



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

MARCELA MOREIRA TERHAAG

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDAS FUNCIONAIS DE LICHIA
E ERVA-MATE**

Londrina
2019

MARCELA MOREIRA TERHAAG

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDAS FUNCIONAIS DE LICHIA
E ERVA-MATE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Doutorado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciência de Alimentos.
Orientadora: Profa. Dra. Sandra Helena Prudencio

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

TERHAAG, MARCELA MOREIRA.

Desenvolvimento de bebidas funcionais de lichia e erva-mate / MARCELA MOREIRA TERHAAG. - Londrina, 2019.
220 f. : il.

Orientador: SANDRA HELENA PRUDENCIO. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, 2019.

Inclui bibliografia.

1. bebida mista - Tese. 2. potencial antioxidante - Tese. 3. Saccharomyces boulardii - Tese. 4. probiótico - Tese. I. PRUDENCIO, SANDRA HELENA. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. III. Título.

MARCELA MOREIRA TERHAAG

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDAS FUNCIONAIS DE LICHIA E
ERVA-MATE**

Tese apresentada ao Programa de Mestrado e
Doutorado em Ciência de Alimentos da
Universidade Estadual de Londrina, como
requisito parcial à obtenção do título de
Doutora em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sandra Helena Prudencio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Beatriz Cervejeira Bolanho Barros
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Dra. Dirlei Diedrich Kieling
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Marta de Toledo Benassi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Wilma Aparecida Spinosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 26 de fevereiro de 2019

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela fé que me mantém viva e fiel à vida honesta de trabalho e estudo.

À Profa Dra Sandra Helena Prudêncio, pela valiosa orientação, por partilhar seu conhecimento, pela compreensão, confiança e amizade, tendo me conduzido com a calma necessária para me ajudar nos momentos difíceis.

A Universidade Estadual de Londrina (UEL), em particular ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, em especial aos professores Fábio Yamashita, Marta T. Benassi, Sandra Garcia e Wilma A. Spinosa, pelo conhecimento compartilhado, acolhida e pela colaboração na orientação deste trabalho.

Ao Instituto Federal do Paraná (IFPR), Câmpus Umuarama pelo incentivo, auxílio e a pela licença concedida. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Ministério da Educação (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro por meio do Programa Novo Prodoutoral.

Ao Laboratório de Materiais e Moléculas (LAMM) e ao Laboratório de Apoio à Pesquisa Agropecuária (LAPA), seus servidores e estagiários pela colaboração na execução das análises de cromatografia gasosa e cromatografia líquida, respectivamente, ambos da Central Multiusuária da PROPPG-UEL/FINEP.

Aos queridos colegas Ariana, José Renato, Leonel, Lycio, Mariana, Maria Thereza, Thamires e Thiago, pelo conhecimento partilhado, pelos valiosos conselhos, grande amizade, bom-humor, companhia e incentivo em todas as horas. A APADEVI pelo auxílio na despolpa e envase da polpa de lichia e aos produtores pela doação das folhas de erva-mate.

A todos os avaliadores das equipes sensoriais que participaram da pesquisa e que foram fundamentais neste trabalho.

A minha filha querida Julia e meu amado esposo Fernando, que souberam entender a minha ausência, sempre me incentivando e apoiando nos muitos momentos do doutorado, juntos comigo ao longo de todas as etapas desta tese. Aos meus pais pelo apoio, encorajamento e pelos ensinamentos que formaram os alicerces de minha história.

Muito obrigada!

TERHAAG, Marcela Moreira. **Desenvolvimento de bebidas funcionais de lichia e erva-mate**. 2019. 213 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A lichia e a erva-mate possuem diversos compostos bioativos e são adequadas para o preparo de bebidas, com potencial antioxidante e podem ser veículo para micro-organismos probióticos. O objetivo desta pesquisa foi desenvolver bebidas funcionais de lichia e erva-mate com potencial antioxidante e probióticas pela adição da *Saccharomyces boulardii*. Folhas de erva-mate nativas (NAT) e de sistema de plantio intencional (PLANT) foram caracterizadas física e quimicamente. As folhas PLANT apresentaram maior conteúdo de compostos fenólicos totais (CFTs) e atividade antioxidante (AA) do que as folhas NAT e distintos perfis de açúcares e ácidos orgânicos. Infusão de folhas PLANT foram empregadas no desenvolvimento de bebidas mistas com suco de lichia em diferentes proporções (10 a 90% (v/v)). As bebidas formuladas com maior proporção de lichia continham maiores conteúdos de glicose, frutose, ácido málico e vitamina C e eram mais viscosas. Aquelas com maiores proporções de infusão apresentaram maior teor de sacarose, ácido cítrico, CFTs, ácidos fenólicos, flavonoides e metilxantinas além de maior AA (métodos DPPH, FRAP e ABTS). Com a pasteurização destas bebidas notou-se em uma redução na viscosidade, conteúdo de sacarose, ácido cítrico, ácidos fenólicos, flavonoides e metilxantinas e incremento no teor de glicose e frutose porém não houve alteração no conteúdo de CFTs e na AA em algumas formulações. Bebidas com 90% de lichia pasteurizadas apresentaram maior conteúdo de vitamina C (37,5 mg/L) e aquelas com 70% ou mais de infusão mostraram maior conteúdo de metilxantinas, além de alto conteúdo de flavonoides e ácidos fenólicos (216,5; 15,9; e 73,8 mg/mL, respectivamente). Os testes sensoriais apontaram que maiores proporções de lichia resultam em bebidas mais aceitas, claras, com aroma e sabor de lichia, sabor adocicado e ácido de fruta, ficam mais viscosas além de conter materiais em suspensão. Enquanto que maiores proporções de infusão tornaram as bebidas mais escuras, marrons, túrbidas e opacas, aroma e sabor de erva-mate, com gosto doce e amargo e adstringentes. O teste de desejabilidade apontou que a proporção de 70/30 (lichia/infusão de erva-mate) como a formulação aceita sensorialmente e com o máximo conteúdo de CFTs e AA. Como continuidade da pesquisa, foram desenvolvidas bebidas probióticas e fermentadas (tipo vinho) de lichia e mista de lichia e erva-mate por meio da adição da levedura *S. boulardii*. Para o preparo das bebidas probióticas houve uma etapa de fermentação e posterior adição de sacarose para diferentes conteúdos de sólidos solúveis totais (SSTs). As bebidas probióticas de lichia (LH) e de lichia e erva-mate (LM) apresentaram características físico-químicas, teor de CFTs e AA adequados para o consumo. Foi avaliado o efeito do armazenamento refrigerado das bebidas probióticas sobre a viabilidade da levedura e características físicas, químicas e sensoriais. Dentre as bebidas LH propostas, verificou-se viabilidade da levedura $> 1 \times 10^6$ UFC/mL na bebida com menor SSTs por até 14 dias de armazenamento, e nas demais por até 21 dias. Ao longo do armazenamento, houve diminuição no conteúdo de SSTs, CFTs. Nas bebidas LM houve redução no conteúdo de SSTs, CFTs, ácido ascórbico e na AA, e aumento no teor alcoólico durante o armazenamento. As bebidas LM com

maior adição de sacarose e armazenadas por 28 dias apresentaram maior viabilidade celular (1×10^7 UFC/mL), teor alcoólico e de SSTs, maior conteúdo de CFTs e de ácido ascórbico, além de maior AA por DPPH e FRAP e aceitas pelo consumidor. Em relação as bebidas fermentadas de lichia (LHF) e fermentadas de lichia e erva-mate (LMF), ambas tipo vinho, ao final do preparo, a viabilidade da *S. boulardii* foi $> 2 \times 10^7$ UFC/mL, mostrando potencial probiótico. A levedura metabolizou os açúcares das bebidas, gerando etanol e CO₂. As bebidas LHF apresentaram maior conteúdo de vitamina C, cor mais clara, sabor alcoólico, adocicado e de fruta doce. Maiores conteúdos de CFTs, metilxantinas, ácidos fenólicos e flavonoides e AA foram observados nas bebidas contendo erva-mate (LMF), comprovando que a adição deste extrato vegetal proporciona potencial antioxidante à bebida fermentada. Nas bebidas LMF, a erva-mate proporcionou coloração marrom, ocre, amarelada, de mel e escura, aroma fermentado, além de gosto amargo, sabor de mate e de fermentado, sabor residual amargo, e maior viscosidade na boca. As bebidas LHF foram, de forma geral, mais aceitas sensorialmente. A lichia e a erva-mate são matérias-primas adequadas para o preparo de bebidas sensorialmente apreciadas e com funcionalidade para a saúde.

Palavras-chave: ILEX paraguariensis. Litchi chinensis. Bebida mista. Potencial antioxidante. Saccharomyces boulardii. Probiótico.

TERHAAG, Marcela Moreira. **Desenvolvimento de bebidas funcionais de lichia e erva-mate**. 2019. 213 p Thesis (Doctorate in Food Science) .– Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Lychee and yerba mate have several bioactive compounds and are suitable for the preparation of beverages, with antioxidant potential and as a vehicle for probiotic microorganism. The objective of this research was to develop functional beverages of lychee and yerba mate with antioxidant potential and probiotics by the addition of *Saccharomyces boulardii*. Leaves of native mate (NAT) and intentional planting system (PLANT) were characterized physically and chemically. The PLANT leaves presented higher content of total phenolic compounds (CFTs) and antioxidant activity (AA) than the NAT leaves, and were different profiles of sugars and organic acids. Infusion of PLANT leaves were used in the development of mixed beverages with lychee juice in different proportions (10 to 90% (v/v)). Beverages formulated with higher proportion of lychee contained higher contents of glucose, fructose, malic acid and vitamin C and were more viscous. Those with higher infusion ratios presented higher content of sucrose, citric acid, CFTs, phenolic acids, flavonoids and methylxanthines besides higher AA (DPPH, FRAP and ABTS methods). With the pasteurization of these beverages, a reduction in the viscosity, sucrose content, citric acid, phenolic acids, flavonoids and methylxanthines and increase in glucose and fructose content was observed, but there was no change in CFTs and AA content in some formulations. Beverages containing 90% of lychee pasteurized presented higher vitamin C content (37.5 mg/L) and those with 70% or more of infusion showed higher content of methylxanthines, as well as high content of flavonoids and phenolic acids (216.5; 15.9 and 73.8 mg/mL, respectively). Sensory tests have shown that higher lychee ratios result in more acceptable, clear, flavored, lychee-flavored, sweet-acid and fruit acidic beverages, more viscous as well as containing suspended materials. While higher infusion ratios made the beverages darker, brown, turbid and opaque, the aroma and taste of yerba mate, with sweet and bitter taste and astringent. The desirability test indicated that the proportion of 70/30 (lychee/infusion of yerba mate) as the formulation accepted sensorially and with the maximum content of CFTs and AA. As a continuation of the research, probiotic and fermented liquors of lychee and mixed lychee and yerba mate were developed by the addition of yeast *S. boulardii*. For the preparation of the probiotic beverages there was a fermentation step and subsequent addition of sucrose to different contents of total soluble solids (SSTs). The probiotic beverages of lychee (LH) and litchi and yerba mate (LM) presented physical-chemical characteristics, CFTs and AA content adequate for consumption. The effect of refrigerated storage of probiotic beverages on yeast viability and physical, chemical and sensory characteristics was evaluated. Among the proposed LH beverages, yeast viability $> 1 \times 10^6$ CFU / mL was observed in the beverage with the lowest SSTs for up to 14 days of storage, and in the others for up to 21 days. Throughout the storage, there was decrease in the content of SSTs, CFTs. In LM beverages there was a reduction in the content of SSTs, CFTs, ascorbic acid and AA, and increase in alcohol content during storage. LM beverages with higher sucrose addition and stored for 28 days showed higher cell viability (1×10^7 CFU / mL), alcohol content and SSTs, higher content of CFTs and ascorbic acid,

and higher AA by DPPH and FRAP and accepted by the consumer. In relation to fermented lychee (LHF) and fermented lychee and yerba mate (LMF) beverages, both wine type, the viability of *S. boulardii* was $> 2 \times 10^7$ CFU / mL at the end of preparation, showing probiotic potential. Yeast metabolized sugars from the drinks, generating ethanol and CO₂. LHF beverages presented higher content of vitamin C, lighter color, alcoholic flavor, sweet and sweet fruit. Higher contents of CFTs, methylxanthines, phenolic acids and flavonoids and AA were observed in the beverages containing yerba mate (LMF), proving that the addition of this plant extract provides antioxidant potential to the fermented beverage. In LMF beverages, the yerba mate provided brown, ocher, yellowish, honey brown and dark, fermented aroma, in addition to bitter taste, maté and fermented taste, residual bitter taste, and higher viscosity in the mouth. LHF beverages were generally more sensorially accepted. Lychee and yerba mate are suitable raw materials for the preparation of sensorially appreciated and health-enhancing beverages.

Key words: *Ilex paraguariensis*. *Litchi chinensis*. Mixed beverage. Antioxidant potencial. *Saccharomyces boulardii*. Probiotic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Aspectos anatômicos e morfológicos da lichia.....	19
Quadro 1 – Composição química média da lichia	21
Figura 2 – Erva-mate.....	24

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Figure 1 - Retention percentage of mineral content, TPC and AA after the preparation of mate infusion from PLANT leaves	59
Figure 2 - UHPLC chromatogram of yerba mate infusion from PLANT leaves: (a) sign in 270 nm; (b) sign extended in 270 nm.....	60

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Figure 1 - Mixed lychee and yerba mate beverages configuration of consensus by Flash Profile	81
Supplementary Material: Figure 1 – General configuration (A) and residual variance (B) of the evaluators considering the two-dimensional solution.....	88

ARTIGO CIENTÍFICO 3

Figura 1 – Conteúdo de sacarose (a), glicose (b), frutose (c) e ácido cítrico (d) em bebidas mistas de lichia e erva-mate, antes e após a pasteurização	105
Figura 2 - Conteúdo de ácido ascórbico nas bebidas mistas de lichia e erva-mate antes e após a pasteurização.....	106
Figura 3 - Concentração relativa de metilxantinas, flavonoides e ácidos fenólicos nas bebidas mistas de lichia e erva-mate	107

ARTIGO CIENTÍFICO 4

Figura 1 – Etapas de produção das bebidas probióticas de lichia.....	120
Figura 2 – Conteúdo de: (A) sacarose (mg/mL); (B) glicose (mg/mL); e (C) frutose (mg/mL) em bebidas probióticas de lichia (LH-4, LH-8 e LH-12) estocados à 4 °C por 28 dias.....	131

Figura 3 – Conteúdo de: (A) ácido málico (mg/mL); (B) ácido acético (mg/mL); e (C) ácido cítrico (mg/mL) em bebidas probióticas de lichia (LH-4, LH-8 e LH-12) estocados sob refrigeração (4 °C) por 28 dias.	133
Figura 4 – Variação no conteúdo de ácido fenólicos, flavonoides e metilxantinas presentes nas bebidas probióticas de lichia LH4, LH8, e LH12, ao longo do período de armazenamento de 28 dias.	136

ARTIGO CIENTÍFICO 5

Figura 1 – Etapas de produção das bebidas probióticas de lichia e erva-mate .	150
Figura 2 – Viabilidade da levedura <i>S. boulardii</i> e conteúdo de sólidos solúveis totais das bebidas probióticas de lichia e erva-mate fermentadas e armazenadas (4 °C) por 28 dias	157
Figura 3 – Conteúdo de ácido málico, ácido acético, e ácido cítrico (mg/mL) em bebidas mistas probióticas de lichia e erva-mate (LM-4, LM-8 e LM-12) estocados sob refrigeração (4 °C) por 28 dias	162
Figura 4 - Conteúdo de sacarose, glicose, e frutose (mg/mL) em bebidas mistas probióticas de lichia e erva-mate (LM-4, LM-8 e LM-12) estocados sob refrigeração (4 °C) por 28 dias	163
Figura 5– Variação no conteúdo de ácido fenólicos, flavonoides e metilxantinas presentes nas bebidas probióticas de lichia LM4, LM8, e LM12, ao longo do período de armazenamento de 28 dias.....	168

ARTIGO CIENTÍFICO 6

Figura 1 - Etapas de preparo das bebidas fermentadas de: (A) lichia (LHF), e (B) lichia com erva-mate (LMF).....	183
Figura 2 – Viabilidade da <i>S. boulardii</i> e conteúdo de SSTs ao longo das etapas de preparo das bebidas LHF e LMF	189
Figura 3 – Conteúdo de etanol e de sacarose, glicose e frutose ao longo das etapas de preparo das bebidas: (A) LHF, e (B) LMF	191
Figura 4 – Configuração geral dos provadores (número de 1-17) (A) e das amostras (LHF-7, LHF-15, LMF-7, LMF-15) (B) listando atributos mais citados e correlacionados com cada dimensão ($r \geq 0,60$), considerando solução bidimensional da APG.....	199

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Table 1 - Chromatographic conditions used for the determination of sugars and organics	52
Table 2 - Chemical composition and antioxidant activity of leaves of native (NAT) and planted (PLANT) mate.....	56
Table 3 - Concentration of bioactive compounds in infusion of yerba mate PLANT.....	61
Supplementary Material: Table 1 - Pearson correlation coefficients between sugars, organic acids, TPC and antioxidant activity of the leaves of yerba mate PLANT and NAT	66

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Table 1– Mixed lychee and yerba mate beverage formulation	70
Table 2 – Total titratable acidity and mineral content of mixed lychee and yerba mate beverages unpasteurised	74
Table 3 – Physical and chemical characteristics of lychee and yerba mate mixed beverages before and after pasteurization	77
Table 4 – Sensory acceptability of pasteurized mixed lychee and yerba mate beverages.....	81
Table 5 - Constant optimization and validation of the optimized formulation for mixed lychee and yerba mate beverage by desirability test	83
Supplementary Material: Table 1 – Pearson correlation coefficients between mixed lychee and yerba mate beverage composition, physical and chemical parameters and sensory global acceptance	90
Supplementary Material: Table 2 – Attributes better correlated ($r \geq 0.6$) to the first two dimensions for each assessor via the Flash Profile	91
Supplementary Material: Table 3 – Regression coefficients from mixture design and ANOVA data described by the sensory global acceptance, TPC and antioxidant activity by DPPH, FRAP and ABTS to mixed lychee and yerba mate beverage	94

ARTIGO CIENTÍFICO 3

Tabela 1 – Formulações (% do componente, v/v) de bebida mista de lichia e erva-mate	99
Tabela 2 - Condições cromatográficas empregadas para a determinação de açúcares e de ácidos orgânicos	100
Tabela 3 - Composição química do suco de lichia	102

ARTIGO CIENTÍFICO 4

Tabela 1 – Condições cromatográficas empregadas para a determinação de açúcares e de ácidos orgânicos	123
Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos e microbiológicos das bebidas probióticas de lichia	128
Tabela 3 – Variação no conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante das bebidas probióticas de lichia ao longo do armazenamento refrigerado	134
Tabela 4 – Aceitabilidade da bebida probiótica de lichia	138

ARTIGO CIENTÍFICO 5

Tabela 1– Condições cromatográficas empregadas para a determinação de açúcares e de ácidos orgânicos	153
Tabela 2 – Variação nas características físico-químicas das bebidas mistas probióticas de lichia e erva-mate, avaliados ao longo do armazenamento refrigerado por 28 dias	158
Tabela 3 – Variação no conteúdo de ácido ascórbico das bebidas mistas probióticas de lichia e erva-mate, avaliados ao longo do armazenamento refrigerado por 28 dias	165
Tabela 4 – Variação na atividade antioxidante das bebidas mistas probióticas de lichia e erva-mate, avaliados ao longo do armazenamento refrigerado por 28 dias.....	167
Tabela 5 – Aceitabilidade sensorial da bebida probiótica de lichia e erva-mate	170

ARTIGO CIENTÍFICO 6

Tabela 1 – Condições cromatográficas empregadas para a determinação de açúcares e de ácidos orgânicos	186
---	-----

Tabela 2 – Variação no conteúdo de ácidos orgânicos e pH das bebidas fermentadas de lichia e de lichia com erva-mate, ao longo das etapas de preparo	193
Tabela 3 – Variação no conteúdo de CFTs, metilxantinas, ácidos fenólicos, flavonoides e ácido ascórbico das bebidas fermentadas de lichia e de lichia com erva-mate, ao longo das etapas de preparo.....	194
Tabela 4 – Variação na atividade antioxidante por DPPH, FRAP e ABTS das bebidas fermentadas de lichia e de lichia com erva-mate, ao longo das etapas do preparo	197
Tabela 5 – Aceitabilidade sensorial das bebidas fermentadas de lichia e de lichia com erva-mate com diferentes tempos de segunda fermentação	200
Material Suplementar: Tabela 1– Atributos melhor correlacionados ($r \geq 0,6$) para as duas primeiras dimensões para cada avaliador por meio do método de Perfil Flash	206

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 Lichia	18
3.1.1 Compostos antioxidantes presentes na lichia	22
3.2 Erva-mate	23
3.2.1 Compostos bioativos e de interesse nutricional presentes na erva-mate	23
3.3 Suco misto	27
3.4 Probióticos e bebidas probióticas	28
3.4.1 Aplicações de probióticos em bebidas à base de frutas e vegetais	29
3.4.2 <i>Saccharomyces boulardii</i>	31
3.5 Bebidas fermentadas de lichia	33
4 REFERÊNCIAS	34
5 MATERIAL E MÉTODOS	46
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
ARTIGO CIENTÍFICO 1: Carbohydrates, organic acids and phenolic compounds in leaves and infusion of yerba mate	48
ABSTRACT	48
1 INTRODUCTION.....	48
2 MATERIAL AND METHODS	50
2.1 Material.....	50
2.1.1 Reagents.....	50
2.1.2 Yerba mate: Plant material, extracts and infusion	51
2.2 Methods	51
2.2.1 Chemical Characterization of the leaves and the infusion.....	51
2.2.2 Determination of sugars and organic acids from mate leaves and infusion.....	52
2.2.3 Determination of total phenolic content and antioxidant activity	53
2.2.4 Statistical analysis.....	54

3 RESULTS AND DISCUSSION	55
3.1 Characterization of the mate leaves	55
3.2 Characteristics of infusion from mate PLANT leaves	57
4 CONCLUSIONS	62
5 REFERENCES	62
6 SUPPLEMENTARY MATERIAL	66
ARTIGO CIENTÍFICO 2: Lychee (<i>Litchi chinensis</i>) and yerba mate (<i>Ilex paraguariensis</i>) mixed beverage with high antioxidant potential	67
ABSTRACT	67
1 INTRODUCTION	67
2 MATERIAL AND METHODS	69
2.1 Material	69
2.2 Methods	69
2.2.1 Preparation of the mixed lychee and yerba mate beverages	69
2.2.2 Physical and chemical analyses of the beverages	70
2.3 Sensory analysis	72
2.4 Statistical analysis	72
2.5 Mathematical optimization of mixed beverage formulation by sensory acceptability, TPC and antioxidant activity	73
3 RESULTS AND DISCUSSION	73
3.1 Total titratable acidity and mineral content of non pasteurized mixed beverages	73
3.2 Pasteurizing effect on physical and chemical characteristics of mixed beverages	75
3.2.1 Viscosity	75
3.2.2 Color parameters	76
3.2.3 Total phenolics content (TPCs) and antioxidant activity (AA)	76
3.3 Characterization and sensory acceptance of mixed drinks pasteurized	80
3.4 Formulation optimization of mixed beverages depending on the sensory acceptability, antioxidant activity and phenolic compounds content	82
4 CONCLUSIONS	83
5 REFERENCES	84
6 SUPPLEMENTARY MATERIAL	88

ARTIGO CIENTÍFICO 3: Bebida mista de lichia e erva-mate: caracterização dos açúcares, ácidos orgânicos e de compostos bioativos, e efeito da pasteurização.....	93
RESUMO.....	93
1 INTRODUÇÃO	94
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	95
2.1 Material.....	95
2.1.1 Reagentes.....	95
2.1.2 Lichia.....	95
2.1.3 Folhas e infusão de erva-mate.....	96
2.2 Métodos.....	96
2.2.1 Caracterização química e atividade antioxidante do suco de lichia.....	96
2.2.2 Preparo das bebidas mistas de lichia e erva-mate.....	98
2.2.3 Determinação de açúcares e ácidos orgânicos.....	98
2.2.4 Determinação da composição de compostos fenólicos e metilxantinas.....	99
2.2.5 Análise estatística	100
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	101
3.1 Composição química e atividade antioxidante do suco de lichia	101
3.2 Açúcares e ácidos orgânicos nas bebidas mistas de lichia e erva-mate ..	103
3.3 Conteúdo de vitamina C nas bebidas mistas de lichia e erva-mate.....	104
3.4 Composição de ácidos fenólicos, metilxantinas e flavonoides nas bebidas mistas de lichia e erva-mate	104
3.5 Efeito da pasteurização sobre as bebidas mistas de lichia e erva-mate...	107
4 CONCLUSÕES	109
5 REFERÊNCIAS.....	110
ARTIGO CIENTÍFICO 4: Desenvolvimento e aceitabilidade sensorial de bebida probiótica de lichia (<i>Litchi chinensis</i>) fermentada por <i>Saccharomyces boulardii</i>	115
RESUMO.....	115
1 INTRODUÇÃO	116
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	117
2.1 Material.....	117
2.1.1 Reagentes.....	117
2.1.2 Suco de lichia.....	118
2.1.3 Cultura probiótica	118

2.2 Métodos	119
2.2.1 Ativação da cultura probiótica	119
2.2.2 Preparo da bebida de lichia probiótica	119
2.2.3 Análises físicas e químicas das bebidas	121
2.2.4 Viabilidade da cultura de <i>S. boulardii</i>	124
2.2.5 Teste de aceitação sensorial.....	124
2.3. Análise estatística	125
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	126
3.1 Efeito da fermentação pela <i>S. boulardii</i> nas características físico-químicas da bebida de lichia.....	126
3.2 Efeito do conteúdo de açúcares e do armazenamento à 4 °C sobre as bebidas probióticas de lichia.....	127
3.2.1 Viabilidade da <i>S. boulardii</i>	127
3.2.2 Conteúdo de Sólidos Solúveis Totais (SSTs) e pH	127
3.2.3 Conteúdo de etanol.....	129
3.2.4 Conteúdo de açúcares	130
3.2.5 Conteúdo de ácidos orgânicos.....	132
3.2.6 Conteúdo de Compostos Fenólicos Totais (CFTs) e na Atividade Antioxidante (AA)	132
3.2.7 Conteúdo de ácidos fenólicos, flavonoides e metilxantinas	135
3.3 Aceitabilidade sensorial da bebida probiótica de lichia	137
4 CONCLUSÕES	138
5 REFERÊNCIAS.....	139
ARTIGO CIENTÍFICO 5: Bebida probiótica mista de lichia e erva-mate fermentada por <i>Saccharomyces boulardii</i> com potencial antioxidante: desenvolvimento e aceitabilidade sensorial	145
RESUMO.....	145
1 INTRODUÇÃO	146
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	147
2.1 Material.....	147
2.1.1 Reagentes.....	147
2.1.2 Cultura probiótica de <i>S. boulardii</i>	148
2.1.3 Erva-mate e lichia.....	148
2.2 Métodos	149

2.2.1	Preparo da bebida probiótica fermentada de lichia e erva-mate	149
2.2.3	Análises físicas e químicas das bebidas	151
2.2.4	Viabilidade da <i>S. boulardii</i>	155
2.3	Análise estatística.....	155
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	156
3.1.	Viabilidade da cultura e características físico-químicas da bebida mista de lichia e erva-mate fermentada	156
3.2	Efeito do conteúdo de açúcares e do armazenamento a 4 °C sobre as bebidas mistas probióticas de lichia e erva-mate	159
3.2.1	Viabilidade da <i>S. boulardii</i> e conteúdo de SSTs	159
3.2.2.	Conteúdo de etanol	160
3.2.3	pH e ácidos orgânicos.....	161
3.2.4	Conteúdo de açúcares	162
3.2.5	Conteúdo de Ácido Ascórbico	164
3.2.6.	Conteúdo de Compostos Fenólicos Totais (CFTs) e a Atividade Antioxidante (AA)	165
3.2.7	Conteúdo de ácidos fenólicos, flavonoides e metilxantinas	166
3.3	Aceitabilidade sensorial da bebida probiótica de lichia e erva-mate.....	169
4	CONCLUSÕES	171
5	REFERÊNCIAS.....	172
ARTIGO CIENTÍFICO 6: Bebida de lichia <i>tipo</i> vinho fermentada por <i>Saccharomyces boulardii</i> : influência da adição de erva-mate nas características físico-químicas e sensoriais.....		
		178
RESUMO.....		
		178
1	INTRODUÇÃO	178
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	180
2.1	Material.....	180
2.1.1	Cultura fermentadora	180
2.1.2	Suco de lichia, folhas e infusão de erva-mate.....	180
2.1.3	Reagentes.....	181
2.2	Métodos	181
2.2.1	Preparação do inóculo da <i>S. boulardii</i>	181
2.2.2	Preparo das bebidas fermentadas de lichia (LHF) e de lichia com erva-mate (LMF).....	182

2.2.3 Determinação da viabilidade da <i>S. boulardii</i> durante etapas de preparo das bebidas fermentadas	184
2.2.4 Análises físicas e químicas das bebidas durante as etapas de preparo das bebidas fermentadas	184
2.2.5 Análise sensorial das bebidas fermentadas durante a segunda fermentação	187
2.3 Análise estatística	187
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	188
3.1 Efeito da adição da erva-mate nas etapas de preparo das bebidas fermentadas de lichia.....	188
3.1.1 Viabilidade da <i>S. boulardii</i> e conteúdo de SSTs	188
3.1.2. Conteúdo de açúcares e de etanol.....	190
3.1.3 Conteúdo de ácidos orgânicos e pH	192
3.1.4 Conteúdo de CFTs, ácido ascórbico, metilxantinas, ácidos fenólicos e flavonoides	192
3.1.5 Atividade antioxidante	196
3.2 Caracterização e aceitação sensorial das bebidas LHF e LMF com sete e quinze dias da segunda fermentação	197
3.2.1 Caracterização por Perfil Flash	198
3.2.2 Aceitabilidade.....	200
4 CONCLUSÕES	201
5 REFERÊNCIAS	201
6 MATERIAL SUPLEMENTAR	207
DEPÓSITO DE PATENTES	209
7 CONCLUSÕES	210
ANEXOS	214

1 INTRODUÇÃO

A lichia (*Litchi chinensis* Sonn), originária do norte da região tropical e sul da região sub-tropical da China (HUANG, 2018), é fruto não climatérico (BATTEN, 1989; PANDEY et al., 2013) de polpa carnosa com cor, aroma e sabores atrativos. Pode ser consumida na forma de suco, polpa em pó ou desidratada, além da fruta enlatada (ZHENG et al., 2014). A disponibilidade da fruta fresca é limitada devido ao curto período de produção e a limitada vida útil, sendo que o processamento da fruta em suco de lichia é uma alternativa ao excedente de produção, pois apresenta sabor agradável (JAYACHANDRAN; CHAKRABORTY; RAO, 2015).

O pericarpo, a semente e a polpa de lichia contém uma grande quantidade de compostos fenólicos com atividade antioxidante (SU et al., 2014; DEMBITSKY et al.; 2011; MA et al., 2014a; MA et al, 2014b).

A lichia, em função das suas características físicas, químicas e sensoriais pode ser adicionada a outras frutas ou extratos vegetais, tornando os sucos mistos mais aceitos sensorialmente e alterando a composição dos mesmos (JAYACHANDRAN; CHAKRABORTY; RAO, 2015).

Um extrato vegetal que pode ser adicionado ao suco de lichia, em função do crescente interesse pelas suas funcionalidades e perfil de compostos bioativos é o da erva-mate. A erva-mate (*Ilex paraguariensis*, Saint-Hilaire, Aquifoliaceae) (COSTA, 1989), nativa de regiões subtropicais da América do Sul, é muito consumida tanto na forma de chimarrão ou mate (morno ou quente) quanto tereré (frio). Para o preparo, usualmente são empregadas principalmente as folhas e outras partes aéreas, obtidas através de fragmentação e secagem (MEINHART et al., 2010; ISOLABELLA et al., 2010; VALERGA; RETA; LANARI, 2012).

Diversos compostos bioativos estão presentes na erva-mate, como polifenóis (ácidos clorogênicos), alcaloides (cafeína e teobromina), flavonoides (rutina e luteolina) e saponinas triterpenoides (matesaponinas) (HECKE; DE MEJIA, 2007; MAZUR et al., 2014; DARTORA et al., 2011). Estudos apontam que os compostos bioativos presentes na erva-mate podem atuar no metabolismo de lipídeos (KIM et al., 2012; RESENDE et al., 2015), controle da diabetes (PEREIRA et al., 2012) além de apresentar propriedades: antioxidantes (BRAVO; GOYA;

LECUMBERRI, 2007; BRAVO et al., 2014; ANESINI et al., 2012; BARG et al., 2014; DA SILVA et al., 2008), quimiopreventivas (RAMIREZ-MARES; CHANDRA; MEJIA, 2004; BARG et al., 2014; MEJIA et al., 2010; BOAVENTURA et al., 2015), de proteção cardiovascular (BRAVO et al., 2014; MAZUR et al., 2014; CAHUE et al., 2019) e de proteção do trato intestinal e do fígado (JANG et al., 2018) além de atuar como estimulante e protetor do sistema nervoso central (MAZUR et al., 2014; SANTOS et al., 2015).

Os probióticos são definidos como sendo micro-organismos não-patogênicos que, quando administrados em quantidades adequadas, exercem efeitos positivos sobre a saúde ou a fisiologia do hospedeiro (MARTEAU et al., 2001; WGO, 2011). Segundo FAO (2006) recomenda-se que o probiótico deve estar viável e em uma dose apropriada para se obter os efeitos desejados. Lee e Salminen (1995) apontam um consumo diário mínimo de 10^6 - 10^9 UFC do micro-organismo probiótico para que se obter o efeito benéfico desejado. A adição de probióticos em bebidas à base de frutas, vegetais, cereais e soja, além de proporcionar benefícios à saúde, pode tornar estes produtos mais aceitos pelo consumidor (GRANATO et al., 2010; PIMENTEL et al., 2015; PERRICONE et al., 2015; MOUSAVI et al., 2011; ZULUETA et al., 2007).

Os micro-organismos com efeitos probióticos incluem as bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, além da levedura *Saccharomyces boulardii* (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002).

A *S. boulardii* é uma levedura termofílica não patogênica, resistente aos ácidos gástricos e proteólise, primeiramente isolada a partir da lichia, na Indochina (FRATIANNI et al., 2014; CZERUCKA, PICHE, RAMPAL, 2007; CZERUCKA, RAMPAL, 2002). A *S. boulardii* não faz parte da microbiota intestinal, não coloniza o intestino e há o declínio da concentração após cessar a administração (CZERUCKA, PICHE, RAMPAL, 2007). Esta levedura tem sido empregada no tratamento de diarreia do viajante, diarreia associada a antibióticos, gastroenterite aguda em adultos e crianças, diarreia em pacientes intubados e diarreia crônica em pacientes HIV positivos, ainda possui efeito protetivo contra *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae*, *Shigella* e *Escherichia coli* (EPEC) (CZERUCKA; RAMPAL, 2002; KÜHLE; SKOVGAARD; JESPERSEN, 2005) e *Salmonella entérica Typhimurium* (CZERUCKA, RAMPAL, 2002; KÜHLE; SKOVGAARD; JESPERSEN, 2005; MARTINS et al., 2013).

Diversos autores propõem a aplicação da *S. boulardii* como microrganismo probiótico e como cultura iniciadora de fermentação em diversos alimentos como em suco de tomate e cenoura (SIVUDU et al., 2016), cerveja artesanal (CAPECE et al., 2018), suco de uva utilizando pedaços de maçã como carreador (GALLO et al., 2014), bebida à base de rabanete, beterraba e cenoura (DEĞIRMENCIOĞLU; GURBUZ; SAHAN, 2016), polpa de maçã (FARINAZZO et al., 2017), bebida de beterraba, cenoura e aipo (PROFIR; VIZIREANU, 2013), suco de tomate (FRATIANNI et al., 2013), leite e bebidas lácteas (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001), iogurte de leite de cabra (KARAOLIS et al., 2013), suco de berries (FRATIANNI et al., 2014), sorvete à base de soja (HEENAN et al., 2004), entre outros. Fratianni et al. (2014) apontam que a levedura *S. boulardii* tem sido pouco explorada comercialmente, apesar de, segundo Değirmencioğlu; Gurbuz; Sahan (2016) conferir características físico-químicas e sensoriais desejáveis a sucos fermentados.

Além das aplicações já citadas, o suco de lichia também pode ser utilizado na fabricação de bebidas fermentadas *tipo vinho*, por meio da ação da *Saccharomyces cerevisiae* e outros micro-organismos usualmente empregados na fabricação de vinhos (ZENG et al., 2008; ALVES et al., 2010; ALVES et al., 2011; WU et al., 2011; CHEN; CHIA; LIU, 2014; CHEN; YAP; LIU, 2015; CHEN; LIU, 2016a; CHEN; LIU, 2016b). Porém, na literatura ainda não foram identificados trabalhos com a adição e/ou fermentação de suco de lichia pela *S. boulardii* e tampouco com a adição de erva-mate.

Dessa forma, a presente tese visa o desenvolvimento de bebidas funcionais mistas de lichia e erva-mate com potencial antioxidante e probióticas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver bebidas funcionais de lichia e erva-mate com potencial antioxidante e potencialmente probióticas pela adição da *Saccharomyces boulardii*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a polpa de lichia e folhas de erva-mate nativa e de sistema de plantio intencional quanto a composição centesimal, conteúdo de compostos fenólicos totais, de açúcares, de ácidos orgânicos e de minerais;
- Determinar a atividade antioxidante da polpa de lichia e das folhas de erva-mate nativa e de sistema de plantio intencional;
- Identificar e quantificar compostos antioxidantes específicos da lichia e em folhas de erva-mate nativa e de sistema de plantio intencional;
- Quantificar o percentual de lixiviação dos compostos fenólicos totais e minerais das folhas para a infusão de erva-mate de sistema de plantio intencional;
- Comparar a atividade antioxidante das folhas e da infusão de erva-mate de sistema de plantio intencional;
- Identificar e quantificar os principais ácidos fenólicos, flavonoides e metilxantinas em polpa de lichia e em infusão de folhas de erva-mate de sistema de plantio intencional;
- Formular bebidas mistas utilizando polpa de lichia e infusão de erva-mate sistema de plantio intencional;
- Determinar parâmetros físico-químicos, conteúdo de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e aceitabilidade sensorial das bebidas formuladas, antes e após a pasteurização;
- Identificar e quantificar compostos antioxidantes específicos em bebidas de polpa de lichia e infusão de erva-mate de sistema de plantio intencional, antes e após a pasteurização;
- Caracterizar sensorialmente as bebidas de polpa de lichia e infusão de erva-mate de sistema de plantio intencional através do método perfil *flash*;
- Desenvolver bebida probiótica de polpa de lichia, com emprego da levedura *Saccharomyces boulardii*;

- Avaliar o efeito do armazenamento refrigerado sobre a viabilidade da levedura, características físico-químicas e aceitação da bebida probiótica de polpa de lichia;
- Desenvolver uma bebida probiótica de polpa de lichia e infusão de erva-mate de sistema de plantio intencional, empregando a levedura *Saccharomyces boulardii*;
- Avaliar o efeito do armazenamento refrigerado sobre características físico-químicas, atividade antioxidante, viabilidade da levedura e aceitação sensorial da bebida probiótica de polpa de lichia e infusão de erva-mate de sistema de plantio intencional;
- Desenvolver uma bebida de polpa de lichia fermentada, *tipo vinho*, pela ação da levedura *Saccharomyces boulardii*;
- Avaliar o efeito da adição da infusão de erva-mate de sistema de plantio intencional sobre as características físico-químicas, conteúdo de fenólicos totais, atividade antioxidante e propriedades sensoriais da bebida de polpa de lichia fermentada *tipo vinho*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LICHIA

A lichia (*Litchi chinensis* Sonn) é um fruto da família das Sapindáceas, originário do norte da região tropical e sul da região sub-tropical da China (HUANG, 2018). Possui casca vermelha, rugosa e fácil de ser retirada, sendo o arilo carnoso e constituído por polpa translúcida, doce e levemente ácida e uma única semente, cujo tamanho e forma variam de acordo com o cultivar (Figura 1) (QUEIROZ; ABREU; OLIVEIRA, 2012; SUN et al., 2008). As frações casca e semente de lichia, juntas, representam cerca de 50% da massa do fruto (QUEIROZ; ABREU; OLIVEIRA, 2012).



Figura 1 - Aspectos anatômicos e morfológicos da lichia
Adaptado de: Yola (2019)

Segundo Phunchaisri e Apichartsrangkoon (2005) os maiores produtores mundiais de lichia são China, Taiwan, Vietnã, Tailândia, Índia, África do Sul e Malásia, sendo que a primeira produziu mais de 1300 mil ton na safra de 1999 (MA et al., 2014a; HUANG, 2018) e 1560 mil ton na safra de 2004 (HOUBIN, 2018). A cultivar mais plantada no Brasil é a “Bengal”, proveniente de Índia, cultivada principalmente no norte de São Paulo e sul de Minas Gerais (QUEIROZ,

2012). Por ser um fruto não climatérico, a lichia preferencialmente deve estar madura para ser colhida (BATTEN, 1989; PANDEY et al., 2013).

A disponibilidade da fruta fresca é limitada devido ao curto período de produção e de vida útil (PHUNCHAISRI; APICHARTSRANGKOON, 2005; ZHAO et al., 2006), devido principalmente às alterações na cor e estrutura da casca da fruta, diminuindo o valor comercial da lichia. O escurecimento do pericarpo é o principal problema de armazenamento de lichias (LIANG et al., 2015; PANDEY et al., 2013), causado principalmente por reações a partir da ação das enzimas polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) (RIVERA-LOPES; ORDORICA-FALOMIR; WESCHE-EBELING, 1999; SUN et al., 2008). Sun et al. (2008) citam que possivelmente há uma rápida degradação das antocianinas e oxidação dos compostos fenólicos por ação da PPO gerando na reação subprodutos marrons. Sun et al. (2010) e Haq e Rab (2012) indicam que as injúrias na casca da lichia levam ao crescimento de micro-organismos deteriorantes além de acarretar em desidratação dos frutos (DA MOTTA, 2009).

Segundo o National Horticulture Board (2018) as práticas de produção inapropriadas, falta de manutenção preventiva, ausência de infraestrutura (armazenamento resfriado e condições de processamento) e de suporte técnico são fatores críticos que impedem a exploração do potencial de consumo da lichia. Segundo Hajare et al. (2010) as perdas no pós-colheita da lichia podem assumir valores entre 25-30%.

A polpa da lichia é rica em açúcares e possui aroma floral-rosas, sabor adocicado e suavemente cítrico (CHEN; CHIA; LIU, 2014). Ong e Acree (1999) citam que o composto aromático mais característico da lichia fresca, identificado por meio de cromatografia gasosa, é o óxido cis-rosa, mesmo componente encontrado em amostras comerciais de lichias enlatadas e de vinhos Gewürztraminer.

