas a 765 nm, em temperatura ambiente em espectrofotômetro.

Previamente utilizou-se ácido gálico (GAE ou EAG) como padrão, o que permitiu através da curva de calibração construída relacionar os valores lidos de absorbância com o teor de fenólicos em gramas de EAG por litro (g EAG/L).

3.3.4 Determinação da concentração de celulose formada

A massa de celulose formada após 15 dias de fermentação foi purificada e seca em estufa a 50 °C, e então medida em balança analítica para obtenção da massa e cálculo da concentração de celulose formada (g/L). A purificação foi feita por imersão em solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L em estufa a 50 °C até a remoção completa das impurezas e microrganismos fixados.

Para determinação da produtividade e fator de conversão foram realizados os seguintes cálculos:

$$Produtividade = \frac{Biofilme\ formado\ (g/L)}{Tempo\ (dias)}$$

(1)

$$\gamma_{biofilme/substrato} = \frac{Biofilme\ formado\ (gb/L)}{Substrato\ inicial\ (gs/L) - Substrato\ final\ (gs/L)} \quad (2)$$

Sendo o substrato o somatório das fontes de carbono, glicose e frutose, como descrito na Tabela 6.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO

4.1.1 Variação do pH ao longo da fermentação

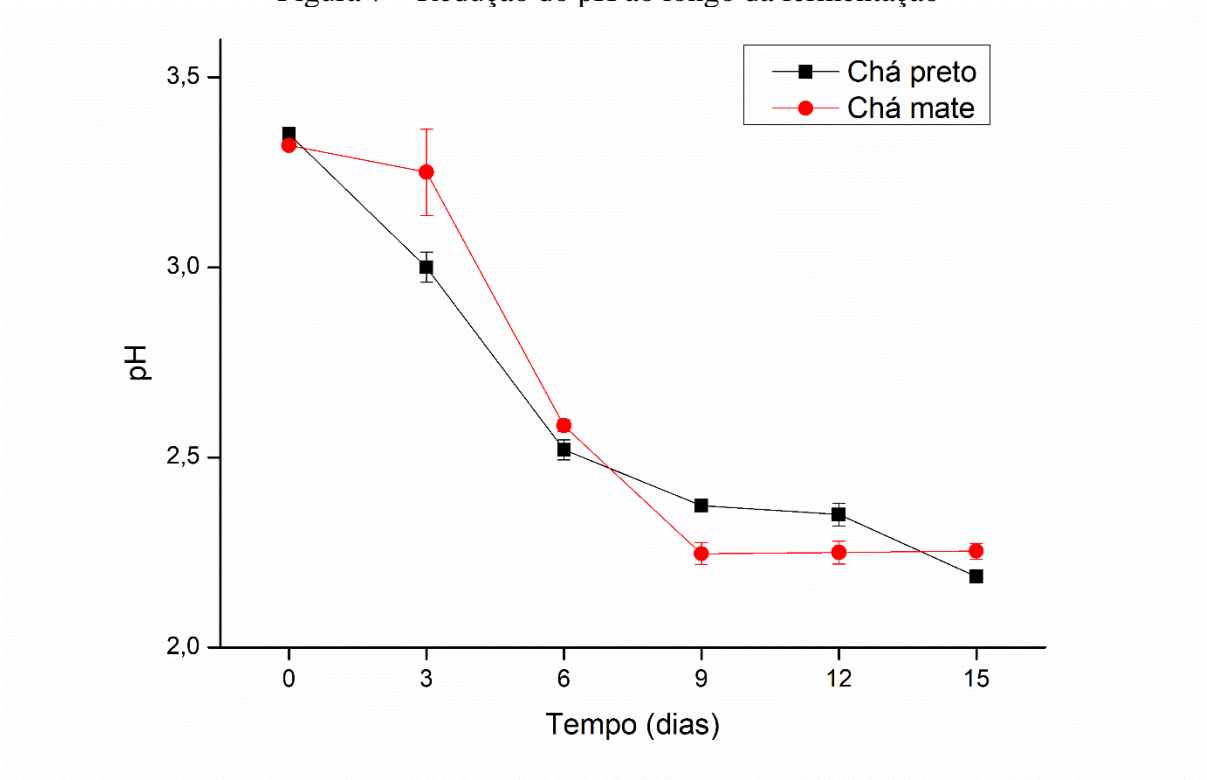
O Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) estabelecido na Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019, determina os limites de pH e acidez volátil que caracterizam kombuchas (Brasil, 2019). Todas as amostras apresentaram pH menor que 3,5 atendendo os requisitos quanto ao pH máximo (4,2), porém as que fermentaram por 9 dias ou mais não se enquadraram no pH mínimo de 2,5.

As fermentações de 6 dias estão no limite estabelecido pela legislação para comercialização da bebida. A kombucha de chá preto apresentou em média pH 2,6 e a de chá mate 2,5. O aconselhável para o consumo das bebidas fermentadas provenientes deste inóculo e realizadas nas condições deste trabalho ocorresse por no máximo 6 dias. Porém, a avaliação da cinética por até 15 dias foi mantida com a intenção de acompanhar a redução do pH.

Observou-se que o pH do fermentado de chá mate decresceu até o nono dia e então permaneceu constante (aproximadamente 2,25), enquanto o pH da kombucha de chá preto decresceu rapidamente até o sexto dia e continuou decrescendo com uma menor velocidade até o fim do experimento (Figura 7). Jayabalan et al. (2008) explica que passados alguns dias o decréscimo do pH torna-se mais lento pelo efeito tampão proveniente da reação entre os íons hidrogênio (H^+) dos ácidos orgânicos e os ânions de bicarbonato (HCO_3^-), formados na dissociação aquosa de dióxido de carbono (CO_2).