Segundo Wu et al. (2009), a polpa de lichia possui de 0,9 a 13,7% (p/p) de açúcares redutores, 1,3 a 4% (p/p) de não redutores, 0,22 a 0,33% (p/p) de ácido cítrico. Da Motta (2009), utilizando lichias cultivadas no Brasil, encontrou a seguinte composição centesimal: umidade 82,42%, proteínas totais 1,20%, lipídios 0,97%, cinzas 0,48% e carboidratos 14,92%, em avaliação do fruto fresco. O teor de vitamina C foi de aproximadamente 40 mg/100g dos frutos frescos. A

composição química da lichia, conforme diversos autores está apresentada no Quadro 1.

Comercialmente a lichia tem sido processada na forma de suco, polpa em pó ou desidratada, e também como fruta enlatada (ZHENG et al., 2014) e vinho (CHEN; LIU, 2016a; ALVES et al., 2011). Diversas técnicas têm sido avaliadas como alternativas para preservação da lichia, visando manutenção das características sensoriais e físico-químicas, dentre elas o enlatamento empregando alta pressão (PHUNCHAISRI; APICHARTSRANGKOON, 2005), pré-resfriamento com água (AGUILA et al., 2009; LIANG et al.; 2013), aplicação de filmes e soluções aquosas diversas (HOJO; DURIGAN; HOJO, 2011), irradiação da casca (PANDEY et al., 2013), congelamento por imersão (LIANG et al., 2015). Ainda, têm sido avaliados a aplicação dos efeitos combinados de alta pressão por dióxido de carbono, calor brando e do antimicrobiano nisina em suco de lichia (LI et al., 2012), secagem por *spray dryer* em suco de lichia com adição prévia de prebióticos (inulina) e probióticos (*Lactobacillus casei*) (KINGWATEE et al. 2014) e formulação de sucos mistos (JAYACHANDRAN; CHAKRABORTY; RAO, 2015).

Quadro 1 – Composição química média da lichia

Parâmetros	Valores encontrados	Referências
Umidade (g/ 100g)	77,0 – 84,0	Holcroft e Mitcham (1996), Menzel (2002), Wall (2006)
Proteínas (g/ 100g)	0,7 - 1,1	Holcroft e Mitcham (1996), Menzel (2002); Menzel e Waite (2005)
Lipídios (g/ 100g)	0,1	Menzel (2002); Menzel e Waite (2005)
Carboidratos (g/ 100g)	15,0 – 18,0	Wu et al. (2009); Menzel (2002); Menzel e Waite (2005)
Ácido ascórbico (mg/ 100g)	34,5 – 49,0	Wu et al. (2009); Menzel (2002)
Sólidos solúveis totais (°Brix)	17,5 - 19,9	Menzel (2002); Wall (2006)

Fonte: próprio autor

O suco processado de lichia caracteriza-se por apresentar sabor agradável (JAYACHANDRAN; CHAKRABORTY; RAO, 2015) e com potencial antioxidante (ZHENG et al., 2014). Como o suco de lichia possui alto conteúdo de carboidratos fermentescíveis além de um pH em torno de 5,0, há maior risco de deterioração quando comparado à outras frutas e sucos ácidos (LI et al., 2012).

3.1.1 Compostos antioxidantes presentes na lichia

O pericarpo, semente e polpa de lichia contêm uma grande quantidade de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes, antibacterianas, anti-inflamatórias, antialérgicas, hepatoprotetoras, antivirais, anticâncer, vasodilatadoras e neuroprotetoras (DUAN et al., 2007; DEMBITSKY et al.; 2011; ZHANG et al., 2013; KITADATE et al., 2014; MA et al., 2014a; MA et al, 2014b; SU et al., 2014; GADKARI; BALARAMANA, 2015; EMANUELE et al., 2017; XIAO et al., 2017).

Mahattanatawee et al. (2006) detectaram inúmeras flavonas glicosídicas, sendo principalmente quercetina e kaempferol, em polpa de lichia da Flórida. Bhoopat et al. (2011) identificaram o ácido trans-cinâmico e pelargonidina-3-O-glicosídeo em polpa de lichia da Tailândia. Em polpa de lichia fresca de 13 cultivares, Zhang et al. (2013) detectaram: (+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina ácido gálico, ácido clorogênico e ácido caféico, sendo predominantes os três primeiros. Em outras cultivares Su et al. (2014) identificaram rutina, (-)-epicatequina e quercetina-3-O-rutinosídeo-7-O- α -L-ramnosidase. Queiroz et al. (2012) identificaram na polpa de lichia Bengal a presença de inibidores de lipases e de α -amilase, os quais, segundo os autores, podem auxiliar no tratamento da obesidade, diabetes melitus tipo II e regular os níveis de glicemia.

Distintos cultivares apresentam diferenças quali e quantitativas em relação aos compostos fenólicos (ZHANG et al., 2013; LV et al., 2014). Zhang et al. (2013) verificaram que o conteúdo de compostos fenólicos totais (CFTs) variou entre 101,51 e 259,18 mg em equivalentes de ácido gálico/100 g de polpa de lichia. Já o conteúdo total de flavonoides variou entre 39,43 e 129,86 mg em equivalentes de catequina/100 g de polpa no estudo de Zhang et al. (2013). Su et al. (2014) apontaram que na cultivar Feizixiao a quercetin-3-O-rutinosídeo-7-O- α -L-ramnosidase, rutina e (-)-epicatequina contribuíram em 70,35%, 14,60% e 9,42%, respectivamente para o teor de CFTs. Já em polpa de lichia fresca brasileira, Da Motta (2009) encontrou conteúdo de CFTs de 276 mg em equivalentes de ácido gálico/100 g de polpa. Segundo Su et al. (2014) há uma correlação positiva entre o conteúdo CFTs e o de flavonoides.

O local de cultivo da lichia interfere na atividade antioxidante. Em extrato metanoico de polpa de lichia fresca brasileira, Da Motta (2009) verificou que a

atividade antioxidante (AA) por DPPH apresentou EC50 de 295,16. Zhang et al. (2013) fracionaram os compostos antioxidantes em porções livres e ligadas e determinaram o EC50 através do método DPPH, cujos valores variaram de 12,30 à 83,81 para as frações livres e de 71,85 a 400,27 para as frações ligadas. Os mesmos autores apontaram diferenças no resultado dos ensaios de AA por FRAP e DPPH para 13 variedades de lichia, com resultados correlacionados com o conteúdo de CFTs e flavonoides. Guo et al. (2003) em avaliação da AA através do ensaio FRAP em polpa de lichia, determinaram valores de 2,86 mmol de equivalentes de FeSO₄/100g. Zhang et al. (2013) determinaram, por meio do método FRAP uma AA variando de 121,53 a 495,96 mg equivalentes de Trolox/100 g. Su et al. (2014) verificaram em lichias, por meio do ensaio ORAC dentre os compostos testados que rutina seguida por catequina, epicatequina, quercetina e ECG (-epicatequina galato) apresentaram as maiores AAs em relação a EGC (-epigallocatequina).

3.2 ERVA-MATE

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*, Saint-Hilaire, Aquifoliaceae), ilustrada na Figura 2, é uma planta nativa de regiões subtropicais da América do Sul (COSTA, 1989). A bebida de erva-mate é muito consumida na Argentina, sul do Brasil, Paraguai e Uruguai, tanto na forma de chimarrão ou mate (morno ou quente) quanto tereré (frio). Usualmente são consumidas principalmente as folhas e outras partes aéreas, obtidas através de fragmentação e secagem (MEINHART et al., 2010; ISOLABELLA et al., 2010; VALERGA; RETA; LANARI, 2012). Comercialmente, o extrato da erva-mate tem sido utilizado em diversas aplicações como cerveja, cremes, doces entre outros (MARCELO et al., 2014; MURAKAMI et al, 2011).

3.2.1 Compostos bioativos e de interesse nutricional presentes na erva-mate

Diversos compostos bioativos estão presentes na erva-mate. Hecke e De Mejia (2007), Mazur et al. (2014), Meinhart et al. (2010) e Dartora et al. (2011) apontam a presença de polifenóis (ácido clorogênico), alcaloides (cafeína e teobromina), flavonoides (rutina e luteolina), saponinas triterpenoides

(matesaponinas) além de aminoácidos, na erva-mate. Dentre as metilxantinas, a cafeína e a teobromina estão presentes em maiores quantidades (MEINHART et al., 2010).

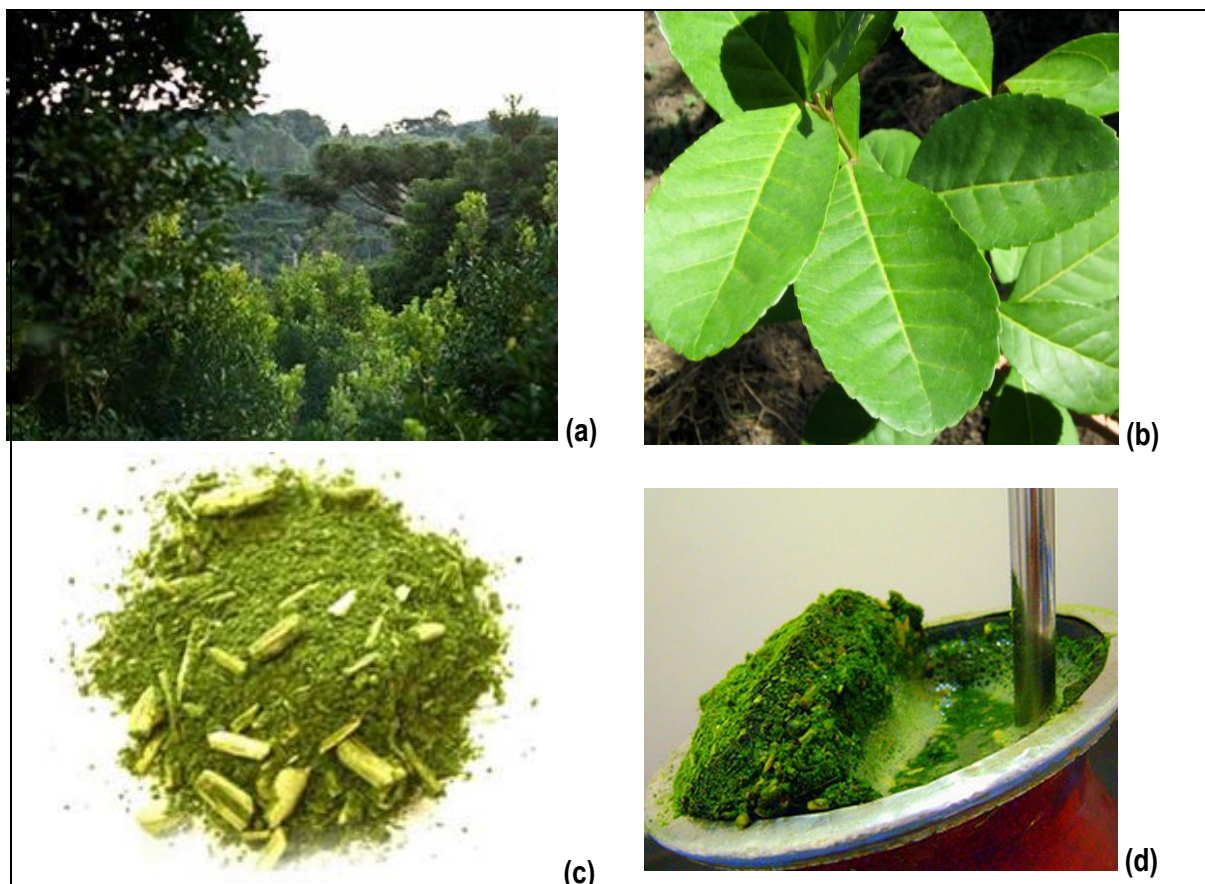


Figura 2 – Erva-mate.

Trecho de uma plantação de erva-mate (a); Folhas de *Ilex paraguariensis* (b); erva-mate moída (c), utilizada para chimarrão (d). Fonte: Erva-Mate Valerio (2015), Erva-mate: Cor e Sabor (2015), Erva-mate (2015) e Bertini (2018), respectivamente.

Anesini et al (2012) e Bravo, Goya e Lecumberri (2007) citam a presença de ácido clorogênico, caféico e rutina em amostras de erva-mate verde e comercial, sendo que a primeira amostra apresentou maior capacidade antioxidante. Valerga, Reta e Lanari (2012) identificaram a presença dos ácidos clorogênicos e caféico além de rutina e quercetina em amostras de folhas verdes de erva-mate. Dentre estes compostos o último apresentou maior atividade antioxidante por meio do método β -caroteno/ácido linoleico (VALERGA; RETA; LANARI, 2012). Já Anesini et al. (2012) citam que a cafeína induziu a oxidação do ácido linoleico atuando como um composto pro-oxidante nas concentrações testadas.

Estudos apontam que os compostos bioativos presentes na erva-mate podem atuar no metabolismo de lipídeos (KIM et al., 2012; RESENDE et al., 2015), controle da diabetes (PEREIRA et al., 2012), apresentam propriedades antioxidantes (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007; BRAVO et al., 2014; ANESINI et al., 2012; BARG et al., 2014; DA SILVA et al., 2008), propriedades quimiopreventivas (RAMIREZ-MARES; CHANDRA; MEJIA, 2004; BARG et al., 2014; MEJIA et al., 2010; BOAVENTURA et al., 2015), fornecem proteção cardiovascular (BRAVO et al., 2014; MAZUR et al., 2014; CAHUE et al., 2019) e do trato intestinal, além de ser estimulante e protetor do sistema nervoso central (SANTOS et al., 2015; MAZUR et al., 2014) e do fígado (JANG et al., 2018).

Maria-Ferreira et al. (2013) identificaram arabinose, galactose e ácido galacturônico em folhas *in natura*, oxidadas e após sapeco e secagem. Neste mesmo estudo os autores verificaram o efeito protetor do extrato de erva-mate contra lesões gástricas agudas. Bastos et al. (2006) verificaram 58% de umidade e de 1,6 mg/mL de sólidos solúveis em folhas frescas, e de 6,02% e de 5,99 mg/mL, respectivamente, em folhas secas de erva-mate. Estes mesmos autores citam que houve uma correlação linear entre os sólidos solúveis e as substâncias bioativas por meio de uma através da maior extração do ácido 5-cafeoilquinico e cafeína.

As diversas partes da planta (folhas ou ramos), proporções de mistura entre as mesmas, formas de ingestão (chimarrão ou tereré), proveniência da planta (plantas nativas ou plantas cultivadas), extração e diluição influenciam o teor de teobrominas, cafeína, CFTs e de metilxantinas (MEINHART et al., 2010).

Segundo Giulian et al. (2007) e Meinhart et al. (2010), a concentração dos taninos presentes nas folhas e a temperatura da água podem influenciar na extração dos elementos minerais da erva-mate e conseqüentemente na concentração destes na infusão (GIULIAN et al., 2007; MEINHART et al., 2010). Murakami et al. (2011) citam que a extração dos CFTs presentes na erva-mate depende dos parâmetros: tempo, temperatura, polaridade do solvente, pH, entre outros. Kotovicz, Wypych e Zanoelo (2014) verificaram que a extração por ultrassom e o processo combinado de ultrassom e pressão eletrostática pulsada melhoram em 200% o rendimento de extração dos componentes da erva-mate. Em relação aos minerais, Giulian et al. (2007) detectaram diferentes concentrações K, Cl, Mg, Al, Si, P, S, Ti, Mn, Fe, Cu, Zn e Rb em ervas-mate

brasileiras, com maiores teores de Cl e K extraídos em temperaturas entre 80-100 °C.

As condições edafoclimáticas influenciam na concentração dos macro e micro elementos na erva-mate. Segundo Marcelo et al. (2014) em estudo comparativo entre amostras de erva-mate do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai, identificaram que as amostras brasileiras possuíam menores quantidades de bário, cálcio, magnésio e alumínio além de maiores quantidades de fosforo e cobre.

Da mesma forma, o conteúdo dos CFTs também sofre interferência das condições edafoclimáticas às quais os ervais são submetidos. Frizon et al. (2015) verificaram que em amostras de erva-mate provenientes da região central do estado do Paraná, em plantios intercalados com eucalipto haviam maiores teores de compostos fenólicos totais.

Dartora et al. (2011) em estudo comparativo entre amostras de folhas de erva-mate de plantas jovens e adultas, amostras cultivadas em áreas sombreadas e ao sol e amostras de erva-mate comercial (com etapas de sapeco e secagem) obtidas a partir de folhas de plantas jovens e adultas, cultivadas ao sol e à sombra, verificaram que amostras a partir de plantas cultivadas ao sol apresentaram maiores teores de compostos bioativos (derivados do cafeoil, cafeína, teobromina e rutina). As amostras processadas comercialmente apresentaram maiores teores de fenólicos e atividade antioxidante.

Anesini et al. (2012) identificaram em amostras de folhas verdes de erva-mate 1,84 e 0,98 g de ácido clorogênico (5-ACQ) e de rutina, respectivamente. Já em amostras de erva-mate comercial foram determinados 2,07 g de ácido clorogênico e 1,28 g de rutina. Já Dartora et al. (2011) encontraram concentração de rutina variando entre 1,21-5,73 mg/g em amostras de folha de erva-mate jovens ou adultas, cultivadas ao sol ou à sombra, in natura ou processadas.

O ácido clorogênico, ácido caféico e rutina encontrados em erva-mate contribuíram positivamente para a atividade antioxidante (AA) por DPPH e para a prevenção da peroxidação de lipídios (ANESINI et al., 2012). Em extrato de erva-mate à 20 µg/mL, proveniente de amostras de folha de erva-mate jovens ou adultas, cultivadas ao sol ou à sombra, in natura ou processadas, Dartora et al. (2011) verificaram AA por DPPH variando entre 17,14 e 23,93%.

Segundo Isolabella et al. (2010), o processamento industrial influencia nos teores dos componentes bioativos presentes na erva-mate, uma vez que em amostras de folhas de erva-mate após sapeco e secagem haviam maiores conteúdos de derivados do cafeol, cafeína, teobromina e rutina em comparação aos teores verificados em folhas verdes.

3.3 SUCO MISTO

Os sucos de frutas são alimentos altamente refrescantes, nutritivos, saudáveis e de fácil digestão (JAYACHANDRAN; CHAKRABORTY; RAO, 2015), são fontes naturais de carboidratos, carotenoides, vitaminas, minerais e outros componentes importantes (BEZERRA et al., 2013). Podem-se utilizar diferentes ingredientes como aromatizantes, probióticos e prebióticos, vitaminas e minerais, oferecendo inúmeras oportunidades de produtos e de marketing, visando consumidores de produtos saudáveis. As indústrias buscam através da diversificação dos seus produtos, melhores atributos sensoriais, nutricionais e funcionais (ANDRÉS et al., 2014).

Em todo o mundo há um aumento no consumo de sucos e bebidas à base de frutas formuladas em função dos apelos de: saúde (ZULUETA et al., 2007; FERRAREZI; SANTOS; MONTEIRO, 2010; ANDRÉS et al., 2014; KOPPEL et al., 2014; RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2015; PORTO et al., 2017; BRASIL FOOD TRENDS 2020, 2018;), conveniência, sabor, inovação e prazer (BRASIL FOOD TRENDS 2020, 2018; FERRAREZI et al., 2010; RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2015; ALQAHTANI et al., 2014). Devido a esta demanda de mercado, houve um incremento no consumo de produtos considerados funcionais ou com apelo saudável tais como: a base de frutas e/ou adicionadas de soja (RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2015; POTTER et al., 2007; ANDRÉS et al., 2014), chá verde puro ou adicionados de outros vegetais (DOMINGUEZ-PERLES et al., 2011), romã (KOPPEL et al., 2014), inulina (CHAITO; JUDPRASONG; PUWASTIEN, 2016; PIMENTEL, MADRONA, PRUDENCIO, 2015) e outras fibras (ALQAHTANI et al., 2014), misturas de frutas e lácteos (ZULUETA et al., 2007; ANDRÉS et al., 2014).

Segundo a legislação brasileira, suco misto é o suco obtido pela mistura de frutas, combinação de fruta e vegetal, combinação das partes comestíveis de vegetais ou mistura de suco de fruta e vegetal, sendo a denominação constituída

da expressão suco misto, seguida da relação de frutas ou vegetais utilizados, em ordem decrescente das quantidades presentes na mistura (BRASIL, 2009). Nestes produtos é proibida a adição de aromas e corantes artificiais e limitada a adição de açúcar a 10% (m/m) desde que empregado o termo adoçado (BRASIL, 2009). Não há atualmente uma legislação brasileira específica que regulamente a polpa de lichia. Para acerola, cacau, maracujá e graviola a polpa deve ser obtida da parte comestível da respectiva fruta, através de processo tecnológico adequado, com teor de sólidos totais conforme legislação (BRASIL, 2000). As bebidas prontas para o consumo contendo lichia devem apresentar ao menos 11,2 °Brix de sólidos solúveis provenientes de polpa de lichia (BRASIL, 2013). O mesmo teor é citado pelo Codex Alimentarius (2018), sendo que a fruta deve totalizar 20% (v/v) do suco reconstituído.

3.4 PROBIÓTICOS E BEBIDAS PROBIÓTICAS

São probióticos os micro-organismos não-patogênicos que, quando administrados em quantidade adequada, exercem uma influência positiva sobre a saúde ou a fisiologia do hospedeiro (MARTEAU et al., 2001; WGO, 2011; HILL et al., 2014). O probiótico deve estar viável e em uma concentração apropriada para se obter os efeitos desejados (FAO, 2006; HILL et al., 2014). Fratianni et al. (2014) citam que tem sido proposta uma ingestão diária de 10^8 células para garantir os efeitos benéficos à saúde. Já Hill et al. (2014) mencionam em revisão sobre o tema, que em diversos países da União Europeia e no Canadá indica-se 10^9 como o número mínimo de células viáveis para que o produto possa ter a alegação de probiótico. A legislação brasileira cita que probióticos são micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002). Para Elmer e McFarland (2001) é possível a utilização de micro-organismos probióticos tanto na prevenção quanto no tratamento, por meio da interação deste com a microecologia natural do hospedeiro.

A FAO (2006) indica que podem ser realizados estudos *in vitro* para verificar a eficácia antes do estudo *in vivo*, como por exemplo, a verificação da tolerância aos ácidos e à bile, a produção de substâncias antimicrobianas e a capacidade de aderência às células do intestino humano, de acordo com o

benefício previsto para a saúde. Duongthingoc et al. (2014) comentam que parte da viabilidade dos micro-organismos é perdida por fatores como choque térmico, acidez gástrica, presença de outros nutrientes e que a encapsulação tem sido empregada em culturas probióticas.

Rivera-Espinoza e Gallardo-Navarro (2010) citam que a maioria dos probióticos pertencem ao gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, mas que espécies dos gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* e *Propionibacterium* são também consideradas probióticas pelos efeitos de promoção da saúde.

3.4.1 Aplicações de probióticos em bebidas à base de frutas e vegetais

Os produtos lácteos são tradicionalmente empregados para veiculação de micro-organismos probióticos, porém aproximadamente 70% da população mundial sofrem de intolerância à lactose ou outros problemas de saúde relacionados aos consumos de lácteos. Desta forma, com a mudança nos hábitos e preferências de consumo, torna-se necessário o desenvolvimento de produtos probióticos isentos de leite (PERRICONE et al., 2015).

As bebidas de frutas e vegetais contêm minerais, fibras e antioxidantes sendo substratos potenciais para o desenvolvimento de probióticos (SHORI, 2016; GRANATO et al., 2010; PERRICONE et al., 2015; MOUSAVI et al., 2011; ZULUETA et al., 2007). Estas bebidas podem ser obtidas pela: (1) adição do(s) micro-organismo(s) probiótico(s), diretamente ou na forma microencapsulada, seguida de armazenamento ou (2) através da adição do(s) micro-organismo(s) através de inoculação, seguida de fermentação e posterior armazenamento.

A adição de probióticos em sucos de fruta pode aumentar a aceitabilidade dos produtos probióticos, já que as frutas possuem a capacidade de mascarar sabores e aromas desagradáveis provenientes do crescimento dos micro-organismos (PERRICONE et al., 2015; LUCKOW et al. (2006). Luckow e Delahunty (2004), em avaliação sensorial de sucos comerciais de groselha e suco de groselha contendo *Lactobacillus plantarum* 299v, verificaram diferença sensorial entre os produtos adicionados de probióticos, com maior aceitação destes pelo grupo formado por consumidores mais velhos e mulheres.

Porém, nos sucos alguns fatores podem influenciar no crescimento de micro-organismos probióticos: (1) parâmetros do próprio alimento: pH, acidez titulável, atividade de água, presença de sais, açúcares e outros ingredientes e/ou aditivos; (2) parâmetros de processamento: tratamento térmico, temperatura de incubação, taxa de resfriamento, materiais e condições de envase e estocagem, etc; (3) parâmetros microbiológicos: cepas de probióticos, taxa e proporção de inoculação (PERRICONE et al., 2015). Desta forma, estes fatores devem ser considerados no desenvolvimento da bebida adicionada de probióticos e/ou fermentada por probióticos.

Há diversas pesquisas sobre aplicação de micro-organismos probióticos em bebidas à base de frutas e outros vegetais. Perricone et al. (2015), em revisão sobre o tema, citam diversas pesquisas com aplicação de probióticos em sucos de frutas: *Lactobacillus casei* (morango, abacaxi, laranja, cranberry e tomate), *L. plantarum* (morango, kiwi, romã e tomate), *L. rhamnosus* (abacaxi, laranja e cranberry), *L. paracasei* (abacaxi, laranja, cranberry e romã), *L. delbrueckii* (romã e cenoura), *L. acidophilus* (romã e tomate), *L. brevis* (tomate), *Bifidobacterium lactis* (cenoura), *Bifidobacterium bifidum* (cenoura). Em estudo da aplicação de *L. reuteri* DSM 20016 em caldo MRS adicionado de sucos de abacaxi, laranja, maçã verde e frutas vermelhas, com estocagem à 4 °C e 37 °C por até 22 dias, Perricone et al. (2014) verificaram que houve uma perda da viabilidade do probióticos no último suco, devido provavelmente a um efeito combinado do pH baixo e dos polifenóis. Pimentel et al. (2015) adicionaram *L. paracasei* ssp. *paracasei* em suco de maçã clarificado com e sem oligofrutose, embalados em frascos de vidro e plástico, com posterior armazenamento por 28 dias à 4 °C. Os autores verificaram que a suplementação com oligofrutose não alterou as características físico-químicas, aceitabilidade e estabilidade ao longo da armazenagem. Também verificaram que a embalagem de vidro foi a mais adequada na manutenção da viabilidade da cultura bacteriana. Porto et al. (2017) adicionaram *L. acidophilus* em bebida mista de beterraba e laranja e obtiveram um produto aceito sensorialmente e com viabilidade $> 10^9$ UFC/200 mL armazenado por 28 dias à 4 °C.

Uma outra alternativa para o processamento das bebidas à base de frutas é a adição seguida de fermentação das bebidas por micro-organismos probióticos. A fermentação, além de proporcionar a preservação, pode possibilitar

o desenvolvimento de características nutricionais e sensoriais desejáveis aos produtos fermentados (SHORI, 2016).

Mousavi et al. (2011) verificaram que em suco de romã fermentado por *L. plantarum* e *L. delbrueckii* por 72 h à 30 °C os micro-organismos permaneceram viáveis nas duas primeiras semanas sob armazenamento à 4 °C. Rivera-Espinoza e Gallardo-Navarro (2010) citam trabalhos onde *L. acidophilus* e *L. plantarum* foram adicionados a suco de beterraba visando a fermentação. A adição de *L. acidophilus* seguida de fermentação tornou uma bebida à base de soro de leite e abacaxi (65:35) mais aceita sensorialmente (nota média 8,87 em escala de 1 a 9) e apresentou viabilidade de $3,78 \times 10^7$ UFC/mL (SHUKLA; JHA; ADMASSU, 2012).

Em fermentação de suco de lichia com *L. casei* tratado por alta pressão hidrostática (HHP) ou termicamente (HT), Zheng et al. (2014) verificou aumento na viabilidade celular após 18 h de fermentação à 30 °C, com um máximo de 8,31 e 8,57 log UFC/mL em suco tratado por HHP e HT, respectivamente. Após fermentação do suco HT, houve completo consumo da sacarose, restando 67,8% de glicose e com aumento de 8,97% de frutose e aumento na viscosidade de 4,7 mPa s para 84,8 mPa s.

Lima et al. (2012) adicionou *L. acidophilus* ATTC 4356 em bebida de erva-mate (pH 4,3), variando-se concentrações de extrato de levedura e de extrato de malte, mel e melaço de cana, obtendo-se uma contagem celular de 10^8 UFC/mL, após 10 h de fermentação e estocagem por 28 dias à 4 °C.

3.4.2 *Saccharomyces boulardii*

A *S. boulardii* foi primeiramente isolada a partir da lichia, na Indochina, crescendo à temperatura de 37 °C e, apesar das semelhanças fenotípicas e genotípicas com *S. cerevisiae*, atualmente é considerada uma espécie distinta (CZERUCKA; RAMPAL, 2002). É uma levedura que não faz parte da microbiota intestinal e não coloniza o intestino, com declínio da concentração após cessar a administração (FRATIANNI et al., 2014; CZERUCKA et al. 2007)

Karaolis et al. (2013) citam que a *S. boulardii* exerce efeito benéfico à saúde como produção de toxinas antibacterianas, indução do crescimento dos probióticos, estímulo à produção das enzimas digestivas maltase, lactase e

sacarase e dos ácidos graxos de cadeia curta além de diminuir as citocinas pró-inflamatórias.

Esta levedura tem sido empregada no tratamento de diarreia do viajante, diarreia associada a antibióticos, gastroenterite aguda em adultos e crianças, diarreia em pacientes intubados e diarreia crônica em pacientes HIV positivos (CZERUCKA; RAMPAL, 2002; CZERUCKA et al., 2007; FRATIANNI et al., 2014). Há relatos de proteção contra *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae*, *Shigella* e *E. coli* (EPEC) (CZERUCKA; RAMPAL, 2002; KÜHLE; SKOVGAARD; JESPERSEN, 20005) e *Salmonella entérica* Typhimurium (MARTINS et al., 2013). Normalmente é prescrita na forma liofilizada (KARAOLIS et al., 2013).

3.4.2.1 Aplicação da *S. boulardii* em alimentos

Pesquisas apontam a potencial aplicação da *S. boulardii* como microorganismo probiótico em alimentos. Karaolis et al. (2013) realizaram estudo aplicando a cultura iniciadora YC- 380 (contendo bactérias lácticas) e a levedura *S. boulardii* em iogurte de cabra. Os autores verificaram que a levedura promoveu o crescimento das bactérias lácticas (BALs), com uma concentração final de cerca de 10^5 UFC/g tanto para BALs quanto para as leveduras, além de conferir uma boa aceitabilidade sensorial ao iogurte de cabra.

Fратиanni et al. (2014) citam que a aplicação de leveduras probióticas como *S. boulardii* em sucos de frutas ainda não tem sido muito explorado comercialmente. Os autores compararam a adição da *S. boulardii*: (1) na aplicação direta em suco de berry, e (2) através da microencapsulação da levedura em uma mistura de alginato, inulina e goma xantana. Nas amostras contendo o micro-organismo microencapsulado foram verificadas maior resistência ao suco gástrico e sais biliares, quando testados *in vitro*, além de maiores contagens ao longo do armazenamento por quatro semanas à 4 °C (FRATIANNI et al., 2014).

Heenan et al. (2004) avaliaram a adição de diversos probióticos em sobremesa à base de soja. Dentre os micro-organismos testados, a *S. boulardii* não manteve a viabilidade desejada (10^6 UFC/g), com uma redução de 50% na quinta semana de estocagem. Ainda, ao longo do armazenamento por 7 meses à -20 °C, propiciou sabores indesejáveis ao produto final.

A utilização da *S. boulardii* para fermentação de produtos lácteos foi avaliada por Lourens-Hattingh e Viljoen (2001), os quais observaram crescimento e sobrevivência desta levedura nos produtos testados. Nesta pesquisa, os autores verificaram aumento da contagem da levedura em iogurte de frutas (de 7,7 log para 8,1 log UFC/mL) ao longo de 28 dias de armazenagem à 5 °C, possivelmente pela facilidade da mesma em fermentar os açúcares provenientes das frutas, além de verificar a presença de 5% de etanol e de CO₂.

Profir e Vizireanu (2013) verificaram a aceitabilidade sensorial de suco fermentado misto de beterraba, cenoura e aipo (11:5:4), inoculado com diferentes combinações e dosagens de *L. acidophilus*, *L. casei* e *S. boulardii*. Neste estudo as amostras foram incubadas à 37 °C até que se atingisse o pH 4,6 e em seguida, resfriadas. Os autores verificaram que a fermentação láctica proporcionou uma acidez que prejudicou a aceitação das amostras pelos julgadores. Neste estudo, maior nota média foi atribuída à amostra contendo uma mistura de *L. acidophilus*, *L. casei* e *S. boulardii* na proporção de 1,3:1,3:1,57 log UFC/mL.

3.5 BEBIDAS FERMENTADAS DE LICHIA

Diversos autores avaliaram produção de bebida fermentada de lichia (*tipo* vinho), empregando-se, além da *Saccharomyces cerevisiae* outros micro-organismos usualmente utilizados em vinificação de uvas (ZENG et al., 2008; ALVES et al., 2010; ALVES et al., 2011; WU et al., 2011; CHEN; CHIA; LIU, 2014; CHEN; YAP; LIU, 2015; CHEN E LIU, 2016a; CHEN E LIU, 2016b), obtendo-se bebidas fermentadas alcoólicas, com inúmeros compostos aromáticos e aceitas sensorialmente, apontando viabilidade na produção de fermentados à base de lichia.

Na medicina tradicional chinesa é comum o consumo de produtos que combinam lichia a extratos de flores e folhas, fermentados ou não, por exemplo adicionado de chá verde (*Camelia sinensis*) (YU, 2014; DURMISHKHANOVNA, 2009). Como a erva-mate apresenta perfil de compostos bioativos e AA semelhante ao do chá verde (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007), a adição de infusão de erva-mate ao suco de lichia pode ser uma alternativa para o desenvolvimento de produtos probióticos e/ou fermentados com potencial

antioxidante e probiótico. Destaca-se que não há relatos na literatura de tal combinação para a produção de bebidas.

4 REFERÊNCIAS

AGUILA, J. S.; HOFMAN, P.; CAMPBELL, T.; MARQUES, J. R.; AGUILA, L. S. H.; KLUGEL, R. A. Pré-resfriamento em água de lichia 'B3' mantida em armazenamento refrigerado, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 8, p. 2373-2379, 2009.

ALQAHTANI, N. K.; ASHTON, J.; KATOPO, L.; HAQUE, E.; JONE, O. A. H.; KASAPIS, S. Consistency of UHT beverages enriched with insoluble fibre during storage. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, Amsterdam, v. 4, n. 1, p. 84-92, 2014.

ALVES, J. A.; LIMA, L. C. O.; DIAS, D. R.; NUNES, C. A.; SCHWAN, R. F. Effects of spontaneous and inoculated fermentation on the volatile profile of lychee (*Litchi chinensis* Sonn) fermented beverages. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.45, n. 11, p.2358-2365, 2010.

ALVES, J. A.; LIMA, L. C. O.; NUNES, C. A.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Chemical, physical-chemical, and sensory characteristics of lychee (*Litchi chinensis* Sonn) Wines. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 76, n. 5, p. S330-S336, 2011.

ANDRÉS, V.; VILLANUEVA, M. J.; MATEOS-APARICIO, I.; TENORIO, M. D. Colour, bioactive compounds and antioxidant capacity of mixed beverages based on fruit juices with milk or soya. **Journal of Food and Nutrition Research**, Bratislava, v.53, n.1, 71-80, 2014.

ANESINI, C.; TURNER, S.; COGOI, L.; FILIP, R. Study of the participation and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT – Food Science and Technology**, London, v.45, n.2, p.299-304, 2012.

BARG, M.; REZIN, G. T.; LEFFA, D. D.; BALBINOT, F.; GOMES, L. M.; CARVALHO-SILVA, M.; VUOLO, F.; PETRONILHO, F.; DAL-PIZZOL, F.; STRECK, E. L.; ANDRADE, V. M. Evaluation of the protective effect of *Ilex paraguariensis* and *Camellia sinensis* extracts on the prevention of oxidative damage caused by ultraviolet radiation. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam v.37, n.1, p.195-201, 2014.

BASTOS, D. H. M.; FORNARI, A. C.; QUEIROZ, Y. S.; TORRES, E. A. F. S. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 3, p. 399-404, 2006.

BATTEN, D. J. Maturity criteria for litchis. **Food Quality and Preference**, Barking, v.1, n.4/5, p. 149-155, 1989.

BERTINI, A. **Chimarrão: Erva Mate**. Fotografia. Color. Disponível em: <https://www.flickr.com/photos/mrabertini/5718883606>. Acesso em: 10 jun 2018.

BEZERRA, C. V.; SILVA, L. H. M.; COSTA, R. D. S.; MATTIETTO, R. A.; RODRIGUES, A. M. C. Comportamento reológico de suco misto elaborado com frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 155-162, 2013.

BHOOPAT, L.; SRICHAIRATANAKOOL, S.; KANJANAPOTHI, D.; TAESOTIKUL, T.; THANANCHAI, H.; BHOOPAT, T. Hepatoprotective effects of lychee (*Litchi chinensis* Sonn.): A combination of antioxidant and anti-apoptotic activities. **Journal of Ethnopharmacology**, Limeric, v. 136, n. 1, p. 55–66, 2011.

BOAVENTURA, B. C. B.; AMBONI, R. D. M. C.; SILVA, E. L.; PRUDENCIO, E. S.; DI PIETRO, P. F.; MALTA, L. G.; POLINATI, R. M.; LIU, R. H. Effect of in vitro digestion of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) extract on the cellular antioxidant activity, antiproliferative activity and cytotoxicity toward HepG2 cells. **Food Research International**, Essex, v. 77, n. 2, p. 257-263, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 01, de 7 de janeiro de 2000. **Regulamento Técnico Geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpa de fruta**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 10 jan. 2000. Seção 1, p. 54.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. **Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedade Funcional e/ou de Saúde**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 9 jan. 2002. Seção 1, p. 191.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Decreto Nº 6.871 de 4 de junho de 2009. **Regulamenta a Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2009, 05 jun. 2009. Seção 1, p. 20.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 19, de 19 de junho de 2013: Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade de Refresco, Refrigerante, Bebida composta, Chá pronto para consumo e Soda**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 20 jun. 2013. Seção 1, p. 14.

BRASIL FOOD TRENDS 2020. Disponível em: http://www.brazilfoodtrends.com.br/brasil_food_trends/files/publication.pdf. Acesso em 06 jul 2018.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity

compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, Essex, v.40, n.3, p.393-405, 2007.

BRAVO, L.; MATEOS, R.; SARRIÁ, B.; BAEZA, G.; LECUMBERRI, E.; RAMOS, S.; GOYA, L. Hypocholesterolaemic and antioxidante effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in high-cholesterol fed rats. **Fitoterapia**, Milano, v. 92, p. 219-229, 2014.

CAHUE, F.; NASCIMENTO, J. H. M.; BARCELLOS, L.; SALERNO, V. P. *Ilex paraguariensis*, exercise and cardioprotection: A retrospective analysis. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 53, p. 105–108, 2019.

CAPECE, A.; ROMANIELLO, R.; PIETRAFESA, A.; GABRIELLA, S.; PIETRAFESA, R.; ZAMBUTO, M.; ROMANO, P. Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value added. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 284, p.22-30, 2018.

CHAITO, C.; JUDPRASONG, K.; PUWASTIEN, P. Inulin content of fortified food products in Thailand. **Food Chemistry**, Barking, v. 193, p. 102–105, 2016.

CHEN, D.; LIU, S. Q. Impact of simultaneous and sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on non-volatiles and volatiles of lychee wines. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 65, p. 53–61, 2016.

CHEN, D.; LIU, S. Q. Transformation of chemical constituents of lychee wine by simultaneous alcoholic and malolactic fermentations. **Food Chemistry**, Barking, v. 196 ,p. 988–995, 2016.

CHEN, D.; CHIA, J. Y.; LIU, S. Q. Impact of addition of aromatic amino acids on non-volatile and volatile compounds in lychee wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* MERIT. ferm. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 170, p.12–20, 2014.

CHEN, D.; YAP, Z. Y.; LIU, S. Evaluation of the performance of *Torulaspora delbrueckii*, *Williopsis saturnus*, and *Kluyveromyces lactis* in lychee wine fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 206, p. 45–50, 2015.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Codex General Standard for fruit juices and nectars: CODEX STAN 247-2005. 2005**. Disponível em: http://www.fao.org/input/download/standards/10154/CXS_247e.pdf. Acesso em: 28 mar. 2018.

COSTA, S.G. **A erva-mate**. Curitiba: Scintia et Labor, 1989. 86 p.

CZERUCKA, D.; RAMPAL, P. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. **Microbes and Infection**, Paris, v.4, n.7, p. 733–739, 2002.

CZERUCA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 26, n. 6, p. 767-778, 2007.

DA MOTTA, E. L. **Avaliação da composição nutricional e atividade antioxidante de *Litchi chinensis* Sonn. (“Lichia”) cultivada no Brasil. 2009.** 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

DA SILVA, E. L.; NEIVA, T. J. C.; SHIRAI, M.; TERAQ, J.; ABDALLA, D. S. P. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Research International**, Essex, v. 41, n. 10, p. 973–979, 2008.

DARTORA, N.; SOUZA, L. M.; SANTANA-FILHO, A. P.; IACOMINI, M.; VALDUGA, A. T.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. UPLC-PDA-MS Evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**, Barking, v. 129, n.4, p. 1453-1461, 2011.

DEĞIRMENCIOĞLU, N.; GURBUZ, O.; SAHAN, Y. S. The monitoring, via an in vitro digestion system, of the bioactive content of vegetable juice fermented with *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. **Journal of Food Processing and Preservation**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 798-811, 2016.

DEMBITSKY, V. M.; POOVARODOM, S.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; VEARASILP, S.; TRAKHTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. **Food Research International**, Essex, v. 44, n. 7, p. 1671–1701, 2011.

DOMINGUEZ-PERLES, R.; MORENO, D. A.; CARVAJAL, M.; GARCIA-VIGUERA, C. Composition and antioxidant capacity of a novel beverage produced with green tea and minimally-processed byproducts of broccoli. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Wageningen, v. 12, n. 3, p. 361–368, 2011.

DUAN, X.; JIANG, Y.; SU, X.; ZHANG, Z.; SHI, J. Antioxidant properties of anthocyanins extracted from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp tissues in relation to their role in the pericarp browning. **Food Chemistry**, Barking, v. 101, n. 4, p. 1365–1371, 2007.

DUONGTHINGOC, D.; GEORGE, P.; GORCZYCA, E.; KASAPIS, S. Studies on the viability of *Saccharomyces boulardii* within microcapsules in relation to the thermomechanical properties of whey protein. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 42, part 2, p. 232 -238, 2014.

DURMISHKHANOVNA, M. I. Ooo Agri. **Method of producing natural semisweet pop wine.** RU20080114608 20080417. Depósito:17 abr. 2008. Concessão: 27 set. 2009.

ELMER, G. W.; McFARLAND, L. V. Biotherapeutic agents in the treatment of infectious diarrhea. **Gastroenterology Clinics of North America**, Philadelphia, v. 30, n. 3, p. 837–854, 2001.

EMANUELE, S.; LAURICELLA, M.; CALVARUSO, G.; D'ANNEO, A.; GIULIANO, M. Litchi chinensis as a functional food and a source of antitumor compounds: an overview and a description of biochemical pathways. **Nutrients**, Basel, v. 9, n. 992, p. 1-15, 2017.

ERVA-MATE: COR E SABOR. Erva mate e perda de gordura. Fotografia. Color. Disponível em: <http://ervamatecoresabor.com.br/site/vernoticia.asp?id=60>. Acesso em: 10 jun. 2018.

ERVA-MATE VALERIO. Saiba mais sobre a erva-mate. Fotografia. Color. Disponível em: http://www.ervateiravalerio.com.br/conteudo/0,2867_A-Erva-Mate. Acesso em: 10 jun. 2018.

ERVA-MATE. A Erva-mate e os seus benefícios. Fotografia. Color. Disponível em: <http://www.ervateiraouoverde.com.br/site/?l=5>. Acesso em: 10 jun 2018.

FAO. **Probióticos en los alimentos: Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación.** 2006. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-a0512s.pdf>. Acesso em: 11 jun 2018.

FARINAZZO, F. S.; FARINAZZO, E. S.; SPINOSA, W. A.; GARCIA, S. *Saccharomyces boulardii*: optimization of simultaneous saccharification and fermentation of cell production in organic and conventional apple substrate pulp. **Food science and biotechnology**, Seoul, v. 26, n. 4, p. 969-977, 2017.

FERRAREZI, A. C.; SANTOS, K. O.; MONTEIRO, M. Avaliação crítica da legislação brasileira de sucos de fruta, com ênfase no suco de fruta pronto para beber. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p.667-677, 2010.

FRATIANNI, F.; CARDINALE, F.; RUSSO, I.; IULIANO, C. CUCCINIELLO, A. C.; MAIONE, M.; D'ACIERNO, A.; NAZZARO, F. Fermentation of tomato juice with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. In: ROBINSON A.; EMERSON D. (eds). **Functional Foods: Sources, Biotechnology Applications, and Health Challenges**. New York, USA: Nova Science Publisher, 2013. p. 143–152.

FRATIANNI, F.; CARDINALE, F.; RUSSO, I.; IULIANO, C.; TREMONTE, P.; COPPOLA, R. NAZZARO, F. Ability of synbiotic encapsulated *Saccharomyces cerevisiae boulardii* to grow in berry juice and to survive under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 31, n. 3, p. 299-305, 2014.

FRIZON, C. N. T.; OLIVEIRA, G. A.; PERUSSELLO, C. A.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; CAMLOFSKI, A. M. O.; ROSSA, U. B.; HOFFMANN-RIBANI, R. Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 60, n. 2, p.795-801, 2015.

FULLER, R. Probiotics in human medicine. **Gut**, London, v.32, n.4, p.439-442, 1991.

GADKARI, P. V.; BALARAMANA, M. Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 93 p. 122–138, 2015.

GALLO, M.; BEVILACQUA, A.; SPERANZA, B.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M. R. Alginate beds and apple pieces as carriers for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, as representative of yeast functional starter cultures. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 49, n. 9, p. 2092-2100, 2014.

GIULIAN, R.; SANTOS, C. E. I.; SHUBEITA, S. M.; SILVA, L. M.; DIAS, J. F.; YONEAMA, M. L. Elemental characterization of commercial mate tea leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) before and after hot water infusion using ion beam techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington v. 55, n. 3, p. 741–746, 2007.

GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 3, p. 292-302, 2010.

GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; LI, Y.; XU, J.; JIANG, Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. **Nutrition Research**, Bratislava, v. 23, n. 12, p. 1719–1726, 2003.

HAJARE, S. N., SAXENA, S., KUMAR, S., WADHAWAN, S., MORE, V., MISHRA, B. B., PARTE, N.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Quality profile of litchi (*Litchi chinensis*) cultivars from India and effect of radiation processing. **Radiation Physics and Chemistry**, Amsterdam, v. 79, n. 9, p. 994-1004, 2010.

HAQ, I. U.; RAB, A. Characterization of physico-chemical attributes of litchi fruit and its relation with fruit skin cracking. **The Journal of Animal and Plant Sciences**, Lahore, v. 22, n. 1, p. 142-147, 2012.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, n. 9, p. R138-R151, 2007.

HEENAN, C.N.; ADAMS, M.C.; HOSKEN, R.W.; FLEET, G.H. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 37, n. 4, p. 461–466, 2004.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term

probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, London, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

HOJO, E. T. D.; DURIGAN, J. F.; HOJO, R. H. Prevenção do escurecimento do pericarpo de lichia através do uso de ácidos e filmes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n.spe1, p. 519-527, 2011.

HOLCROFT, D. M.; MITCHAM, E. J. Postharvest physiology and handling of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v. 9, n. 3, p. 265-281, 1996.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILINGER, U. 2002. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, Essex, v. 35, n. 2-3, p. 109-116, 2002.

HOUBIN, C. **The production and uses of litchis in China**. Disponível em: <http://www.gmup.org/presentation%20pdf/day1Chen.pdf>. Acesso em: 05 mar 2018.

HUANG, X. **Lychee Production in China**. Food and Agriculture Organization - FAO Corporate Document Repository. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/005/ac684e/ac684e07.htm>. Acesso em: 05 mar 2018.

ISOLABELLA, S.; COGOI, L.; LÓPEZ, P.; ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, Barking, v. 122, n.3, p.695-699, 2010.

JAYACHANDRAN, L. E.; CHAKRABORTY, S.; RAO, P. S. Effect of high pressure processing on physicochemical properties and bioactive compounds in litchi based mixed fruit beverage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Wageningen, v. 28, n. 1, p. 1–9, 2015.

JANG, S.; HOSSAIN, A.; LEE, J. S.; REZA, A.; LEE, S.; KANG, J. W.; PARK, S. Hepatoprotective effects of *Ilex paraguariensis* St. Hilaire (Yerba mate) extract in rats. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, New Delhi, v. 17, n. 4, p. 707-715, 2018.

KARAOLIS, C.; BOTSARIS, G.; PANTELIDES, I.; TSALTAS, D. Potential application of *Saccharomyces boulardii* as a probiotic in goat's yoghurt: survival and organoleptic effects. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 48, n. 7, p. 1445–1452, 2013.

KIM, H. J.; KO, J.; STORNI, C.; SONG, H. J.; CHO, Y. G. Effect of green mate in overweight volunteers: a randomized placebo-controlled human study. **Journal of functional Foods**, Amsterdam, v. 4, n.1, p.287-293, 2012.

KINGWATEE, N.; APICHARTSRANGKON, A.; CHAIKHAM, P.; WORAMETRACHANON, S.; TECHARUNG, J.; PANKASEMSUK, T. Spray drying *Lactobacillus casei* 01 in lychee juice varied carrier materials. **LWT – Food Science and Technology**, Oxford, v. 62, n. 1, p. 847-853, 2014.

KITADATE, K.; HOMMA, K.; ROBERTS, A.; MAEDA, T. Thirteen-week oral dose toxicity study of Oligonol containing oligomerized polyphenols extracted from lychee and green tea. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, San Diego, v. 68, n. 1, p. 140–146, 2014.

KOPPEL, K.; CHAMBERS IV; E.; VÁZQUEZ-ARAÚJO, L.; TIMBERG, L.; CARBONELL-BARRACHINA, A.; SUWONSICHON, S. Cross-country comparison of pomegranate juice acceptance in Estonia, Spain, Thailand, and United States. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 31, n. 1, p. 116–123, 2014.

KOTOVICZ, V.; WYPYCH, F.; ZANOELO, E. F. Pulsed hydrostatic pressure and ultrasound assisted extraction of soluble matter from mate leaves (*Ilex paraguariensis*): Experiments and modeling. **Separation and Purification Technology**, v. 132, p. 1-9, 2014.

KÜHLE, A. A.; SKOVGAARD, K.; JESPERSEN, L. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.101, n.1, p.29– 39, 2005.

LEE, Y. L.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 6, p. 241–245, 1995.

LI, H.; ZHAO, L.; WU, J.; ZHANG, Y.; LIAO, X. Inactivation of natural microorganisms in litchi juice by high-pressure carbon dioxide combined with mild heat and nisin. **Food Microbiology**, London, v. 30, n.1, p. 139-145, 2012.

LIANG, D.; LIN, F.; YANG, G.; YUE, X.; ZHANG, Q., ZHANG, Z.; CHEN, H. Advantages of immersion freezing for quality preservation of litchi fruit during frozen storage. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 60, n. 2, p. 948-956, 2015.

LIANG, Y. S.; WONGMETHA, O.; WUA, P. S.; KE, L. S. Influence of hydrocooling on browning and quality of litchi cultivar Feizixiao during storage. **International Journal of Refrigeration**, Vurrey, v. 36, n. 3, p. 1173-1179, 2013.

LIMA, I. F. P.; LINDNER, J. D. D.; SOCCOL, V. T.; PARADA, J. L.; SOCCOL, C. R. Development of an Innovative Nutraceutical Fermented Beverage from Herbal Mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) Extract. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, n. 1, p. 788-800, 2012.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. **Food Research International**, Essex, v. 34, n. 9, p. 791-796, 2001.

LUCKOW, T.; DELAHUNTY, C. Which juice is 'healthier'? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. **Food Quality and Preference**, Barking, v.15, n.7-8, p.751-759, 2004.

LUCKOW, T.; SHEEHAN, V.; FITZGERALD, G.; DELAHUNTY, C. Exposure, health information and flavor masking strategies for improving the sensory quality of probiotic juice. **Appetite**, London, v. 47, n. 3, p. 315–325, 2006.

- LV Q.; SI, M. M.; YAN, Y. Y.; LUO, F. L.; HU, G. B.; WU, H. S.; SUN, C.; LI, X.; CHEN, K. Effects of phenolic-rich litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pulp extracts on glucose consumption in human HepG2 cells. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 7, p. 621–629, 2014.
- MA, Q.; XIE, H.; JIANG, Y.; WEI, X. Phenolics and sesquiterpenes from litchi pericarp. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 9, n. 1, p.156–161, 2014.
- MA, Q.; XIE, H.; LI, S.; ZHANG, R.; ZHANG, M.; WEI, X. Flavonoids from the Pericarps of *Litchi chinensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 62, n. 5, p. 1073–1078, 2014.
- MAHATTANATAWEE, K.; MANTHEY, J. A.; LUZIO, G. L.; TALCOTT, S. T.; GOODNER, K.; BALDWIN, E. A. Total Antioxidant Activity and Fiber Content of Select Florida-Grown Tropical Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 19, p. 7355–7363, 2006.
- MARCELO, M. C. A.; MARTINS, C. A.; POZEBON, D.; DRESSLER, V. L.; FERRAO, M. F. Classification of yerbamate (*Ilex paraguariensis*) according to the country of origin based on element concentrations. **Microchemical Journal**, New York, v.117, p.164–171, 2014.
- MARIA-FERREIRA, D.; DARTORA, N.; DA SILVA, L. M.; PEREIRA, I. T.; DE SOUZA, L. M.; RITTER, D. S.; IACOMINI, M.; WERNER, M. F. P.; SASSAKI, G. L.; BAGGIO, C. H. Chemical and biological characterization of polysaccharides isolated from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 59, p. 125–133, 2013.
- MARTEAU, P.R; DE VRESE, M.; CELLIER, C.J.; SCHREZENMEIR, J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, n. 2, p. 430s–436s, 2001.
- MARTINS, F. S.; VIEIRA, A. T.; ELIAN, S. D. A.; ARANTES, R. M. E.; TIAGO, F. C. P.; SOUSA, L. P.; ARAUJO, H. R. C.; PIMENTA, P. F.; BONJARDIM, C. A.; NICOLI, J. R. TEIXEIRA, M. M. Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. **Microbes and Infection**, Paris, v. 15, n. 4, p. 270-279, 2013.
- MAZUR, L.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; DEMCZUK JR, B.; RIBANI, R. H. Application of multivariate calibration and NIR spectroscopy for the quantification of methylxanthines in yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 35, n. 2, p. 55–60, 2014.
- MEINHART, A. D.; BIZZOTTO, C. S.; BALLUS, C. A.; RYBKA, A. C. P.; SOBRINHO, M. R.; CERRO-QUINTANA, R. S.; TEIXEIRA-FILHO, J.; GODOY, H. T. Methylxanthines and Phenolics Content Extracted during the Consumption of Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) Beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, n. 4, p. 2188-2193, 2010.
- MEJÍA, E. G.; SONG, Y. S.; HECK, C. I.; RAMÍREZ-MARES, M. V. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of

colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 23-34, 2010.

MENZEL, C. M. **Lychee crop in Asia and the pacific**. Food and Agricultural Organization of the United Nations: Bangkok, Thailand, 2002, p. 12.

MENZEL, C. M.; WAITE, G. K. **Litchi and Longan: botany, cultivation and uses**. CABI Publishing: Queensland, Australia, 2005, p. 1.

MONGELO, A.I **Validação de Método Baseado em Visão Computacional para Automação da Contagem de Viabilidade de Leveduras em Indústrias Alcooleiras**. 2012. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande.

MOUSAVI, Z. E., MOUSAVI, S. M.; RAZAVI, S. H.; EMAM-DJOMEH, Z.; KIANI, H. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 123 - 128, 2011.

MURAKAMI, A.N. N.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDENCIO, E. S.; AMANTE, E. R.; ZANOTTA, L. M.; MARASCHIN, M.; PETRUS, J. C. C.; TEOFILO, R. F. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 44, n. 10, p. 2211-2216, 2011.

NATIONAL HORTICULTURE BOARD. **Litchi**. Disponível em: http://nhb.gov.in/report_files/litchi/LITCHI.htm. Acesso em: 05 mar 2018.

ONG, P. K.; ACREE, T. E. Similarities in the aroma chemistry of Gewürztraminer variety wines and lychee (*Litchi chinensis* sonn.) fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, n. 2, p.665-70, 1999.

PANDEY, N.; JOSHI, S. K.; SING, C. P.; KUMAR, S.; RAJPUT, S.; KHANDAL, R. K. Enhancing shelf life of litchi (*Litchi chinensis*) fruit through integrated approach of surface coating and gamma irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, Amsterdam, v. 85, p. 197–203, 2013.

PEREIRA, D. F.; KAPPEL, V. D.; CAZAROLLI, L. H.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; GUESSER, S. M.; DA SILVA, E. L.; SILVA, F. R. M. B. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 19, n. 10, p. 868– 877, 2012.

PERRICONE, M.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M.; SPERANZA, B.; BEVILACQUA, A. Viability of *Lactobacillus reuteri* in fruit juices. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 10, p.421–426, 2014.

PERRICONE, M.; BEVILACQUA, A.; ALTIERI, C.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M. R. Challenges for the Production of Probiotic Fruit Juices. **Beverages**, Basel, v. 1, n. 2, p. 95-103, 2015.

PHUNCHAISRI, C.; APICHARTSRANGKOON, A. Effects of ultra-high pressure on biochemical and physical modification of lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). **Food Chemistry**, Barking, v.93, n.1, p. 57–64, 2005.

PIMENTEL, T. C.; MADRONA, G. S.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp - paracasei and oligofructose in different package type. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 63, n.1, p. 415-422, 2015.

PIMENTEL, T. C.; MADRONA, G. S.; PRUDENCIO, S. H. Probiotic clarified apple juice with oligofructose or sucralose as sugar substitutes: sensory profile and acceptability. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 62, n. 1, part.2, p. 838-846, 2015.

PORTO, M. R. A.; OKINA, V. S.; PIMENTEL, T. C.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Beet and Orange mixed juices added with *Lactobacillus acidophilus*. **Nutrition and Food Science**, London, v. 48, n. 1, p. 76-87, 2018.

POTTER, R. M.; DOUGHERTY, M. P.; HALTEMAN, W. A.; CAMIRE, M. E. Characteristics of wild blueberry-soy beverages. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 40, n. 5, p. 807-814, 2007.

PROFIR, A. G.; VIZIREANU, C. Sensorial analysis of a functional beverage based on vegetables juice. **Acta Biologica Szegediensis**, Szeged, v. 57, n. 2, p. 145-148, 2013.

QUEIROZ, E. R. **Frações de lichia: caracterização química e avaliação de compostos bioativos**. 2012. 122 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

QUEIROZ, E. R.; ABREU, C. M. P.; OLIVEIRA, K. S. Constituintes químicos das frações de lichia in natura e submetidas à secagem: potencial nutricional dos subprodutos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 4, p. 1174-1179, 2012.

RAMIREZ-MARES, M. V.; CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. **Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 554, n. 1-2, p.53-65, 2004.

RESENDE, P. E.; KAISER, S.; PITTOL, V.; HOEFEL, A. L.; SILVA, R. D.; MARQUES, C. V.; KUCHARSKI, L. C.; ORTEGA, G. G. Influence of crude extract and bioactive fractions of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (yerba mate) on the Wistar rat lipid metabolism. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 15, p. 440-451, 2015.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 1, p.1-11, 2010.

RIVERA-LÓPEZ, J.; ORDORICA-FALOMIR, C.; WESCHE-EBELING, P. Changes in anthocyanin concentration in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp during maturation. **Food Chemistry**, Barking, v. 65, n. 2, p. 195-200, 1999.

- RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J.; ANCOS, B.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; CANO, M. P.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARTÍN-BELLOSO, O. Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 14, n. 1, p. 33–43, 2015.
- SANTOS, E. C. S.; BICCA, M. A.; BLUM-SILVA, C. H.; COSTA, A. P. R.; DOS SANTOS, A. A.; SCHENKEL, E. P.; FARINA, M.; REGINATTO, F. H.; DE LIMA, T. C. M. Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice. **Neuroscience**, Oxford, v. 292, p.13–21, 2015.
- SHORI, A. B. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. **Food Bioscience**, Amsterdam, v. 13, p. 1-8, 2016.
- SIVUDU, N.; RAMESH, B.; UMAMAHESH, K.; REDDY, O. V. S. Probiotication of tomato and carrot juices for shelf-life enhancement using micro-encapsulation. **Journal of Food Biosciences and Technology**, Tehran, v. 6, n. 2, p. 13-22, 2016.
- SU, D.; TI, H.; ZHANG, R.; ZHANG, M.; WEI, Z.; DENG, Y. GUO, J. Structural elucidation and cellular antioxidant activity evaluation of major antioxidant phenolics in lychee pulp. **Food Chemistry**, Barking, v. 158, p. 385–391, 2014.
- SUKLA, M.; JHA, Y. K.; ADMASSU, S. Development of Probiotic Beverage from Whey and Pineapple Juice. **Journal Food Processing and Technology**, Los Angeles, v. 4, n. 2, p. 1-4, 2013.
- SUN, D.; LIANG, G.; XIE, J.; LEI, X.; MO, Y. Improved preservation effects of litchi fruit by combining chitosan coating with ascorbic acid treatment during postharvest storage. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 9, n. 22, p. 3272-3279, 2010.
- SUN, J.; SHI, J.; ZHAO, M.; XUE, S. J.; REN, J.; JIANG, Y. A comparative analysis of property of lychee polyphenoloxidase using endogenous and exogenous substrates. **Food Chemistry**, Barking, v. 108, n. 3, p. 818–823, 2008.
- VALERGA, J.; RETA, M.; LANARI, M. C. Polyphenol input to the antioxidante activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 45, n. 1, p. 28-35, 2012.
- WALL, M. M. Ascorbic acid and mineral composition of longan (*Dimocarpus longan*), lychee (*Litchi chinensis*) and rambutan (*Nephelium lappaceum*) cultivars grown in Hawaii. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 6-7, p. 655–663, 2006.
- WGO. Organização Mundial de Gastroenterologia. **Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia: Probióticos e prebióticos**. 2011. Disponível em: http://www.worldgastroenterology.org/assets/export/userfiles/Probiotics_FINAL_pt_2012.pdf. Acesso em: 11 jun. 2018.

WU, Y. W.; PAN, Q. H.; QU, W. J. DUAN, C. Q. Comparison of volatile profiles of nine litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) cultivars from Southern China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.57, n. 20, p. 9676-9681, 2009.

WU, Y.; ZHU, B.; TU, C.; DUAN, C.; PAN, Q. Generation of volatile compounds in litchi wine during winemaking and short-term bottle storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 9, p. 4923–4931, 2011.

XIAO, J.; ZHANG, R.; HUANG, F.; LIU, L.; DENG, Y.; WEI, W.; ZHANG, Y.; LIU, D.; ZHANG, M. The biphasic dose effect of lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) pulp phenolic extract on alcoholic liver disease in mice. **Food and Function**, London, v. 8, p. 189-200, 2017.

YOLA. ¿**Donde está Yola?** Disponível em:
<http://www.dondeestayola.com/2009/08/frutas-asiaticas-iii-lichi-y-logan.html>.
Acesso em 04 mar. 2019.

YU, Z. Beihai Dongyu Agricultural Science & Technology Co. Ltd. **Brewing method of low-alcohol lychee wine**. CN20141492304 20140922. Depósito: 22 set. 2014. Concessão: 10 dez. 2014.

ZENG, X. A.; CHEN, X. D.; QIN, F. G. F.; ZHANG, L. Composition analysis of litchi juice and litchi wine. **International Journal of Food Engineering**, Berlin, v. 4, n. 4, p.1-16, 2008.

ZHANG, R. F.; ZENG, Q. S.; DENG, Y. Y.; ZHANG, M. W.; WEI, Z. C.; ZHANG, Y.; TANG, X. J. Phenolic profiles and antioxidant activity of litchi pulp of different cultivars cultivated in Southern China. **Food Chemistry**, Barking, v. 136, n. 3-4, p. 1169–1176, 2013.

ZHAO, M.; YANG, B.; WANG, J.; LI, B.; JIANG, Y. Identification of the major flavonoids from pericarp tissues of lychee fruit in relation to their antioxidant activities. **Food Chemistry**, Barking, v. 98, n. 3, p. 539–544, 2006.

ZHENG, X.; YU, Y.; XIAO, G.; XU, Y.; WU, J.; TANG, D.; ZHANG, Y. Comparing product stability of probiotic beverages using litchi juice treated by high hydrostatic pressure and heat as substrates. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Wageningen, v. 23, p. 61–67, 2014.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRASQUET, I.; FRÍGOLA, A. Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain. **Food Chemistry**, Barking, v. 103, n. 4, p. 1365–1374, 2007.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e métodos empregados no desenvolvimento deste trabalho de pesquisa estão descritos no corpo dos quatro artigos científicos redigidos, sendo que cada artigo corresponde a uma etapa da pesquisa.

O projeto foi submetido ao SISGEN, sob número de autorização A4BF62A.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEL (CEP) conforme CAEE nº 56478316.8.0000.5231 e parecer 1.590.124 (Anexo 1).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no decorrer das etapas da pesquisa desenvolvida estão apresentados a seguir, na forma de quatro artigos científicos.

Esta pesquisa resultou no depósito de quatro patentes.

ARTIGO CIENTÍFICO 1: Carbohydrates, organic acids and phenolic compounds in leaves and infusion of yerba mate

ABSTRACT

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) cultivation may be native (NAT), composed of native, spontaneously growing, with variable spacing and shading, or composed of native transplanted and/or plant breeding (PLANT), cultivated in dense form or as a silvicultural consortium with eucalyptus, pinus and others. Some factors such as industrial processing and consumption form interfere qualitatively and quantitatively in bioactive compounds of mate beverages. The aim of this work was to evaluate the total phenolic compounds (TPCs) and antioxidant activity (AA), and to identify and quantify the sugars, organic acids and minerals present in NAT and PLANT leaves. A higher content of TPCs and AA was identified in PLANT than NAT mate leaves, in addition to different profiles of sugars and organic acids. So, the PLANT leaves were chosen for analysis and preparation of infusion. It was found that only a fraction of the content of minerals, TPCs and AA were preserved in the infusion. Furthermore, compounds with a potential beneficial effect on health, caffeine, theobromine, ascorbic acid, epicatechin and chlorogenic acid were leached to the infusion.

Key words: *Ilex paraguariensis*, chimarrão, caffeine, native, intentional planting

1 INTRODUCTION

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*), a native plant in South America, is consumed as *chimarrão* (or *maté*), *tereré*, hot or iced tea with fruit juice (ISOLABELLA et al., 2010, MEINHART et al., 2010).

The yerba mate has antioxidant properties and acts in cardiovascular protection, as a central nervous system stimulant, it has also effect a antimutagenic and acts in weight reduction (AZAM et al., 2003; HECK; DE MEJIA, 2007; DARTORA et al., 2011; BARG et al., 2014; BOAVENTURA et al., 2015; JANG et al., 2018). The benefits of yerba mate are due to its numerous bioactive

compounds such as saponins, phenolic acids, flavonoids and methylxanthines, whose concentrations vary according the edaphoclimatic conditions of mate tree cultivation (FRIZON et al, 2015).

Factors such as levels of radiation, progeny of plants, location and planting way interfere in the content of phenolic compounds (DONADUZZI et al, 2003; HECK et al., 2008) and in the micro and macro nutrients of mate leaves (GIULIAN et al., 2007; MARCELO et al., 2014). Frizon et al. (2015) evaluated the content of phenolic compounds in mate from different regions of the State of Paraná and observed that there is a greater content of phenolic compounds in herbal from central State, where cultivation was jointly with eucalyptus and different radiation levels.

The native mate cultivation is characterized by yerba mate trees from spontaneous growth and without spacing defined among them. There is shading or partial solar radiation level, due to the growth associated with other tree species such as *Araucaria* (*Araucaria angustifolia*) (BORGES; LÁZZARI; LAZZARI, 2003; EFFING et al., 2009).

The intentional mate cultivation consists of native plants transplanted and/or plants from genetic improvement, cultivated in thickened form or as forestry consortium with eucalyptus, pinus or others (PES et al., 1995; FRIZON et al., 2015). In consortium cultivation, the solar radiation level is variable and depends on the associated plant (PES et al., 1995).

Thus, it becomes important to check, between native mate cultivation and intentional planting, which one provides leaves with higher phenolic compounds content and antioxidant activity, besides determining the profile of minerals and bioactive compounds in mate infusions.

The bioactive compounds of mate may change qualitatively and quantitatively and depend on the industrial process and consumption form (DARTORA et al., 2011; BOAVENTURA et al., 2013). Only a fraction of the content of phenolic acids, flavonoids, methylxanthines and minerals can be carried into the aqueous fraction during the preparation of chimarrão, tereré, tea or infusion (JACQUES et al., 2007; BASTOS et al., 2014; BRAGHINI et al., 2014). Therefore, the determination of the content of bioactive compounds and minerals leached from the leaves to the infusion of yerba mate provides relevant

information to the development of products with potential benefits to health, after proper adjustment of process and formulation.

This work aimed to evaluate the total phenolic content (TPCs) and antioxidant activity (AA), identify and quantify sugars, organic acids and minerals presents in leaves of native yerba mate (NAT) and yerba mate from intentional planting (PLANT). Leaves with higher content of TPCs and AA were used to prepare an infusion, and so verify the leaching of phenolics and minerals. Antioxidant activity as well as identification and quantification of major phenolic acids, flavonoids and methylxanthines were also done.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Reagents

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), TPTZ (2,4,6-tripyridyl-S-triazine), ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), Folin-Ciocalteu reagent, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromo-2-carboxylic acid), glucose, fructose, sucrose, stachyose, mannitol, citric acid, malic acid, tartaric acid, lactic acid, succinic acid, acetic acid, ascorbic acid, gallic acid, protocatechuic acid, theobromine, paraxanthine, epigallocatechin, catechin, epicatechin, quercetin, caffeic acid, caffeine, rutin, kaempferol, chlorogenic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid, myricetin, theophylline and trigonelline were purchased from Sigma-Aldrich (purity \geq 99%). Ethanol and the other reagents were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). HPLC grade acetonitrile and methanol was purchased from J.T. Baker (Xalostoc, Mexico). The ultrapure water used in the preparation of standard solutions and extraction was produced by the Milli-Q® System (Simplicity 185, Millipore, MA, USA).

2.1.2 Yerba mate: Plant material, extracts and infusion

Plant material from native (NAT) and intentional cultivation (PLANT) of *Ilex paraguariensis* (Saint-Hilaire), with unknown age were obtained from Campina do Simão, Paraná, Brazil (25°4'8" S; 51°49'31"W; altitude: 963 m). The native cultivation was situated between Araucarias and livestock, random spacing and variable solar radiation level. The grown location of intentional cultivation was located nearby eucalyptus, pinus and others trees species, thickened form and increased incidence of sunlight compared to native cultivation.

Adult leaves were harvested in March 2015 and separated according to the origin as: native (NAT) or planted (PLANT). The leaves were washed into water and dried in an oven with forced circulation by 24h at 45 °C. They were ground into knife mill to particle size less than 3.55 mm and stored at -18 °C in polyethylene bags covered with foil (MURAKAMI et al., 2011).

The infusion was prepared by adding water at 85 °C on dehydrated and ground leaves of mate in a proportion of 1:10 (leaves: water; m:v). The infusion was maintained for 15 minutes in an open, unshielded container, filtered in paper filter (Whatman n.1) and maintained at -15 °C until the analyzes which were carried out within until 8 hours after the infusion prepare.

2.2 METHODS

2.2.1 Chemical Characterization of the leaves and the infusion

The moisture content, proteins, fibers and ash were determined according to the methods described by AOAC (2005). Total carbohydrates were estimated by difference. The mineral analyses were performed in an atomic absorption spectrometer (AAS, Varian AA-140) and in mass spectrometer by inductively coupled plasma (ICP-MS, Varian 820-MS). The results were expressed in g per 100 g (dry weight basis (dw), except the moisture). All analyses were carried out in triplicate (n = 3).

2.2.2 Determination of sugars and organic acids from mate leaves and infusion

For identification and quantification of sugars and organic acids, 1 g of mate leaves or mate infusion was homogenized in 10 mL of water, centrifuged at 9056g for 15 min. The supernatant was collected and filtered in PVDF membrane (0.22 μm Millipore, Cork, Ireland). The analyses were carried out in duplicate ($n = 2$).

The analyses were done with a Shimadzu LC 20 (Shimadzu co., Kyoto, Japan) high performance liquid chromatograph with a high pressure pump (LC-20AT), automatic injector (SIL-20AC HT), column oven (CTO-20A) and photodiode-array detector (SPD-M20A) and refractive index detector (RID-10A) coupled in series (HPLC-PDA-RID). Chromatographic analyses were in isocratic mode.

The chromatographic conditions for the determination of sugars and organic acids are described in Table 1. The wavelength of the PDA was set at 215 nm beyond scanning 200 to 400nm (Pauli, Cristiano and Nixdorf, 2011). The acquisition of data and the integration of chromatographic peaks were performed in LC software Solutions (Shimadzu co., Kyoto, Japan). The analyses were performed in duplicate ($n=2$). The results are expressed in mg/g (dw).

Table 1 - Chromatographic conditions used for the determination of sugars and organics

	Sugars	Organic acids
Mobile phase	100% ultrapure water	100% Phosphate buffer 25mM pH 2.4
Column	Aminex HPX-87P (7.8 x 300 mm)	CapCell Pak C18 (Shiseido Co., Ltd., Japan) (250 x 4.6mm x 5 μm)
Oven temperature ($^{\circ}\text{C}$)	85	40
Detector temperature ($^{\circ}\text{C}$)	40	40
Flow rate (mL/min)	1.0	1.0
Injection volume (μL)	20	20

Source: Pauli, Cristiano and Nixdorf (2011)

2.2.3 Determination of total phenolic content and antioxidant activity

The extracts were obtained from the addition of 1 g of dehydrated and ground leaves to 10 mL 80% hydroethanolic (v/v). The mixture was stirred continuously for 20 min at room temperature, centrifuged to 699 *g*/5 min and the supernatant collected. The extraction procedure was repeated twice more. The supernatants were combined and completed with 80% ethanol up to achieve 30 mL. The extracts were obtained in triplicate for each yerba mate sample (*n* = 3). The extracts were stored at -80° C until analyzes of total phenolic content and antioxidant activity.

The total content of phenolic content (TPC) was determined as described by Singleton, Orthofer; Lamuela-Raventos (1999), with some modifications. At a 0.5 mL of extract or infusion was added reagent Folin-Ciocalteu 0.9 N and 0.5 mL of sodium carbonate solution: 10% (w/v) and kept in dark for 30 min, the absorbance was read at 760 nm in spectrophotometer (Biochrom Pound S22, United Kingdom). The water was used as blank. The concentration of TPC was obtained using gallic acid as standard (4 to 24 µg/mL) and the results were expressed in µg of gallic acid equivalents (GAE) per g of sample (dw).

For the determination of the phenolics and methylxanthines composition in infusion, it was used ultra-high efficiency liquid chromatograph (UHPLC) with DAD (Acquity UPLC I Class Waters ©). A HSS C18 column (1.8 µm 2.1 × 100 mm) (Waters), using two mobile phases: Ultrapure water (A) and methanol (B), with 0.05% and 0.1% formic acid, respectively. The injection volume was 1.0 µL, 0.4 mL/min of flow rate. The separation was performed with a gradient condition (0.00 – 10.00 min: 95% phase A; 10.00-10.10 min: 95% of phase B; 10.10 – 13.00 min: 95% phase A). The Diode Array Detector (DAD) was used to scan the wavelengths between 190 and 700 nm. The reading was set in 270 and at 320 nm. The analysis was carried out in 13 min. The separation and quantification were performed in duplicate (*n* = 2). The results were expressed in µg/mL of infusion.

The antioxidant activity (AA) was evaluated by free radical reduction methods 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), and of the ABTS^{•+} (2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) and the ability of reduction from Fe³⁺ to Fe²⁺ according to Sánchez-González, Jimenez-Escrig and Saura-Calixto (2005).

For the DPPH method, was added in a tube 1 mL of 100 mM acetate buffer, pH 5.5; 1 mL of ethanol; 0.5 mL of ethanolic solution of DPPH 250 μ M and 50 μ L of sample. After 15 min of incubation in the dark at room temperature the absorbance was read at 517 nm in a spectrophotometer. The positive control did not contain sample and blank was consisted of 1 mL of acetate buffer and 1.5 mL of ethanol.

The radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ was produced from the reaction of the solution of ABTS 7 mM with potassium persulfate 2.45 mM in dark environment for 16h. The $\text{ABTS}^{\bullet+}$ was diluted in 20 mM phosphate buffer (pH 7.4) to absorbance 0.700 and it was read at 730 nm. An aliquot of 10 μ L of the sample was added in tube containing 4 mL of $\text{ABTS}^{\bullet+}$ diluted and after 6 min of reaction the absorbance, it was read at 730 nm.

The FRAP reagent has been obtained by the combination of 25 mL of acetate buffer (300 mM, pH 3.6), 2.5 mL of TPTZ (10 mM TPTZ in HCl 40 mM) and 2.5 mL of iron chloride 20 mM. The reagent was prepared at the time of analysis. After 30 μ L of sample, 70 μ L of distilled water and 900 μ L of reagent FRAP react for 30 min, in dark environment at 37° C, the absorbance was read at 595 nm spectrophotometer. Water was used as blank.

We used standard curves of Trolox (Sigma-Aldrich, Brazil) to DPPH (from 50 to 600 μ M), FRAP (from 50 to 600 μ M) and ABTS (aqueous solutions of Trolox with ethanol 80%, from 0.75 to 7.5 μ M). The results of the AA were expressed for each method in μ mol of Trolox equivalents antioxidant activity (TEAC) per g of sample (dw).

2.2.4 Statistical analysis

Data was analysed by one way Anova, considering the crop system (NAT and PLANT) as the source of variance and Tukey test. The Pearson test was applied to determine the correlation among the content of sugars, organic acids, TPC and AA of PLANT and CULT leaves. The significance level was 5%. It was considered the mean and the standard deviation for the data of the infusion. All the statistics analysis was performed using Statistica 7.1 (Statsoft, USA) (STATSOFT, 2006).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 CHARACTERIZATION OF THE MATE LEAVES

NAT and PLANT leaves were similar in relation to moisture content, fiber and lipids (Table 2). The PLANT leaves had greater ash content and total carbohydrates and less protein. Edaphoclimatic and others factors such as fertilizing, cultural practices, among others interfere on the chemical characteristics of mate leaves. Esmelindro et al. (2002), Efining et al. (2009) and Braghini et al. (2014) identified centesimal composition proximate in leaves of Brazilian yerba mate.

The PLANT leaves had higher levels of Ca, P and Fe, while NAT leaves had a higher concentration of Mg. NAT and PLANT leaves were similar in boron, manganese (both with less than 0.02 μ g/g, data not shown in Table 2) and potassium content. In general, the mineral concentration decreased in the following order: P, K, Ca, Mn and Fe. Giulian et al. (2007) and Marcelo et al. (2014) detected the same minerals, but in higher concentrations in mate PLANT.

The PLANT leaves presented a lower content of glucose and fructose than NAT leaves (Table 2). They were not detected sucrose, stachyose and mannitol in the samples. The PLANT leaves also presented lower levels of malic, tartaric, succinic and lactic acids and higher levels of citric and acetic acids than NAT leaves (Table 2). The sugars were correlated positively with citric and malic acid and negatively with succinic and lactic (Table 1 Supplementary). Naturally, the organic acids occurring in leaves of mate as a result of physiological biochemical processes. Both the presence and the content of these compounds are related to secondary reactions of glycolytic pathway and the Krebs cycle. According to Rizzon and Sganzerla (2007), malic acid in grape vines is synthesized from secondary reactions of photosynthesis in mature leaves and can use citric acid as a precursor. Souza et al. (2015) found greater content of citric acid and minor of malic acid in leaves of mate.

Table 2 - Chemical composition and antioxidant activity of leaves of native (NAT) and planted (PLANT) mate

Parameters	Yerba mate	
	NAT	PLANT
Centesimal composition (g/100 g) ¹		
Moisture	6.74 (\pm 1.54) ^a	4.57 (\pm 0.67) ^a
Proteins	16.04 (\pm 0.45) ^a	12.42 (\pm 0.56) ^b
Total fiber	19.79 (\pm 0.30) ^a	19.53 (\pm 0.38) ^a
Ash	5.82 (\pm 0.03) ^b	6.18 (\pm 0.07) ^a
Lipids	7.75 (\pm 0.21) ^a	8.13 (\pm 0.16) ^a
Total carbohydrates	50.60 (\pm 0.49) ^b	53.74 (\pm 0.19) ^a
Minerals (mg/100 g) ¹		
Potassium	667.25 (\pm 54.02) ^a	588.46 (\pm 10.97) ^a
Calcium	15.72 (\pm 4.33) ^b	41.71 (\pm 2.94) ^a
Phosphorus	7.13 (\pm 0.31) ^b	12.64 (\pm 0.25) ^a
Magnesium	2.87 (\pm 0.19) ^a	2.35 (\pm 0.15) ^b
Iron	0.019 (\pm 0.0003) ^b	0.020 (\pm 0.0002) ^a
Sugars (mg/g) ²		
Glucose	2.12 (\pm 0.01) ^a	1.03 (\pm 0.00) ^b
Fructose	2.34 (\pm 0.00) ^a	1.09 (\pm 0.00) ^b
Organic acids (mg/g) ²		
Citric acid	0.92 (\pm 0.02) ^b	1.28 (\pm 0.05) ^a
Malic acid	2.55 (\pm 0.01) ^a	2.17 (\pm 0.01) ^b
Tartaric acid	4.52 (\pm 0.04) ^a	4.51 (\pm 0.17) ^b
Lactic acid	0.75 (\pm 0.01) ^a	0.34 (\pm 0.03) ^b
Succinic acid	0.43 (\pm 0.00) ^a	0.40 (\pm 0.00) ^b
Acetic acid	0.39 (\pm 0.00) ^b	0.59 (\pm 0.00) ^a
Total phenolics and antioxidant activity ¹		
TPC ³	3.73 (\pm 0.009) ^b	4.30 (\pm 0.024) ^a
DPPH ⁴	195.62 (\pm 2.51) ^b	270.15 (\pm 5.53) ^a
FRAP ⁴	318.56 (\pm 7.83) ^b	408.31 (\pm 5.59) ^a
ABTS ⁴	573.32 (\pm 7.94) ^b	661.02 (\pm 31.35) ^a

¹Results are expressed in dry basis, except moisture, as average (n = 3) \pm standard deviation. Values followed by same letters in the same line do not differ by Tukey test (p < 0.05). ²Results are

expressed in dry basis, as average ($n = 2$) \pm standard deviation. Values followed by same letters in the same line do not differ by Tukey test ($p < 0.05$). ³Results are expressed in dry basis, as g of gallic acid equivalent per 100 g of sample ($\mu\text{g GAE/g}$). ⁴Results are expressed in dry basis, as μmol of Trolox equivalent antioxidant activity per g of sample ($\mu\text{mol TEAC/g}$). NAT: leaves of native mate; PLANT: leaves of intentional planting.

Factors like progenies of plants, soil type, level of solar radiation, presence and type of fertilizing in mate culture interfere in mineral and sugars contents (DONADUZZI et al., 2003; JACQUES et al., 2007), and consequently in organic acids contents. Among these factors, the observed differences between NAT and PLANT leaves may be related to the level of solar radiation, since the PLANT cultivation received higher incidence of solar radiation compared to NAT trees.

The TPC content (Table 2) was 14% higher in the PLANT than in the NAT leaves. These results were lower than those reported by Bravo et al. (2007) and Chandra and Mejia (2004) in aceto-methanolic extracts from mate. The efficiency of extraction of TPC depends on the polarity of solvent and the methodology employed (ANDREO; JORGE, 2006). Thus, the use of hydroalcoholic solvent in extraction process in the present study did not promote an efficient extraction of TPC. Further, the extraction of non-phenolic compounds may have occurred during extraction. Besides, it was observed higher AA through in PLANT leaves than in NAT.

It was verified a positive correlation between contents of TPC and AA (Supplementary Table 1). These results confirm the same ones reported by Bravo et al. (2007) and Anesini et al. (2012), and show that most of AA comes from phenolic compounds. Also, it showed positive correlation among the results of AA assessed by three methods.

Donaduzzi et al. (2003), Bravo et al. (2007), Dartora et al. (2011) pointed a relationship among edaphoclimatic factors, content of TPC and AA in mate leaves. In this way, the higher incidence of sunlight also provided higher TPC and AA to PLANT leaves.

3.2 CHARACTERISTICS OF INFUSION FROM MATE PLANT LEAVES

As the typical consumption of mate is in the form of chimarrão or tereré, an infusion from leaves was prepared to study the leaching percentage of minerals

and TPC, AA retention also determining the main phenolic compounds and methylxanthines for the infusion.