Para a kombucha de chá preto o pH inicial era de 3,35 e diminuiu até 2,19. Enquanto Jayabalan et al. (2008 e 2007) fermentando chá preto com 10% de sacarose apresentou redução de pH de aproximadamente 5,0 para 3,0 em 12 dias. No meio de chá mate, o pH inicial, após a inoculação, era 3,32 atingindo 2,25 em 15 dias, como mostra a Figura 7. Em comparação, Santos Júnior et al. (2009) fermentando meio de chá mate com 25% de sacarose obtiveram decréscimo no pH de aproximadamente 4,0 para 2,0 em 14 dias.

Figura 7 – Redução do pH ao longo da fermentação



Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

4.1.2 Variação na concentração de ácidos orgânicos

As concentrações de ácidos orgânicos obtidas na fermentação com chá preto foram superiores às encontradas em chá mate, como mostra a Tabela 7. A maior concentração de ácido acético foi de 1,15 g/L para a fermentação de chá preto e 0,88 g/L para de chá mate, enquanto a de ácido láctico foi 0,08 g/L para o chá preto e 0,04 g/L para o chá mate.

Os maiores valores de concentração dos ácidos orgânicos analisados foram obtidos em 3 dias de fermentação para ambos os ensaios, o mesmo aconteceu para Jayabalan et al. (2007) com relação ao ácido láctico, em fermentação de chá preto.

A concentração de etanol é uma peça fundamental para o entendimento completo destes resultados, pois o seu consumo por bactérias acéticas está diretamente ligado à produção de ácido acético e o seu excesso pode ser danoso a microbiota de kombucha (May et al., 2019). Porém, na condição de análise não foi possível quantificá-lo em HPLC, provavelmente pelas baixas concentrações presentes no meio, considerando a diluição das amostras e limitações do método.

Tabela 7 – Ácidos orgânicos ao longo da fermentação

	Ensaio	0 dia	3 dias	6 dias	9 dias	12 dias	15 dias
Ác. acético (g/L)	P	0	1,15	0,75	0,61	0,31	0
	M	0	0,88	0,81	0,41	0,41	0,26
Ác. láctico (g/L)	P	0	0,08	0,06	0,03	0,02	0
	M	0	0,04	0,04	0,02	0,01	0

Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

É possível notar que houve a diminuição de ácido acético a partir do sexto dia (Tabela 7). Rizzon (2006) afirma que as principais perdas desse ácido ocorrem pela evaporação natural dos compostos voláteis (álcool e ácido acético) e pelo consumo de álcool por certas bactérias. Além disso, nos casos em que há presença predominante de *Acetobacter xylinum* (bactéria responsável pela formação de celulose em kombuchas) as perdas são elevadas já que elas são capazes de transformar esse ácido em água e CO₂. Essa transformação chama-se superoxidação e ocorre em casos de escassez de etanol. Os gêneros *Gluconacetobacter* e *Komagataeibacter*, também comuns em kombucha, possuem tal capacidade, além das *Acetobacter* (Rizzon, 2006; Raspor & Goranovič, 2008; Gomes et. al, 2018).

Neffe-skocińska et al. (2017) fermentando a 30 °C um meio misto com chá preto e verde encontrou um valor máximo de 1,42 g/L de ácido acético em 10 dias. Quanto ao ácido láctico, não foram encontrados valores que indicassem sua presença na kombucha. Os autores explicam que estes valores relativamente baixos podem ser provenientes de uma quantidade insuficiente de glicose para a síntese de ácido acético, sendo que parte dela é utilizada para produzir celulose e outros ácidos, como o glucônico.