Comparing the content of minerals, TPC and AA in 1 g of PLANT leaves and infusion prepared with the same mass of leaves, a reduction was observed in these parameters (Figure 1). Only a fraction of these compounds were dissolved in hot water and consequently was leached for the infusion. The minerals are part of numerous physiological processes in leaves of mate and their accessibility and solubility are related to the location and function of each of them in the plant tissue (BASTOS et al., 2014; MARCELO et al., 2014). The ways of processing and extraction of the leaves interfere in the minerals content spread during the preparation of the infusion of mate (MARCELO et al., 2014). So, there was a difference in the percentage of each mineral leached for the infusion. The elements Mg, Ca and P had a higher retention percentage in the mate leaves, while Fe and K showed the higher water solubility and subsequent leaching (about 28 and 16%, respectively).

It was observed the following content of minerals in infusion: 9.4; 2.51; 0.8; 1.2; 0.005 mg/100 g, respectively for K, Ca, P, Mg and Fe. Although, only a fraction of the minerals was leached, this content should be considered for the consumption of beverage or development of infusion products. Higher concentrations of minerals were identified by Heinrichs and Malavoltam (2001) in infusions of mate.

The TPC content observed in the infusion was of 11 mg GAE/g (dw.), i.e. almost 76% less than the one found in PLANT leaves. This demonstrates that only the hot water was not efficient to leach all TPCs. Pagliosa et al. (2010) indicated that the phenolic compounds may be linked to the polysaccharides in the cell wall, being found in suber cells and sclerenchyma in bark from residues from mate tree. This indicates that part of phenolic compounds are lignified and in regions with difficult extraction in the tissues of the leaves of yerba mate. Bravo et al. (2007) found higher contents of TPCs (7.76-8.12 g GAE/100 g) and AA (803-846 $\mu\text{mol TEAC/g}$) by FRAP assay in infusions from commercial yerba mate than observed in this study.

It was noted a decrease in AA of the infusion in relation to PLANT leaves, 39, 76 and 92% for the methods FRAP, DPPH, ABTS, respectively. Since the AA

of mate is related to the TPC (BRAVO et al., 2007), the reduction on AA was due to the low leaching of TPC to infusion.

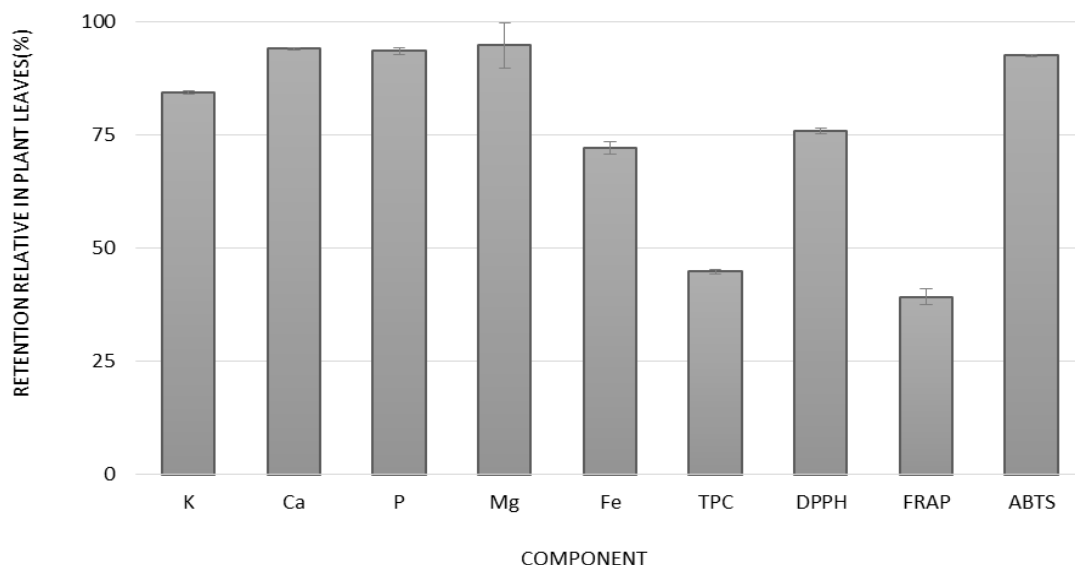


Figure 1 - Retention percentage of mineral content, TPC and AA after the preparation of mate infusion from PLANT leaves

¹Average percent reduction calculated from the comparison between the results determined in 1 g of leaves of mate PLANT and infusion prepared from 1 g of leaves PLANT. PLANT: leaves of intentional planting.

By chromatographic analysis (with 19 standards) were identified 17 compounds in PLANT infusion (Figure 2). Six of these were phenolic acids (gallic acid, protocatechuic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, p-coumaric acid and ferulic acid), three were methyl xanthines (theobromine, paraxanthine and caffeine) and five flavonoids (catechin, epigallocatechin, epicatechin, rutin and kaempferol). Bravo et al. (2007) identified similar profile of phenolic compounds in mate and infusion. As in this study were employed 19 standard compounds for analysis, the result indicates adequate discrimination and quantification. Ascorbic acid and nicotinic acid were also identified but were not detected trigonelline, quercetin, theophylline and sinapic acid. Among the compounds identified (Table 3), there was a greater relative concentration of the bioactive compounds caffeine (66%), theobromine (19%), ascorbic acid (8%), epicatechin (1.7%) and chlorogenic acid (1.5%).

The caffeine content was similar to the one observed by Anesini et al. (2012), Isolabella et al. (2010) and Meinhart et al. (2010), in leaves and infusion of commercial yerba mate and higher than those indicated by Pagliosa et al. (2010)

in the waste processing of mate. Anesini et al. (2012) found greater concentration of chlorogenic acid, caffeic acid and rutin while Isolabella et al. (2010) indicated greatest content of rutin and theobromine. Pagliosa et al. (2010) also identified theophylline and 4.5 dicaffeoylquinic acid and smaller contents of theobromine, chlorogenic acid and caffeic acid.

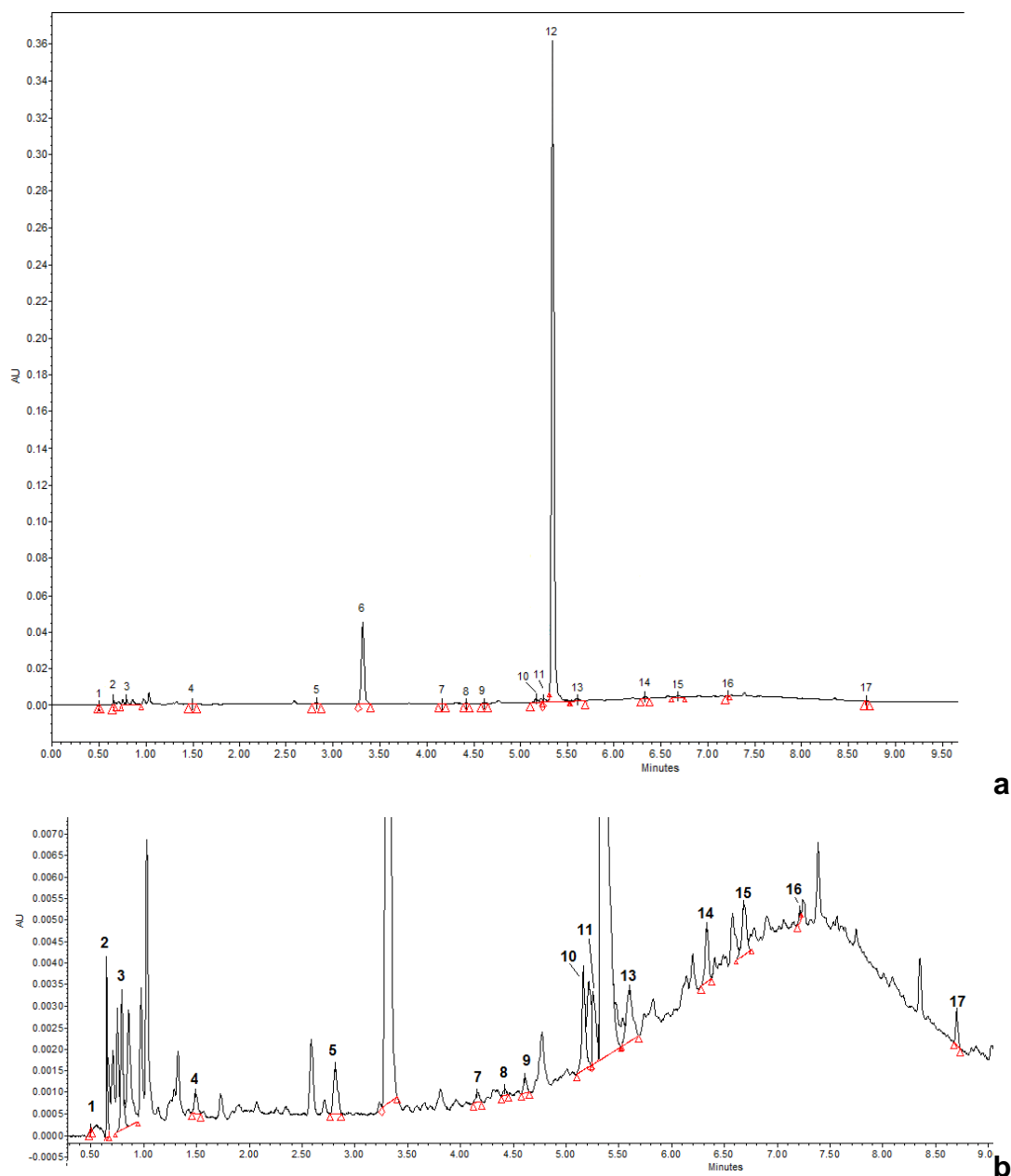


Figure 2 - UHPLC chromatogram of yerba mate infusion from PLANT leaves: (a) sign in 270 nm; (b) sign extended in 270 nm

PLANT: leaves of intentional planting. 1: Trigonelline; 2: Ascorbic acid; 3: Nicotinic acid; 4: Gallic acid; 5: Protocatechuic acid; 6: Theobromine; 7: Paraxanthine; 8: Epigallocatechin; 9: Catechin; 10: Chlorogenic acid; 11: Caffeic acid; 12: Caffeine; 13: Epicatechin; 14: P-coumaric acid; 15: Ferulic acid; 16: Rutin; 17: Kaempferol

The p-coumaric acid and ferulic acid were identified in mate infusion. Pagliosa et al. (2010) also detected such compounds in leaves and in waste production of yerba mate, indicating that both acids are common constituents of cell walls.

According to Dartora et al. (2010), during the drying of mate leaves occur plant cells disruption occurs resulting in greater extraction of caffeine during the infusion preparation. Possibly drying and grinding of the leaves increased the hydroextraction and consequent leaching of methyl xanthines, phenolic acids and flavonoids during the infusion preparation.

Table 3 - Concentration of bioactive compounds in infusion of yerba mate PLANT¹

	Compound ²	RT (min)	µg/mL
1	Trigonelline	0.498	B.d.
2	Ascorbic acid	0.651	93.51 (±1.80)
3	Nicotinic acid	0.798	13.48 (±0.10)
4	Gallic acid	1.491	0.51 (±0.06)
5	Protocatechuic acid	2.819	3.20 (±0.10)
6	Theobromine	3.311	223.01 (±1.44)
7	Paraxanthine	4.162	0.89 (±0.05)
8	Epigallocatechin	4.415	0.055 (±0.07)
9	Catechin	4.612	6.45 (±0.50)
10	Chlorogenic acid	5.166	18.13 (±2.34)
11	Cafeic acid	5.25	7.90 (±2.87)
12	Caffeine	5.345	778.87 (±1.00)
13	Epicatechin	5.605	20.25 (±0.59)
14	P-coumaric acid	6.330	2.58 (±0.22)
15	Ferulic acid	6.678	5.23 (±0.00)
16	Rutin	7.208	0.001 (±0.01)
17	Kaempferol	8.694	5.08 (±0.27)

¹Results are expressed as average (± standard deviation). Infusion at 10% (w/v), prepared from the leaves of mate PLANT. ² As described in Liu (2004). PLANT: leaves of intentional planting. B.d.: Below detection limit; RT: retention time.

4 CONCLUSIONS

The leaves of yerba mate from intentional planting system have higher contents of total phenolic compounds and antioxidant activity than native yerba mate. The leaves of yerba mate from intentional planting system also presented different profiles of sugars and organic acids when compared to those of native yerba mate.

Only a fraction of mineral, phenolic contents, and antioxidant activity are preserved in the mate infusion. Compounds such as caffeine, theobromine, ascorbic acid, chlorogenic acid and epicatechin are leached from the leaves to the yerba mate infusion. Therefore, an infusion of yerba mate has potential beneficial health effect, either in direct consumption or as an ingredient for the development of products.

5 REFERENCES

- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 319-326, 2006.
- ANESINI, C.; TURNER, S.; COGOI, L.; FILIP, R. Study of the participation and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 45, n. 2, p. 299-304, 2012.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists**. 18 ed. Maryland: AOAC, 2005. 1094 p.
- AZAM, S.; HADI, N.; KHAN, N. U.; HADI, S. M. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. **Medical Science Monitor**, Warsaw, v. 9, n. 9, BR 325-330, 2003.
- BASTOS, M. C.; REISSMANN, C. B.; KESEKERC J. F.; PAULETTI, V.; GAIAD, S.; STURION, J. A. Mineral content of young leaves of yerba mate. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 34, n. 77, p. 63-71, 2014.
- BARG, M.; REZIN, G. T.; LEFFA, D. D.; BALBINOT, F.; GOMES, L. M.; CARVALHO-SILVA, M.; VUOLO, F.; PETRONILHO, F.; DAL-PIZZOL, F.; STRECK, E. L.; ANDRADE, V. M. Evaluation of the protective effect of *Ilex paraguariensis* and *Camellia sinensis* extracts on the prevention of oxidative

damage caused by ultraviolet radiation. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam v. 37, n. 1, p.195-201, 2014.

BOAVENTURA, B. C. B.; MURAKAMI, A. N. N.; PRUDENCIO, E. S.; MARASCHIN, M.; MURAKAMI, F. S.; AMANTE, E. R.; AMBONI, R. D. M. C. Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) through freeze concentration technology. **Food Research International**, Essex, v. 53, n. 2, p. 686-692, 2013.

BOAVENTURA, B. C. B.; AMBONI, R. D. M. C.; SILVA, E. L.; PRUDENCIO, E. S.; DI PIETRO, P. F.; MALTA, L. G.; POLINATI, R. M.; LIU, R. H. Effect of in vitro digestion of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) extract on the cellular antioxidant activity, antiproliferative activity and cytotoxicity toward HepG2 cells. **Food Research International**, Essex, v. 77, n. 2, p. 257-263, 2015.

BORGES, L.; LÁZZARI, S. M. N.; LÁZZARI, F. A. Comparação dos sistemas de cultivo nativo e adensado de erva mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil., quanto à ocorrência e flutuação populacional de insetos. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 47, n. 4, p. 563-568, 2003.

BRAGHINI, F.; DE CARLI, C. G.; BONSAGLIA, B.; JUNIOR, J. F. S. S.; OLIVEIRA, D. F.; TRAMUIAS, J.; TONIAL, I. B. (2014). Composição físico-química de erva-mate, antes e após simulação do chimarrão. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 20, n. 1/2, p. 7-15, 2014.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, Essex, v. 40, n. 3, p. 393-405, 2007.

CHANDRA, S.; DE MEJIA, G. E. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 11, p. 3583-3589, 2004.

DARTORA, N.; SOUZA, L. M.; SANTANA-FILHO, A. P.; IACOMINI, M.; VALDUGA, A. T.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. (2011). UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**, Barking, v. 129, n. 4, p. 1453-1461, 2011.

DONADUZZI, C. M.; JUNIOR, E. L.C.; DONADUZZI, E. M.; DA SILVA, M. M.; STURION, J. A.; CORREA, G. Variação nos teores de polifenóis totais e taninos em dezesseis progênies de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) cultivadas em três municípios do Paraná. **Arquivo de Ciências da Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 7, n. 2, p. 129-133, 2003.

EFING, L. C.; CALIARI, T. K.; NAKASHIMA, T.; DE FREITAS, R. J. S. Caracterização química e capacidade antioxidante da erva-mate (*Ilex*

paraguariensis St. Hil.). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 27, n. 2, p. 241-246, 2009.

ESMELINDRO, M. C.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D. Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 193-204, 2002.

FRIZON, C. N. T.; OLIVEIRA, G. A.; PERUSSELLO, C. A.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; CAMLOFSKI, A. M. O.; ROSSA, U. B.; HOFFMANN-RIBANI, R. Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 60, p. 795-801, 2015.

GIULIAN, R.; DOS SANTOS, C. E. I.; SHUBEITA, S. M.; DA SILVA, L. M.; DIAS, J. F.; YONEAMA, M. L. Elemental Characterization of Commercial Mate Tea Leaves (*Ilex paraguariensis* St.-Hil.) before and after Hot Water Infusion Using Ion Beam Techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n.3, p. 741-746, 2007.

HECK, C. I., SCHMALKO, M., & DE MEJÍA, G. (2008). Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of mate teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, 56 (18), 8394-8403. DOI: 10.1021/jf801748.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, n.9, p. 138-151, 2007.

HEINRICH, R.; MALAVOLTA, E. Mineral composition of a commercial product from mate-herb (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 781-785, 2001.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. (2005). **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. (4th ed.) São Paulo, SP: Instituto Adolfo Lutz.

ISOLABELLA, S.; COGOI, L.; LÓPEZ, P.; ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, Barking, v. 122, n. 3, p. 695-699, 2010.

JACQUES, R.A.; ARRUDA, E.J.; OLIVEIRA, L.C.S.; OLIVEIRA, A.P.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J.V.; CARAMÃO, E.B. Influence of agronomic variables on the macronutrient and micronutrient contents and thermal behavior of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 18, p. 7510-7516, 2007.

JANG, S.; HOSSAIN, A.; LEE, J. S.; REZA, A.; LEE, S.; KANG, J. W.; PARK, S. Hepatoprotective effects of *Ilex paraguariensis* St. Hilaire (Yerba mate) extract in rats. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, New Delhi, v. 17, n. 4, p. 707-715, 2018.

MARCELO, M. C. A.; MARTINS, C. A.; POZEBON, D.; DRESSLER, V. L.; FERRAO, M. F. Classification of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) according to the country of origin based on element concentrations. **Microchemical Journal**, New York, v. 117, p. 164–171, 2014.

MEINHART, A. D.; BIZZOTTO, C. S.; BALLUS, C. A.; RYBKA, A. C. P.; SOBRINHO, M. R.; CERRO-QUINTANA, R. S.; TEIXEIRA, J.; GODOY, H. T. Methylxanthines and phenolics content extracted during the consumption of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) Beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, n. 4, p. 2188-2193, 2010.

MURAKAMI, A. N. N.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDENCIO, E. S.; AMANTE, E. R.; ZANOTTA, L. M.; MARASCHIN, M.; PETRUS, J. C.; TEOFILO, R. F. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 44, p. 2211-2216, 2011.

PAGLIOSA, C. M.; VIEIRA, M. A.; PODESTÁ, R.; MARASCHIN, M.; ZENI, A. L. B.; AMANTE, E. R.; AMBONI, R. D. M. C. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Food Chemistry**, Barking, v. 122, n. 1, p. 173-178, 2010.

PAULI, E. D.; CRISTIANO, V.; NIXDORF, S. L. Método para determinação de carboidratos empregado na triagem de adulterações em café. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 689-694, 2011.

RIZZON, L. A.; SGANZERLA, V. M. A. Ácidos tartárico e málico no mosto de uva em Bento Gonçalves-RS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 911-914, 2007.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). **Food Chemistry**, Barking, v. 90, n. 1-2, p. 133-139, 2005.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, New York, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOUZA, A. H. P.; CORRÊA, R. C. G.; BARROS, L.; CALHELHA, R.; SANTOS-BUELGA, C.; PERALTA, R. M.; BRACHT, A.; MATSUSHITA, M.; FERREIRA, I. C. F. R. Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex paraguariensis*: An in-vitro comparative study between the whole plant, leaves and stems. **Food Research International**, Essex, v. 78, p. 286–294, 2015.

STATSOFT. **STATISTICA for Windows: computer program manual**. Versão 7.1. [Tulsa]: Software Inc., 2006.

6 SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material: Table 1 - Pearson correlation coefficients among sugars, organic acids, TPC and antioxidant activity of leaves of yerba mate PLANT and NAT ¹

	FRU	CIT	ACE	MAL	TAR	LAT	SUC	TPC	DPPH	FRAP	ABTS
GLU	1.000*	0.994*	-0.992*	-0.998*	0.691	-0.993*	-0.819*	-0.999*	-0.006*	-0.991*	-0.919*
FRU	1.000	0.994*	-0.991*	-0.999*	0.683	-0.994*	-0.820*	-0.998*	-0.996*	-0.993*	-0.921*
CIT		1.000	-0.980*	-0.991*	0.683	-0.993*	-0.840*	-0.997*	-0.991*	-0.990*	-0.877*
ACE			1.000	0.984*	-0.683	0.973*	0.797	0.992*	0.993*	0.975*	0.912*
MAL				1.000	-0.679	0.995*	0.816*	0.996*	0.992	0.993*	0.927*
TAR					1.000	-0.652	-0.512	-0.693	-0.681	-0.634	-0.646
LAT						1.000	0.862*	0.991*	0.990*	0.999*	0.889*
SUC							1.000	0.816*	0.853*	0.874*	0.580
TPC								1.000	0.994*	0.989*	0.907*
DPPH									1.000	0.992*	0.898*
FRAP										1.000	0.886*
ABTS											1.000

¹ Relative parameters from PLANT and NAT leaves

*Significant ($p \leq 0,05$)

GLU: glucose (mg/g); FRU.: fructose (mg/g); CIT: citric acid (mg/g); ACE: acetic acid (mg/g); MAL: malic acid (mg/g); TAR: tartartaric acid (mg/g); LAT: latic acid (mg/g); SUC: succinic acid (mg/g); TPC: Total Phenolic Content (μg GAE/g); DPPH: Antioxidant activity by DPPH assay (μmol TEAC/g); FRAP: Antioxidant activity by FRAP assay (μmol TEAC/g); ABTS: Antioxidant activity by ABTS assay (μmol TEAC/g); PLANT: leaves of intentional planting NAT: leaves of native mate.

ARTIGO CIENTÍFICO 2: Lychee (*Litchi chinensis*) and yerba mate (*Ilex paraguariensis*) mixed beverage with high antioxidant potential

ABSTRACT

This study aimed to develop a mixed beverage with high phenolic compounds content and antioxidant activity (AA), and good acceptance using different lychee and yerba mate proportions (10 to 90% v/v). Beverages presented physicochemical and sensory characteristics, AA, phenolic compounds content and satisfactory acceptance after pasteurization. Beverages with higher yerba mate proportions had higher phenolic compounds levels, antioxidant activity, aroma and taste of yerba mate, astringency and dark color. Those containing higher lychee proportions presented more lychee aroma and flavor, sweetish, fruit acidity, viscosity and particulate material. There was positive correlation among proportion of yerba mate and phenolic compounds content and AA. The proportion of lychee showed positive correlation with viscosity and acceptance. The test of desirability pointed out that a beverage with 70% of lychee and 30% of yerba mate assembles the maximum phenolic compounds content and AA, with good acceptance.

Key words: juice, total phenolic compounds, pasteurization, sensory evaluation, desirability.

1 INTRODUCTION

The lychee (*Litchi chinensis* Sonn), originating in China (ZHANG et al., 2013), has fleshy pulp, color and aromas. It can be consumed in syrup, powder, dehydrated and in the juice form (ZHENG et al., 2014). The lychee presents a limited lifetime and its processing is an alternative to the surplus production (JAYACHANDRAN; CHAKRABORTY; RAO, 2015). The pericarp, seed and pulp of lychee have antioxidant properties, anti-inflammatory, antibacterial, antiallergic,

hepatoprotective, anticancer, antiviral, vasodilator and neuroprotective effects (ZHANG et al., 2013; SU et al., 2014).

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*, Saint-Hilaire) is native to subtropical regions of South America and is very consumed in the form of hot beverage as chimarrão or mate, or cold one as tereré (BOAVENTURA et al., 2013). For the preparation of beverages, the leaves and other aerial parts of the plant are usually employed, after fragmentation and drying (MEINHART et al., 2010; ISOLABELLA et al., 2010).

Various bioactive compounds are present in yerba mate, like polyphenols, alkaloids, flavonoids and triterpenoid saponins (HECK; DE MEJÍA, 2007; ISOLABELLA et al., 2010). Studies show that these compounds can act in the metabolism of lipids (BRAVO et al., 2014), cardiovascular protection (BRAVO et al., 2014). They also present antioxidant (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007; ISOLABELLA et al., 2010) and chemopreventive properties (MEJÍA et al., 2010), besides acting as a stimulant and protector of the central nervous system (SANTOS et al., 2015; HECK et al., 2007).

In addition to presenting bioactive compounds, lychee and yerba mate have essential minerals to the diet whose composition and concentration may vary as a function of edaphoclimatic factors (WALL, 2006; GIULIAN et al., 2007).

The mixture of fruits and vegetables in beverages is a way to use fruit and/or vegetable extracts underutilized and often discarded or overlooked by features like low total soluble solids (TSS), outstanding flavor, high acidity, astringency and bitterness (JAYACHANDRAN et al., 2015). The lychee juice presents a rich and pleasant flavor with potential for use in mixed beverages with fruit or vegetable extracts, such as yerba mate. In this way, a beverage made by lychee juice and yerba mate infusion can be an option of beverage with good sensory characteristics and antioxidant potential.

The main objective of the study was to develop a mixed beverage of lychee and yerba mate with high phenolic compounds content and antioxidant activity and good sensory acceptance. Formulations with different proportions of each component and were characterized regarding physical and sensory attributes and the effect of pasteurization on the physicochemical characteristics was also studied.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 MATERIAL

Lychees (*Litchi chinensis* Sonn.) cultivar Bengal, harvested in 2014, were obtained from producers in the region of Umuarama, Paraná, Brazil (23 °45 '57 "S; 53 °19' 30" and altitude of 442 m). About 195 kg of fruit have been sanitized with sodium hypochlorite solution (100 ppm v/v) for 5 min, washed and peeled manually. The pulp (15.8 °Brix) was processed in fruit pulper (Silva, model MS-200, Brazil) and it was wrapped in polyethylene bags and stored at -15 °C until its use and analysis. For the preparation of the mixed beverages, the pulp was thawed at 4 °C and filtered in 200 mesh to obtain the juice.

Approximately 65 kg of *Ilex paraguariensis* (Saint-Hilaire) leaves were harvested in Campina do Simão, Paraná, Brazil (25 °4 ' 8 " S; 51 °49 ' 31 " and altitude: 963 m) in March 2015. The leaves were washed into drinking water and dried in an oven with forced circulation by 24 h at 45 °C. The dehydrated leaves were ground into knife mill to particle size less than 3.5 mm, stored in polyethylene bags and covered with aluminum foil at -18°C (MURAKAMI et al., 2011).

The yerba mate infusion was prepared from the addition of 150 mL of water at 85 °C to 1.5 g of dehydrated and grounded leaves. The infusion was maintained in rest for 15 min, filtered (Whatman nº 1) and added water complete 150 mL (BRAVO et al., 2007). The infusion was stored at -15 °C until use. This procedure was performed on the same day of the beverages preparation or the analysis.

2.2 METHODS

2.2.1 Preparation of the mixed lychee and yerba mate beverages

From preliminary tests, five beverages were formulated with different proportions of litchi juice and yerba mate infusion as described in Table 1. The total soluble solid content (TSS) was fixed with sucrose to 12 °Brix and pH was adjusted to 4.5 with aqueous solution of citric acid, 20% (w/v). The mixed beverages were bottled in 500 mL glass bottles, pasteurized in a water bath (80

°C/20 min), cooled to 37 °C in ice bath and stored at 4 °C until analysis, according to Pimentel et al. (2015). Through research of coliforms at 45 °C and *Salmonella* sp was confirmed that the pasteurization the attending of brazilian legislation (BRAZIL, 2001). The formulations of the mixed beverages were prepared in two repetitions.

Table 1– Mixed lychee and yerba mate beverage formulation

Formulation	Percentual of the component (%v/v)	
	Lychee juice	Yerba mate infusion
F1	90	10
F2	70	30
F3	50	50
F4	30	70
F5	10	90

Formulation with lychee and yerba mate different proportions: F1 (90:10); F2 (70:30); F3 (50:50); F4 (30:70); F5 (10: 90).

2.2.2 Physical and chemical analyses of the beverages

The analyses were carried out in triplicate for each repetition of the formulation (n = 6).

Right after preparation, it was determined the total titratable acidity (ATT) and mineral content in the non-pasteurized beverages. ATT was estimated from the titration with NaOH 0.1 M and the result expressed in g/100 mL citric acid (IAL, 2005). The mineral analysis of the elements Mg, Co, Cr, Cu, B, Mn, Fe, Zn and Mo was performed in induced argon plasma with detection by mass spectrometer (ICP-MS, Varian 820-MS) and Ca in an atomic absorption spectrometer (AAS, Varian AA-140), as 984.27 and 985.35 methods respectively (AOAC, 2005).

The viscosity was measured by Brookfield viscometer (model DV-II, Harlow, United Kingdom) using 4 to 100 rpm spindle and 25 °C. The color was determined in digital colorimeter (Minolta CR-300, Japan), D65 illuminant and 45°/0° geometry utilizing a CR-A33A accesory. Hue was calculated ($h^\circ = \arctan b^*/a^*$).

The total phenolic content (TPC) was determined by Singleton, Orthofer and Lamuela-Raventos (1999) method, with some modifications. In 0.5 mL of beverage or standard was added 0.5 mL of Folin-Ciocalteau reagent 0.9 N, 0.5 mL

of sodium carbonate 10% (w/v) and was maintained for 30 min in dark place. The absorbance was read at 760 nm in spectrophotometer (Biochrom Pound S22, United Kingdom). The water was used as blank. The TPC was obtained from the standard curve of gallic acid (4 to 24 μ g/mL) and the results were expressed in μ g of gallic acid equivalents (GAE) per mL.

The AA was evaluated by free radical reduction 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), the cation ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) and the ability to reduce Fe³⁺ to Fe²⁺ according to Sánchez-González, Jiménez-Escrig and Saura-Calixto (2005).

In DPPH assay, into a tube, was added 1 mL of 100 mM acetate buffer, pH 5.5; 1 mL of ethanol; 0.5 mL of ethanolic DPPH 250 μ M and 50 μ L of sample. After 15 min of incubation in the dark at room temperature, the absorbance was read at 517 nm in a spectrophotometer. The positive control did not contain sample. The blank was made up of 1 mL of acetate buffer and 1.5 mL of ethanol.

The radical ABTS^{•+} was produced from the reaction of ABTS 7 mM with potassium persulfate 2.45 mM in dark place for 16h. The ABTS^{•+} was then diluted in 20 mM phosphate buffer (pH 7.4) to absorbance of 0.700 at 730 nm. An aliquot of 10 μ L of the sample was added in tube containing 4 mL of ABTS^{•+} diluted and after 6 min of reaction the absorbance was read at 730 nm.

The FRAP reagent was obtained from the combination of 25 mL of acetate buffer (300 mM, pH 3.6), 2.5 mL of TPTZ (10 mM TPTZ in HCl 40 mM) and 2.5 mL of iron chloride 20 mM. The reagent was prepared at the time of analysis. After 30 μ L of sample to react with 70 μ L of distilled water and 900 μ L of reagent FRAP in dark place at 37 °C for 30 minutes, the absorbance was read at 595 nm spectrophotometer. Water was used as blank.

It was used curves of Trolox (Sigma-Aldrich, Brazil) to DPPH (from 50 to 600 μ M), FRAP (from 50 to 600 μ M) and ABTS (aqueous solutions of Trolox and ethanol 80%, from 0.75 to 7.5 μ M). The AA results were expressed for each method in μ mol of Trolox equivalents (TEAC) per mL of sample.

2.3 SENSORY ANALYSIS

The sensory tests were carried out in individual cabins under white light. The samples (30 mL) were served at 7 ± 2 °C in coded plastic cups with three-digit random numbers. The order of presentation of the samples was random for each assessors. Drinking water at room temperature and cracker biscuits were served among samples for cleaning the oral cavity. The procedures were approved by the Committee of ethics in Research Involving Humans (certificate CAAE n°56478316.8.0000.5231).

The descriptive analysis by Flash Profile was applied as described by Terhaag and Benassi (2011) employing a single session for each assessor and using a team of 19 untrained assessors. For survey of attributes, the beverages were presented simultaneously and the assessors were asked to note the similarities and differences. An evaluation form and a list with definitions of attributes were prepared, the samples were resubmitted simultaneously and requesting them to be sorted in ascending order of intensity for each attribute.

To evaluate the acceptance, 100 usual or potential consumers of fruits and mate tea beverages were employed (65% reported that they would ingest an average of 3.93 liters of juice fruit per month). The team consisted of 54 women and 46 men, with high schooling (87% had undergraduate or graduate) and young people (80% aged between 18 and 30 years). The beverages were presented monadically and a structured hybrid scale of ten centimeters was used (0 = disliked very much, 10 = liked very much) for the evaluation of the attributes of color, aroma, texture, flavor and global acceptance (VILLANUEVA; PETENATE; DA SILVA, 2005).

2.4 STATISTICAL ANALYSIS

The mineral content and ATT were analyzed by analysis of variance (ANOVA) of a factor (formulation). Other physical and chemical analysis data were treated by two-factor ANOVA (formulation and pasteurization) and the interaction among the factors. The sensory acceptance data were submitted to two-factor ANOVA (beverages and assessors).

For comparison of means, the Tukey test was used. The Pearson test was applied to determine the correlation among the components proportions in the formulation, the TPC, antioxidant activity and global sensory acceptance. The significance level of 5% was considered. It was employed the program Statistica 7.1 (STATSOFT, 2006) for the analysis.

Flash profile data were analyzed by Generalized Procrustes Analysis, using the Senstools program Version 2.3.28 (OP & P PRODUCT RESEARCH, 1998).

2.5 MATHEMATICAL OPTIMIZATION OF MIXED BEVERAGE FORMULATION BY SENSORY ACCEPTABILITY, TPC AND ANTIOXIDANT ACTIVITY

It was applied the test of desirability of the Statistica 7.1 program (STATSOFT, 2006) to the studied formulation data (Table 1) to find a formulation that would present greatest AA and content of TPC, and sensory acceptability \geq 6.0 (10 cm scale).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 TOTAL TITRATABLE ACIDITY AND MINERAL CONTENT OF NON PASTEURIZED MIXED BEVERAGES

The formulations presented total titratable acidity (TTA) from 0.17 (F5) to 0.26 g (F1) of citric acid/100 mL (Table 2), the acidity increase with increased lychee proportion. TTA in the beverage formulated with higher proportion of lychee was similar to verified by Vijayanand, Kulkarni and Prathibha (2010) in lychee juice.

Table 2 – Total titratable acidity and mineral content of mixed lychee and yerba mate beverages unpasteurised¹

	F1	F2	F3	F4	F5
TTA (g citric acid/100 mL)	0.26 ^a ± 0.002	0.25 ^a ± 0.002	0.23 ^b ± 0.004	0.22 ^b ± 0.004	0.17 ^c ± 0.004
Minerals					
K [µg/ mL]	1131.85 ^b ± 4.20	1392.96 ^{ab} ± 0.70	630.30 ^c ± 51.8	666.04 ^c ± 0.3	1520.27 ^a ± 17.00
P [µg/ mL]	9.72 ^a ± 0.20	9.36 ^a ± 0.3	9.34 ^a ± 0.20	7.52 ^b ± 0.30	9.06 ^a ± 0.20
Ca [µg/ mL]	6.42 ^a ± 1.10	5.53 ^a ± 0.3	6.50 ^a ± 2.90	6.98 ^a ± 0.03	8.38 ^a ± 0.01
Mg [µg/ L]	4.75 ^b ± 4.3e-5	4.04 ^b ± 0.04	4.41 ^b ± 0.33	4.16 ^b ± 0.12	27.67 ^a ± 0.11
Fe [µg/ L]	3.00 ^b ± 1,1e-4	24.70 ^a ± 4.80	6.70 ^b ± 0.40	33.10 ^a ± 3.60	25.60 ^a ± 0.20
B [µg/ L]	nd	4.80 ^a ± 0.07	5.20 ^a ± 0.60	4.50 ^a ± 0.06	4.60 ^a ± 0.60
Mn [µg/ L]	nd	nd	2.70 ^b ± 0.05	2.70 ^b ± 0.06	10.3 ^a ± 0.70
Cr [µg/ L]	nd	nd	nd	nd	0.10 ^a ± 0.006

¹ Results are expressed as average (n = 6) ± standard deviation. Statistically significant differences are noted by different superscript letters within a line (p ≤ 0.05).

TTA: Total titratable acidity (g citric cid/100 mL)

nd: not detected

Formulation with lychee and yerba mate different proportions: F1 (90:10); F2 (70:30); F3 (50:50); F4 (30:70); F5 (10: 90).

For mineral contents (Table 2), F5 beverage had higher K, Mg and Mn content (1520.3 g/mL, 27.67 μ g/L and 10.3 μ g/L, respectively). It was observed that F4 showed lower levels of P. The calcium levels were similar among formulated beverages (5.53 to 8.38 μ g/mL). The beverage which contained 90% of lychee juice (F1), presented 1131.85 μ g/mL of K, a low content of Fe (3 μ g/L) and absence of Mn, B and Cr elements. The K contents were higher than those found by Wall (2006) (1307 to 1806 μ g/g) in lychee pulp grown in Hawaii.

Overall, beverages presented a decreasing content of minerals, in the following order: K, P, Ca, Mg and Fe. This result was similar that found by Marcelo et al. (2014) in yerba mate leaves. The levels of K (1185 ppm) determined by Shakti et al. (2007) were close to those found in the mixed beverages with \geq 50% yerba mate infusion.

3.2 PASTEURIZING EFFECT ON PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF MIXED BEVERAGES

3.2.1 Viscosity

The viscosity of non-pasteurized beverage ranged from 7.56 (F5) to 9.88 cP (F1) (Table 3) and it was higher than that one observed by Zheng et al. (2014) in lychee juice (4.03 cP) with the increase in the proportion of infusion of yerba mate the mixed beverages resulted in less viscous.

Pasteurization caused a decrease in beverages viscosity, whose values were between 6.81 (F5) and 8.00 cP (F1). This reduction in viscosity may have occurred by hydrolytic enzymes acting on the formulated beverages polysaccharides. Huang et al. (2014) mentioning that there is a relationship between the degradation of lychee pulp polysaccharides and action of the hydrolytic enzymes that were not thermally inactivated. Furthermore, the authors observed the action of hydrolytic and pectinase enzymes in studies with drying at 55 °C. In pasteurized beverages, there was positive correlation among the viscosity and the proportion of lychee ($r = 0.97$) and inversely with the ratio of infusion ($r = -0.97$) (Supplementary table 1).

It was observed a precipitate formation in the beverages after the pasteurization. This precipitation can be formed by pectin aggregation with other

materials of cell walls (SIMS; BALABAN; MATTHEUS, 1993) from lychee juice and the yerba mate infusion, such as proteins, lipids, neutral polysaccharides, minerals and organic acids (GENOVESE; LOZANO, 2006) since both the lychee juice and the infusion of yerba mate were not subjected to any enzyme treatment. In non-clarified juices the dispersed material is mainly formed by the crushed tissue during the fruit processing (BENITEZ et al., 2006).

3.2.2 Color parameters

Beverages presented h° values between 35.6 (F3) and 78.05 (F1) right after the preparation and between 29.68 (F4) and (F1) 75.97 after pasteurization. In general, beverages containing higher lychee proportions were more yellowish and the increase in yerba mate proportion conferred a reddish hue to the beverages. Pasteurization did not alter the hue of the beverages.

3.2.3 Total phenolics content (TPCs) and antioxidant activity (AA)

The TPCs of non-pasteurized beverages ranged from 854.08 (F1) to 3243.18 (F5) $\mu\text{g/mL}$ GAE (Table 3). The beverage with 90% yerba mate infusion showed the highest level of TPC than the others, due the high content of polyphenols presents in yerba mate (HECK et al., 2007; MEJÍA et al., 2010). Jayachandran et al. (2015) reported a TPC of 336 μg GAE/mL after the preparation of mixed beverage of lychee, coconut water and lemon.

The TPC observed in mixed lychee and yerba mate beverages was higher than that pointed in mate tea, white and rosé wines and in orange juice (BRAVO et al., 2007). Beverages containing more than 50% of yerba mate infusion showed a higher content of phenolic than in samples of red wine, green tea, black tea (BRAVO et al., 2007), yerba mate products from different countries (MEJÍA et al., 2010) and mate and tereré (MEINHART et al., 2010). This demonstrates that the beverages of this study are good TPCs sources.

Table 3 – Physical and chemical characteristics of lychee and yerba mate mixed beverages before and after pasteurization¹

		F1	F2	F3	F4	F5
VISC (cP)	NP	9.88 ^{aA} ± 0.11	9.69 ^{aA} ± 0.11	9.25 ^{bA} ± 0.11	8.31 ^{cA} ± 0.11	7.56 ^{dA} ± 0.11
	P	8.00 ^{aB} ± 0.10	7.50 ^{bB} ± 0.01	7.19 ^{cB} ± 0.10	6.88 ^{dB} ± 0.11	6.81 ^{dB} ± 0.11
h°	NP	78.05 ^{aA} ± 0.48	49.94 ^{cA} ± 2.12	35.60 ^{dA} ± 1.81	37.32 ^{dA} ± 1.16	63.46 ^{bA} ± 2.33
	P	75.97 ^{aA} ± 2.05	43.85 ^{bcA} ± 3,99	59.06 ^{abA} ± 11,17	29.68 ^{cA} ± 3.11	36.48 ^{cA} ± 1.54
TPC ²	NP	854.08 ^{eA} ± 9.94	1273.66 ^{dA} ± 25.43	2565.87 ^{bcA} ± 77.29	2739.70 ^{bA} ± 31.02	3243.18 ^{aA} ± 289.19
	P	786.42 ^{eA} ± 12.93	1194.55 ^{dA} ± 17.39	2201.69 ^{cB} ± 42.26	2329.75 ^{bcB} ± 66.57	3161.59 ^{aA} ± 79.50
DPPH ³	NP	4.66 ^{eA} ± 0.45	6.81 ^{dA} ± 0.12	10.01 ^{cA} ± 0.39	11.86 ^{bA} ± 1.31	17.91 ^{aA} ± 0.32
	P	3.65 ^{eA} ± 0.33	5.43 ^{dA} ± 0.61	8.90 ^{cA} ± 0.45	11.01 ^{bA} ± 0.25	17.71 ^{aA} ± 0.28
FRAP ³	NP	4.54 ^{dA} ± 0.10	8.53 ^{cA} ± 0.35	9.48 ^{cA} ± 0.16	15.75 ^{bA} ± 0.49	17.39 ^{aA} ± 0.57
	P	3.74 ^{eA} ± 0.07	7.58 ^{dA} ± 0.32	9.35 ^{cA} ± 0.09	13.59 ^{bB} ± 0.86	15.52 ^{aB} ± 0.07
ABTS ³	NP	2.42 ^{dA} ± 0.05	6.35 ^{cA} ± 0.07	6.56 ^{cA} ± 0.21	7.81 ^{bA} ± 0.61	10.50 ^{aA} ± 0.38
	P	2.36 ^{dA} ± 0.06	4.91 ^{cB} ± 0.21	4.93 ^{cB} ± 0.09	6.95 ^{bA} ± 0.24	10.33 ^{aA} ± 0.68

¹Results are expressed as average (n = 10) ± standard deviation. Statistically significant differences are noted by different capital superscript letters within a column for each characteristic (p ≤ 0.05). Statistically significant differences are noted by different minuscule letter within a line between each beverage formulation (p ≤ 0.05). ²Results are expressed as μg galic acid equivalent per mL of beverage (μg GAE/ mL). ³Results are expressed as μmol Trolox equivalent (μmol TEAC/ mL).

Formulation with lychee and yerba mate different proportions: F1 (90:10); F2 (70:30); F3 (50:50); F4 (30:70); F5 (10: 90).

VISC: Aparent viscosity (cP)

NP: non pasteurized

P: pasteurized

h°: hue chromaticity (h°=arct b*/a*)

After pasteurization, the TPC varied from 786.42 (F1) to 3161.59 (F5) $\mu\text{g GAE/mL}$, with a 14 and 15% reduction in the beverages containing 50 and 70% of infusion, respectively. Other authors have reported TPC reduction of 7% (KAUSHIK et al., 2015) and 15.6% (YU et al., 2014) in litchi juice after heat treatment.

The pasteurized beverage with 90% lychee presented 786.42 $\mu\text{g GAE/mL}$. This result was similar to that reported by Su et al. (2014) (861.1 $\mu\text{g GAE/g}$) and lower than the one reported by Zhang et al. (2013) in Chinese lychee pulp from different cultivars (1015.1 to 2591.8 $\mu\text{g GAE/g}$). These studies demonstrate that there is variation in the TPCs in relation to lychee cultivars and edaphoclimatic factors.

In fact, edaphoclimatic factors also influence the TPC in yerba mate beverages. Heck, Schmalko and De Mejía (2008) pointed out that the forms of cultivation may have important effect on production and concentration of yerba mate phytochemical compounds. Research with yerba mate from some regions of the Paraná State (Brazil) indicated that the samples grown in the central region of the State (FRIZON et al., 2015) and in Guarapuava city (DONADUZZI et al., 2003) showed higher levels of CFT. In these plants are often local consortium with eucalyptus and grown under different levels of sunlight (FRIZON et al., 2015). It should be noted that the mixed lychee and yerba mate beverage of the present study were formulated using leaves of yerba mate from the central region of Paraná.

The mixed lychee and yerba mate beverages showed AA that ranged from 4.66 (F1) to 17.91 (F5), 4.54 (F1) to 17.39 (F5) and 2.42 (F1) to 10.50 (F5) $\mu\text{mol TEAC/mL}$ in the DPPH, FRAP and ABTS tests, respectively. For all evaluation was found higher AA in beverages containing higher proportions of yerba mate infusion.

By DPPH method, the beverages containing more than 90% yerba mate infusion showed AA higher than the reported by Bassani, Nunes and Granato (2014) for mate tea infusions. Beverages containing 50% or more of lychee presented more AA when compared to white tea and lychee commercial ready to drink beverage (BASSANI et al., 2014).

The values of AA by FRAP method to beverages were similar to those found in lychee juice by Zhang et al. (2013) (110-500 mg TEAC/100 g), but higher

than those recorded in a yerba mate infusion to 3% (4.11 TEAC $\mu\text{mol/mL}$) (BOAVENTURA et al., 2013) and infusion to 1% (7.48-7.88 TEAC $\mu\text{mol/mL}$) (BRAVO et al., 2007). The results by ABTS method were similar in lychee juice thermally treated (770-600 $\mu\text{g TEAC/mL}$) by Liu et al. (2015).

Even after pasteurization, the beverage containing higher yerba mate proportion remained with the highest AA in all assays. Pasteurization did not alter the AA of the mixed beverages when assessed using the DPPH method, but by FRAP assay there was a significant reduction of more than 10% on AA in beverages containing 70% or more of infusion. Yet, the ABTS test pointed to a reduction of about 25 and 11% of the AA in the beverages containing 50 and 70% of lychee, respectively. This difference in AA reduction levels were observed by FRAP and ABTS tests that occurred due to differing reaction mechanisms involved and the pH of each of these tests (TAN; LIM, 2015). After heat treatment (100 °C/60 s) of lychee juice, Liu et al. (2015) verified a reduction about 22% in AA assessed by methods FRAP and ABTS.

There was a positive correlation between the yerba mate infusion proportion and TPC and AA by DPPH, FRAP and ABTS ($r = 0.98$; $r = 0.97$; $r = 0.99$ and $r = 0.96$, respectively) (Supplementary Table 1), indicating that the yerba mate is the main responsible for this action.

The phenolic content and the AA showed a positive correlation by DPPH method ($r = 0,97$), FRAP ($r = 0,95$) and ABTS ($r = 0,92$) (Supplementary Table 1). These results pointed out that the TPC was the main substances involved in the antioxidant mechanism in mixed lychee and yerba mate beverages. The same result was observed by Zhang et al. (2013) who checked a positive correlation between the TPC and AA by DPPH and FRAP in lychee pulp and the authors suggested the TPC levels are an indicator of pulp AA. Boaventura et al. (2013) also reported a significant positive and high correlation between FRAP and TPC in a yerba mate infusion.

There was a positive correlation between the results of AA, and it was greater the correlation between assays DPPH and ABTS ($r = 0.97$) (Supplementary Table 1). In this way, all the tested methods can be used to evaluate the AA in mixed lychee and yerba mate beverages. Bravo et al. (2007) observed in yerba mate a significant, high and positive correlation between FRAP and ABTS ($r = 0.93$).

3.3 CHARACTERIZATION AND SENSORY ACCEPTANCE OF MIXED DRINKS PASTEURIZED

In descriptive analysis by Profile Flash, the two-dimensional solution explained 81% of the variability (Figure 1). There was good consensus among the panel by setting of the assessors and residual variance (Supplementary Figure 1) because there was a low residual variance among the assessors. It was considered in the sample description attributes that were cited by a greater number of assessors and with higher correlation $| 0.60 |$ (Supplementary Table 2).

The beverages were discriminated mainly by Dimension 1 (71% of the variability), which separated the samples regarding the proportion of lychee and yerba mate, and the positive direction associated with greater lychee presence and negative with the yerba mate (Figure 1).

The beverages with higher lychee proportion (F1 and F2) were characterized sensorially as being clearer, with higher aroma and taste of lychee, sweet and sour fruit taste and a more viscous and containing particulate matter (Figure 1 and Table 4). This results agree with the observed in instrumental analysis of viscosity (Table 3). The beverage F1, at the right of the plot, presented greater intensity of these attributes.

Beverages with higher yerba mate proportion (F4 and F5) were characterized as darker, with brownish and mate color, more turbid and opaque, in agreement with instrumental measurement result (Table 3). They had more aroma and taste of tea/ mate tea/yerba mate in addition to bitter taste and astringent flavor. The beverage F5, located at the left corner of the plot, presented greater intensity of these attributes (Figure 1 and Table 4).

The F3, which featured lychee and yerba mate equal proportions, was properly in the central position of the D1 showing intermediate characteristics in relation to the others.

The mixed beverages were accepted, showing scores next to six in a 10 cm scale. The higher scores was observed for texture, followed by the color and aroma attributes.

The different levels of yerba mate could have influenced on acceptance of the flavor, color and texture of beverages. The beverage F4, with 70% of yerba

mate, had a color, flavor, texture and taste less appreciated than F2 (30% of lychee).

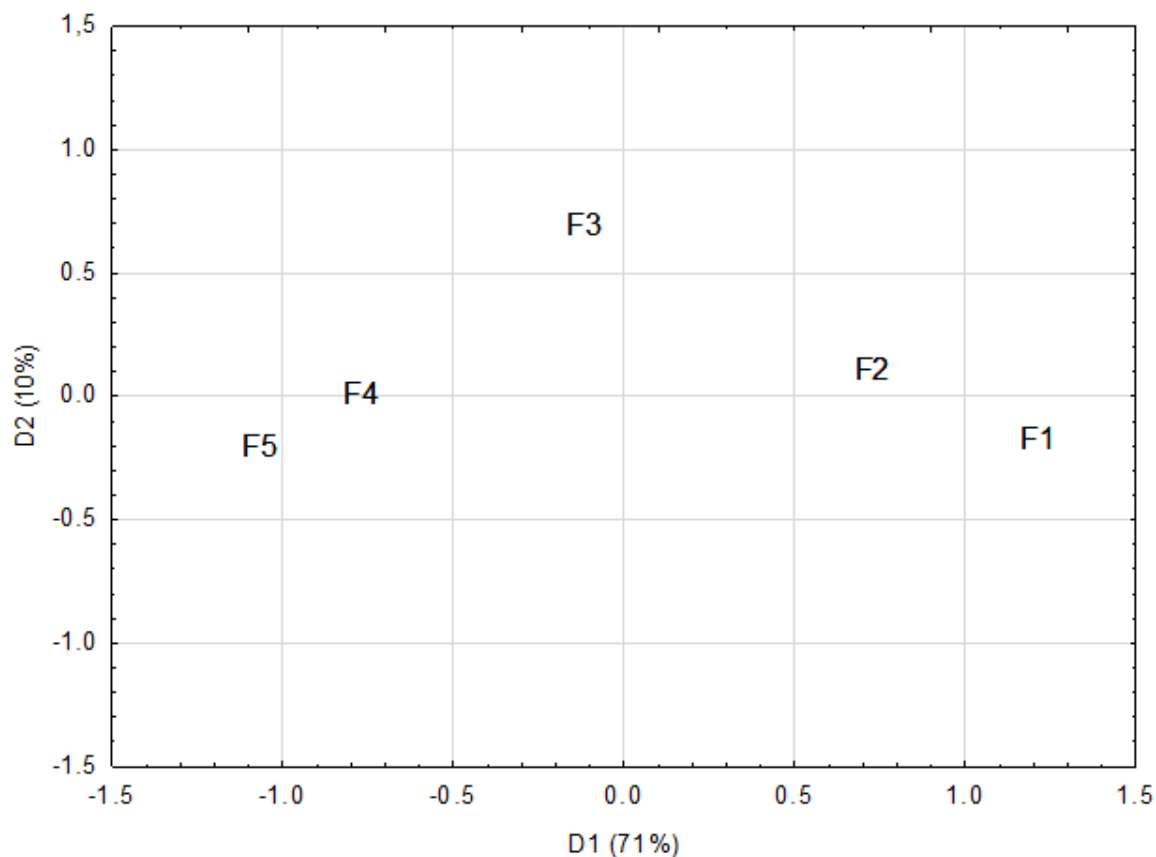


Figure 1 - Mixed lychee and yerba mate beverages configuration of consensus by Flash Profile

Formulation with lychee and yerba mate different proportions: F1 (90:10); F2 (70:30); F3 (50:50); F4 (30:70); F5 (10: 90).

Table 4 – Sensory acceptability of pasteurized mixed lychee and yerba mate beverages¹

	F1	F2	F3	F4	F5
Color	6.1 ± 2.0 ^{ab}	6.5 ± 1.9 ^a	5.9 ± 2.0 ^{ab}	5.7 ± 2.0 ^b	6.0 ± 1.8 ^{ab}
Flavor	5.8 ± 1.8 ^{ab}	6.7 ± 1.7 ^a	6.1 ± 1.8 ^{ab}	5.9 ± 1.9 ^{ab}	5.7 ± 2.1 ^b
Texture	6.8 ± 1.7 ^{ab}	7.1 ± 1.6 ^a	6.8 ± 1.7 ^{ab}	6.3 ± 1.8 ^b	6.4 ± 1.8 ^b
Taste	6.3 ± 2.1 ^{ab}	6.6 ± 1.9 ^a	5.7 ± 2.0 ^{bc}	5.7 ± 1.9 ^{bc}	5.3 ± 2.1 ^c
Global acceptance	6.4 ± 1.9 ^a	6.6 ± 1.7 ^a	5.7 ± 1.8 ^b	5.6 ± 1.7 ^b	5.4 ± 1.8 ^b

¹ Results are expressed as average (n = 100) ± standard deviation. Statistically significant differences are noted by different letter within a line between each beverage formulation (p ≤ 0.05). Formulation with lychee and yerba mate different proportions: F1 (90:10); F2 (70:30); F3 (50:50); F4 (30:70); F5 (10: 90). Hedonic scale of 10 cm (0 = dislike extremely; 10 = like extremely).

It was observed a greater global acceptance of beverages with 70% or more of lychee in their composition (Table 4). It was observed, a positive correlation between the global acceptance and the proportion of lychee ($r = 0.93$) and viscosity ($r = 0.88$, Supplementary Table 1), showing a trend of more acceptance for beverages more viscous and with more lychee.

The beverage F2 obtained greater hedonic average for the aroma, texture, flavor and overall acceptance compared to F5 (Table 4), highlighting it as best potential.

3.4 FORMULATION OPTIMIZATION OF MIXED BEVERAGES DEPENDING ON THE SENSORY ACCEPTABILITY, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHENOLIC COMPOUNDS CONTENT

The data obtained from the analyses of the global sensory acceptance, TPC and AA using the DPPH, FRAP and ABTS methods were analyzed using the mixture design and generated five models of linear equations (Supplementary Table 3), for each of these parameters as function of beverages composition. The models showed a $p < 0.024$, with a lower explanation for the sensory acceptance. The models for the TPC, DPPH, FRAP and ABTS were a good fit to experimental data, as pointed by the regression coefficient values ($R^2 > 0.89$). There was less adjustment to the overall sensory acceptance ($R^2 > 0.81$).

From the mathematical test of desirability, using data from the global sensory acceptance, TPC and AA content measured by DPPH, FRAP and ABTS of five formulations of mixed beverages, it was found out that the best proportion for the formulation of the beverage was 70% lychee and 30% infusion of yerba mate. As the formulation indicated by desirability was an experimental point, for validation of the optimization experimental results F2 beverage were evaluated (Table 5). The optimized formulation for mixed beverage indicated as predicted results: a) the sensory acceptance of 6.18; b) TPC of 1463 $\mu\text{g GAE/mL}$; c) DPPH of 6.64 $\mu\text{mol TEAC/mL}$; d) FRAP of 7.59 $\mu\text{mol TEAC/mL}$ and, e) ABTS of 4.46 $\mu\text{mol TEAC/mL}$. The experimental result of AA by FRAP assay presented close to the predicted. It was verified experimental answers 6% and 9% higher for global acceptance and AA by ABTS, respectively, in this way, the model reflected satisfactorily the global acceptance and AA by ABTS assay. However, there were 22% lower responses to the TPC and to the AA by DPPH, demonstrating that

although there is a good fit for models, they do not reflect the experimental responses. So the formulation containing 70% of lychee and 30% of yerba mate infusion was selected as optimized based on the criteria established, i.e. maximum AA and TPC and overall sensory acceptance ≥ 6 .

Table 5 - Constant optimization and validation of the optimized formulation for mixed lychee and yerba mate beverage by desirability test

Parameter/ response	Limits	Optimized condition	
		Predicted	Experimental
Lychee	In range (90 - 10%)	70	70
Yerba mate infusion	In range (10 - 90%)	30	30
Global acceptance	In range (6,00 - 6,55)	6.18	6.55 \pm 1.71
TPC (μg GAE/ mL)	Maximum value	1463.96	1194.55 \pm 17.39
DPPH (μmol TEA/ mL)	Maximum value	6.64	5.43 \pm 0.61
FRAP (μmol TEAC/ mL)	Maximum value	7.59	7.58 \pm 0.32
ABTS (μmol TEAC/ mL)	Maximum value	4.46	4.91 \pm 0.21

4 CONCLUSIONS

Beverages prepared with different lychee and yerba mate proportions presented physical-chemical and sensory profiles, antioxidant properties, content of phenolic compounds and adequate acceptability for consumption.

Pasteurization of beverages caused changes in viscosity while retained high antioxidant activity of beverages. In one of the formulations, beverages with higher yerba mate proportions had a higher content of phenolic compounds and antioxidant activity, were sensorially darker, turbid and opaque, with aroma and taste of tea and yerba mate, sweet and sour taste in addition to astringent. While the beverages containing greater proportions of lychee had more lychee flavor and aroma, sweetness and fruity acid taste, they were more viscous containing particles in suspension.

The yerba mate proportion had a positive correlation with the total content of phenolic and antioxidant activity. There was also a positive correlation between the proportion of lychee and sensory viscosity and acceptance.

Among the tested proportions of lychee and infusion of yerba mate, the beverage containing 70% lychee and 30% yerba mate infusion presented maximum total content of phenolic and antioxidant activity, besides a good sensory acceptance.

5 REFERENCES

ANESINI, C.; TURNER, S.; COGOI, L.; FILIP, R. Study of the participation and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT – Food Science and Technology**, London, v.45, n.2, p.299-304, 2012.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists**. 18 ed. Maryland: AOAC, 2005. 1094 p.

BASSANI, D.; NUNES, D. S.; GRANATO, D. Quality control of *Camellia sinensis* and *Ilex paraguariensis* teas marketed in Brazil based on total phenolics, flavonoids and free-radical scavenging activity using chemometrics. In: Granato, D.; Ares, G. (Org.). **Mathematical and Statistical Approaches in Food Science and Technology**, 1 ed, Oxford, UK: Wiley Blackwell, 2014. p. 219–230.

BENITEZ, E. I.; LOZANO, J. E. Influence of the soluble solids on the zeta potential of a cloud apple juice. **Latin American Applied Research**, Bahía Blanca, v. 36, n. 3, p. 163-168, 2006.

BOAVENTURA, B. C. B.; MURAKAMI, A. N. N.; PRUDENCIO, E. S.; MARASCHIN, M.; MURAKAMI, F. S.; AMANTE, E. R.; AMBONI, R. D. M. C. (2013). Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) through freeze concentration technology. **Food Research International**, Essex, v. 53, n. 2, p. 686-692, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 10 jan. 2001. Seção 1, p. 45.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, Essex, v.40, n.3, p.393-405, 2007.

BRAVO, L.; MATEOS, R.; SARRIÁ, B.; BAEZA, G.; LECUMBERRI, E.; RAMOS, S.; GOYA, L. Hypocholesterolaemic and antioxidante effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in high-cholesterol fed rats. **Fitoterapia**, Milano, v. 92, p. 219-229, 2014.

DONADUZZI, C. M.; JUNIOR, E. L.C.; DONADUZZI, E. M.; DA SILVA, M. M.; STURION, J. A.; CORREA, G. Variação nos teores de polifenóis totais e taninos em dezesseis progênies de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) cultivadas em três municípios do Paraná. **Arquivo de Ciências da Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 7, n. 2, p. 129-133, 2003.

FRIZON, C. N. T.; OLIVEIRA, G. A.; PERUSSELLO, C. A.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; CAMLOFSKI, A. M. O.; ROSSA, U. B.; HOFFMANN-RIBANI, R. Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 60, n. 2, p.795-801, 2015.

GENOVESE, D. B.; LOZANO, J. E. Contribution of colloidal forces to the viscosity and stability of cloudy apple juice. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 20, n. 6, p. 767–773, 2006.

GIULIAN, R.; DOS SANTOS, C. E. I.; SHUBEITA, S. M.; DA SILVA, L. M.; DIAS, J. F.; YONEAMA, M. L. Elemental Characterization of Commercial Mate Tea Leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) before and after Hot Water Infusion Using Ion Beam Techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 3, p. 741–746, 2007.

HECK, C. I.; SCHMALKO, M.; DE MEJÍA, G. Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of mate teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 18, p. 8394-8403, 2008.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, n. 9, p. R138-R151, 2007.

HUANG, F.; GUO, Y.; ZHANG, R.; YI, Y.; YI, DENG, Y.; SU, D.; ZHANG, M. Effects of Drying Methods on Physicochemical and Immunomodulatory Properties of Polysaccharide-Protein Complexes from Litchi Pulp. **Molecules**, Basel, v. 19, n. 8, p. 12760-12776, 2014.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 2005, 1018p.

ISOLABELLA, S.; COGOI, L.; LÓPEZ, P.; ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, Barking, v. 122, n. 3, p. 695-699, 2010.

JAYACHANDRAN, L. E.; CHAKRABORTY, S.; RAO, P. S. Effect of high pressure processing on physicochemical properties and bioactive compounds in litchi based mixed fruit beverage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Wageningen, v. 28, n. 1, p. 1–9, 2015.

KAUSHIK, N.; GONDI, A. R.; RANA, R.; RAO, S. Application of fuzzy logic technique for sensory evaluation of high pressure processed mango pulp and litchi

juice and its comparison to thermal treatment. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Wageningen, v. 32, p. 70–78, 2015.

LIU, L., ZENG, Q., ZHANG, R., WEI, Z., DENG, Y., ZHANG, Y., TANG X. & ZHANG, M. Comparative Study on Phenolic Profiles and Antioxidant Activity of Litchi Juice Treated by High Pressure Carbon Dioxide and Thermal Processing. **Food Science and Technology Research**, Tsukuba, v. 21, n. 1, p. 41-49, 2015.

MARCELO, M. C. A., MARTINS, C. A., POZEBON, D., DRESSLER, V. L. & FERRAO, M. F. Classification of yerbamate (*Ilex paraguariensis*) according to the country of origin based on element concentrations. **Microchemical Journal**, New York, v. 117, p. 164–171, 2014.

MEINHART, A. D.; BIZZOTTO, C. S.; BALLUS, C. A.; RYBKA, A. C. P.; SOBRINHO, M. R.; CERRO-QUINTANA, R. S.; TEIXEIRA-FILHO, J.; GODOY, H. T. Methylxanthines and Phenolics Content Extracted during the Consumption of Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) Beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, n. 4, p. 2188-2193, 2010.

MEJÍA, E. G.; SONG, Y. S.; HECK, C. I.; RAMÍREZ-MARES, M. V. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 23-34, 2010.

MURAKAMI, A.N. N.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDENCIO, E. S.; AMANTE, E. R.; ZANOTTA, L. M.; MARASCHIN, M.; PETRUS, J. C. C.; TEOFILLO, R. F. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 44, n. 10, p. 2211-2216, 2011.

OP & P PRODUCT RESEARCH: *Senstools Versão 2.3*. Utrecht: OP & P Product Research, 1995-1998. Conjunto de Programas 1CD room.

PIMENTEL, T. C.; MADRONA, G. S.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp - paracasei and oligofructose in different package type. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 63, n.1, p. 415-422, 2015.

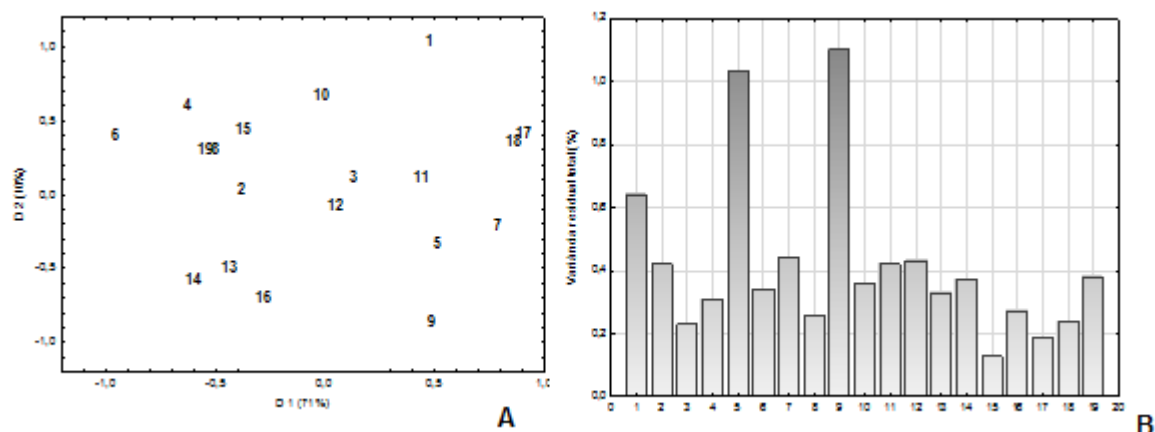
SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). **Food Chemistry**, Barking, v. 90, n. 1-2, p. 133-139, 2005.

SANTOS, E. C. S., BICCA, M. A., BLUM-SILVA, C. H., COSTA, A. P. R., DOS SANTOS, A. A., SCHENKEL, E. P., FARINA, M., REGINATTO, F. H. & DE LIMA, T. C. M. Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice. **Neuroscience**, Oxford, v. 292, p. 13–21, 2015.

SIMS, C. A.; BALABAN, M. O.; MATTHEWS, R. F. Optimization of carrot juice color and cloud stability. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 58, n. 5, p. 1129-1131, 1993.

- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 152-178, 1999.
- SU, D., TI, H., ZHANG, R., ZHANG, M., WEI, Z., DENG & Y. GUO, J. Structural elucidation and cellular antioxidant activity evaluation of major antioxidant phenolics in lychee pulp. **Food Chemistry**, Barking, v. 158, p. 385–391, 2014.
- STATSOFT. **STATISTICA for Windows: computer program manual**. Versão 7.1. Tulsa: Software Inc., 2006.
- TAN, J. B. L.; LIM, Y. Y. Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. **Food Chemistry**, Barling, v. 172, p. 814–822, 2015.
- TERHAAG, M. M.; BENASSI, M. T. Perfil Flash: uma opção para análise descritiva rápida. **Brazilian Journal and Food Technology**, Campinas, p. 140-151, 2010. 6º SENSIBER, 19-21 ago. 2010.
- VIJAYANAND, P.; KULKARNI, S. G.; PRATHIBHA, G. V. Effect of pectinase treatment and concentration of litchi juice on quality characteristics of litchi juice. **Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 2, p. 235–239, 2010.
- VILLANUEVA, N. D. M.; PETENATE, A. J.; DA SILVA, M. A. A. P. Performance of hybrid hedonic scale as compared to the traditional hedonic, self-adjusting and ranking scales. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 16, n. 8, p. 691–703, 2005.
- WALL, M. M. Ascorbic acid and mineral composition of longan (*Dimocarpus longan*), lychee (*Litchi chinensis*) and rambutan (*Nephelium lappaceum*) cultivars grown in Hawaii. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 6-7, p. 655–663, 2006.
- YU, Y., XIAO, G., XU, Y., WU, J. & WEN, J. Effects of Dimethyl Dicarbonate (DMDC) on the Fermentation of Litchi Juice by *Lactobacillus casei* as an Alternative of Heat Treatment. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 79, n. 5, p. M947-M954, 2014.
- ZENG, X. A.; QIN, F. G. F.; CHEN, X. D.; ZHANG, L. Composition Analysis of Litchi Juice and Litchi Wine. **International Journal of Food Engineering**, Berlin, v. 4, n. 4, 2008.
- ZHANG, R. F.; ZENG, Q. S.; DENG, Y. Y.; ZHANG, M. W.; WEI, Z. C.; ZHANG, Y.; TANG, X. J. Phenolic profiles and antioxidant activity of litchi pulp of different cultivars cultivated in Southern China. **Food Chemistry**, Barking, v. 136, n. 3-4, p. 1169–1176, 2013.
- ZHENG, X.; YU, Y.; XIAO, G.; XU, Y.; WU, J.; TANG, D.; ZHANG, Y. Comparing product stability of probiotic beverages using litchi juice treated by high hydrostatic pressure and heat as substrates. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Wageningen, v. 23, p. 61–67, 2014.

6 SUPPLEMENTARY MATERIAL



Supplementary Material: Figure 1 – General configuration (A) and residual variance (B) of the evaluators considering the two-dimensional solution
Numbers (1-19) identify assessor.

Supplementary Material: Table 1 – Pearson correlation coefficients between mixed lychee and yerba mate beverage composition, physical and chemical parameters and sensory global acceptance ¹

	LICH	MATE	AG	TPC	DPPH	FRAP	ABTS	VISC
LICH	1	-1.00*	0.93*	-0.98*	-0.97*	-0.99*	-0.96*	0.97*
MATE		1	-0.93*	0.98*	0.97*	0.99*	0.96*	-0.97*
AG			1	-0.96*	-0.91*	-0.89*	-0.81	0.88*
TPC				1	0.97*	0.95*	0.92*	-0.94*
DPPH					1	0.94*	0.97*	-0.89*
FRAP						1	0.96*	-0.98*
ABTS							1	-0.89*
VISC								1

¹ Relative parameters from pasteurized beverages;

*Significant terms ($p \leq 0,05$);

LICH: lychee juice proportion (mL/ 100 mL);

MATE: yerba mate infusion proportion (mL/ 100 mL);

AG: global acceptance (scale of 10 cm);

TPC: Total phenolic content ($\mu\text{g GAE} / \text{mL}$);

DPPH: antioxidant activity by DPPH ($\mu\text{mol TEAC} / \text{mL}$);

FRAP: antioxidant activity by FRAP ($\mu\text{mol TEAC} / \text{mL}$);

ABTS: antioxidant activity by ABTS ($\mu\text{mol TEAC} / \text{mL}$);

VISC: viscosity (cP).

Supplementary Material: Table 2 – Attributes better correlated ($r \geq 0.6$) to the first two dimensions for each assessor via the Flash Profile

Assessor	Dimension 1 (71.18%)	Dimension 2 (10.03%)
1	Yerba mate tonality (-0.99); Opacity (-0.99); Sweet aroma (0.99); Tea with fruit aroma (-0.99); Sweet taste (-0.80); Sweet flavor of fruit (0.99); Mate tea flavor (-0.99); Smooth texture (0.99); Body (0.99)	
2	Dark color (-0.94); Aroma of tea (-0.79); Fruity aroma (-0.91); Sweet taste (-0.86); Sour taste (-0.79); Bitter flavor of coffee (-0.73); Residual bitter taste (-0.94); Arenosity (-0.73)	Bitter taste of coffee (0,62)
3	Brown color (-0.99); Brightness (-0.99); Material precipitated in the glass (-0.99); Aroma of lychee (0.99); Aroma of tea mate (-0.99); Aroma of cooked (0.85); Mate tea flavor (-0.99); Astringency (-0.79); Sweet taste (0.69); Lychee flavor (0.99); Residual astringent flavor of yerba mate (-0.94); Body (0.85)	
4	Brown color (-0.99); Aroma of yerba mate (-0.99); Lychee flavor (0.91); Yerba mate flavor (-0.99); Presence of granular waste (0.80)	
5	Light color (-0.68); Precipitated presence(0.94); Lychee flavor (-0.68); Tea flavor (-0.68); Bitter taste (-0.68)	Light color (0.71); Smell of mate (0.83); Lychee flavor (0.71); Tea flavor (0.71); Bitter taste (0.71)
6	Turbidity (-0.99); Brown color (-0.94); Aroma of tea (-0.94); Acidic fruit aroma (0.91); Sour taste (0.91); Sweet taste (-0.94); Residual taste astringent (-0.99)	

7	Dark color (-0.99); Aroma of tea (-0.85); Fruity aroma of lychee (0.99); Juice concentrate flavor (0.99); Tea taste (-0.94)	Viscosity (0,74)
8	Color of mate tea (-0.99); Lack of uniformity of colour (0.88); The smell of weed (plant) (-0.99); Fruity aroma (0.99); Residual taste of grass (-0.94); Smooth texture (-0.91)	Sweet taste (0.65)
9	Dark color (-0.73); Precipitated (-0.64); Aroma of yerba mate (-0.68); Sweet fruit aroma (0.64); Tea flavor (-0.68); Residual taste of tea (-0.68)	Dark color (0.62); Turbidity (-0.66); Precipitated (-0.7); Aroma of yerba mate (0.71); Sweet fruit aroma (0.70); Sweet taste (0.83); Tea flavor (0.71); Residual taste of tea (0.71); Viscosity (0.83)
10	Brown color (-0.99); Fluid appearance (0.99); Precipitated (0.99); Aroma of mate (-0.94); Sweetly aroma (0.88); Fruity aroma (0.99); Fruit flavor (0.80); Residual taste (-0.91); Bitter taste (-0.99); Fluidity (0.99)	
11	Brown color (-0.99); Turbidity (0.99); Presence of material on the surface (-0.99); Sedimentation in the glass (0.73); Aroma of mate (-0.99); Fruity aroma (0.99); Sweet taste (-0.88); Tea flavor (-0.88); Residual bitter taste (-0.88)	Sedimentation in the glass (-0.62)
12	Color of mate tea (-0.99); Amount of suspended particles (-0.73); Aroma of mate (-0.88); Sweet fruity aroma (0.69); Sweet taste (-0.88); Sour fruit flavor (0.64); Residual acid fruit flavor (0.91);	Amount of suspended particles (0.62); Sweet fruity aroma (0.57); Sour fruit flavor (0.70)

	Body (-0.65)	
13	Color of juice (0.99); Presence of cream (-0.94); Aroma of tea (-0.68); Astringency (0.51); Sweetness (-0.79); Residual taste astringent (-0.94); Tea flavor (-0.94); Juice flavor (0.91); Body (-0.73)	Aroma of juice (0.83); Aroma of tea (0.71); Astringency (0.73); Acidity (0.73); Body (0.62)
14	Color yellow (0.91); Brown color (-0.94); Aroma of lychee (0.69); Aroma of mate (-0.79); Mate flavor (-0.79); Lychee flavor (0.69); Residual taste (-0.79); Sweet taste (0.69); Cloudy (-0.88); Fluid texture (0.85)	
15	Brown color (-0.99); Precipitated (0.88); Aroma of yerba mate (-0.99); Yerba mate flavor (-0.99); Bitter taste (-0.73)	Bitter taste (0.62)
16	Brown color (-0.94); Turbidity (-0.68); Herbal aroma (-0.94); Aroma of tea (-0.88); Fruity aroma (0.64); Tea flavor (-0.73); Sour taste (0.91); Fruity flavor (0.91)	Turbidity (0.71); Fruity aroma (0.70); Tea flavor (0.62); Residual taste (-0.91)
17	Caramel tonality (-0.99); Turbidity (-0.99); Sweet aroma (0.99); Boldo* tea aroma (-0.99); Sweet taste (0.68); Bitter taste (-0.99); Sour fruit flavor (0.99); Suspended particles; Residual taste astringent (-0.99)	Sweet taste (-0.71)
18	Light color (-0.99); Opacity (-0.73); Aroma typical of tea (-0.99); Aroma typical of lychee (0.99); Sweet taste (0.99); Residual taste (0.99); Residual bitter taste (-0.73); Suspended particles (0.64); Resistance to movement (0.99)	Opacity (0.62); Residual bitter taste(0.62)

19 Yellow color (0.91); Brown color (-0.94); Mate tea flavor (0.62)
 Brightness (-0.94); Material in
 suspension (-0.94); Aroma of mate tea (-
 0.94); Sweet fruity aroma (0.64); Mate
 tea flavor (-0.73); Sweet fruity flavor
 (0.86); Residual taste of grass (-0.94);
 Viscosity (0.65)

**Plectranthus barbatus*

Supplementary Material: Table 3 – Regression coefficients from mixture design and ANOVA data described by the sensory global acceptance, TPC and antioxidant activity by DPPH, FRAP and ABTS to mixed lychee and yerba mate beverage

Parâmetro	Modelo das equações	p_{model}	F_{value}	R^2	R^2_{adjust}
Y_{AC}	$Y_{AC} = 6.55 X_1^* + 5.33 X_2^*$	0.024	18.19	0.858	0.811
Y_{TPC}	$Y_{TPC} = 757.69 X_1^* + 3111.91 X_2^*$	0.003	76.97	0.963	0.950
Y_{DPPH}	$Y_{DPPH} = 2.60 X_1 + 16.08 X_2^*$	0.006	47.83	0.941	0.921
Y_{FRAP}	$Y_{FRAP} = 4.04 X_1^* + 15.87 X_2^*$	0.0008	190.5	0.985	0.979
Y_{ABTS}	$Y_{ABTS} = 2.30 X_1 + 9.49 X_2^*$	0.01	34.01	0.919	0.892

Y_{AC} : sensory global acceptance; Y_{TPC} : total phenolic content ($\mu\text{g GAE/ mL}$); Y_{DPPH} : antioxidant activity by DPPH ($\mu\text{mol TEAC/ mL}$); Y_{FRAP} : antioxidant activity by FRAP ($\mu\text{mol TEAC/ mL}$); Y_{ABTS} : antioxidant activity by ABTS ($\mu\text{mol TEAC/ mL}$); X_1 : lychee proportion; X_2 : yerba mate infusion proportion. *Significant terms ($p \leq 0.05$).

ARTIGO CIENTÍFICO 3: Bebida mista de lichia e erva-mate: caracterização dos açúcares, ácidos orgânicos e de compostos bioativos, e efeito da pasteurização

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar o conteúdo de açúcares, ácidos orgânicos e de compostos bioativos (flavonoides, ácidos fenólicos e metilxantinas) em bebidas mistas formuladas com diferentes proporções de lichia e erva-mate (10 a 90% v/v), antes e após uma pasteurização lenta. O suco de lichia foi caracterizado e mostrou 462,2 e 426,9 mg/g de frutose e glicose, respectivamente, 1,39 mg/g de vitamina C e 2114,2 mg EAG/g de compostos fenólicos totais. Sua atividade antioxidante foi de 5,6; 21 e 0,004 μmol de TEAC/g quando avaliada por DPPH, FRAP e ABTS. Os seguintes compostos bioativos estavam presentes: ácido ferrúlico (2,08 mg/L), epicatequina (0,97 mg/L), quercetina (0,33 mg/L), kaempferol (0,21 mg/L), ácido gálico (0,10 mg/L) e rutina (0,03 mg/L). Nas bebidas mistas não pasteurizadas observou-se maiores conteúdos de glicose, frutose, ácido málico e vitamina C em maiores proporções de suco de lichia. Bebidas com maior proporção de infusão de erva-mate apresentaram maiores teores de sacarose, ácido cítrico, ácidos fenólicos, flavonoides e metilxantinas. Com a pasteurização houve redução no conteúdo de sacarose, ácido cítrico, ácidos fenólicos, flavonoides e metilxantinas e um incremento no teor de glicose e frutose. Após a pasteurização, as bebidas com 90% de suco de lichia apresentaram maior conteúdo de vitamina C (37,5 mg/L) e as bebidas com mais de 70% de infusão de erva-mate diferenciaram-se das demais por conterem maior conteúdo de metilxantinas, além de alto conteúdo de flavonoides e ácidos fenólicos (216,5; 15,9; e 73,8 mg/mL, respectivamente). As formulações propostas podem proporcionar bebidas com adequado perfil nutricional, alto conteúdo de vitamina C (bebidas com $\geq 50\%$ de suco de lichia) ou ricas em compostos fenólicos e metilxantinas (bebidas com $\geq 70\%$ de infusão erva-mate), de acordo com a proporção de lichia/infusão de erva-mate empregada na formulação.

Palavras-chave: *Litchi chinensis*; *Ilex paraguariensis*; infusão; suco; compostos fenólicos.

1 INTRODUÇÃO

A lichia (*Litchi chinensis* Sonn) é uma fruta tropical e subtropical, consumida principalmente *in natura* e pode ser processada na forma de suco (LI et al., 2009; ZHANG et al., 2013). O suco de lichia é adocicado, de cor clara, com sabor e aroma agradáveis, além de conter inúmeros compostos bioativos como por exemplo: ácido clorogênico, ácido gálico, ácido caféico, além de catequina, rutina, quercetin-3-rut-7-rha, epicatequina e ácido ferrúlico (LI et al., 2009; ZHANG et al., 2013; SU et al., 2014; EMANUELE et al., 2017).

Há uma tendência de consumo de alimentos e bebidas que, além do seu valor nutricional, melhorem a saúde e o bem-estar, reduzindo o risco de doenças (RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2014). Desta forma, a indústria alimentícia tem desenvolvido novos produtos cujos ingredientes possuam potenciais benefícios à saúde (ORJUELA-PALACIO; ZAMORA; LANARI, 2014).

A mistura do suco de lichia a outras frutas ou extratos vegetais é uma forma para melhorar o perfil nutricional de bebidas, aumentar o consumo desta fruta (JAYACHANDRAN et al., 2015), além de tornar os sucos mistos sensorialmente mais aceitos. Um extrato vegetal, cujo consumo tem aumentado na Europa e Estados Unidos, em função das propriedades estimulantes e alegações de funcionalidade, é o da erva-mate (*Ilex paraguariensis*, Saint-Hilaire) (NUTRACEUTICALS INTERNATIONAL, 2018) e pode ser uma opção para formular bebida mista com a lichia.

A erva-mate é uma planta muito utilizada para o preparo de infusões e chimarrão e possui potencial aplicação em bebidas gaseificadas, energéticas, com extrato de soja e com suco de frutas (MELLO et al., 2009; BOAVENTURA et al., 2013; FRIZON et al., 2015). Inúmeros compostos bioativos e alguns com potencial antioxidante foram identificados em infusão de erva-mate, como metilxantinas (caféina, teobromina e teofilina), ácidos fenólicos (ácido caféico, ácido clorogênico, ácido ferrúlico, etc) e flavonoides (catequina, kaempferol, epicatequina, etc) (HECK; DE MEJIA, 2007; DARTORA et al., 2011; BRAVO, GOYA, LECUMBERRI, 2007).

Os objetivos deste estudo foram determinar o conteúdo de açúcares, ácidos orgânicos e de compostos bioativos (flavonoides, ácidos fenólicos e

metilxantinas) em formulações de bebidas mistas com diferentes proporções de lichia e erva-mate, antes e após uma pasteurização lenta. Antes do preparo das bebidas mistas, o suco de lichia foi caracterizado quanto a composição química e atividade antioxidante.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Reagentes

Os reagentes DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), TPTZ (2,4,6-tripiridyl-S-triazina), ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), Folin-Ciocalteu, Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), glicose, frutose, sacarose, estaquiose, manitol, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, ácido ascórbico, ácido gálico, ácido protocateúico, teobromina, paraxantina, epigallocatequina, catequina, epicatequina, quercetina, ácido caféico, cafeína, rutina, kaempferol, ácido clorogênico, ácido p-cumárico, ácido ferrúlico, ácido sinápico, miricetina e trigonelina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, EUA), contendo grau de pureza $\geq 99\%$. Etanol e os demais reagentes foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A acetonitrila grau HPLC foi adquirida da J.T. Baker (Xalostoc, México). A água ultrapura utilizada no preparo das soluções padrão foi produzida pelo Sistema Milli-Q® (Simplicity 185, Millipore, MA, EUA).

2.1.2 Lichia

As lichias (*Litchi chinensis* Sonn.) da variedade Bengal, provenientes da safra de 2014, foram obtidas de produtores da região de Umuarama, Paraná, Brasil (23°45'57"S; 53°19'30"O e altitude de 442 m). Foram sanitizados 150 kg de frutos de lichia com hipoclorito de sódio à 100 ppm (v/v) por 5 minutos, descascados manualmente e despulpados em despulpadeira (F. Silva, modelo MS-200). Após homogeneização a polpa foi empacotada em porções de 2 kg em

sacos de polietileno e armazenada à -15 °C até o momento da utilização e análises. Para o preparo das bebidas mistas, a polpa foi descongelada à 4°C e filtrada em peneiras de 200 mesh obtendo-se o suco de lichia.