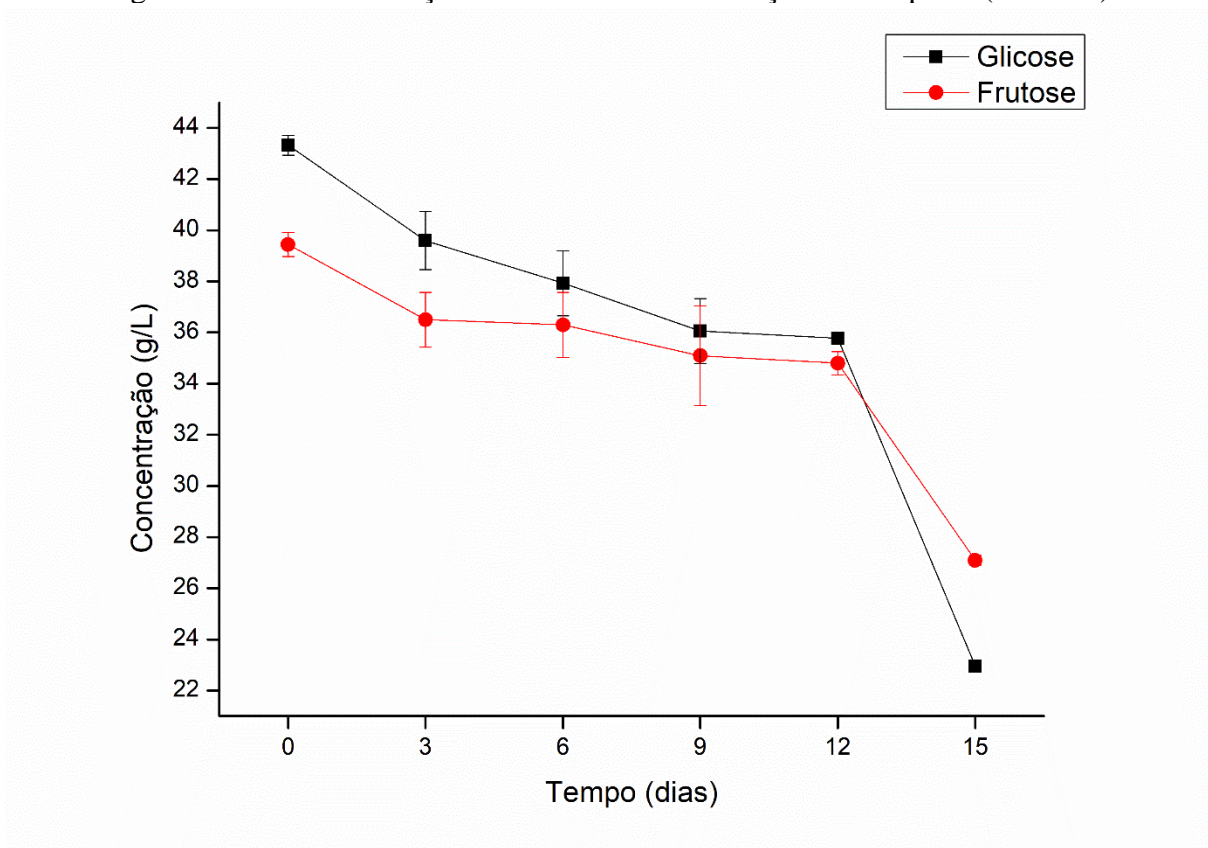
Malbasa et al. (2008) fermentaram chá preto por 14 dias com sacarose obtendo 0,53 g/L de ácido acético e 0,05 g/L de ácido láctico. Quando a fermentação foi realizada usando melado em substituição a sacarose, os valores variaram entre 0,28 e 0,21 g/L de ácido acético e 0,4 e 0,16 g/L de ácido láctico. Como observado, as fontes de carbono utilizadas impactaram a produção dos ácidos, sugerindo que sistemas com sacarose favoreçam a formação de ácido acético.

A utilização de glicose e frutose puras como fontes de carbono nos meios de cultivo, substituindo a tradicional sacarose, pode ter influenciado a produção destes ácidos. Recomenda-se então para trabalhos futuros replicar este experimento e realizar ensaios com sacarose como substrato para comparação, levando em consideração a diferença de molaridade.

4.1.3 Consumo de açúcares

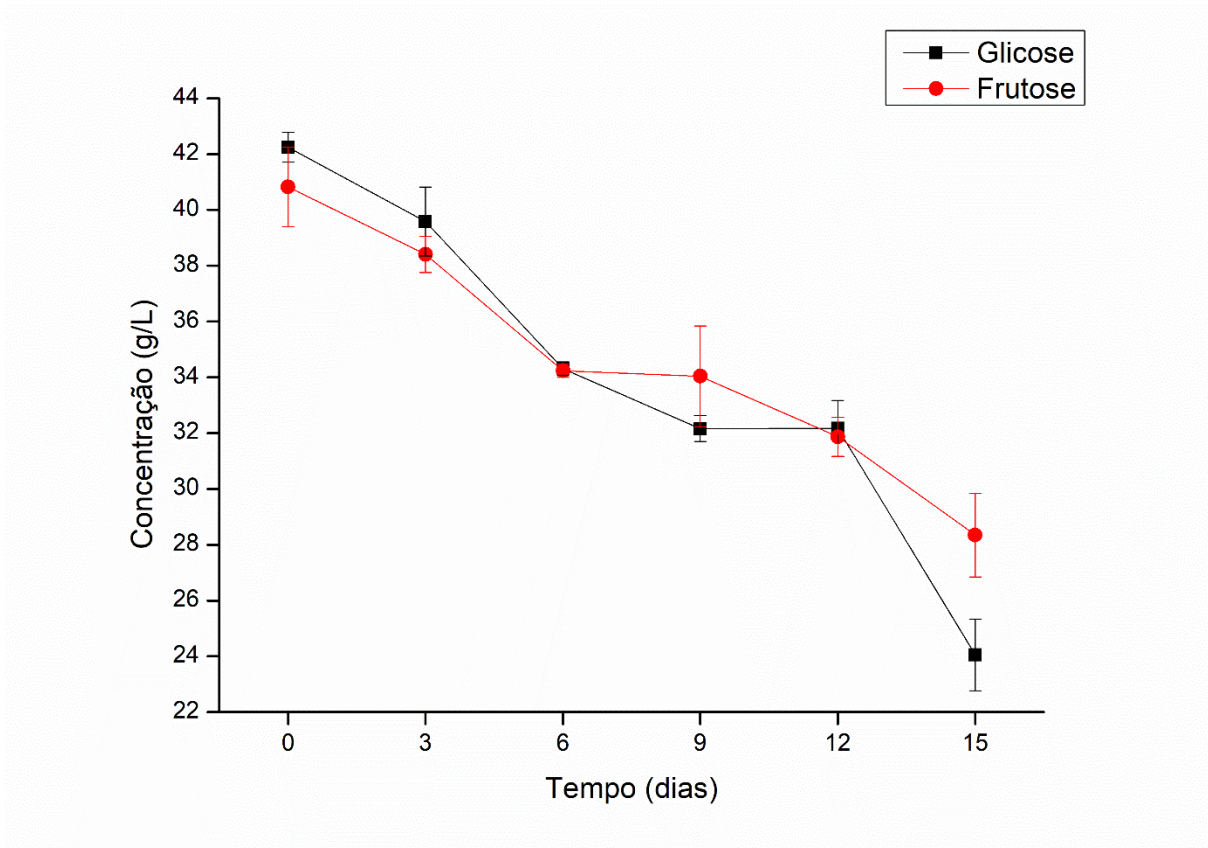
As Figuras 8 e 9 mostram o consumo dos açúcares durante a fermentação da kombucha de chá preto e chá mate, respectivamente. Embora a quantidade de glicose e frutose adicionadas na formulação fossem iguais (40 g/L), as concentrações iniciais se diferem devido a quantidade de açúcares residuais presentes no inóculo.