2.1.3 Folhas e infusão de erva-mate

As plantas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint-Hilaire) foram colhidas de ervais de cultivo intencional (plantados) em Campina do Simão, Paraná, Brasil (25°4'8" S; 51°49'31"O e altitude: 963 m) em março de 2015. As folhas adultas foram colhidas em março de 2015. As folhas foram lavadas em água potável e secas em estufa com circulação forçada por 24 h à 45 °C, moídas em moinho de facas até atingir tamanho de partícula menor que 3,55 mm, armazenadas à -18 °C em sacos de polietileno recobertos com papel alumínio (MURAKAMI et al., 2011).

A infusão foi preparada por meio da adição de água à 85 °C sobre as folhas desidratadas e moídas de erva-mate em uma proporção de 1:10 (folhas:água). A infusão foi mantida em repouso por 15 minutos, filtrada em papel de filtro Whatman nº 1 e mantida à -15 °C até o momento das análises, que foram executadas dentro de oito horas após a obtenção da infusão. Esta infusão continha 93,5 mg/L de vitamina C, além de 37,5; 1002,7; e 31,8 mg/L de ácidos fenólicos, metilxantinas e flavonoides, respectivamente conforme descrita por Terhaag (2018a).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Caracterização química e atividade antioxidante do suco de lichia

O conteúdo de proteínas, fibras, cinzas e sólidos solúveis totais do suco de lichia foi determinado conforme os métodos descritos pela AOAC (2005). Os carboidratos totais foram estimados pela diferença percentual em relação aos demais componentes. Os sólidos solúveis (SST) foram determinados em refratômetro digital (Atago, Japão), sendo expressos em °Brix e o pH por meio de leitura direta em pHmetro (Mettler Todelo, Switzerland) de acordo com IAL (2008). Para avaliação da acidez total titulável (ATT) a amostra foi titulada com NaOH 0,1

M com resultado expresso em gramas de ácido cítrico 100 mL^{-1} . Os resultados foram expressos em gramas por 100 g de suco. As análises dos minerais foram realizadas em espectrômetro de absorção atômica (AAS, Varian AA-140, Austrália) e em espectrômetro de massas por plasma acoplado indutivamente, conforme AOAC (2005) (ICP-MS, Varian 820-MS). Os resultados foram expressos em mg/g (b.s.).

O teor de compostos fenólicos totais (CFT) foi determinado conforme método de Singleton; Orthofer; Lamuela-Raventos (1999), com algumas modificações. Em uma alíquota de 0,5 mL de amostra ou padrão foram adicionados 0,5 mL do reativo de Folin-Ciocalteu 0,9 N e 0,5 mL de solução de carbonato de sódio 10% (m/v) e após repouso por 30 min em ambiente escuro, a absorbância foi lida à 760 nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S22, Reino Unido). A água foi usada como branco. A concentração de CFT foi obtida a partir da curva padrão de ácido gálico (4 a 24 $\mu\text{g/mL}$) e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de amostra (b.s.).

A atividade antioxidante (AA) foi avaliada pelos métodos de redução do radical livre 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), e do cátion ABTS \bullet^+ (2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) e na capacidade de redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} conforme Sánchez-González, Jiménez-Escrig e Saura-Calixto (2005).

Para o método DPPH, em um tubo foram adicionados 1 mL de tampão acetato 100 mM, pH 5,5; 1 mL de etanol; 0,5 mL de solução etanólica de DPPH 250 μM e 50 μL de amostra ou padrão. Após 15 min de incubação no escuro à temperatura ambiente a absorbância foi lida a 517 nm em espectrofotômetro. O controle positivo não continha amostra e o branco foi constituído de 1 mL de tampão acetato e 1,5 mL de etanol.

O radical ABTS \bullet^+ foi produzido a partir da reação da solução de ABTS 7 mM com solução de persulfato de potássio 2,45 mM em ambiente escuro por 16 h. O ABTS \bullet^+ foi diluído em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4) até absorbância de 0,700 a 730 nm. Uma alíquota de 10 μL da amostra ou padrão foi adicionada em tubo contendo 4 mL da solução ABTS \bullet^+ diluída e após 6 min de reação a absorbância foi lida à 730 nm.

O reagente de FRAP foi obtido pela combinação de 25 mL de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL de solução de TPTZ (10 mM de TPTZ em HCl 40 mM) e 2,5 mL de cloreto de ferro 20 mM. O reagente foi preparado no

momento da análise. Após a reação de 30 μL da amostra com 70 μL de água destilada e 900 μL do reagente FRAP em ambiente escuro à 37 °C, por 30 minutos, a absorbância foi lida a 595 nm em espectrofotômetro. Utilizou-se água como branco.

Soluções de Trolox em etanol a 80% foram empregadas para construção das curvas padrão (50 a 600 μM para DPPH e FRAP, e de 0,75 a 7,5 μM para ABTS). Os resultados da atividade antioxidante para os três métodos foram expressos para cada método em μmol de equivalentes de Trolox (TEAC) por g de amostra (b.s.).

Todas as análises foram realizadas em triplicata ($n = 3$).

2.2.2 Preparo das bebidas mistas de lichia e erva-mate

A partir de testes preliminares, foram preparadas cinco bebidas com diferentes proporções de suco de lichia e infusão de erva-mate (Tabela 1) conforme descrito por Terhaag (2018b), a partir de testes preliminares. O teor de sólidos solúveis totais (TSS) foi corrigido com sacarose para 12 °Brix e pH ajustado para 4,5 com solução aquosa de ácido cítrico à 20% (m/v). As bebidas mistas foram envasadas em garrafas de vidro de 500 mL e pasteurizadas em banho-maria (80 °C/ 20 min), resfriadas até 37 °C em banho de gelo e armazenadas à 4°C até análises, conforme Pimentel et al. (2015). Foi verificado se a bebida pasteurizada atendia aos padrões microbiológicos da legislação vigente (BRASIL, 2001) por meio de pesquisa de Coliformes à 45 °C e de *Salmonella sp.* As formulações das bebidas foram preparadas em duas repetições.

2.2.3 Determinação de açúcares e ácidos orgânicos

Para a identificação e quantificação dos açúcares e ácidos orgânicos, 1 mL de suco de lichia ou de bebida mista foi homogeneizado em 10 mL de água e centrifugada à 9056 g por 15 min. O sobrenadante foi recolhido e filtrado em membrana de PVDF 0,22 μm (Millipore, Cork, Ireland).

Tabela 1 – Formulações das bebidas mistas de lichia e erva-mate

Formulação	Suco de lichia (% v/v)	Infusão de erva-mate (%v/v)
F1	90	10
F2	70	30
F3	50	50
F4	30	70
F5	10	90

Formulações contendo diferentes proporções de suco de lichia e erva-mate: F1 (90:10); F2 (70:30); F3 (50:50); F4 (30:70); F5 (10: 90).

Empregou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC 20 A (Shimadzu Co., Kyoto, Japão) composto de uma bomba de alta pressão (LC-20AT), injetor automático (SIL-20AC HT), forno de coluna (CTO-20A) e detectores de arranjo de fotodiodos (SPD-M20A) e índice de refração (RID-10A) acoplados em série (HPLC-PDA-RID). As análises cromatográficas foram isocráticas.

As condições cromatográficas para a determinação de açúcares e ácidos orgânicos estão descritas na Tabela 2. O comprimento de onda do PDA foi fixado em 215 nm, e do RID no modo varredura de 200 a 400 nm (PAULI; CRISTIANO; NIXDORF, 2011). A aquisição dos dados e a integração dos picos cromatográficos foram realizadas no software LC Solutions (Shimadzu Co., Kyoto, Japão). As análises foram realizadas em duplicata (n = 2). Os resultados foram expressos em mg/g (b.s.).

2.2.4 Determinação da composição de compostos fenólicos e metilxantinas

Para as análises de identificação e quantificação das metilxantinas, ácidos fenólicos e flavonoides, 1 mL de suco de lichia ou de bebida mista foi homogeneizado em 10 mL de água e centrifugado à 9056 g por 15 min. O sobrenadante foi recolhido e filtrado em membrana de PVDF 0,22 µm (Millipore, Cork, Ireland).

Empregou-se cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência (UHPLC) (Acquity UPLC I Class Waters©) com coluna HSS C18 1,8 µm 2,1×100 mm (Waters), utilizando duas fases móveis – A: Água Ultrapura e B: Metanol (JT Backer, HPLC grade), acidificadas com 0,05% e 0,1% de ácido fórmico, respectivamente. O

volume de injeção foi de 1,0 μL no modo *partial loop with needle overfill*, vazão de 0,4 mL/min, e a separação foi realizada na condição de gradiente utilizando curva de concentração (tempo de 0,00–10,00 min: 95% da fase A e 5% da fase B; tempo de 10,00–10,10 min: 5% da fase A e 95% da fase B; tempo de 10,10–13,00 min: 95% da fase A e 5% da fase B). O detector de arranjo de fotodiodos (DAD) foi utilizado para realizar a varredura dos comprimentos de ondas entre 190 e 700 nm, e a leitura fixada nos canais de 270 e 320 nm. O tempo total de análise foi de 13 min, considerando as etapas de separação, limpeza da coluna e equilíbrio das condições iniciais do gradiente. Para aquisição dos dados e a integração dos picos cromatográficos empregou-se o software Empower 3 (Waters). A separação e quantificação foram feitas em duplicata ($n = 2$). Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/mL}$ de amostra.

Tabela 2 - Condições cromatográficas empregadas para a determinação de açúcares e de ácidos orgânicos ¹

	Açúcares	Ácidos Orgânicos
Fase móvel	100% Água ultrapura	100% Tampão fosfato 25mM pH 2,4
Coluna	Aminex HPX-87P (7,8 x 300 mm, Biorad, CA, USA)	CapCell Pak C18 (250 x 4,6mm x 5 μm ; Shiseido Co., Ltd., Japão)
Temperatura do forno ($^{\circ}\text{C}$)	85	40
Temperatura do detector ($^{\circ}\text{C}$)	40	40
Vazão (mL/min)	1,0	1,0
Volume de injeção (μL)	20	20

Fonte: Pauli, Cristiano e Nixdorf (2011)

2.2.5 Análise estatística

Consideraram-se a média e o desvio padrão para os dados das análises do suco de lichia. Os dados das análises das bebidas mistas foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) de dois fatores (formulação e pasteurização) e teste de Tukey considerando um nível de significância de 5%. O teste de Pearson foi aplicado para determinar a correlação entre as proporções dos componentes

na formulação, o conteúdo de ácido ascórbico, de metilxantinas, de ácidos fenólicos e de flavonoides. Para as análises estatísticas empregou-se o Statistica 7.1 (Statsoft, EUA) (STATSOFT, 2006).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO SUCO DE LICHIA

O suco de lichia apresentou 16 °Brix, sendo a maior parte dos sólidos solúveis totais a frutose e glicose (462 e 427 mg/g, respectivamente) (Tabela 3). Havia também pequena concentração de sacarose, manitol e estaquiase. Estes resultados são semelhantes aos relatados na literatura (HAQ; RAB, 2012; QUEIROZ et al., 2012; ZHENG et al., 2014; LIANG et al., 2015; CHEN; LIU, 2016). Zeng et al. (2008) encontraram maiores conteúdos de glicose e sacarose e em contrapartida menos frutose em lichias chinesas. Diferentes cultivares de lichia podem apresentar diferenças qualitativas e quantitativas em relação aos compostos bioativos (EMANUELE et al., 2017).

O suco de lichia continha baixo conteúdo de proteína, lipídeos e fibras (Tabela 2). Estes resultados foram semelhantes aos reportados por Queiroz et al. (2012) e Clerici e Carvalho-Silva (2011), que classificam a lichia como uma fruta de baixo conteúdo de fibras. Os minerais detectados em ordem decrescente foram potássio (K), cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg) e ferro (Fe) (9,7; 0,12; 0,07; 0,05 e 0,073 mg/g, respectivamente). Wall (2006) determinou teores semelhantes de K, Ca e Fe e um pouco menores de P e Mg em lichias havaianas de diversos cultivares.

O suco apresentou um pH ácido (4,54), devido a presença dos ácidos cítrico, láctico e acético (Tabela 2). Este resultado foi próximo ao determinado por Da Silva et al. (2011) em suco de lichias da variedade Bengal (4,2). Um teor semelhante de ácido cítrico, e maior de ácido acético e ácido málico foi apontado por Zheng et al. (2014). Já Zeng et al. (2008) observaram menor conteúdo destes ácidos orgânicos e de potássio em polpa de lichia.

Tabela 3 - Composição química do suco de lichia

Parâmetros	Valores ¹
Sólidos Solúveis Totais (°Brix)	16,53 ± 0,05
Carboidratos totais (g/100 de suco)	12,94 ± 0,35
Frutose (mg/g)	462,19 ± 2,06
Glicose (mg/g)	426,92 ± 0,01
Sacarose (mg/g DW)	9,01 ± 0,01
Manitol (mg/g DW)	1,21 ± 0,00
Estaquiose (mg/g)	0,97 ± 0,00
Proteínas totais (g/100g de suco)	0,30 ± 0,01
Lipídios totais (g/100g de suco)	1,17 ± 0,08
Fibras totais (g/100g de suco)	0,20 ± 0,01
Cinzas (g/100g de suco)	1,92 ± 0,04
Potássio (mg/g)	9,70 ± 0,02
Cálcio (mg/g)	0,12 ± 0,002
Fósforo (mg/g)	0,07 ± 0,001
Magnésio (mg/g)	0,05 ± 0,001
Ferro (mg/g)	0,073 ± 0,036
pH	4,54 ± 0,00
Ácido cítrico (mg/g)	15,25 ± 0,67
Ácido láctico (mg/g)	49,36 ± 0,36
Ácido acético (mg/g)	5,51 ± 0,18
CFT (µg EAG/g)	2114,20 ± 167,89
Ácido Ascórbico (mg/g)	1,39 ± 0,07
Atividade antioxidante ² (µmol TEAC/g)	
DPPH	5,56 ± 0,75
FRAP	21,00 ± 0,87
ABTS	0,039 ± 0,0005

¹ Resultados expressos como média (n = 3) ± desvio padrão. ²Resultados expressos como equivalente de Trolox por g de amostra seca (µmol TEAC/g).

O conteúdo de ácido ascórbico (139 mg/100 g) no suco de lichia foi semelhante ao quantificado por diversos autores (GUO et al., 2003; ZHENG et al., 2014; LIANG et al., 2015).

Verificou-se conteúdo CFTs de 2114 μg EAG/g e AA avaliada por DPPH, FRAP e ABTS de aproximadamente 5,6; 21 e 0,04 μmol de TEAC/g, respectivamente.

O teor de CFTs foi maior que o observado por Su et al. (2014) em extratos aceto-aquosos e por Zhang et al. (2013) em 13 cultivares de lichias chinesas e menor que o determinado por Lv et al. (2014), demonstrando uma grande variação no conteúdo de compostos fenólicos em função da cultivar e proveniência da lichia.

Guo et al. (2003) observaram AA por FRAP semelhante em lichias da variedade Feizixiao (500 mg TEAC/100g). Segundo estes autores há uma relação entre o teor de ácido ascórbico e a AA avaliada por FRAP, em lichias, uma vez que houve correlação entre a AA determinada por FRAP e o teor de ácido ascórbico.

Por meio do método DPPH, Mahattanatawee et al. (2006) encontraram valores próximos aos do presente trabalho (103,8 μg EAG/ g de polpa de lichia).

Foram identificados e quantificados no suco de lichia alguns flavonoides e ácidos orgânicos. Em maior concentração estavam presentes: ácido ferrúlico (2,08 mg/L), epicatequina (0,97 mg/L), quercetina (0,33 mg/L), kaempferol (0,21 mg/L), ácido gálico (0,10 mg/L) e rutina (0,03 mg/L). Este perfil de compostos bioativos é semelhante ao reportado por Zhang et al. (2013), Lv et al. (2014) e Su et al. (2014) para suco de lichia.

3.2 AÇÚCARES E ÁCIDOS ORGÂNICOS NAS BEBIDAS MISTAS DE LICHIA E ERVA-MATE

As bebidas mistas não pasteurizadas apresentaram conteúdo de sacarose entre 55 (F1) e 1077 mg/100 mL (F5), de glicose entre 649 (F1) e 134 mg/100 mL (F5) e de frutose entre 420 (F1) e 93 mg/100 mL (F5) (Figura 1a-c).

A glicose e a frutose estavam presentes em maior quantidade nas bebidas que continham maiores proporções de suco de lichia (>70%) e de forma inversa, houve correlação negativa entre o conteúdo de sacarose e a proporção de suco de lichia. Em função do ajuste dos SSTs das formulações para 12°Brix, houve uma maior adição de sacarose nas formulações com menores proporções de lichia, o que justifica a variação no conteúdo dos açúcares nas bebidas não pasteurizadas, em função da proporção de lichia.

As bebidas mistas com mais de 50% de suco de lichia apresentaram menor conteúdo de ácido cítrico (5,2 e 4,5 mg/100mL, F1 e F2, respectivamente). Já o ácido málico foi detectado apenas nas bebidas com mais de 50% de suco de lichia e em maior quantidade na F1 (13, 7 e 6 mg/100 mL nas formulações F1, F2 e F3, respectivamente). Como a infusão de erva-mate possuía um de pH 6,00, assim nas bebidas com maiores proporções de infusão foi necessário um maior volume de ácido cítrico para ajuste do pH em 4,5. Dessa forma verificaram-se maiores conteúdos de ácido cítrico nas formulações com mais de 50% de infusão de erva-mate (Figura 1 d).

3.3 CONTEÚDO DE VITAMINA C NAS BEBIDAS MISTAS DE LICHIA E ERVA-MATE

As bebidas mistas logo após o preparo apresentaram conteúdo de vitamina C entre 58,7 (F1) e 29,2 mg/L (F5) (Figura 2), sendo maior o conteúdo nas bebidas contendo maiores proporções de suco de lichia. Este resultado é inferior ao encontrado por Tyagi et al. (2014) em treze amostras de sucos comerciais de diferentes frutas (0,002 a 0,025 %) e inferior ao observado por Jayachandran et al. (2015) (21,8 mg/100 mL) em bebida mista de lichia (72%), água de côco (27%) e limão (1%). Verificou-se correlação positiva e significativa entre o conteúdo de vitamina C e a proporção de suco de lichia ($r = 0,592$, $p \leq 0,05$), para as bebidas mistas de lichia e erva-mate.

3.4 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS, METILXANTINAS E FLAVONOIDES NAS BEBIDAS MISTAS DE LICHIA E ERVA-MATE

Nas bebidas mistas foram identificados e quantificados 20 compostos bioativos. Destes, quatro eram da classe das metilxantinas (teobromina, paraxantina, teofilina e cafeína), sete eram flavonoides (epigallocatequina, catequina, epicatequina, rutina, miricetina, quercetina e kaempferol) e sete eram ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido protocatecúico, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferrúlico e ácido sinápico).

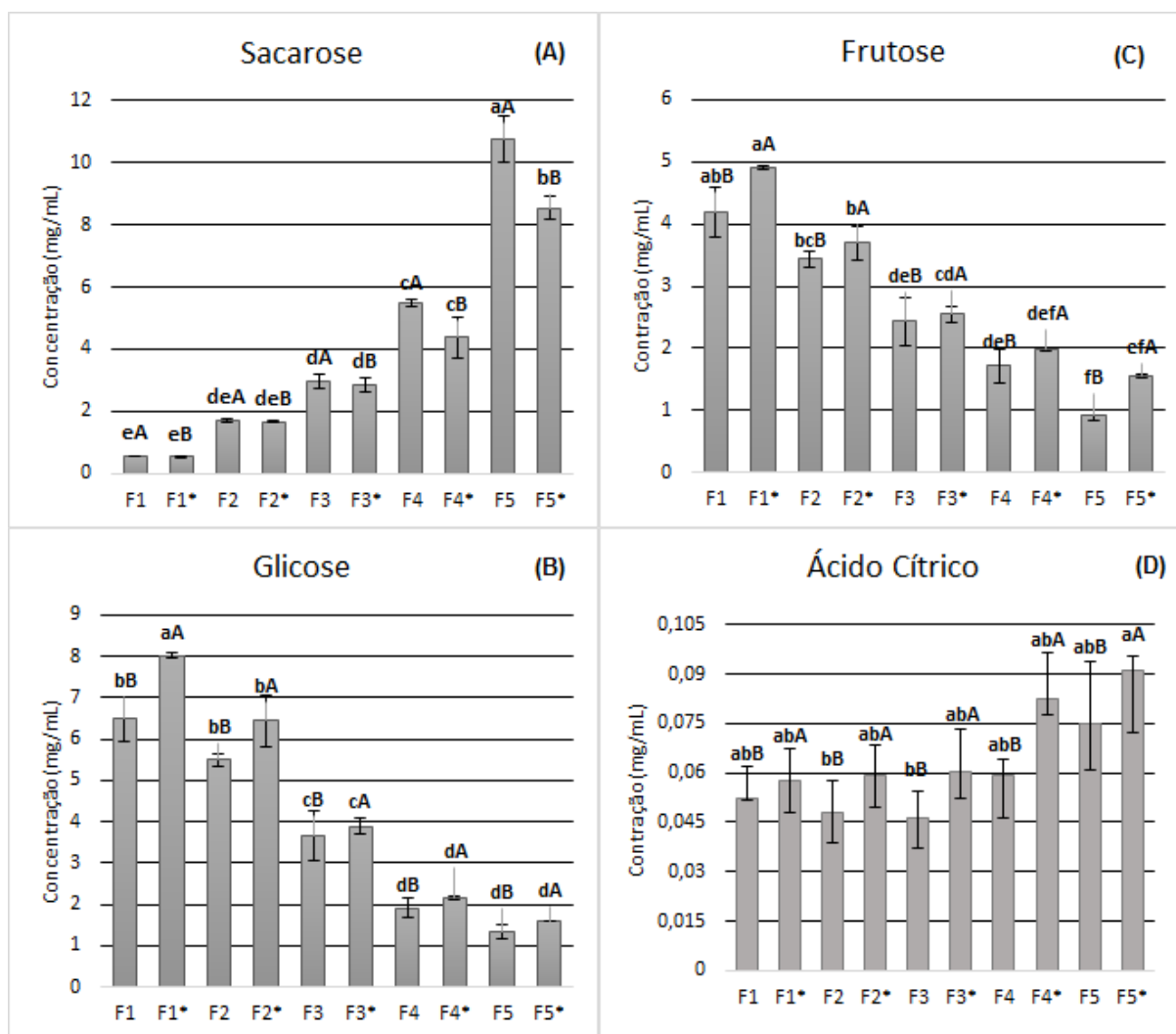


Figura 1 – Conteúdo de sacarose (a), glicose (b), frutose (c) e ácido cítrico (d) em bebidas mistas de lichia e erva-mate, antes e após a pasteurização ¹

Formulações contendo diferentes proporções de suco de lichia e erva-mate: F1 (90:10); F2 (70:30); F3 (50:50); F4 (30:70); F5 (10: 90). ¹Gráficos plotados a partir dos resultados médios (n = 10) e desvio padrão. Barras verticais contendo letras maiúsculas distintas, para mesma formulação, indicam diferenças significativas a $p \leq 0,05$ em função do tratamento térmico. Barras contendo letras minúsculas distintas, para mesma característica, linha indicam diferenças significativas a $p \leq 0,05$ entre as formulações de bebidas. F1, F2, F3, F4 e F5: bebidas não pasteurizadas; F1*, F2*, F3*, F4* e F5*: bebidas pasteurizadas

Ainda, foram identificados e quantificados a trigonelina e ácido nicotínico. Segundo Ashihara (2006) a trigonelina usualmente é detectada em café, já o ácido nicotínico é comumente encontrado em café e chás. Desta forma, a detecção e quantificação da trigonelina, com 16 a 5 mg/L (F1 a F5, respectivamente), em bebida mista de lichia e erva-mate sugere que as matérias-primas empregadas neste experimento continham este composto. Ressalta-se que não foram encontrados estudos na literatura que tenham detectado a presença deste composto em folhas, infusão ou bebidas à base de erva-mate.

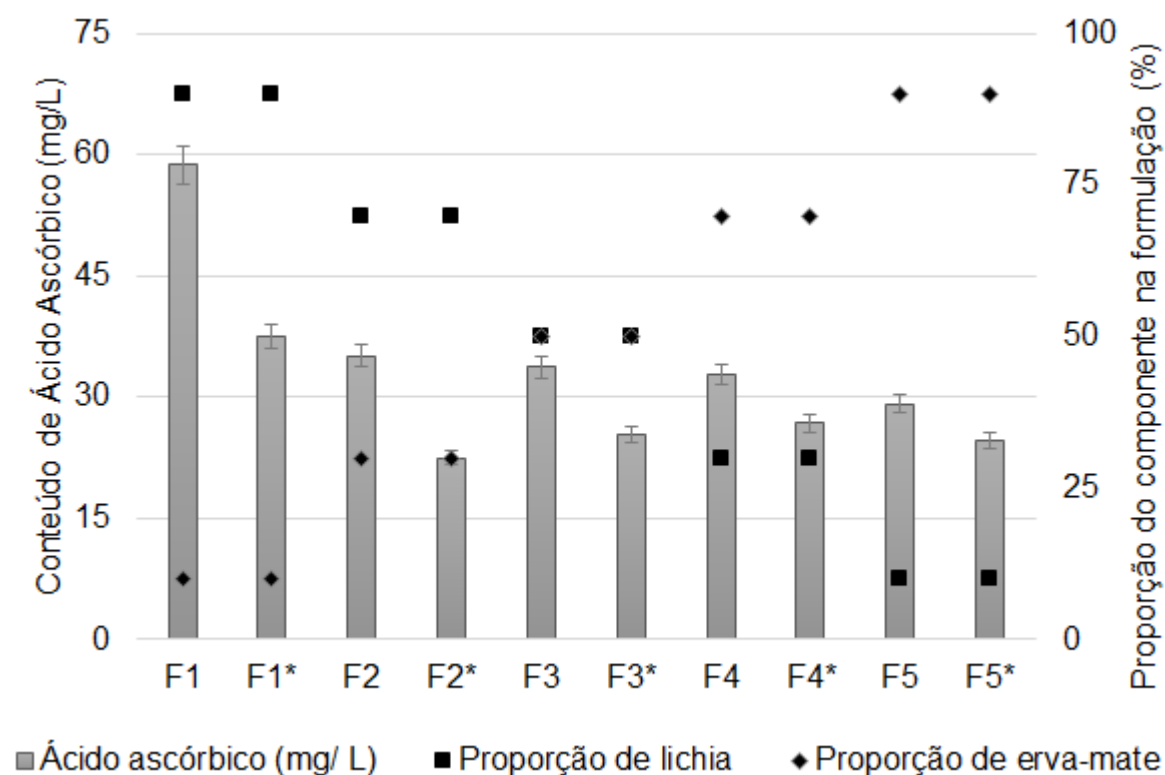


Figura 2 - Conteúdo de ácido ascórbico nas bebidas mistas de lichia e erva-mate antes e após a pasteurização¹

¹Barras de erros representam desvio padrão, sendo n = 10. F1, F2, F3, F4 e F5: bebidas não pasteurizadas; F1*, F2*, F3*, F4* e F5*: bebidas pasteurizadas

De forma geral, os compostos com maior concentração, em ordem decrescente foram cafeína, ácido clorogênico e ácido caféico (Figura 3). Maiores conteúdos de ácidos fenólicos, flavonoides e metilxantinas foram observados em bebidas com maiores proporções de erva-mate, em função do perfil dos

compostos fenólicos e metilxantinas deste ingrediente, confirmado pela correlação positiva e significativa entre a proporção de erva-mate e conteúdo de metilxantinas, ácidos fenólicos e flavonoides ($r = 0,87$; $r = 0,87$; e $r = 0,82$, respectivamente, $p \leq 0,05$).

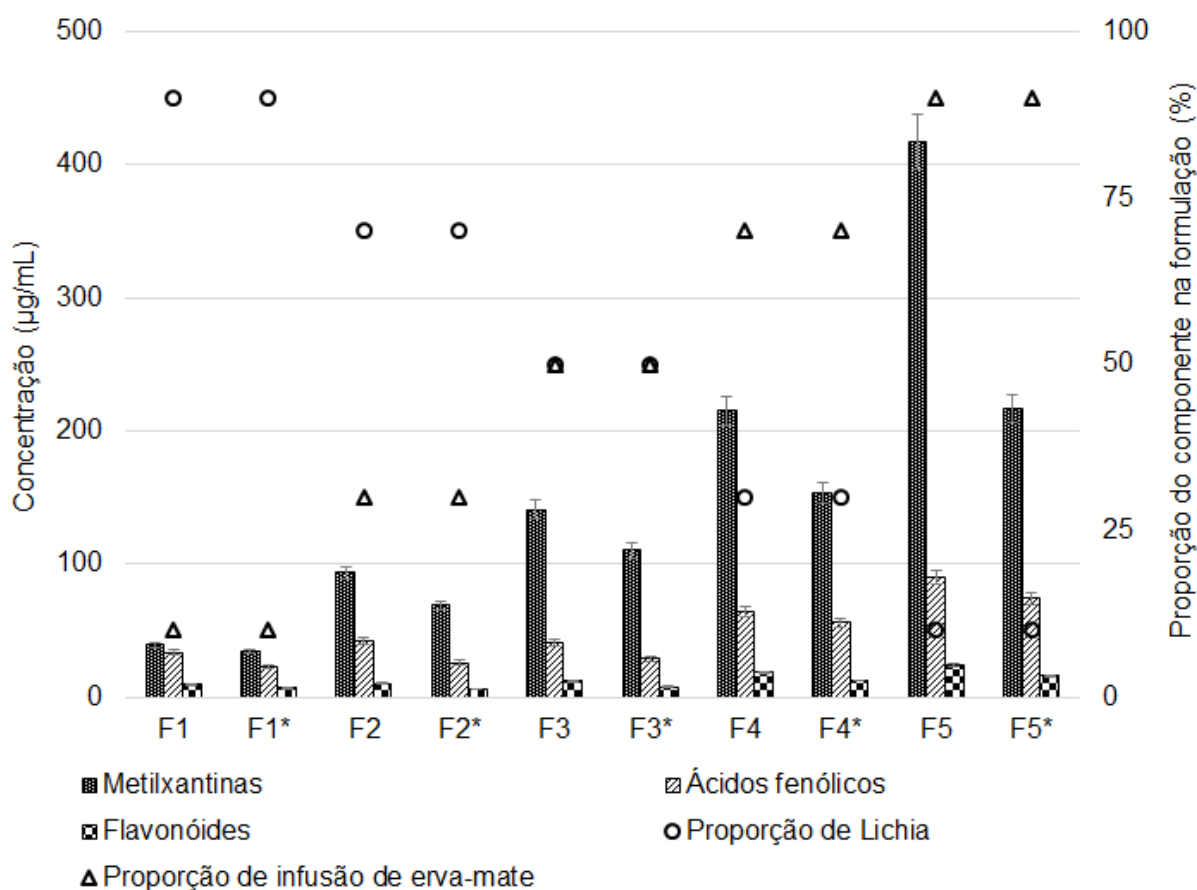


Figura 3 - Concentração relativa de metilxantinas, flavonoides e ácidos fenólicos nas bebidas mistas de lichia e erva-mate¹

¹Barras de erros representam desvio padrão (n = 10). F1, F2, F3, F4 e F5: bebidas não pasteurizadas; F1*, F2*, F3*, F4* e F5*: bebidas pasteurizadas

3.5 EFEITO DA PASTEURIZAÇÃO SOBRE AS BEBIDAS MISTAS DE LICHIA E ERVA-MATE

O tratamento térmico da bebida mista de lichia e erva-mate por 80°C/20 min foi eficiente para a pasteurização do produto, uma vez que atende a legislação vigente quanto a pesquisa de coliformes à 45 °C e *Salmonella sp.* (BRASIL, 2001).

A pasteurização influenciou significativamente o conteúdo dos açúcares e de ácido orgânicos (Figura 1 a-d).

Após a pasteurização, em todas as formulações, houve redução no conteúdo de sacarose e aumento no conteúdo de glicose e frutose. Esta ocorrência pode ser atribuída a inversão da sacarose durante a pasteurização, sendo favorecida pela acidez das bebidas (pH = 4,5). Este comportamento também foi apontado por Nisar, Baba e Masoodi, (2015) em polpa de maçã. Porém Yu et al. (2014) e Zheng et al. (2014) não verificaram alterações no conteúdo de sacarose, glicose e frutose em suco de lichia após o tratamento térmico (95 °C/1 min).

Observou-se, de forma geral, aumento no conteúdo de ácido cítrico após a pasteurização. Yu et al. (2014) também observaram aumento no conteúdo deste ácido após tratamento térmico (95 °C/1 min) de suco de lichia. Em contrapartida, observou-se que após a pasteurização houve uma redução no conteúdo de ácido málico em 14, 21 e 17%, para F1, F2 e F3, respectivamente. Esta diminuição também foi observada por Aguilar-Rosas et al. (2007) em suco de maçã termicamente tratado à 90 °C/30s. Já Zheng et al. (2014) e Yu et al. (2014) não detectaram alterações no conteúdo de ácido málico em suco de lichia tratado a 95 °C/1 min.

Woo et al. (2015) verificaram aumento no conteúdo de ácidos orgânicos em soluções com 20% de glicose e de 20% de maltose, após o tratamento térmico com injeção de vapor à alta pressão (130-150 °C/1-5 h). Cserhalmi et al. (2006) não observaram diferenças entre conteúdo de ácidos orgânicos após pasteurização por luz pulsada em sucos de *grapefruit* (toranja), tangerina, limão e laranja.

Após o tratamento térmico, nas bebidas F1, F2, F3 e F4 verificou-se reduções de 36, 24, 18 e de 16% no conteúdo de vitamina C, em função do comportamento termo lábil do ácido ascórbico, acentuado em presença de oxigênio (ZHENG et al., 2014). Mesmo após a pasteurização, a menor redução no conteúdo de vitamina C nas bebidas F4 e F5 pode ser justificada pela maior proporção de erva-mate nestas bebidas. A infusão de erva-mate apresenta inúmeros compostos com atividade antioxidante (HECK; DE MEJIA, 2007; Dartora et al., 2011; BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007) que reagem com compostos oxidantes presentes nas bebidas (AGUIAR et al., 2007).

Assim como em outras bebidas de frutas (RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2015), tem sido observada redução no conteúdo de ácido ascórbico em suco puro ou bebida mista de lichia após a pasteurização em diferentes condições de tempo e temperatura (YU et al.; 2014; GUO et al., 2015; JAYACHANDRAN et al., 2015).

Em todas as formulações, após pasteurização, houve redução no conteúdo das metilxantinas, ácidos fenólicos e dos flavonoides (Figura 3), que pode ser justificada pela degradação térmica destes compostos. Para Liu et al. (2015) a redução no conteúdo de rutina, epicatequina e ácido clorogênico em suco de lichia tratado termicamente (100 °C/60s ou 134 °C/4s) está relacionada a degradação dos compostos fenólicos em quininos, que podem reagir com aminoácidos e proteínas presentes no suco de lichia. Hajare et al. (2010) não detectou alteração no conteúdo de flavonoides em frutas de lichias tratadas por radiação, enquanto que Rodríguez-Roque et al. (2015) apontam que com o tratamento térmico (90 °C/60 s) levou a uma redução de até 36% no conteúdo de alguns ácidos fenólicos em bebidas à base de frutas.

4 CONCLUSÕES

A lichia é uma fruta rica em frutose e glicose, vitamina C e compostos fenólicos totais. Apresenta atividade antioxidante considerável avaliada pelos métodos de DPPH, FRAP e ABTS. Contém compostos com potencial bioatividade, sendo em maior concentração o ácido ferrúlico, a epicatequina, a quercetina, o kaempferol, o ácido gálico e a rutina.

A mistura da lichia com erva-mate proporciona bebidas com adequados conteúdos de açúcares, ácidos orgânicos, vitamina C, ácidos fenólicos, metilxantinas e flavonoides.

As bebidas mistas de lichia com erva-mate não pasteurizadas, com maiores proporções de lichia contém mais glicose, frutose, ácido málico e vitamina C. Em maiores proporções de erva-mate as bebidas mistas não pasteurizadas têm mais sacarose, ácido cítrico, ácidos fenólicos, flavonoides e metilxantinas.

Nas bebidas mistas a pasteurização a 80 °C/20 min reduz o conteúdo de sacarose, ácido cítrico, ácidos fenólicos, flavonoides e metilxantinas e aumenta o teor de glicose e frutose.

As bebidas com mais de 50% de suco de lichia apresentam maior conteúdo de vitamina C enquanto que aquelas com mais de 70% de infusão de erva-mate mostram maior conteúdo de ácidos fenólicos, metilxantinas e flavonoides.

5 REFERÊNCIAS

- AGUILAR-ROSAS, S. F.; BALLINAS-CASARRUBIAS, M. L.; NEVAREZ-MOORILLON, G. V.; MARTIN-BELLOSO, O.; ORTEGA-RIVAS, E. Thermal and pulsed electric fields pasteurization of apple juice. Effects on physicochemical properties and flavor compounds. **Journal of Food Engineering**, London, v.83, n.1, p.41–46, 2007
- AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; TSAI, S. M.; PARK, Y. K. Transformações enzimáticas de flavonóides. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 61-76, 2007.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists**. 18 ed. Maryland: AOAC, 2005. 1094 p.
- ASHIHARA, H. Metabolism of alkaloids in coffee plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2006.
- BOAVENTURA, B. C. B.; MURAKAMI, A. N. N.; PRUDENCIO, E. S., MARASCHIN, M.; MURAKAMI, F. S.; AMANTE, E. R.; AMBONI, R. D. M. C. Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) through freeze concentration technology. **Food Research International**, Essex, v. 53, n. 2, p. 686-692, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 10 jan. 2001. Seção 1, p. 45.
- BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, Essex, v.40, n.3, p.393-405, 2007.
- CHEN, D.; LIU, S. Q. Impact of simultaneous and sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on non-volatiles and volatiles of lychee wines. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 65, p. 53-61, 2016.

- CLERICI, M. T. P. S.; CARVALHO-SILVA, L. B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Research International**, Essex, v. 44, n. 7, p. 1658–1670, 2011.
- CSERHALMI, Z.; SASS-KISS, Á.; TÓTH-MARKUS, M.; LECHNER, N. Study of pulsed electric field treated citrus juices. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Wageningen, v. 7, n. 1-2, p. 49 – 54, 2006.
- DARTORA, N., SOUZA, L. M., SANTANA-FILHO, A. P., IACOMINI, M., VALDUGA, A. T., GORIN, P. A. J, & SASSAKI, G. L. UPLC-PDA–MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**, Barking, v. 129, n. 4, p. 1453-1461, 2011.
- DA SILVA, D. F. P.; SALOMÃO, L. C. C.; CABRINI, E. C.; ALVES, R. R.; STRUIVING, T. B. Prevenção do escurecimento do pericarpo de lichia através do uso de ácidos e filmes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, volume especial, E., p. 519-527, 2011.
- EMANUELE, S.; LAURICELLA, M.; CALVARUSO, G.; D'ANNEO, A.; GIULIANO, M. Litchi chinensis as a functional food and a source of antitumor compounds: an overview and a description of biochemical pathways. **Nutrients**, Basel, v. 9, n. 992, p. 1-15, 2017.
- FRIZON, C. N. T.; PERUSSELLO, C. A.; STURION, J. A.; FRACASSO, A. F.; HOFFMANN-RIBANI, R. Stability of beverages of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) with soy. **Nutrition and Food Science**, Bingley, v. 45, n. 3, p. 467-478, 2015.
- GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; LI, Y.; XU, J.; JIANG, Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. **Nutrition Research**, Bratislava, v. 23, n. 12, p. 1719–1726, 2003.
- GUO, H.; YU, Y.; XIAO, G.; XU, Y.; WU, J. Changes in quality attributes during storage of litchi juice treated with dimethyl dicarbonate (DMDC) and nisin. **Journal of Food Research**, Toronto, v. 4, n. 4, p. 81-91, 2015.
- HAJARE, S. N.; SAXENA, S.; KUMAR, S.; WADHAWAN, S.; MORE, V.; MISHRA, B. B.; PARTE, N.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Quality profile of litchi (*Litchi chinensis*) cultivars from India and effect of radiation processing. **Radiation Physics and Chemistry**, London, v.79, n.9, p. 994-1004, 2010.
- HAQ, I. U.; RAB, A. Characterization of physico-chemical attributes of litchi fruit and its relation with fruit skin cracking. **The Journal of Animal and Plant Sciences**, Lahore, v. 22, n. 1, p. 142-147, 2012.
- HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, n. 9, p. R138-151, 2007.
- IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4ª ed., 1ª Ed. Digital, São Paulo: 2008.

JAYACHANDRAN, L. E.; CHAKRABORTY, S.; RAO, P. S. Effect of high pressure processing on physicochemical properties and bioactive compounds in litchi based mixed fruit beverage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Wageningen, v. 28, n. 1, p. 1–9, 2015.

LI, C.; HAO, J.; ZHONG, H.; DANG, M.; XIE, B. Aroma components at various stages of litchi juice processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 89, n. 14, p. 2405–2414, 2009.

LIANG, D.; LIN, F.; YANG, G.; YUE, X.; ZHANG, Q.; ZHANG, Z.; CHEN, H. Advantages of immersion freezing for quality preservation of litchi fruit during frozen storage. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 60, n. 2, p. 948-956, 2015.

LIU, L.; ZENG, Q.; ZHANG, R.; WEI, Z.; DENG, Y.; ZHANG, Y.; TANG X.; ZHANG, M. Comparative study on phenolic profiles and antioxidant activity of litchi juice treated by high pressure carbon dioxide and thermal processing. **Food Science and Technology Research**, Tsukuba, v. 21, n. 1, p. 41-49, 2015.

LV, Q.; SI, M. M.; YAN, Y. Y.; LUO, F. L.; HU, G. B.; WU, H. S.; SUN, C.; LI, X.; CHEN, K. Effects of phenolic-rich litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pulp extracts on glucose consumption in human HepG2 cells. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 7, p. 621–629, 2014.

MAHATTANATAWEE, K.; MANTHEY, J. A.; LUZIO, G.; TALCOTT, S. T.; GOODNER, K.; BALDWIN, E. A. Total Antioxidant Activity and Fiber Content of Select Florida-Grown Tropical Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 19, p. 7355–7363, 2006.

MELLO, A. C. B.; DE FREITAS, R. J. S.; WASZCZYNSKYJ, N.; KOEHLER, H. S.; WILLE, G. M. F. C.; BERTÉ, K. A. S. Bebida gaseificada de erva-mate verde. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 27, n. 1, p. 19-26, 2009.

MURAKAMI, A. N. N.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDENCIO, E. S.; AMANTE, E. R.; ZANOTTA, L. M.; MARASCHIN, M.; PETRUS, J. C.; TEOFILO, R. F. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 44, n. 10, p. 2211-2216, 2011.

NISAR, R.; BABA, W. N.; MASOODI, F. A. (2015). Effect of chemical and thermal treatments on quality parameters and antioxidant activity of apple (pulp) grown in high Himalayan regions. **Journal Cogent Food and Agriculture**, v. 1, n. 1. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23311932.2015.1063797>. Acesso em: 28 jun. 2018.

NUTRACEUTICALS INTERNATIONAL. (1999). **Mate herbal drink finds growth markets outside South America**. Nutraceuticals International, p. NA. Academic OneFile. Disponível em:

<http://link.galegroup.com/apps/doc/A54053516/AONE?u=capes&sid=AONE&xid=7bac6052>. Acesso em 4 jun. 2018.

ORJUELA-PALACIO, J. M.; ZAMORA, M. C.; LANARI, M. C. Consumers' acceptance of a high-polyphenol yerba mate/black currant beverage: effect of repeated tasting. **Food Research International**, Essex, v. 57, p. 26–33, 2014.

PAULI, E. D.; CRISTIANO, V.; NIXDORF, S. L. Método para determinação de carboidratos empregado na triagem de adulterações em café. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 689-694, 2011.

PIMENTEL, T. C.; MADRONA, G. S.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp - *paracasei* and oligofructose in different package type. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 63, n.1, p. 415-422, 2015.

QUEIROZ, E. R.; ABREU, C. M. P. OLIVEIRA, K. S. Constituintes químicos das frações de lichia in natura e submetidas a secagem: potencial nutricional dos subprodutos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 4, p. 1174-1179, 2012.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J.; ROJAS-GRAÜ, M. A.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARTÍN-BELLOSO, O. In vitro bioaccessibility of health-related compounds as affected by the formulation of fruit juice- and milk-based beverages. **Food Research International**, Essex, v. 62, p. 771–778, 2014.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J.; ANCOS, B.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; CANO, M. P.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARTÍN-BELLOSO, O. Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 14, n. 1, p. 33–43, 2015.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). **Food Chemistry**, Barking, v. 90, n. 1-2, p. 133-139, 2005.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, New York, v. 299, p. 152-178, 1999.

STATSOFT. **STATISTICA for Windows: computer program manual**. Versão 7.1. Tulsa: Software Inc., 2006.

SU, D.; TI, H.; ZHANG, R.; ZHANG, M.; WEI, Z.; DENG, Y. GUO, J. Structural elucidation and cellular antioxidant activity evaluation of major antioxidant phenolics in lychee pulp. **Food Chemistry**, Barking, v. 158, p. 385–391, 2014.

TAN, J. B. L.; LIM, Y. Y. Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. **Food Chemistry**, Barling, v. 172, p. 814–822, 2015.

- TERHAAG, M. M. (2018). **Carbohydrates, organic acids and phenolic compounds in leaves and infusion of yerba mate**. 21p. A ser encaminhado para publicação.
- TERHAAG, M. M. (2018). **Lychee (*Litchi chinensis*) and yerba mate (*Ilex paraguariensis*) mixed beverage with high antioxidant potential**. 26 p. A ser encaminhado para publicação.
- TYAGI, G.; JANGIR, D. K.; SINGH, P.; MEHROTRA, R.; GANESAN, R.; GOPAL, E. S. R. Rapid determination of main constituents of packed juices by reverse phase-high performance liquid chromatography: an insight in to commercial fruit drinks. **Journal of Food Science and Technology**, New Delhi; v. 51, n. 3, p. 476–484, 2014.
- VILLANUEVA, N. D. M.; PETENATE, A. J.; DA SILVA, M. A. A. P. Performance of hybrid hedonic scale as compared to the traditional hedonic, self-adjusting and ranking scales. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 16, n. 8, p. 691–703, 2005.
- WALL, M. M. (2006). Ascorbic acid and mineral composition of longan (*Dimocarpus longan*), lychee (*Litchi chinensis*) and rambutan (*Nephelium lappaceum*) cultivars grown in Hawaii. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 6-7, p. 655-663.
- WOO, K. S.; KIM, H. Y.; HWANG, I. G.; LEE, S. H.; JEONG, H. S. Characteristics of the thermal degradation of glucose and maltose solutions. **Preventive Nutrition and Food Science**, Busan, v. 20, n. 2, p.102-109, 2015.
- YU, Y.; XIAO, G.; XU, Y.; WU, J.; WEN, J. Effects of dimethyl dicarbonate (dmdc) on the fermentation of litchi juice by *Lactobacillus casei* as an alternative of heat treatment. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 79, n. 5, p. 947-954, 2014.
- ZENG, X. A.; QIN, F. G. F.; CHEN, X. D.; ZHANG, L. Composition analysis of litchi juice and litchi wine. **International Journal of Food Engineering**, Berlin, v. 4, n. 4, p. 1-16, 2008.
- ZHANG, R. F.; ZENG, Q. S.; DENG, Y. Y.; ZHANG, M. W.; WEI, Z. C.; ZHANG, Y.; TANG, X. J. Phenolic profiles and antioxidant activity of litchi pulp of different cultivars cultivated in Southern China. **Food Chemistry**, Barking, v. 136, n. 3-4, p. 1169–1176, 2013.
- ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I. M.; GRANATO, D. A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**, Essex, v. 60, p. 246–254, 2014.
- ZHENG, X.; YU, Y.; XIAO, G.; XU, Y.; WU, J.; TANG, D.; ZHANG, Y. Comparing product stability of probiotic beverages using litchi juice treated by high hydrostatic pressure and heat as substrates. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Wageningen, v. 23, p. 61–67, 2014.

ARTIGO CIENTÍFICO 4: Desenvolvimento e aceitabilidade sensorial de bebida probiótica de lichia (*Litchi chinensis*) fermentada por *Saccharomyces boulardii*

RESUMO

A *Saccharomyces boulardii* é uma levedura probiótica com potencial aplicação em suco de frutas, como o da lichia. A lichia é uma fruta com polpa carnosa e adocicada, com aromas e sabores característicos. Objetivou-se neste estudo o desenvolvimento de uma bebida probiótica de lichia, com emprego da levedura *S. boulardii*. Avaliou-se também o efeito do armazenamento refrigerado sobre a viabilidade celular da cultura, suas características físico-químicas e sua aceitação da bebida. Foram desenvolvidas bebidas de lichia por meio da adição de *S. boulardii* com uma etapa de fermentação durante 24h e posterior adição de sacarose para diferentes conteúdos de sólidos solúveis totais. As bebidas foram armazenadas à 4 °C por até 28 dias e apresentaram compostos fenólicos, propriedades antioxidantes e características físico-químicas adequados para o consumo. Dentre as bebidas propostas, verificou-se viabilidade celular $> 1 \times 10^6$ UFC/mL durante 14 dias de armazenamento nas amostras que continham menor conteúdo de sólidos solúveis totais. Bebidas com maiores teores de açúcares atingiram uma viabilidade $> 1 \times 10^6$ UFC/mL, maior teor de compostos fenólicos totais, teor de sólidos solúveis totais e de etanol, quando armazenadas sob refrigeração, por 21 dias. Observou-se diminuição no conteúdo de sólidos solúveis totais, compostos fenólicos totais e na atividade antioxidante ao longo do armazenamento. As bebidas com maior conteúdo de sólidos solúveis totais e com a adição da *S. boulardii* foram aceitas pelo consumidor, com características físico-químicas e com viabilidade de cultura que tornaram a com bebida potencial probiótico até os 21 dias de armazenamento refrigerado à 4 °C.

Palavras-chave: suco, fermentação, levedura, armazenamento, funcional

1 INTRODUÇÃO

Probióticos são micro-organismos não patogênicos que, quando administrados em quantidade adequada, exercem uma influência positiva sobre a saúde ou a fisiologia do hospedeiro (WGO, 2011; HILL et al., 2014).

Dentre os micro-organismos com efeitos probióticos incluem as bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, além da levedura *Saccharomyces boulardii* (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002). A *S. boulardii* é uma levedura termofílica não patogênica, resistente aos ácidos gástricos e proteólise, isolada a partir da lichia, na Indochina (FRATIANNI et al., 2014; CZERUCKA, PICHE, RAMPAL, 2007; CZERUCKA, RAMPAL, 2002). A *S. boulardii* não faz parte da microbiota intestinal, não coloniza o intestino e há o declínio da concentração após cessar a administração (CZERUCKA, PICHE, RAMPAL, 2007). Esta levedura tem sido empregada no tratamento de diarreia do viajante, diarreia associada a antibióticos, gastroenterite aguda em adultos e crianças, diarreia em pacientes intubados e diarreia crônica em pacientes HIV positivos. Ainda possui efeito protetivo contra *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae*, *Shigella* e *E. coli* (EPEC) e *Salmonella entérica* Typhimurium (CZERUCKA, RAMPAL, 2002; KÜHLE; SKOVGAARD; JESPERSEN, 2005; MARTINS et al., 2013).

Os sucos de frutas e vegetais são apropriados como matriz para o desenvolvimento de produtos probióticos por não conterem alergênicos lácteos que impedem o consumo por parte da população (LUCKOW; DELAHUNTY, 2004). Segundo Fratianni et al. (2014), a aplicação da levedura *S. boulardii* em sucos de frutas não tem sido muito explorado comercialmente. Porém, pesquisas têm demonstrado diversas aplicações da *S. boulardii* em diferentes matrizes alimentícias, como o suco de tomate e cenoura (SIVUDU et al., 2016), cerveja artesanal (CAPECE et al., 2018), suco de uva utilizando pedaços de maçã como carreador (GALLO et al., 2014), bebida à base de rabanete, beterraba e cenoura (DEĞIRMENCIOĞLU; GURBUZ; SAHAN, 2016), polpa de maçã (FARINAZZO et al., 2017), bebida de beterraba, cenoura e aipo (PROFIR; VIZIREANU, 2013), suco de tomate (FRATIANNI et al., 2013), leite e bebidas lácteas (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001), iogurte de leite de cabra (KARAOLIS et al., 2013),

suco de berries (FRATIANNI et al., 2014), sorvete à base de soja (HEENAN et al., 2004), entre outros.

A lichia (*Litchi chinensis* Sonn), originária da China (ZHANG et al., 2013), é uma fruta doce, rica em açúcares, possui polpa carnosa, cor e aromas atrativos, podendo ser consumida em calda, polpa em pó, desidratada e na forma de suco (ZHENG et al., 2014). A lichia apresenta limitada vida útil e o seu processamento é uma alternativa ao excedente de produção (JAYACHANDRAN, CHAKRABORTY; RAO, 2015).

Além de apresentar compostos bioativos, com propriedades antioxidantes, antibacterianas, anti-inflamatórias, antialérgicas, hepatoprotetoras, antivirais, anticâncer e vasodilatadoras (ZHANG et al., 2013; SU et al., 2014), a lichia possui sabor rico e agradável, com boas características sensoriais e de potencial aplicação em bebidas fermentadas e probióticas (ZENG et al.; 2008; ALVES et al., 2010; ALVES et al., 2011; KALITA et al., 2018).

Alves et al. (2011) indicam que bebidas de lichia apresentam boa aceitação sensorial quando fermentadas por *S. cerevisiae*, porém, na literatura não foram encontradas pesquisas em que a *S. boulardii* foi aplicada em suco de lichia como matriz para a produção de bebidas fermentadas probióticas.

Assim, os objetivos do estudo foram desenvolver uma bebida probiótica de lichia, com emprego da levedura *Saccharomyces boulardii* e avaliar o efeito do armazenamento refrigerado sobre a viabilidade celular, características físico-químicas e aceitação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Reagentes

Os reagentes DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), TPTZ (2,4,6-tripiridyl-S-triazina), ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico), Folin-Ciocalteu, Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), glicose,

frutose, sacarose, estaquiose, manitol, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, ácido ascórbico, ácido gálico, ácido protocatecúico, teobromina, paraxantina, epigallocatequina, catequina, epicatequina, quercetina, ácido caféico, cafeína, rutina, kaempferol, ácido clorogênico, ácido p-cumárico, ácido ferrúlico, ácido sinápico, miricetina e trigonelina foram adquiridos junto à Sigma-Aldrich (St Louis, EUA), contendo grau de pureza $\geq 99\%$. Etanol e os demais reagentes foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A acetonitrila grau HPLC foi adquirida da J.T. Baker (Xalostoc, México). A água ultrapura utilizada no preparo das soluções padrão e na extração foi produzida pelo Sistema Milli-Q[®] (Simplicity 185, Millipore, Danvers, EUA).

2.1.2 Suco de lichia

Lichias (*Litchi chinensis* Sonn.) da variedade Bengal, provenientes da safra de 2014, foram obtidas de produtores da região de Umuarama, Paraná, Brasil (23°45'57"S; 53°19'30"O e altitude de 442 m). Os 195 kg de frutos foram sanitizados com solução de hipoclorito de sódio (100 ppm v/v) por 5 min, descascados manualmente e despulpados em despulpadeira (F. Silva, modelo MS-200, Brasil). A polpa (15,8 °Brix) foi acondicionada em sacos de polietileno e armazenada à -15 °C até o momento da utilização e análises. Para o preparo das bebidas, a polpa foi descongelada a 4 °C e filtrada em peneiras de 200 mesh obtendo-se o suco.

2.1.3 Cultura probiótica

A *S. boulardii* empregada para a preparação de inóculo foi obtida de produto comercial na forma liofilizada (Floratil[®]Merck S.A. Brazil). Cada cápsula de 100 mg continha ao menos $0,5 \times 10^9$ células de *S. boulardii*-17.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Ativação da cultura probiótica

A levedura liofilizada foi reativada em 100 mL de caldo YPD (extrato de levedura 10 g/L; peptone bacteriológica, 20 g/L; dextrose, 20 g/L) previamente esterilizada por autoclavagem (121 °C/20 min) e mantida a 30 °C, 120 rpm, por 24 h em estufa com agitação (CT-712 Cientec, Brasil).

A biomassa da levedura obtida após incubação foi centrifugada a 14000g/15 min à 10 °C (Eppendorf 5804 R, Alemanha) e lavada por duas vezes com solução salina 0,85% (p/v) estéril para remoção por centrifugação do YPD residual. A biomassa foi ressuspensa em 50 mL de solução salina 0,85% (p/v) estéril, obtendo-se assim a cultura probiótica ativada.

2.2.2 Preparo da bebida de lichia probiótica

As bebidas probióticas foram preparadas conforme Figura 1. Foi adicionada água potável ao suco de lichia em quantidade suficiente para ajuste do teor de sólidos solúveis totais (SSTs) em 12 °Brix. O pH foi corrigido para 4,5 por meio da adição de ácido cítrico 20% (p/v). As bebidas foram acondicionadas em garrafas de vidro de 500 mL e pasteurizadas em banho-maria por 20 min/80 °C com imediato resfriamento em banho de gelo. Por meio de pesquisa de Coliformes a 45 °C e de *Salmonella sp*, confirmou-se que a bebida pasteurizada atendia aos padrões microbiológicos da legislação vigente (BRASIL, 2001).

O inóculo de *S. boulardii* (cultura ativada) foi adicionado ao suco de lichia em quantidade suficiente para 10⁵ células/mL de suco e permitiu-se a fermentação em estufa com agitação (120 rpm), por 24 h/30 °C. O suco fermentado, com conteúdo de sólidos solúveis de 4,07 °Brix, foi dividido em três porções: a primeira permaneceu com conteúdo de sólidos solúveis original, sendo denominado de bebida de lichia com 4 °Brix (LH4), outra recebeu adição de sacarose em quantidade suficiente para 8 °Brix (LH8), e a última porção, recebeu a adição de sacarose até 12 °Brix (LH12). As bebidas foram armazenadas em

refrigerador à 4 °C durante 28 dias, com coletas a cada sete dias para análises. As bebidas foram preparadas em duas repetições.

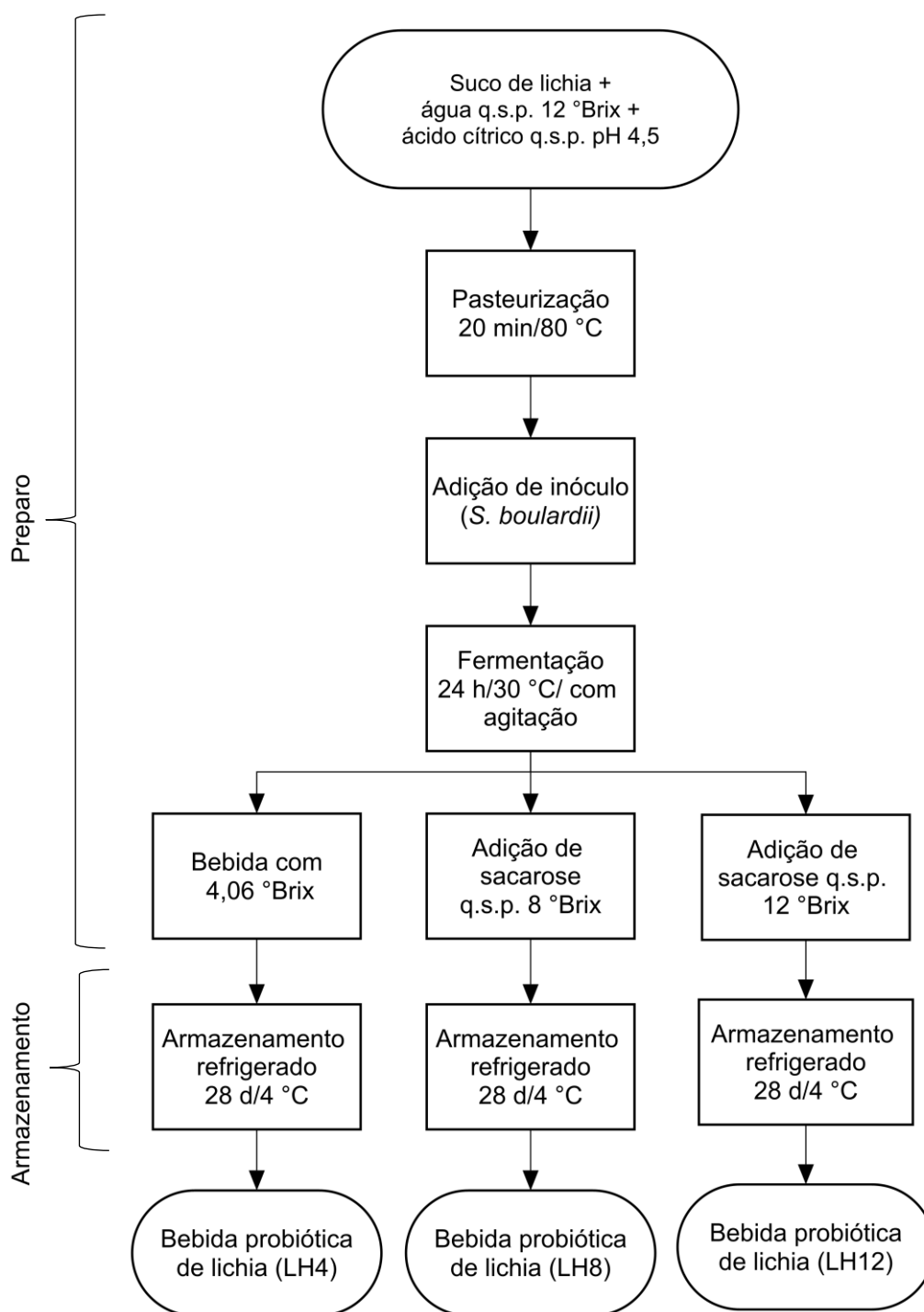


Figura 1 – Etapas de produção das bebidas probióticas de lichia q.s.p.: quantidade suficiente para; h: horas; d: dias

2.2.3 Análises físicas e químicas das bebidas

O pH foi determinado utilizando pHmetro (modelo HI 3221; Hanna Instruments Inc., Woonsocket, RI, USA). O conteúdo de sólidos solúveis totais (SST) em °Brix foi determinado em refratômetro digital (modelo Pocket Pal-1; Atago, Tokyo, Japão).

O teor de compostos fenólicos totais (CFT) foi determinado conforme método de Singleton; Orthofer; Lamuela-Raventos (1999), com algumas modificações. Em uma alíquota de 0,5 mL de bebida ou padrão foram adicionados 0,5 mL do reativo de Folin-Ciocalteau 0,9 N e 0,5 mL de solução de carbonato de sódio 10% (m/v) e após repouso por 30 min em ambiente escuro, a absorbância foi lida à 760 nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S22, Reino Unido). A água foi usada como branco. A concentração de CFT foi obtida a partir da curva padrão de ácido gálico (4 a 24 µg/mL). Os resultados foram expressos em µg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por mL.

A atividade antioxidante (AA) foi avaliada pelos métodos de redução do DPPH, do cátion ABTS^{•+} e pela capacidade de redução do Fe³⁺ em Fe²⁺ (FRAP) conforme Sánchez-González, Jiménez-Escrig e Saura-Calixto (2005).

Para DPPH, em um tubo foram adicionados 1 mL de tampão acetato 100 mM, pH 5,5; 1 mL de etanol; 0,5 mL de solução etanólica de DPPH 250 µM e 50 µL de bebida ou padrão. Após 15 min de incubação no escuro à temperatura ambiente a absorbância foi lida à 517 nm em espectrofotômetro. O controle positivo não continha amostra e o branco foi constituído de 1 mL de tampão acetato e 1,5 ml de etanol.

O radical ABTS^{•+} foi produzido partir da reação da solução de ABTS 7 mM com solução de persulfato de potássio 2,45 mM em ambiente escuro por 16 h. O ABTS^{•+} foi diluído em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4) até absorbância de 0,700 à 730 nm. Uma alíquota de 10 µL da amostra ou padrão foi adicionada em tubo contendo 4 mL da solução ABTS^{•+} diluída e após 6 min de reação a absorbância foi lida à 730 nm.

O reagente de FRAP foi obtido pela combinação de 25 mL de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL de solução de TPTZ (10 mM de TPTZ em HCl 40 mM) e 2,5 mL de cloreto de ferro 20 mM. O reagente foi preparado no momento da análise. Após a reação de 30 µL de bebida com 70 µL de água

destilada e 900 μL do reagente FRAP em ambiente escuro à 37 °C, por 30 minutos, a absorbância foi lida à 595 nm em espectrofotômetro. Utilizou-se água como branco.

Soluções com diferentes concentrações de Trolox em etanol 80% foram empregadas para obter as curvas padrão: de 50 a 600 μM (DPPH e FRAP) e de 0,75 a 7,5 μM (ABTS). Os resultados da atividade antioxidante foram expressos para cada método em μmol de equivalentes de Trolox (TEAC) por mL de amostra.

2.2.3.1 Preparo das amostras para análises cromatográficas

Para a identificação e quantificação dos açúcares, ácidos orgânicos, ácidos fenólicos, metilxantinas e flavonoides 1 mL da amostra foi homogeneizada em 10 mL de água e centrifugada à 9056 g por 15 min. O sobrenadante foi recolhido e filtrado em membrana de PVDF 0,22 μm (Millipore, Cork, Ireland) para as análises.

2.2.3.2 Determinação de açúcares e ácidos orgânicos

Empregou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC 20 A (Shimadzu Co., Kyoto, Japão) composto de uma bomba de alta pressão (LC-20AT), injetor automático (SIL-20AC HT), forno de coluna (CTO-20A) e detectores de arranjo de fotodiodos (PDA) (SPD-M20A) e índice de refração (RID-10A) acoplados em série (HPLC-PDA-RID). As análises cromatográficas foram isocráticas.

Na Tabela 1 estão descritas as condições cromatográficas para a determinação de açúcares e ácidos orgânicos. O comprimento de onda do PDA foi fixado em 215nm, e o do RID no modo varredura de 200 a 400nm (PAULI; CRISTIANO; NIXDORF, 2011) e a aquisição dos dados e a integração dos picos cromatográficos foram realizadas no software LC Solutions (Shimadzu Co., Kyoto, Japão). As análises foram realizadas em duplicata ($n = 2$). Os resultados foram expressos em mg/mL.

2.2.3.3 Determinação de ácidos fenólicos, metilxantinas e flavonoides

Os ácidos fenólicos, metilxantinas e flavonoides foram determinados por meio de cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência (UHPLC) (Acquity UPLC I Class Waters®, Waters Corporation, Milford, MA, USA) com coluna HSS C18 1,8 µm 2,1×100 mm (Waters), utilizando duas fases móveis – A: Água Ultrapura e B: Metanol (JT Backer, HPLC grade), acidificadas com 0,05% e 0,1% de ácido fórmico, respectivamente. O volume de injeção foi de 1,0 µL no modo *partial loop with needle overfill*, vazão de 0,4 mL/min, e a separação foi realizada na condição de gradiente utilizando curva de concentração (tempo de 0,00–10,00 min: 95% da fase A e 5% da fase B; tempo de 10,00–10,10 min: 5% da fase A e 95% da fase B; tempo de 10,10–13,00 min: 95% da fase A e 5% da fase B). O detector de arranjo de fotodiodos (PDA) foi utilizado para realizar a varredura dos comprimentos de ondas entre 190 e 700 nm, e a leitura fixada nos canais de 270 e 320 nm. O tempo total de análise foi de 13 minutos, considerando as etapas de separação, limpeza da coluna e equilíbrio das condições iniciais do gradiente. Para aquisição dos dados e a integração dos picos cromatográficos empregou-se o software Empower 3 (Waters). As análises foram realizadas em duplicata (n = 2). Os resultados foram expressos em µg/mL de amostra.

Tabela 1 – Condições cromatográficas empregadas para a determinação de açúcares e de ácidos orgânicos ¹

	Açúcares	Ácidos Orgânicos
Fase móvel	100% Água ultrapura	100% Tampão fosfato 25mM pH 2.4
Coluna	Aminex HPX-87P (7,8 x 300 mm; Biorad, CA, USA)	CapCell Pak C18 (250 x 4,6mm x 5µm; Shiseido Co., Ltd., Japão)
Temperatura do forno (°C)	85	40
Temperatura do detector (°C)	40	40
Vazão (mL/min)	1,0	1,0
Volume de injeção (µL)	20	20

Fonte: Pauli, Cristiano e Nixdorf (2011)

2.2.3.4 Determinação de etanol

Para identificação e quantificação de etanol empregou-se cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas (CG-MS, QP2010-SE-SHIMADIZU). As condições cromatográficas empregadas foram: coluna capilar Restek Rtx-5MS, (30 m x 0,25 mm; diâmetro interno de 0,25 μ m); hélio como gás de arraste com vazão de 0,7 mL/min; pressão e temperatura da coluna de 23,3 kPa e 35 °C, respectivamente. A rampa da temperatura do forno foi de 35-280 °C, sendo: de 1-5 min a uma taxa de 30 °C/min; e de 5-7,5 min a 50 °C/min; e uma temperatura constante mantida por 7,5-9,43 min; temperatura do injetor de 150 °C; temperatura do detector de 200 °C, temperatura de interface de 280 °C, operando em modo Scan 30-100 (m/z) com impacto eletrônico de 70 eV. Injeção de um volume de 500 μ L em razão de split de 1:20 (BAGEWADI; MULLA; NINNEKAR 2016).

Os resultados foram obtidos por análise dos tempos de retenção e áreas dos picos dos cromatogramas das amostras, após comparação com curva padrão de etanol grau HPLC, e expressos em percentual do volume de bebida probiótica de lichia (v/v).

2.2.4 Viabilidade da cultura de *S. boulardii*

Amostras foram coletadas e por meio de diluições seriadas em água peptonada 0,1% (p/v) (Oxoid®), as leveduras viáveis foram enumeradas por plaqueamento em ágar YPD à 37 °C/ 48 h, com resultados expressos em UFC/mL de amostra conforme Farinazzo et al. (2017).

2.2.5 Teste de aceitação sensorial

Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (certificado CAAE n° 56478316.8.0000.5231).

Foi conduzido um teste de aceitação de laboratório em cabines individuais sob luz branca. As amostras (30 mL) foram servidas à 7 ± 2 °C em copos plásticos codificados com números aleatórios de três dígitos. Elas foram apresentadas monadicamente e aleatorizada para cada avaliador. Água potável à

temperatura ambiente e biscoitos água e sal foram servidos para limpeza da cavidade oral.

Utilizou-se escala híbrida estruturada de dez centímetros (0 = desgostei muitíssimo; 10 = gostei muitíssimo) para a avaliação dos atributos de cor, aroma, textura, sabor e aceitação global (VILLANUEVA; PETENATE; DA SILVA, 2005)

A equipe foi composta por 53 consumidores usuais ou potenciais de bebidas à base de frutas e/ou bebidas funcionais (83% declararam saber o conceito de bebida funcional, relatando um consumo médio de 2,5 litros de bebidas de frutas por mês). A equipe foi composta por 33 mulheres e 20 homens, com alta escolaridade (85% possuíam graduação ou pós-graduação) e jovens (76% com idade entre 18 a 39 anos).

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi conduzido duas vezes usando delineamento inteiramente ao acaso. Os parâmetros físico-químicos e microbiológicos foram determinados em triplicata em cada repetição do experimento, a cada 7 dias, por um período de 28 dias. Um esquema de tratamento em parcelas subdivididas foi empregado, onde o tratamento principal foi o conteúdo de açúcar na bebida e o secundário foi o armazenamento. Foram considerados os dados da etapa de preparo e de armazenamento. Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de Tukey ($\alpha = 5\%$). O programa Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2014) foi utilizado para as análises estatísticas.

O experimento sensorial foi de blocos completos casualizados. Os dados foram submetidos à ANOVA de dois fatores (bebidas e avaliadores). Para comparação das médias empregou-se o teste de Tukey ($\alpha = 5\%$). Empregou-se o programa Statistica 7.1 (STATSOFT, 2006) para estas análises.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EFEITO DA FERMENTAÇÃO PELA *S. BOULARDII* NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA BEBIDA DE LICHIA

A viabilidade da cultura, pH, conteúdo de sólidos solúveis totais e etanol da bebida após preparo e imediatamente após a fermentação estão apresentados na Tabela 2. A adição do inóculo, seguida da fermentação por 24h proporcionou um aumento significativo ($p \leq 0,05$) na viabilidade da *S. boulardii* na bebida de lichia ($6,1 \times 10^6$ UFC/mL). Lee e Salminen (1995) apontam um consumo diário mínimo de 10^6 - 10^9 UFC do micro-organismo probiótico para se obter o efeito benéfico desejado. Esta quantidade varia em função do tipo de micro-organismo probiótico e do efeito desejado à saúde (WGO, 2011). Assim, a etapa de fermentação é necessária na produção da bebida probiótica de lichia, já que a mesma torna uma porção do produto com uma viabilidade de *S. boulardii* suficiente para o cumprimento desta recomendação ($1,2 \times 10^9$ UFC/ 200 mL).

A fermentação e aumento na viabilidade da *S. boulardii* levou a uma diminuição no conteúdo dos SSTs, uma vez que as leveduras utilizaram açúcares como principal fonte de energia para seu metabolismo (NELSON; COX, 2014). Outro fator a ser considerado, é que a etapa de fermentação foi conduzida sob agitação, proporcionando maior oxigenação na bebida de lichia e consequentemente, contribuído para o aumento no número de leveduras, já que segundo Rosenfeld et al. (2003), a oxigenação está relacionada a uma maior produção de constituintes da parede celular das leveduras, contribuindo para o aumento na viabilidade destas.

Na fermentação houve produção de etanol e de CO_2 , além de uma redução no pH da bebida de lichia. Este resultado está de acordo com a literatura, que segundo Estela-Escalante et al. (2012) e Nelson e Cox (2014), as leveduras, bem como a *S. boulardii* metabolizam açúcares produzindo principalmente etanol e CO_2 além de pequenas quantidades ácidos orgânicos.

3.2 EFEITO DO CONTEÚDO DE AÇÚCARES E DO ARMAZENAMENTO À 4 °C SOBRE AS BEBIDAS PROBIÓTICAS DE LICHIA

3.2.1 Viabilidade da *S. boulardii*

As bebidas, mesmo armazenadas sob refrigeração, apresentaram um incremento no número de colônias de *S. boulardii* com 1 dia de armazenamento, passando a apresentar viabilidade de 22 a 33 x 10⁶ UFC/mL (Tabela 2). Como o suco de lichia empregado para o preparo das bebidas probióticas continha 4,2; 3,7; e 0,1 g/100mL de frutose, glicose e sacarose, respectivamente, a multiplicação das leveduras na amostra LH4 ocorreu em virtude da presença natural destes carboidratos fermentescíveis (NELSON; COX, 2014; LAZO-VÉLEZ et al., 2018). Já as bebidas LH8 e LH12, além de conterem os açúcares naturais do suco de lichia, receberam suplementação de sacarose, apresentando maior aumento na viabilidade da *S. boulardii* quando comparada à LH4. Este resultado está de acordo com Gaboardi et al. (2018), os quais apontam que a suplementação de efluentes com sacarose proporciona maior viabilidade da *S. boulardii* e que a mesma utiliza preferencialmente a sacarose para metabolização, multiplicação e manutenção celular.

Para todas as amostras verificou-se uma maior população de leveduras após 7 dias de armazenamento. As bebidas LH4 e LH8 continham > 1 x 10⁶ UFC/mL no 21º dia de armazenamento. Já a bebida LH12 apresentou contagem de 8,5 e 0,7 x 10⁶ UFC/ mL com 21 e 28 dias de armazenamento, respectivamente.

Essa capacidade da *S. boulardii* manter-se viável e em quantidade > 1 x 10⁶ UFC/ mL na bebida de lichia LH12 aos 21 dias de armazenamento, torna a amostra LH12 a mais adequada, dentre as testadas, para o desenvolvimento de uma bebida probiótica de lichia.

3.2.2 Conteúdo de Sólidos Solúveis Totais (SSTs) e pH

Em geral, as bebidas apresentaram um decaimento no conteúdo de SSTs (Tabela 2) com 1 dia de armazenamento, em relação a etapa de preparo (0 e 24h). Este resultado está de acordo com o Lazo-Vélez et al. (2018), que indicam

que a *S. boulardii* metaboliza primeiramente os monossacarídeos e dissacarídeos como principal fonte de carbono, levando ao aumento da biomassa celular.

Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos e microbiológicos das bebidas probióticas de lichia ¹

Parâmetros	Etapa	Tempo	Formulações ²		
			LH-4	LH-8	LH-12
Viabilidade (10 ⁶ UFC/ mL)	Preparo ³	0 h	0,10 ± 0,00 ^{dA}	0,10 ± 0,00 ^{eA}	0,10 ± 0,00 ^{fA}
		24 h	6,10 ± 0,00 ^{cA}	6,10 ± 0,00 ^{cdA}	6,10 ± 0,00 ^{deA}
	Armaze- namento	1 d	26,67 ± 3,56 ^{bB}	22,00 ± 7,44 ^{bB}	33,16 ± 2,76 ^{cA}
		7 d	36,00 ± 8,89 ^{aC}	55,00 ± 1,00 ^{aB}	71,00 ± 4,58 ^{aA}
		14 d	2,22 ± 0,94 ^{cB}	7,90 ± 0,84 ^{cB}	59,50 ± 3,50 ^{bA}
		21 d	0,84 ± 0,12 ^{cB}	0,73 ± 0,07 ^{cdB}	8,50 ± 0,50 ^{dA}
	28 d	0,49 ± 0,28 ^{cA}	0,50 ± 0,05 ^{cdA}	0,72 ± 0,03 ^{eA}	
Sólidos solúveis totais (°Brix)	Preparo ³	0 h	12,00 ± 0,00 ^{aA}	12,00 ± 0,01 ^{aA}	12,00 ± 0,02 ^{aA}
		24 h	4,06 ± 0,01 ^{bA}	4,06 ± 0,01 ^{fA}	4,06 ± 0,01 ^{bA}
	Armaze- namento	1 d	3,73 ± 0,11 ^{cC}	6,97 ± 0,15 ^{bB}	10,07 ± 0,03 ^{bA}
		7 d	3,74 ± 0,01 ^{cC}	5,85 ± 0,04 ^{bB}	9,51 ± 0,04 ^{cA}
		14 d	3,72 ± 0,04 ^{cC}	5,14 ± 0,04 ^{cB}	8,53 ± 0,14 ^{dA}
		21 d	3,72 ± 0,02 ^{cC}	4,70 ± 0,04 ^{dB}	7,58 ± 0,08 ^{eA}
	28 d	3,67 ± 0,02 ^{cC}	4,57 ± 0,10 ^{eB}	6,64 ± 0,43 ^{fA}	
pH	Preparo ³	0 h	4,50 ± 0,00 ^{aA}	4,50 ± 0,00 ^{aA}	4,50 ± 0,00 ^{aA}
		24 h	3,75 ± 0,01 ^{bcA}	3,75 ± 0,01 ^{dA}	3,75 ± 0,01 ^{cA}
	Armaze- namento	1 d	3,74 ± 0,01 ^{cA}	3,65 ± 0,10 ^{eB}	3,59 ± 0,01 ^{eC}
		7 d	3,80 ± 0,00 ^{bB}	3,90 ± 0,01 ^{bA}	3,83 ± 0,02 ^{bB}
		14 d	3,78 ± 0,02 ^{bcB}	3,84 ± 0,02 ^{cA}	3,68 ± 0,01 ^{dC}
		21 d	3,75 ± 0,03 ^{bcA}	3,76 ± 0,02 ^{dA}	3,66 ± 0,02 ^{dC}
	28 d	3,41 ± 0,03 ^{dB}	3,46 ± 0,05 ^{fA}	3,46 ± 0,04 ^{fA}	
Etanol (%)	Preparo ³	0 h	0,00 ± 0,00 ^{cA}	0,00 ± 0,00 ^{cA}	0,00 ± 0,00 ^{fA}
		24 h	3,99 ± 0,13 ^{bA}	3,99 ± 0,13 ^{bA}	3,99 ± 0,13 ^{eA}
	Armaze- namento	1 d	5,55 ± 0,11 ^{aB}	7,48 ± 0,29 ^{aA}	6,22 ± 0,17 ^{dB}
		7 d	5,62 ± 0,08 ^{aB}	7,47 ± 0,02 ^{aA}	7,09 ± 0,02 ^{cA}
		14 d	5,79 ± 0,05 ^{aB}	7,79 ± 0,77 ^{aA}	7,79 ± 0,09 ^{cA}
		21 d	6,06 ± 0,12 ^{aB}	8,14 ± 0,03 ^{aA}	8,73 ± 0,05 ^{bA}
	28 d	6,17 ± 0,24 ^{aC}	8,11 ± 0,06 ^{aB}	10,13 ± 0,85 ^{aA}	

¹Resultados expressos como média (n = 6) ± desvio padrão. Média seguida de letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas a p ≤ 0,05 entre as formulações no mesmo dia de estocagem. Média seguida de letras minúsculas distintas na mesma coluna e para uma mesma característica, indicam diferenças significativas a p ≤ 0,05 para cada formulação afetada pelo tempo de estocagem. ² Formulações: LH-4 (bebida probiótica de lichia fermentada por 24 h); LH-8 (bebida probiótica de lichia fermentada por 24 h ajustada para 8 °Brix); e LH-12 (bebida probiótica de lichia fermentada por 24 h ajustada para 12 °Brix). ³ Preparo: incluindo a fermentação por 24h/30 °C sob agitação e ajuste do SSTs (°Brix).

Assim, como grande parte dos açúcares já havia sido consumido pela levedura na etapa da fermentação (antes do armazenamento) (Figura 1), a bebida LH4 apresentou o conteúdo de SSTs constante ao longo do período de armazenamento. Já as bebidas LH8 e LH12 apresentaram diminuição gradativa no teor de SSTs ao longo do armazenamento, uma vez que o SSTs no início do armazenamento era 8 e 12 °Brix, respectivamente. Na bebida LH8 notou-se redução de cerca de 13 e 43%, com 1 e 28 dias de armazenamento refrigerado, respectivamente. Já para a bebida LH12 os SSTs decresceram 16 e 45%, com 1 e 28 dias de armazenamento, respectivamente. Desta forma, pode-se afirmar, que a *S. boulardii*, mesmo sob refrigeração, continuou a metabolização dos açúcares, nas bebidas LH8 e LH12.

O maior conteúdo de SSTs da bebida LH12 está relacionado à maior viabilidade da *S. boulardii* nesta amostra, com correlação significativa e positiva entre a viabilidade e o teor de sólidos solúveis iniciais ($r = 0,37$, $p \leq 0,05$).

As bebidas apresentaram diferentes valores de pH (entre 3,74 (LH4) e 3,59 (LH12)) no 1º dia de armazenamento. O pH da bebida LH4 manteve-se constante do 7º até o 21º dia de armazenamento, com uma queda no 28º dia. Tanto a bebida LH8 quanto a LH12 tiveram acréscimo no pH com 7 dias, seguido de posterior decaimento até o final do período de armazenagem. Essa pequena variação no pH pode ser justificada pelo fato de que a levedura *S. boulardii* não tem como produto principal do seu metabolismo os ácidos orgânicos, apesar dos mesmos serem produzidos em pequenas quantidades (NELSON; COX, 2014; LAZO-VÉLEZ et al., 2018).

3.2.3 Conteúdo de etanol

Assim como as demais leveduras do gênero *Saccharomyces*, a *S. boulardii* é uma levedura produtora de etanol e CO₂ a partir da fermentação da glicose (NELSON; COX, 2014; LAZO-VÉLEZ et al., 2018). As bebidas LH4, LH8 e LH12 apresentaram no início do armazenamento diferentes conteúdos de etanol (5,5; 7,5; e 6,2%, respectivamente), uma vez que continham distintos teores de SSTs (Tabela 2). O teor de etanol manteve-se constante ao longo do armazenamento para as bebidas LH4 e LH8, possivelmente devido à redução no conteúdo dos SSTs e ao teor de etanol presente nestas bebidas. Segundo Bai, Anderson e

Moo-Young (2008), fatores como a composição do meio, e o acúmulo de etanol interferem na viabilidade e capacidade fermentativa da levedura. Na bebida LH12 houve um incremento no teor de etanol de 40 e 63%, aos 21 e 28 dias de armazenamento, respectivamente, em função da continuidade do metabolismo da *S. boulardii*, mesmo em ambiente refrigerado.

Comparando-se as bebidas LH8 e LH12, verificou-se teor alcoólico semelhante entre elas aos 21 dias de armazenamento, porém um maior teor foi observado na LH12 com 28 dias. Houve uma correlação significativa e positiva ($r = 0,69$, $p \leq 0,05$) entre o SSTs antes da fermentação e o teor alcoólico das bebidas, e também entre o tempo de armazenamento e o teor alcoólico ($r = 0,45$, $p \leq 0,05$).

3.2.4 Conteúdo de açúcares

Na bebida LH4 não foi detectada sacarose (Figura 2A), além de pequenas quantidades de glicose (Figura 2B), demonstrando que estes nutrientes já haviam sido consumido pela levedura na etapa de fermentação (Figura 1), antes de iniciar o armazenamento refrigerado.

As bebidas LH8 e LH12 apresentaram conteúdo de sacarose de 0,08 e 0,78 mg/mL (Figura 2A), respectivamente, com 1 dia de armazenamento refrigerado, com decaimento de cerca de 63% e 27% aos 28 dias. De forma similar, o conteúdo de glicose (Figura 2B) sofreu um decaimento ao longo do armazenamento para as amostras LH8 e LH12, com máximo conteúdo com 1 dia e mínimo aos 14 dias. Este resultado está de acordo com o apresentado por Gaboardi et al. (2018), os quais observaram uma preferência da *S. boulardii* em utilizar a sacarose em detrimento de outras matéria orgânicas em efluente de arroz.