Figura 8 - Consumo de açúcares durante a fermentação de chá preto (ensaio P)



Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Figura 9 – Consumo de açúcares durante a fermentação de chá mate (ensaio M)



Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

No chá preto, a concentração de glicose reduziu de aproximadamente 43,3 para 23 g/L, enquanto a frutose reduziu de 40 para 27 g/L, sendo as maiores taxas de consumo entre 12 e 15 dias de fermentação. O mesmo ocorreu com relação às taxas para Kallel et al. (2012). Já para o chá mate, a concentração de glicose passou de aproximadamente 42,3 para 24,1 g/L sendo sua maior taxa de decréscimo também entre 12 e 15 dias, enquanto a frutose passou de 40,9 a 28,4 g/L mostrando uma taxa de consumo mais linear durante os 15 dias de fermentação.

Kallel et al. (2012) sugerem que há uma preferência de consumo de glicose em relação à frutose como fonte de carbono pela microbiota de kombucha, uma vez que não esteja ocorrendo isomerização considerável de glicose em frutose. Sendo que essa preferência já era conhecida para algumas bactérias presentes em kombucha: as cepas de *Acetobacter* (Seto et al., 1997).

Este consumo preferencial se mostrou evidente tanto para o chá preto (Figura 8) quanto para o chá mate (Figura 9). Em ambas as fermentações o consumo de frutose foi de aproximadamente 31%, enquanto o de glicose foi de 47% para o chá preto e de 43% para o chá mate.

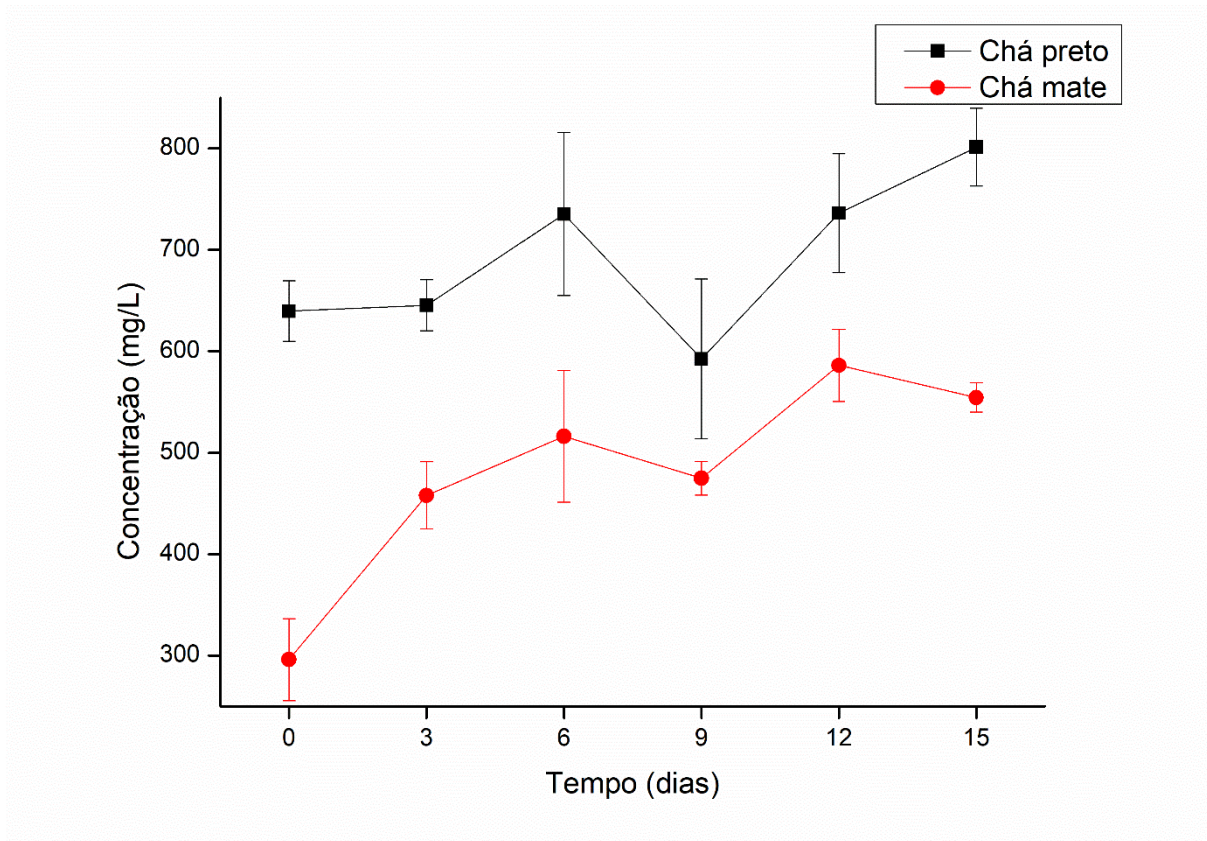
O açúcar remanescente geralmente é substrato de uma segunda fermentação, realizada em condições anaeróbias, com o intuito de aumentar a gaseificação e quando adicionado de ingredientes (como especiarias, suco de fruta ou outro) a saborização da bebida (Crum & LaGory, 2016).

4.1.4 Variação na concentração de compostos fenólicos totais

Devido às diferenças de composição dos chás utilizados, já no início da fermentação a bebida preparada a partir do chá preto apresentava compostos fenólicos totais em maior quantidade (640 mg EAG/L) quando comparado aquela de chá mate (296 mg EAG/L).

Como mostrado na Figura 10, as duas fermentações levaram a um aumento no conteúdo de compostos fenólicos, sendo a de chá mate a que apresentou o maior aumento. Ao longo de 15 dias a sua quantidade aumentou em 87%, apresentando ao final 554,43 mg EAG/L. Já na kombucha de chá preto o aumento foi de apenas 25% em 15 dias, equivalente a uma quantidade final de 801,29 mg EAG/L. Jayabalan et al. (2007) sugere que o teor de fenólicos aumente devido a liberação de catequinas presentes nas células microbianas sensíveis ao meio ácido e a ação de enzimas não identificadas, excretadas por microrganismos da kombucha. Essas enzimas poderiam hidrolisar cadeias longas de polifenóis produzindo novas moléculas que contribuiriam para o aumento da concentração de polifenóis totais.

Figura 10 – Compostos fenólicos totais ao longo da fermentação



Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Valores finais similares foram obtidos para a kombucha de chá preto em pesquisas recentes realizadas no Brasil por Santos et al. (2019) e Melo et al. (2018), porém em fermentação de 6 dias.

Paludo (2017) fermentou infusão de erva-mate verde por SCOBY em um período de 7 dias e obteve 605,90 mg EAG/L. Então pode-se afirmar que a utilização tanto da erva verde como da tostada proporcionam resultados satisfatórios e similares de compostos fenólicos totais.

Saldanha (2005) avaliou a quantidade de compostos fenólicos em extratos aquosos de erva-mate e obteve em torno de 0,007 mg EAC/L para a tostada. Comparando os resultados deste extrato com o fermentado neste trabalho tem-se uma diferença significativa, comprovando que a fermentação foi um processo importante no aumento de fenólicos.

A comparação entre os dois chás, mostrou que a fermentação do chá mate pode ser mais interessante para o aumento desses compostos. Porém somente estudos *in vitro* e *in vivo* poderiam elucidar se os compostos formados teriam maiores benefícios ao consumidor.

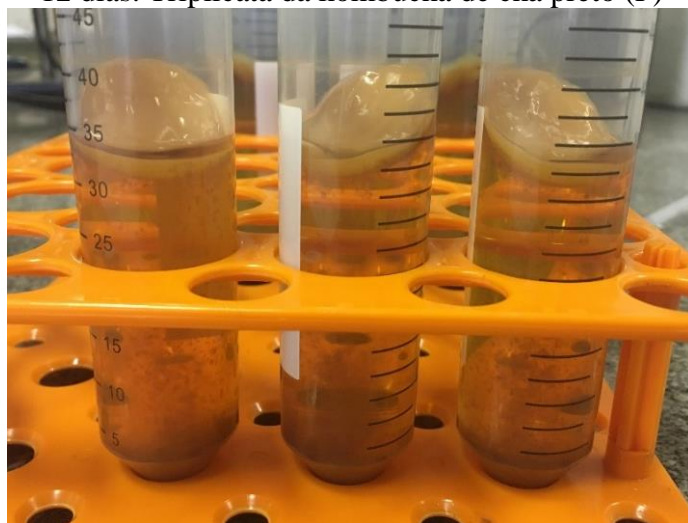
4.2 PRODUÇÃO DE BIOFILME

A fermentação foi iniciada apenas com inóculo líquido, ou seja, sem presença de biofilme, apesar de tradicionalmente o biofilme é utilizado como inóculo considerando que uma quantidade relevante de micro-organismos se adere a ele.

Com o decorrer do tempo houve a formação do biofilme, ao terceiro dia já era possível observar uma película fina homogênea na superfície dos meios de cultura, e nos dias seguintes foi notável o aumento de tamanho.

O filme formado aderiu nas laterais do tubo, o que pode ter dificultado a transferência de oxigênio para o meio líquido. Isso pode ter favorecido a formação de bolhas de CO₂, as quais elevaram o filme causando uma leve curvatura, e em tempo mais prolongados, perda de contato com o meio líquido, como mostra a Figura 11.

Figura 11 – Falcons contendo o meio de fermentação e a celulose formada na superfície após 12 dias. Triplicata da kombucha de chá preto (P)

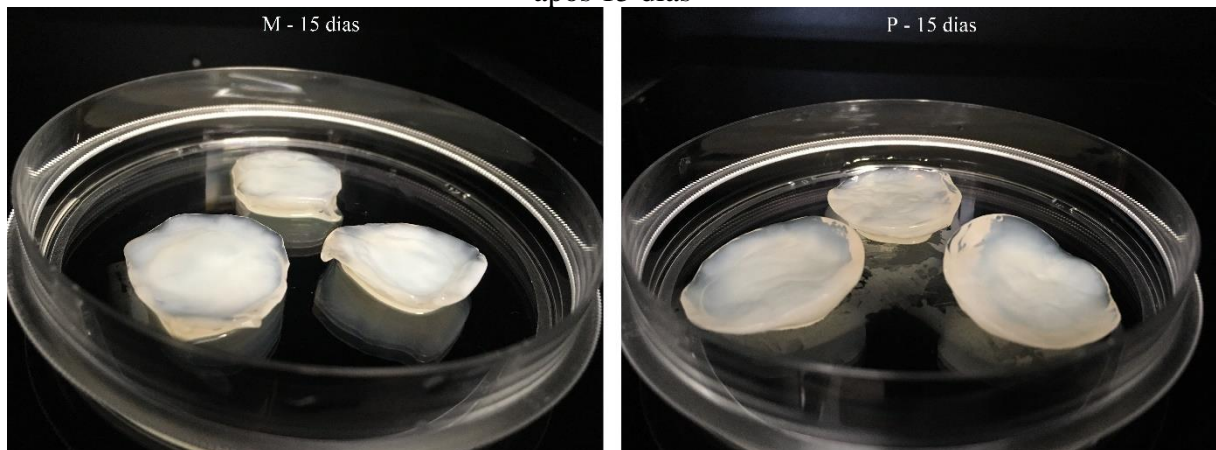


Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Os biofilmes não apresentaram homogeneidade de espessura, provavelmente devido a essa perda de contato, que fez com que a distribuição de oxigênio pelo filme variasse, fator importante no metabolismo dos micro-organismos produtores de celulose.

A Figura 12 apresenta imagens dos biofilmes purificados, possibilitando a comparação visual das triplicatas dos ensaios de chá mate (M) e de chá preto (P), após 15 dias de fermentação. É possível perceber que o processo em chá preto proporcionou filmes um pouco mais espessos que em chá mate.

Figura 12 - Biofilmes purificados obtidos da fermentação de chá mate (M) e chá preto (P) após 15 dias



Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Para determinar a produção exata de celulose foi necessário secar as amostras para eliminação da água. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 8. A fermentação em chá preto resultou em biofilmes com massa em base seca média maior que em chá mate, sendo de 55 mg e 45 mg, respectivamente. Quando analisada a produção pelo consumo de substrato (glicose e frutose) foi possível notar que a conversão de açúcares em celulose foi em torno de 12% maior em chá preto.

Tabela 8 - Resultados de produção de biofilme para chá mate (M) e de chá preto (P).

Ensaio	Produção (g/L)	Produtividade (g/L.dia)	Fator de conversão (g celulose/g substrato)
P	1,38	0,092	0,042
M	1,12	0,075	0,037

Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Schroeder (2019) avaliou a formação de biofilme a partir de kombucha de chá verde e obteve para a celulose purificada massa de 0,25 g, sendo que o sistema de fermentação utilizado continha 450 mL e o experimento teve duração de 21 dias. Outra pesquisa foi feita a partir da bactéria *G. xylinus*, isolada de kombucha, onde Nguyen et al. (2008) fermentou por 7 dias meios com diferentes concentrações de chá preto e obteve uma produção de celulose bacteriana máxima de 0,14 g/L. A produtividade de ambos foi similar (próximo a 0,02 g/L dia) e inferior ao presente trabalho.

Vieira (2013) avaliou a produção de celulose por uma cultura mista de *G. xylinus* e *S. cerevisiae*. Estes micro-organismos podem estar presentes em kombucha, e embora o objetivo não fosse simular a bebida, o ensaio com fermentação de chá verde por 15 dias, 11% de inóculo

e 85 g/L de sacarose representou bem as condições de cultivo de kombucha. Neste ensaio a produtividade de celulose foi de 0,67 g/L.dia e o fator de conversão de 0,071 g celulose/ g sacarose.

A celulose bacteriana pode ser utilizada na indústria têxtil, de tintas, de embalagens (biodegradáveis, embalagens ativas etc.), alimentícia (como fibra alimentar, para produção de sobremesas dietéticas, nata de coco, teekvass etc.). Na indústria farmacêutica e biomédica, segundo Vieira (2013), vem sendo estudada como substituta da pele, curativo de feridas cirúrgicas das papilas mamárias de vacas, curativo para cirurgias periodontais, substituta da dura-máter, torniquetes, cobertura de stent, reconstrução vascular, meio de cultura para células mamárias entre outros.

5 CONCLUSÃO

Constatou-se que o chá mate tostado (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) é uma alternativa viável ao chá preto (*Camellia sinensis*) e que suas bebidas fermentadas apresentam resultados similares nas presentes análises.

A cinética de fermentação apresentou resultados esperados de acordo com a literatura: o pH de ambos os ensaios decresceram durante a fermentação até 2,19 (P) e 2,25 (M) em 15 dias, indicando a produção de ácidos, enquanto os açúcares foram consumidos, até aproximadamente a metade da quantidade inicial. O maior consumo de glicose na bebida de chá preto (47%) e chá mate (43%), indica sua preferência como fonte de carbono em relação a frutose (31% consumida em ambos).

As fermentações com SCOBY de kombucha se mostram promissoras também como um processo de interesse para produção de celulose bacteriana. Essa celulose, atualmente pouco utilizada para outros fins, pode ser aproveitada por ser um subproduto com potencial de aplicação na indústria têxtil, de tintas, de embalagens, alimentícia, farmacêutica e biomédica, evitando seu descarte como resíduo e gerando maior rentabilidade aos fabricantes da bebida.

Um dos pontos a se destacar na comparação dos chás é que a bebida de chá mate tostado foi a que apresentou o maior aumento (87%) da concentração de compostos fenólicos ao longo da fermentação, totalizando ao final do período 554,43 mg EAG/L, indicando um possível potencial nutricional da bebida fermentada com este chá.

O uso do chá mate para produção de uma bebida com alta concentração de compostos benéficos valoriza a cultura regional de produção de erva-mate e aumenta as possibilidades de aplicação da erva.

Mesmo que o produto produzido não seja aquele descrito pela legislação brasileira, e que não seja permitido a denominação de “kombucha” para produtos que não utilizem *Camellia sinensis*, este produto possui grande potencial no mercado pelas suas características similares. Além disso, o uso de chá mate favorece um menor gasto na aquisição de insumos para produção da bebida fermentada, considerando que a região Sul se destaca pela produção de erva-mate e seu valor é menor em relação ao chá preto.

Para maior compreensão, melhoria do processo e das características da bebida e do biofilme, recomenda-se para trabalhos futuros:

- investigar a influência dos açúcares na fermentação, fazendo testes com sacarose e comparando com glicose e frutose;

- testar outras formulações, variando as concentrações de chá mate tostado e de açúcares para avaliação dos produtos produzidos;
- analisar a microbiota do SCOBY utilizado e outros compostos de interesse que podem estar presentes na bebida;
- realizar testes de avaliação sensorial das bebidas fermentadas por chá mate e comparar a apreciação com a kombucha original;
- caracterizar o biofilme formado e variar os fatores para otimização da sua produção.

REFERÊNCIAS

AQUINO, Márcio; CENTENARO, Moisés; MARTINS, Romildo Camargo; MARTINS. Identidade Cultural e Transterritorialidade: A Erva-Mate como Elemento Histórico na Formação Identitária da Fronteira Ponta Porã (BR) e Pedro Juan Caballero (PY). In: VIII SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE DESENVOLVIMENTO REGIONAL, Territórios, Redes e Desenvolvimento Regional: Perspectivas e Desafios, 2017, Santa Cruz do Sul. **Anais [...]**. Santa Cruz do Sul: 2017.

BLOIS, Marsden S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, [s.l.], v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, abr. 1958. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0>.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 abr. 1999.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 241, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 jul. 2018.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº. 302 de 07 novembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Erva-Mate. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 nov. 2002.

BRASIL. Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019. Estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha em todo o território nacional. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 set. 2019.

BRASIL. Portaria nº 519, de 26 de junho de 1998. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de "Chás - Plantas Destinadas à Preparação de Infusões ou Decocções". **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 jun. 1998.

CARDOZO, Euclides Lara; FERRARESE-FILHO, Osvaldo; CARDOZO FILHO, Lucio; FERRARESE, Maria de Lourdes Lucio; DONADUZZI, Carmen Maria; STURION, José Alfredo. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. **Journal Of Food Composition And Analysis**, [s.l.], v. 20, n. 7, p. 553-558, nov. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2007.04.007>.

CHU, Sheng-Che; CHEN, Chinshuh. Effects of Origins and Fermentation Time on the Antioxidant Activities of Kombucha. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 98, n. 3, p. 502-507, jan. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.080>.

CRUM, Hannah; LAGORY, Alex. **The Big Book of Kombucha: Brewing, Flavoring and Enjoying the Health Benefits of Fermented Tea**. Adams do Norte (EUA): Storey Publishing, 2016.

DELADINO, Lorena; TEIXEIRA, Aline Schneider; RETA, Mario; GARCÍA, Antonio D. Molina; NAVARRO, Alba S.; MARTINO, Miriam N.. Major Phenolics in Yerba Mate Extracts (*Ilex paraguariensis*) and Their Contribution to the Total Antioxidant Capacity. **Food and Nutrition Sciences**, [s.l.], v. 04, n. 08, p. 154-162, 2013. Scientific Research Publishing, Inc.. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2013.48a019>.

DUFRESNE C., FARNWORTH E.. Tea, Kombucha, and health: a review. **Food Research International**, [s.l.], v. 33, n. 6, p. 409-421, 2000.

ESMELINDRO, Maria Carolina; TONIAZZO, Geciane; WACZUK, Adroaldo; DARIVA, Cláudio; OLIVEIRA, Débora de. Caracterização físico-química da erva mate: influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 22, n. 2, p. 199-204, ago. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612002000200016>.

FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, p. 1–11. 2002.

FERRAZ, Helena Margarete da Rosa. **Situação da Atividade Ervateira no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: EMATER RS, 1995. (Série Realidade Rural, v. 19).

GOMES, Rodrigo José BORGES, Maria de Fátima ROSA, Morsyleide de Freitas CASTRO GÓMEZ, Raúl Jorge Hernan SPINOSA, Wilma Aparecida Acetic Acid Bacteria in the Food Industry systematics characteristics and applications Food Technology And Biotechnology „[S L v 56 n 2 p 0 0 2018 Faculty of Food Technology and Biotechnology University of Zagreb <http://dx.doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5593>.

HARBOWY, Matthew E.; BALENTINE, Douglas A.; DAVIES, Alan P.; CAI, Ya. Tea Chemistry. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [s.l.], v. 16, n. 5, p. 415-480, jan. 1997. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07352689709701956>.

JAYABALAN, Rasu; MALBAŁA, Radomir V.; LONČAR, Eva S.; VITAS, Jasmina S.; SATHISHKUMAR, Muthuswamy. A Review on Kombucha Tea-Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 538-550, 21 jun. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12073>.

JAYABALAN, R.; SUBATHRADEVI, P.; MARIMUTHU, S.; SATHISHKUMAR, M.; SWAMINATHAN, K.. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 109, n. 1, p. 227-234, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.037>.

KALLEL, Lina; DESSEAUX, Véronique; HAMDI, Moktar; STOCKER, Pierre; AJANDOUZ, El Hassan. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. **Food Research International**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 226-232, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.018>.

KAPP, Julie M.; SUMNER, Walton. Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. **Annals Of Epidemiology**, [s.l.], v. 30, p. 66-70, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.annepidem.2018.11.001>.

LEE, Stephen; KOOPMAN, Ken. **Kombucha Revolution: 75 recipes for homemade brews, fixers, elixirs and mixers**. Berkeley: 10 Speed Press, 2014.

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

MALBAŁA, R.; LONČAR, E.; DJURIĆ, M.. Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 106, n. 3, p. 1039-1045, fev. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.020>.

MATSUMOTO, Ruth Lobato Teixeira. **Atividade Antioxidante Do Chá Mate (*Ilex Paraguariensis*)**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MAY, Alexander; NARAYANAN, Shrinath; ALCOCK, Joe; VARSANI, Arvind; MALEY, Carlo; AKTIPIS, Athena. Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. **PeerJ**, [S.L.], v. 7, p. 1-22, 3 set. 2019. PeerJ. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.7565>.

NASCIMENTO, Adão Aparecido. **Elaboração de bebida fermentada de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. 2013. 45f. Trabalho de Conclusão de Curso – Tecnologia em Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Campo Mourão, 2013.

NEFFE-SKOCIŃSKA, Katarzyna; SIONEK, Barbara; ŚCIBISZ, Iwona; KOŁOŚYN-KRAJEWSKA, Danuta. Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. **Cyta - Journal Of Food**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 601-607, 18 jul. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2017.1321588>.

NGUYEN, Vu Tuan; FLANAGAN, Bernadine; MIKKELSEN, Deirdre; RAMIREZ, Santiago; RIVAS, Lucia; GIDLEY, Michael J.; DYKES, Gary A.. Spontaneous mutation results in lower cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 80, n. 2, p. 337-343, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.11.019>.

OLIVEIRA, Yeda Maria Malheiros de; ROTTA Emilio. **Área de Distribuição Natural de Erva-Mate (*Ilex Paraguariensis* St. Hil.)**. In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), 10, 1983. **Anais [...]**. Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1985. p. 17-36.

OMAR, Daniel. **Erva-mate: sistema de produção e processamento industrial**. Dourados, MS: UFGD; UEMS, 2009. 288p. <https://doi.org/10.13140/2.1.3312.9603>.

PALUDO, Natália. **Desenvolvimento e caracterização de kombucha obtida a partir de chá verde e extrato de erva-mate: processo artesanal e escala laboratorial**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

RASPOR, Peter; GORANOVIČ, Dušan. Biotechnological Applications of Acetic Acid Bacteria. **Critical Reviews In Biotechnology**, [S.L.], v. 28, n. 2, p. 101-124, jan. 2008. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07388550802046749>.

RIZZON, Luiz Antenor. Sistema de Produção de Vinagre: fermentação acética. **Embrapa**, dez. 2006. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Vinagre/SistemaProducaoVinagrefermentacao.html>. Acesso em: 7 nov. 2020.

SALDANHA, Luciane Arias. **Avaliação da atividade antioxidante in vitro de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*).**

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SANTOS, Mafalda Jorge dos. **Kombucha: Caracterização Da Microbiota e Desenvolvimento de Novos Produtos Alimentares Para Uso Em Restauração.** 2016. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Gastronômicas) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2016.

SANTOS JÚNIOR, Rodrigo José; BATISTA, Rejane Andrade; RODRIGUES, Sheyla Alves; XAVIER FILHO, Lauro; LIMA, Álvaro Silva. Antimicrobial Activity of Broth Fermented with Kombucha Colonies. **Journal Of Microbial & Biochemical Technology**, [s.l.], v. 01, n. 01, p. 072-078, 2009. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000014>.

SANTOS, Yasmin Maria de Azevedo; MOTA, Mércia Melo de Almeida; SANTIAGO, Ângela Maria; GOUVEIA, Deyzi Santos; DANTAS, Rebeca de Lima; MOREIRA, Inácia dos Santos. Avaliação da Composição de Kombucha a Base de Diferentes Chás (Verde e Preto). **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, Pombal, v. 12, n. 3, p.1-6, abr./jun 2019.

SANTOS, Yasmin Maria de Azevedo; MOTA, Mércia Melo de Almeida; GOUVEIA, Deyzi Santos; DANTAS, Rebeca de Lima; SILVA, Maria José Silveira da; MOREIRA, Inácia dos Santos. Caracterização Química de Kombucha a Base de Chás de Hibisco e Preto. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, [s.l.], v. 8, n. 3, p. 32 – 37, 2018. ISSN: 2317-3114.

SETO, Akira; KOJIMA, Yukiko; TONOUCI, Naoto; TSUCHIDA, Takayasu; YOSHINAGA, Fumihiro. Screening of Bacterial Cellulose-producing Acetobacter Strains Suitable for Sucrose as a Carbon Source. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [S.L.], v. 61, n. 4, p. 735-736, jan. 1997. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.61.735>.

TANAKA, Takashi; KOUNO, Isao. Oxidation of Tea Catechins: Chemical Structures and Reaction Mechanism: Review. **Food Science and Technology Research**, Nagasaki, v. 9, n. 2, p. 128-133, fev. 2003.

VIEIRA, Denise Cristina Moretti. **Produção de biofilme (membrana de biocelulose) por Gluconacetobacter xylinus em meio de frutas e folhas chá verde**. 2013. 699 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

VILLARREAL-SOTO, Silvia Alejandra; BEAUFORT, Sandra; BOUJILA, Jalloul; SOUCHARD, Jean-pierre; TAILLANDIER, Patricia. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 83, n. 3, p. 580-588, mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.14068>.

VĪNA, Ilmāra; SEMJONOVŠ, Pāvels; LINDE, Raimonds; PATETKO, Artūrs. Glucuronic Acid Containing Fermented Functional Beverages Produced By Natural Yeasts and Bacteria Associations. **IJRRAS**, Rīga, v. 14, n. 1, p. 17–25, jan. 2013.