Dentre os açúcares detectados e quantificados, a frutose foi o único que permaneceu presente na bebida LH4 até o final do período de armazenamento (Figura 2C), com uma redução de cerca de 22% ao longo dos 28 dias. Com 1 dia de armazenamento, as bebidas LH8 e LH12 apresentaram conteúdo de frutose de 24,9 e 29,3 mg/ml, respectivamente, com uma taxa de decaimento ao longo do armazenamento de 27,5% (LH8) e 31,1% (LH12). Este resultado foi semelhante ao observado por Sulieman et al. (2018), que verificaram, em fermentação de

xaropes açucarados de tamareira por *S. cerevisiae* por 72h, uma grande diminuição na concentração de sacarose e glicose, e apenas uma pequena perda no conteúdo de frutose, além de um aumento significativo no teor alcoólico do xarope.

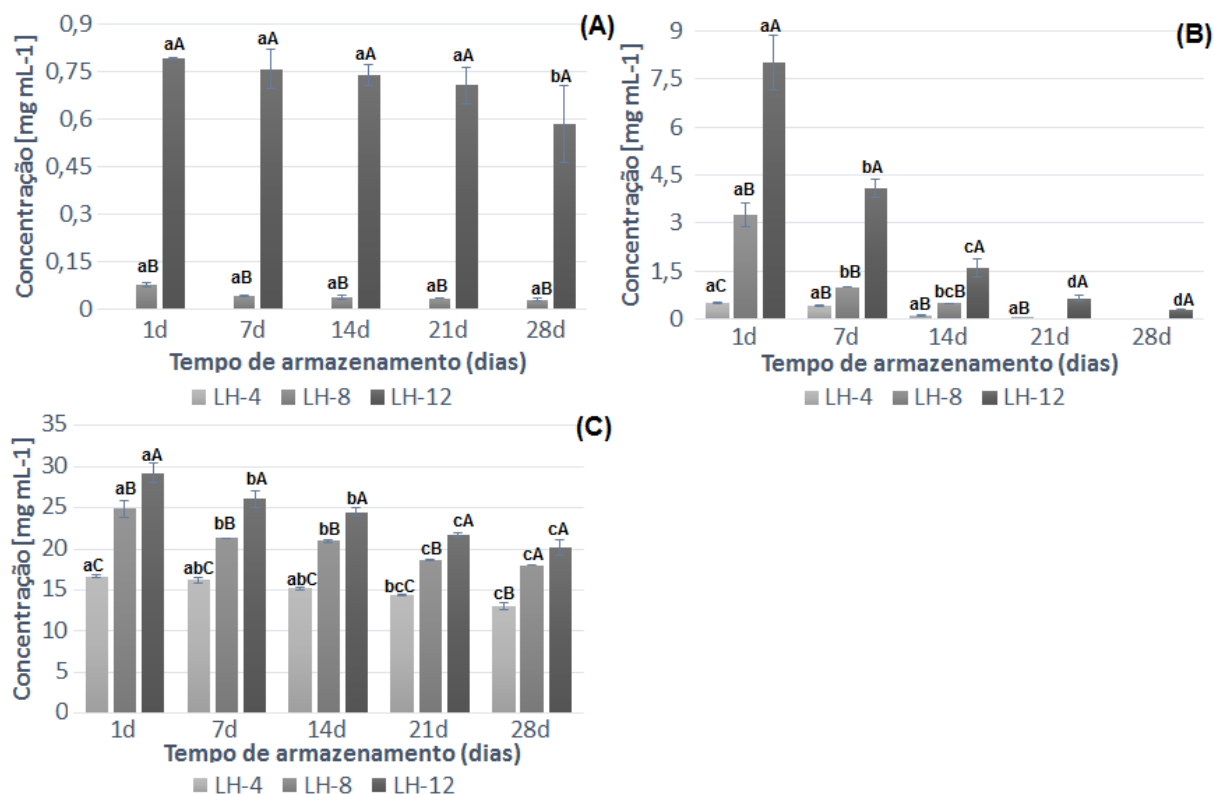


Figura 2 – Conteúdo de: (A) sacarose (mg/mL); (B) glicose (mg/mL); e (C) frutose (mg/mL) em bebidas probióticas de lichia (LH-4, LH-8 e LH-12) estocados à 4 °C por 28 dias

As barras de erro representam o desvio padrão (n = 4). Médias acompanhadas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna ou maiúscula na mesma linha diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$). Formulações: LH-4 (bebida probiótica de lichia fermentada por 24 h); LH-8 (bebida probiótica de lichia fermentada por 24 h ajustada para 8 °Brix); e LH-12 (bebida probiótica de lichia fermentada por 24 h ajustada para 12 °Brix).

Além disso, tendo em vista que mesmo após a primeira etapa (fermentação) (Figura 1) ainda verificou-se a presença de frutose em todas elas, pode-se inferir que a *S. boulardii* não metaboliza preferencialmente a frutose. Estudos apontam que em meios contendo sacarose, glicose e frutose, o gênero *Saccharomyces* degrada preferencialmente sacarose e glicose em detrimento da frutose (SULIEMAN et al., 2018; D'AMORE, 1989). Esse aspecto pode ser considerado positivo para as bebidas probióticas de lichia, uma vez que este

monossacarídeo possui uma doçura relativa de 1,3 quando comparada à sacarose, que tem índice 1 (PARKER; SALAS; NWOSU, 2010), conferindo doçura e podendo tornar as bebidas aceitas pelos consumidores.

Comparando-se as formulações das bebidas, houve interferência entre os SSTs, o conteúdo de glicose e de frutose no início do armazenamento, já que maiores SSTs proporcionaram conteúdos crescentes destes monossacarídeos, na ordem: LH4<LH8<LH12. Ao final dos 28 dias, havia glicose apenas na LH12 e maior teor de frutose na LH8 e LH12, justificado pela hidrólise da sacarose adicionada durante a metabolização dos açúcares pela *S. boulardii*.

3.2.5 Conteúdo de ácidos orgânicos

Identificou-se na bebida a presença dos ácidos málico, acético e cítrico. Estes ácidos orgânicos são de ocorrência natural na fruta e também derivados de substâncias envolvidas durante as etapas da glicólise das células das leveduras (NELSON; COX, 2014; DATTA; TIMSON; ANNAPURE, 2017).

Ao longo do armazenamento houve um incremento no conteúdo de ácido málico (Figura 3A) nas bebidas LH4 e LH12 e não houve variação na LH8. O conteúdo de ácido acético (Figura 3B) na bebida LH4 manteve-se constante e nas bebidas LH8 e LH12 houve um acréscimo de 41% e 56%, respectivamente, ao final dos 28 dias.

Notou-se 27%, 52%, e 69% de acréscimo de ácido cítrico aos 28 dias de armazenamento (Figura 3C), para as bebidas LH4, LH8 e LH12, respectivamente. Bebidas com maior adição de sacarose proporcionaram maior conteúdo do ácido cítrico.

3.2.6 Conteúdo de Compostos Fenólicos Totais (CFTs) e na Atividade Antioxidante (AA)

As bebidas probióticas de lichia, após a fermentação e armazenadas por 1 dia à 4 °C apresentaram conteúdo de CFTs de 151,7; 133,7; e 190,1 µg de EAG/mL (LH4, LH8 e LH12, respectivamente). Estes valores foram semelhantes aos observados por Değirmencioğlu, Gurbuz e Sahan (2016) em suco de rabanete fermentado por *S. boulardii* e outros fungos.

De forma geral, verificou-se decréscimo no conteúdo de CFTs e na AA em todas as bebidas ao longo do armazenamento (Tabela 3).

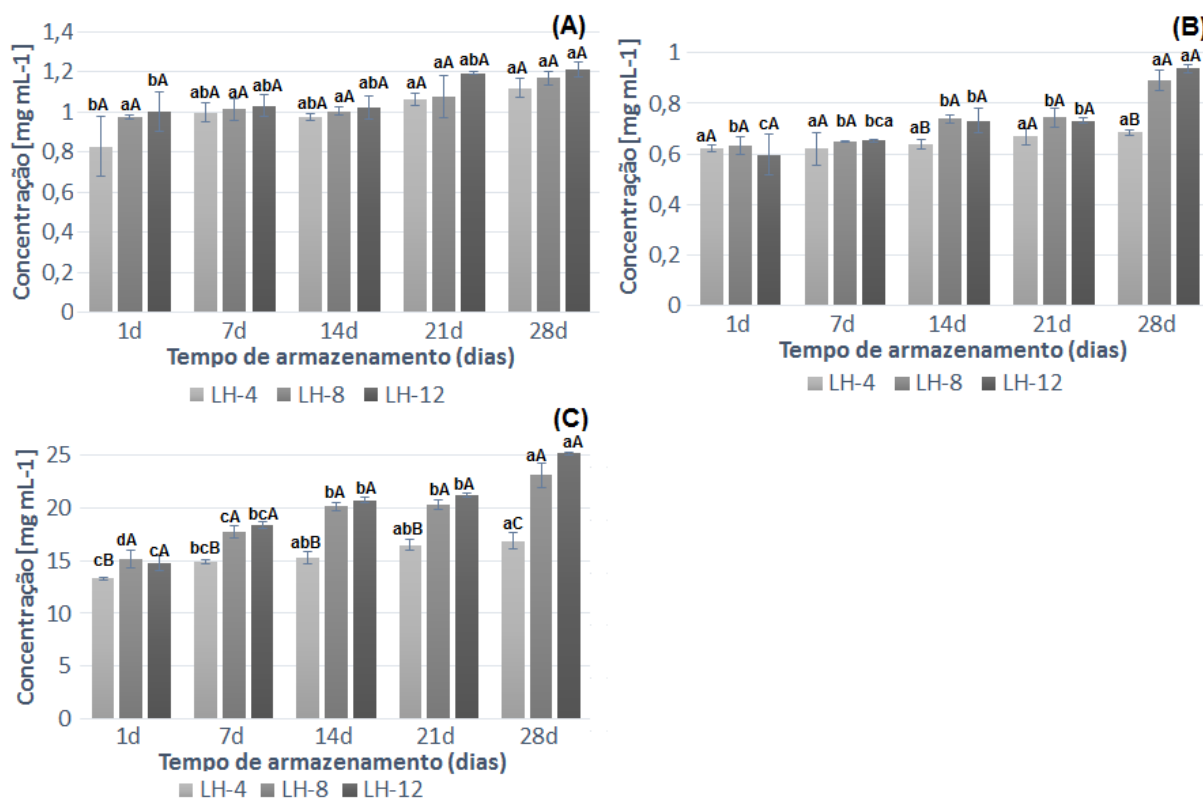


Figura 3 – Conteúdo de: (A) ácido málico (mg/mL); (B) ácido acético (mg/mL); e (C) ácido cítrico (mg/mL) em bebidas probióticas de lichia (LH-4, LH-8 e LH-12) estocados sob refrigeração (4 °C) por 28 dias.

As barras de erro representam o desvio padrão (n=4). Médias acompanhadas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna ou maiúscula na mesma linha diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$). Formulações: LH-4 (bebida probiótica de lichia fermentada por 24 h); LH-8 (bebida probiótica de lichia fermentada por 24 h ajustada para 8 °Brix); e LH-12 (bebida probiótica de lichia fermentada por 24 h ajustada para 12 °Brix).

No início do armazenamento, a bebida LH12 apresentou maior conteúdo de CFTs em relação as bebidas LH4 e LH8, em função da composição da bebida e da fermentação pela *S. boulardii*, mas ao final de 28 dias todas as bebidas mostraram teor semelhante. Fatores como fermentação, exposição ao oxigênio e a luz, além de interações inter moleculares podem interferir, reduzindo o conteúdo dos CFTs, e conseqüentemente a AA (JAKOBEK, 2015). Comparando-se o conteúdo de CFTs no início e ao final do armazenamento, observou-se uma redução de 19,8%; 8,2%; e 26,3%, para as bebidas LH4, LH8 e LH12. Redução

no conteúdo de CFTs ao longo do armazenamento por 28 dias, em sucos adicionados de *S. boulardii*, também foi observada em suco de berry (7,8%), por Fratianni et al. (2014) e em suco de tomate (3,6%) (FRATIANNI et al., 2013).

Tabela 3 – Variação no conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante das bebidas probióticas de lichia ao longo do armazenamento refrigerado ¹

Parâmetros	Tempo de armazenamento à 4 °C (dias)	Formulações ²		
		LH-4	LH-8	LH-12
CFT ³	1	151,67 ± 7,32 ^{aB}	133,70 ± 6,67 ^{bcB}	190,08 ± 4,30 ^{abA}
	7	144,46 ± 3,09 ^{abB}	157,01 ± 2,38 ^{abB}	202,10 ± 34,00 ^{aA}
	14	129,34 ± 4,56 ^{abB}	169,49 ± 2,65 ^{aA}	176,68 ± 5,89 ^{bcA}
	21	121,87 ± 1,17 ^{bb}	123,55 ± 3,28 ^{cb}	153,17 ± 1,46 ^{cdA}
	28	121,87 ± 1,97 ^{ba}	122,80 ± 2,44 ^{ca}	140,13 ± 0,84 ^{da}
DPPH ⁴	1	0,73 ± 0,04 ^{aA}	0,80 ± 0,11 ^{aA}	0,51 ± 0,15 ^{abB}
	7	0,59 ± 0,09 ^{abA}	0,69 ± 0,20 ^{aA}	0,68 ± 0,13 ^{aA}
	14	0,43 ± 0,13 ^{bcAB}	0,64 ± 0,04 ^{aA}	0,41 ± 0,11 ^{bB}
	21	0,33 ± 0,02 ^{cA}	0,27 ± 0,01 ^{ba}	0,33 ± 0,01 ^{ba}
	28	0,31 ± 0,02 ^{cA}	0,25 ± 0,01 ^{ba}	0,30 ± 0,03 ^{ba}
FRAP ⁴	1	1,20 ± 0,07 ^{aA}	1,19 ± 0,02 ^{aA}	1,13 ± 0,02 ^{ba}
	7	0,82 ± 0,06 ^{bcB}	1,24 ± 0,10 ^{aA}	1,23 ± 0,03 ^{aA}
	14	0,90 ± 0,02 ^{bc}	1,00 ± 0,02 ^{bb}	1,18 ± 0,02 ^{abA}
	21	0,79 ± 0,05 ^{cAB}	0,73 ± 0,01 ^{cb}	0,85 ± 0,01 ^{cA}
	28	0,78 ± 0,01 ^{cA}	0,78 ± 0,02 ^{ca}	0,71 ± 0,04 ^{da}
ABTS ⁴	1	6,11 ± 0,33 ^{aA}	5,42 ± 0,71 ^{bb}	5,61 ± 0,13 ^{baB}
	7	4,23 ± 0,02 ^{bb}	6,29 ± 0,16 ^{aA}	6,29 ± 0,16 ^{aA}
	14	2,44 ± 0,15 ^{cb}	3,32 ± 0,05 ^{ca}	3,30 ± 0,10 ^{ca}
	21	1,71 ± 0,15 ^{da}	0,29 ± 0,06 ^{db}	0,28 ± 0,08 ^{db}
	28	0,87 ± 0,05 ^{ea}	0,11 ± 0,05 ^{db}	0,03 ± 0,00 ^{db}

¹Resultados expressos como média (n = 6) ± desvio padrão. Média seguida de letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas a p ≤ 0,05 entre as formulações no mesmo dia de estocagem. Média seguida de letras minúsculas distintas na mesma coluna e para uma mesma característica, indicam diferenças significativas a p ≤ 0,05 para cada formulação afetada pelo tempo de estocagem. ² Formulações: LH-4 (bebida probiótica de lichia fermentada por 24 h); LH-8 (bebida probiótica de lichia fermentada por 24 h ajustada para 8 °Brix); e LH-12 (bebida probiótica de lichia fermentada por 24 h ajustada para 12 °Brix). ³Resultados expressos como equivalente de ácido gálico por mL de amostra ($\mu\text{g EAG/ mL}$). ⁴Resultados expressos como equivalente de Trolox por mL de amostra ($\mu\text{mol TEAC/ mL}$).

A AA avaliada por DPPH demonstrou uma redução de 57,5%; 68,8%; e 41,2% ao final do armazenamento para as bebidas LH4, LH8 e LH12, respectivamente. Menores taxas de redução foram observadas pelo método FRAP e maiores reduções pelo método ABTS. As formulações testadas foram consideradas semelhantes com relação a atividade antioxidante por DPPH, FRAP e ABTS ao final do armazenamento refrigerado.

Notou-se uma correlação significativa e positiva ($r = 0,60$, $p \leq 0,05$), entre o conteúdo de CFTs e de SSTs das bebidas. Também houve correlação significativa ($p \leq 0,05$) e positiva entre o conteúdo de CFTs e a AA avaliada por DPPH, FRAP e ABTS ($r = 0,39$; $r = 0,66$; $r = 59$, respectivamente).

3.2.7 Conteúdo de ácidos fenólicos, flavonoides e metilxantinas

Foram separados na bebida probiótica de lichia, por meio da análise cromatográfica, 21 compostos bioativos e identificados em ordem crescente de tempo de retenção: trigonelina, ácido ascórbico, ácido nicotínico, ácido gálico, ácido protocatecúico, teobromina, paraxantina, teofilina, epigallocatequina, catequina, ácido clorogênico, ácido caféico, cafeína, epicatequina, ácido p-cumárico, ácido ferrúlico, ácido sinápico, rutina, miricetina, quercetina e kaempferol.

Com exceção da trigonelina, ácido ascórbico e ácido nicotínico, os demais compostos foram agrupados em três classes, ácidos fenólicos, flavonoides e metilxantinas, a fim de facilitar a discussão dos dados. Os compostos pertencentes a cada classe tiveram as concentrações somadas (Figura 4). Foram classificados como ácidos fenólicos os compostos: ácido gálico, ácido protocatecúico, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferrúlico e ácido sinápico. Os flavonoides foram: epigallocatequina, catequina, epicatequina, rutina, miricetina, quercetina e kaempferol. Já as metilxantinas foram cafeína, teobromina, paraxantina, teofilina.

Verificou-se que na bebida LH4, ao longo do armazenamento, houve um decréscimo de 24% na concentração dos ácidos fenólicos, com pequena elevação no conteúdo das metilxantinas no 7º e 21º dia de armazenamento. Os flavonoides aumentaram o conteúdo do 7º ao 21º dias, seguido de decréscimo. Na bebida LH8, o conteúdo dos ácidos fenólicos, flavonoides e as metilxantinas

decreceram ao longo do armazenamento (30%, 14% e 19%, respectivamente). Já na bebida LH12, houve um acréscimo no conteúdo dos flavonoides na ordem de 9% ao longo dos 28 dias de armazenamento e, em contrapartida, um decréscimo de 19% no conteúdo dos ácidos fenólicos e manutenção no conteúdo das metilxantinas.

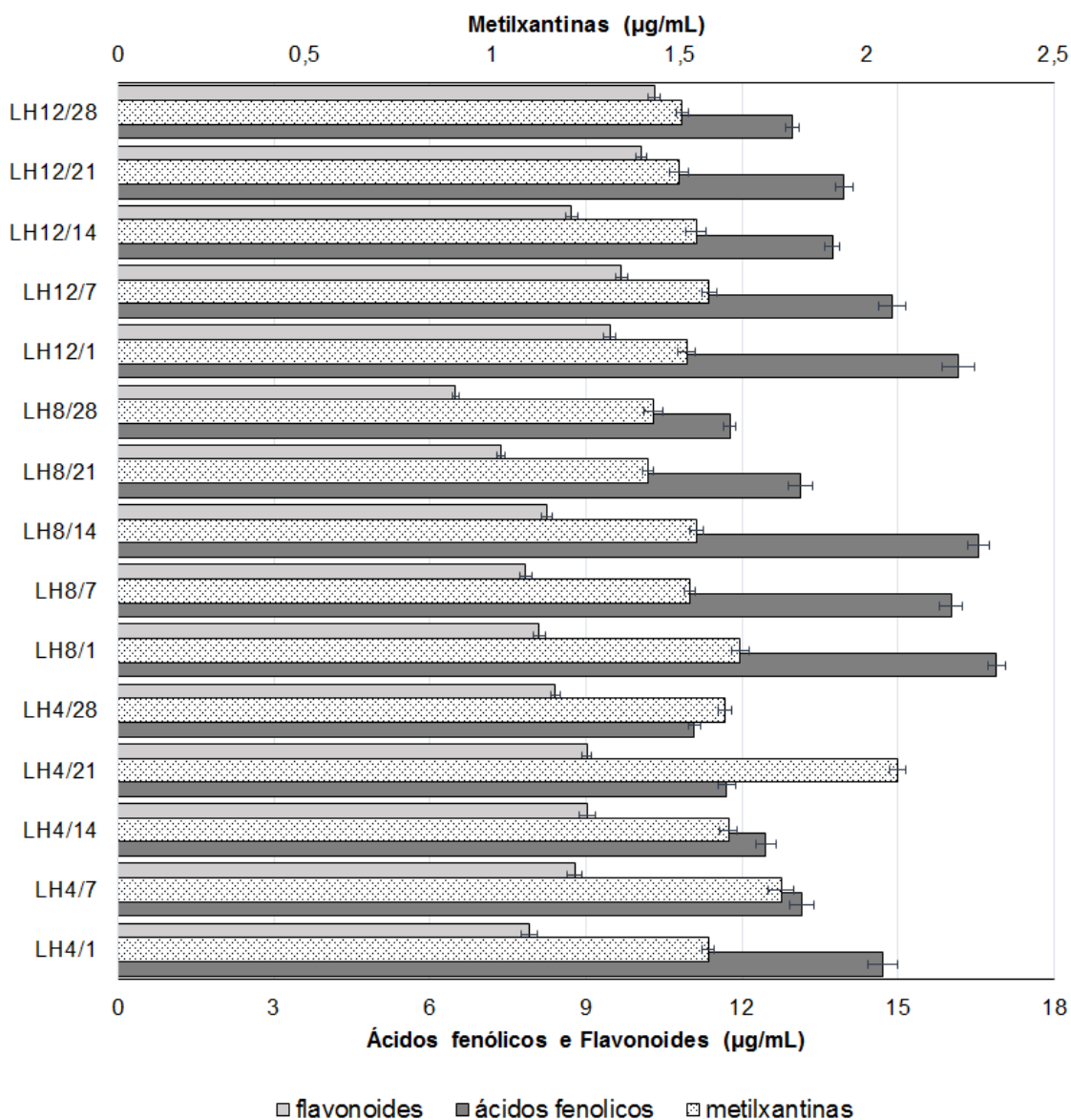


Figura 4 – Variação no conteúdo de ácido fenólicos, flavonoides e metilxantinas presentes nas bebidas probióticas de lichia LH4, LH8, e LH12, ao longo do período de armazenamento de 28 dias.

As barras de erro representam o desvio padrão ($n = 4$). Formulações: LH-4 (bebida probiótica de lichia fermentada por 24 h); LH-8 (bebida probiótica de lichia fermentada por 24 h ajustada para 8 °Brix); e LH-12 (bebida probiótica de lichia fermentada por 24 h ajustada para 12 °Brix).

Pesquisas indicam que a ação dos micro-organismos ao longo da fermentação, metabolizando o substrato e proporcionando interações moleculares inclusive com o oxigênio presente no meio, interferem no perfil e conteúdo dos ácidos fenólicos, metilxantinas e flavonoides (TIWARI, CUMMINS, 2013; WICZKOWSKI; SZAWARA-NOWAK; TOPOLSKA, 2015; DEĞIRMENCIOĞLU; GURBUZ; SAHAN, 2016). Assim, os distintos conteúdos de sacarose das bebidas proporcionaram diferenças ao longo do armazenamento com relação a viabilidade da levedura, conteúdo de etanol, açúcares e ácidos orgânicos e, também, dos compostos fenólicos nas bebidas.

3.3 ACEITABILIDADE SENSORIAL DA BEBIDA PROBIÓTICA DE LICHIA

A bebida probiótica de lichia LH12 foi escolhida para o estudo da aceitabilidade sensorial por apresentar maior viabilidade da *S. boulardii* e maiores conteúdos de CFTs e SSTs ao final do período de armazenamento estudado. Ainda, utilizou-se como critério de exclusão no estudo, as bebidas com viabilidade de levedura $< 1 \times 10^6$ UFC/mL. Como a viabilidade da LH12 foi $> 8,5 \times 10^6$ UFC/mL até o 21º dia, a aceitação foi determinada nestas bebidas com 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento (LH12/1, LH-12/7, LH-12/14 e LH-12/21, respectivamente).

Assim, as bebidas foram preparadas a cada sete dias (do maior para o menor tempo de armazenamento) para que ao final de 21 dias todas estivessem prontas para o teste sensorial. A Tabela 4 apresenta a aceitação sensorial das bebidas probióticas de lichia para os atributos de cor, aroma, sabor, textura e global.

De forma geral, as bebidas dos quatro tempos de armazenamento analisadas foram aceitas sensorialmente em relação aos atributos avaliados (notas médias $> 6,6$, Tabela 4). Não houve diferença significativa entre a aceitação das bebidas nos diferentes tempos de armazenagem, para o aroma, sabor, textura e global. Apenas em relação a cor, a bebida LH12/14 foi mais aceita que a LH12/7 e LH12/21 e semelhante à LH12/1. Estes resultados indicam que apesar das bebidas apresentarem diferenças em algumas características físico-químicas, estes parâmetros não afetaram a aceitação pelos consumidores.

Considerando os atributos, conforme relatos dos avaliadores, destacou-se a apreciação da textura devido a presença de bolhas. Estas são de CO₂ produzidas por ação da *S. boulardii* (LAZO-VÉLEZ et al., 2018; HEENAN et al., 2004). O aroma e aceitação global, foram os atributos seguintes destacados em função do “*aroma atrativo*” e aroma “*muito semelhante a um frisante*”. De forma contrária, Heenan et al. (2004) apontaram que em sorvete probiótico de soja houve muitos relatos, por parte dos avaliadores sensoriais, da presença de sabores residuais indesejáveis em função da adição da *S. boulardii*. Já Lourens-Hattingh e Viljoen (2001) apontaram que a *S. boulardii* é inviável como agente probiótico em iogurtes aromatizados e em iogurtes de frutas por ocasionar a formação de quantidade excessiva de etanol e de CO₂.

Tabela 4 – Aceitabilidade da bebida probiótica de lichia¹

Formulações ²	Parâmetros				
	Cor	Aroma	Sabor	Textura	Aceitação global
LH-12/1	7,5 ± 1,5 ^{ab}	7,8 ± 1,6 ^a	7,7 ± 1,9 ^a	7,9 ± 1,6 ^a	7,7 ± 1,7 ^a
LH-12/7	6,6 ± 2,2 ^c	7,6 ± 1,8 ^a	7,4 ± 1,9 ^a	7,8 ± 1,6 ^a	7,4 ± 1,7 ^a
LH-12/14	7,8 ± 1,4 ^a	7,9 ± 1,4 ^a	7,5 ± 1,8 ^a	8,0 ± 1,5 ^a	7,7 ± 1,5 ^a
LH-12/21	6,9 ± 2,1 ^{bc}	7,7 ± 1,4 ^a	7,6 ± 1,8 ^a	7,9 ± 1,2 ^a	7,5 ± 1,6 ^a

Valores hedônicos (cor, aroma, sabor, textura, e aceitação global): 0 = desgostei muitíssimo; 10 = gostei muitíssimo.

¹ Médias ± desvio padrão na mesma coluna seguida da mesma letra não diferem a $p \leq 0,05$. ² LH-12: bebida probiótica de lichia fermentada por 24 h ajustada para 12 °Brix; 1, 7, 14 e 21: dias de armazenamento à 4 °C.

4 CONCLUSÕES

Bebidas de lichia adicionadas de *S. boulardii* com diferentes teores de sólidos solúveis totais, adicionados ou não de sacarose, apresentam características físico-químicas, propriedades antioxidantes, teor de compostos fenólicos adequados para o consumo.

As bebidas de lichia com adição da *S. boulardii* e menor conteúdo de sólidos solúveis totais apresentam viabilidade celular maior do que 1×10^6 UFC/mL durante 14 dias de armazenamento.

Maior teor de açúcares proporciona maior viabilidade celular da levedura *S. boulardii* ($> 1 \times 10^6$ UFC/mL), podendo ser potencialmente probiótica, além de maior teor de compostos fenólicos totais, sólidos solúveis totais e de etanol, quando armazenadas sob refrigeração, por 21 dias.

Durante o armazenamento refrigerado da bebida probiótica de lichia há uma diminuição no conteúdo de compostos fenólicos totais e na atividade antioxidante. Em bebidas probióticas de lichia adicionadas de sacarose há um decréscimo no conteúdo de sólidos solúveis totais ao longo do armazenamento.

A fermentação pela *S. boulardii* e maior conteúdo de sólidos solúveis proporciona uma bebida de lichia aceita pelo consumidor, com características físico-químicas adequadas e com viabilidade de cultura que confere potencial ação probiótica, ao longo dos 21 dias de armazenamento refrigerado à 4 °C.

5 REFERÊNCIAS

ALVES, J. A.; LIMA, L. C. O.; DIAS, D. R.; NUNES, C. A.; SCHWAN, R. F. Effects of spontaneous and inoculated fermentation on the volatile profile of lychee (*Litchi chinensis* Sonn) fermented beverages. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.45, n. 11, p.2358-2365, 2010.

ALVES, J. A.; LIMA, L. C. O.; NUNES, C. A.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Chemical, physical–chemical, and sensory characteristics of lychee (*Litchi chinensis* Sonn) Wines. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 76, n. 5, p. S330–S336, 2011.

BAGEWADI, Z.; MULLA, S.; NINNEKAR, H. Z. Purification and characterization of endo b-1,4-D-glucanase from *Trichoderma harzianum* strain HZN11 and its application in production of bioethanol from sweet sorghum bagasse. **3 Biotech**, Basel, v. 6, n. 1, art. 101, 2016.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; WOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation Technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Aprova o Regulamento técnico**

sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 10 jan. 2001. Seção 1, p. 45.

CAPECE, A.; ROMANIELLO, R.; PIETRAFESA, A.; GABRIELLA, S.; PIETRAFESA, R.; ZAMBUTO, M.; ROMANO, P. Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value added. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 284, p.22-30, 2018.

CZERUCKA, D.; RAMPAL, P. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. **Microbes and Infection**, Paris, v.4, n.7, p. 733–739, 2002.

CZERUCA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 26, n. 6, p. 767-778, 2007.

D'AMORE, T.; RUSSEL, I.; STEWART, G. Sugar utilization by yeast during fermentation. **Journal of Industrial Microbiology**, Berlin, v. 4, n. 4, p. 315-324, 1989.

DATTA, S.; TIMSON, D. J.; ANNAPURE, U. S. Antioxidant properties and global metabolite screening of the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 97, n. 9, p. 3039-3049, 2017.

DEĞIRMENCIOĞLU, N.; GURBUZ, O.; AHAN, Y. S. The monitoring, via an in vitro digestion system, of the bioactive content of vegetable juice fermented with *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. **Journal of Food Processing and Preservation**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 798-811, 2016.

ESTELA-ESCALANTE, W. D.; RYCHTERA, M.; MELZUCH, K.; HATTA, B. Effect of aeration on the fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae* cultured in apple juice. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, Distrito Federal, v. 11, n. 2, p. 211-226, 2012.

FARINAZZO, F. S.; FARINAZZO, E. S.; SPINOSA, W. A.; GARCIA, S. *Saccharomyces boulardii*: optimization of simultaneous saccharification and fermentation of cell production in organic and conventional apple substrate pulp. **Food science and biotechnology**, Seoul, v. 26, n. 4, p. 969-977, 2017.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FRATIANNI, F.; CARDINALE, F.; RUSSO, I.; IULIANO, C. CUCCINIELLO, A. C.; MAIONE, M.; D'ACIERNO, A.; NAZZARO, F. Fermentation of tomato juice with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. In: ROBINSON A.; EMERSON D. (eds). **Functional Foods: Sources, Biotechnology Applications, and Health Challenges**. New York, USA: Nova Science Publisher, 2013. p. 143–152.

FRATIANNI, F.; CARDINALE, F.; RUSSO, I.; IULIANO, C.; TREMONTE, P.; COPPOLA, R. NAZZARO, F. Ability of synbiotic encapsulated *Saccharomyces cerevisiae boulardii* to grow in berry juice and to survive under simulated

gastrointestinal conditions. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 31, n. 3, p. 299-305, 2014.

GABOARDI, G.; DOS SANTOS, D. G.; MENDES, L.; CENTENO, L.; MEIRELES, T.; VARGAS, S.; GRIEP, E.; SILVA, A. C. J.; MOREIRA, A. N.; CONCEIÇÃO, F. R. Bioremediation and biomass production from the cultivation of probiotic *Saccharomyces boulardii* in parboiled rice effluent. **Journal of Environmental Management**, London, v. 226, p. 180–186, 2018.

GALLO, M.; BEVILACQUA, A.; SPERANZA, B.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M. R. Alginate beds and apple pieces as carriers for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, as representative of yeast functional starter cultures. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 49, n. 9, p. 2092-2100, 2014.

HEENAN, C.N.; ADAMS, M.C.; HOSKEN, R.W.; FLEET, G.H. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 37, n. 4, p. 461–466, 2004.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, London, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILINGER, U. 2002. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, Essex, v. 35, n. 2-3, p. 109-116, 2002.

JAKOBEK, L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. **Food Chemistry**, Barking, v. 175, p. 556-567, 2015.

JAYACHANDRAN, L. E.; CHAKRABORTY, S.; RAO, P. S. Effect of high pressure processing on physicochemical properties and bioactive compounds in litchi based mixed fruit beverage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Wageningen, v. 28, n. 1, p. 1–9, 2015.

KALITA, D.; SAIKIA, S.; GAUTAM, G.; MUKHOPADHYAY, R. Characteristics of synbiotic spray dried powder of litchi juice with *Lactobacillus plantarum* and different carrier materials. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 87, p. 351-360, 2018.

KARAOLIS, C.; BOTSARIS, G.; PANTELIDES, I.; TSALTAS, D. Potential application of *Saccharomyces boulardii* as a probiotic in goat's yoghurt: survival and organoleptic effects. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 48, n. 7, p. 1445–1452, 2013.

KÜHLE, A. A.; SKOVGAARD, K.; JESPERSEN, L. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne

Saccharomyces cerevisiae strains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.101, n.1, p.29– 39, 2005.

LAZO-VÉLEZ, M. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; ROSALES-MEDINA, M. F.; TINOCO-ALVEAR, M.; BRIONES-GARCIA, M. Application of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in food processing: a review. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 125, n. 4, p. 943-951, 2018.

LEE, Y. L.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 6, p. 241–245, 1995.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. **Food Research International**, Essex, v. 34, n. 9, p. 791-796, 2001.

LUCKOW, T.; DELAHUNTY, C. Which juice is 'healthier'? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. **Food Quality and Preference**, Barking, v.15, n.7-8, p.751-759, 2004.

MARTINS, F. S.; VIEIRA, A. T.; ELIAN, S. D. A.; ARANTES, R. M. E.; TIAGO, F. C. P.; SOUSA, L. P.; ARAUJO, H. R. C.; PIMENTA, P. F.; BONJARDIM, C. A.; NICOLI, J. R. TEIXEIRA, M. M. Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. **Microbes and Infection**, Paris, v. 15, n. 4, p. 270-279, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger** (tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga...et al.); revisão técnica: Carlos Termignoni... (et al.), 6ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2014, 900 p.

PARKER, K.; SALAS, M.; NWOSU, V. C. High fructose corn syrup: production, uses and public health concerns. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, Lagos, v. 5, n. 5, p. 71-78, 2010.

PAULI, E. D.; CRISTIANO, V.; NIXDORF, S. L. Método para determinação de carboidratos empregado na triagem de adulterações em café. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 689-694, 2011.

PROFIR, A. G.; VIZIREANU, C. Sensorial analysis of a functional beverage based on vegetables juice. **Acta Biologica Szegediensis**, Szeged, v. 57, n. 2, p. 145-148, 2013.

ROSENFELD, E.; BEAUVOIT, B.; BLONDIN, B.; SALMON, J. M. Oxygen consumption by anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under enological conditions: effect on fermentation kinetics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 113-21, 2003.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). **Food Chemistry**, Barking, v. 90, n. 1-2, p. 133-139, 2005.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, New York, v. 299, p. 152-178, 1999.

SIVUDU, N.; RAMESH, B.; UMAMAHESH, K.; REDDY, O. V. S. Probiotication of tomato and carrot juices for shelf-life enhancement using micro-encapsulation. **Journal of Food Biosciences and Technology**, Tehran, v. 6, n. 2, p. 13-22, 2016.

STATSOFT. **STATISTICA for Windows: computer program manual**. Versão 7.1. Tulsa: Software Inc., 2006.

SU, D.; TI, H.; ZHANG, R.; ZHANG, M.; WEI, Z.; DENG, Y. GUO, J. Structural elucidation and cellular antioxidant activity evaluation of major antioxidant phenolics in lychee pulp. **Food Chemistry**, Barking, v. 158, p. 385–391, 2014.

SULIEMAN, A. K.; PUTRA, M. D; ABASAEED, A. E.; GAILY, M. H.; AL-ZAHRANI, S. M.; ZEINELABDEEN. Kinetic modeling of the simultaneous production of ethanol and fructose by *Saccharomyces cerevisiae*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 34, p. 1–8, 2018.

TIWARI, U.; CUMMINS, E. Factors influencing levels of phytochemicals in selected fruit and vegetables during pre- and post-harvest food processing operations. **Food Research International**, Essex, v. 50, n. 2, p. 497-506, 2013.

VILLANUEVA, N. D. M.; PETENATE, A. J.; DA SILVA, M. A. A. P. Performance of hybrid hedonic scale as compared to the traditional hedonic, self-adjusting and ranking scales. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 16, n. 8, p. 691–703, 2005.

WGO. Organização Mundial de Gastroenterologia. **Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia: Probióticos e prebióticos**. 2011. Disponível em:
http://www.worldgastroenterology.org/assets/export/userfiles/Probiotics_FINAL_pt_2012.pdf. Acesso em: 11 jun. 2018.

WICZKOWSKI, W.; SZAWARA-NOWAK, D.; TOPOLSKA, J. Changes in the content and composition of anthocyanins in red cabbage and its antioxidant capacity during fermentation, storage and stewing. **Food Chemistry**, Barking, v. 167, p. 115–123, 2015.

ZENG, X. A.; CHEN, X. D.; QIN, F. G. F.; ZHANG, L. Composition analysis of litchi juice and litchi wine. **International Journal of Food Engineering**, Berlin, v. 4, n. 4, p.1-16, 2008.

ZHANG, R. F.; ZENG, Q. S.; DENG, Y. Y.; ZHANG, M. W.; WEI, Z. C.; ZHANG, Y.; TANG, X. J. Phenolic profiles and antioxidant activity of litchi pulp of different cultivars cultivated in Southern China. **Food Chemistry**, Barking, v. 136, n. 3-4, p. 1169–1176, 2013.

ZHENG, X.; YU, Y.; XIAO, G.; XU, Y.; WU, J.; TANG, D.; ZHANG, Y. Comparing product stability of probiotic beverages using litchi juice treated by high hydrostatic pressure and heat as substrates. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Wageningen, v. 23, p. 61–67, 2014.

ARTIGO CIENTÍFICO 5: Bebida probiótica mista de lichia e erva-mate fermentada por *Saccharomyces boulardii* com potencial antioxidante: desenvolvimento e aceitabilidade sensorial

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram desenvolver uma bebida probiótica mista de lichia e erva-mate fermentada pela levedura probiótica *Saccharomyces boulardii*, e avaliar o efeito do armazenamento refrigerado sobre características físico-químicas, atividade antioxidante, a viabilidade celular e aceitação sensorial. Foram desenvolvidas bebidas probióticas mistas de lichia e erva-mate (30:70, lichia : infusão de erva-mate (v/v)) com diferentes conteúdos de sólidos solúveis totais (SSTs) (4, 8 e 12 °Brix), as quais apresentaram características físico-químicas, propriedades antioxidantes, teor de compostos fenólicos adequados para o consumo. Durante o armazenamento houve redução no conteúdo de SSTs, compostos fenólicos totais (CFTs), ácido ascórbico e na atividade antioxidante (AA), e aumento no teor alcoólico das bebidas. Dentre as formulações propostas, bebidas adicionadas de mais sacarose (12 °Brix) e armazenadas por 28 dias à 4 °C apresentaram maior viabilidade celular (1×10^7 UFC/mL), maior teor alcoólico (9,58%) e de SSTs (6,8 °Brix), maior conteúdo de CFTs (512,1 µg de EAG/mL) e de ácido ascórbico (128,78 mg/L), além de maior AA por DPPH e FRAP (2,06 e 3,85 µmol TEAC/mL). Bebidas com mais açúcar e fermentadas por *S. boulardii* foram aceitas pelo consumidor, apresentam características físico-químicas adequadas e viabilidade de cultura que confere à bebida potencial probiótico, ao longo dos 28 dias de armazenamento refrigerado à 4 °C.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*, *Litchi chinensis*, formulação, armazenamento, sacarose

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*, Saint-Hilaire) é uma planta nativa da América do Sul, consumida na forma de infusões e chimarrão. Apresenta potencial antioxidante e poder estimulante devido a presença de metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina), ácidos fenólicos (ácido caféico, ácido clorogênico, ácido ferrúlico, etc) e flavonoides (catequina, kaempferol, epicatequina, etc) (HECK; DE MEJIA, 2007; DARTORA et al., 2011; BRAVO, GOYA; LECUMBERRI, 2007). Estudos indicam sua potencial aplicação em bebidas adicionadas de frutas, extrato de soja, gaseificadas e energéticas (MELLO et al., 2009; BOAVENTURA et al., 2013; FRIZON et al., 2015).

Uma fruta que pode ser adicionada à infusão de erva-mate para o preparo de bebidas é a lichia (*Litchi chinensis* Sonn). A lichia é uma fruta doce, com polpa carnosa, cor e aromas atrativos, possui vários compostos bioativos e com propriedades antioxidantes e pode ser consumida *in natura*, como suco e outras formas processadas (ZHANG et al., 2013; SU et al., 2014; ZHENG et al., 2014). O processamento da lichia na forma de suco é uma alternativa ao excedente a produção, já que a mesma apresenta uma limitada vida útil (JAYACHANDRAN, CHAKRABORTY; RAO, 2015). Como o suco de lichia apresenta uma boa aceitação sensorial ele pode ser adicionado a extratos vegetais e melhorando o perfil nutricional e sensorial de bebidas mistas (JAYACHANDRAN, CHAKRABORTY; RAO, 2015), e de bebida probióticas e fermentadas (ZENG et al.; 2008; ALVES et al., 2010; ALVES et al., 2011; KALITA et al., 2018).

Diversos estudos indicam que os sucos de frutas são adequados para o desenvolvimento de produtos probióticos, principalmente por não conterem ingredientes lácteos e desta forma poderem ser consumidos por pessoas com intolerância à lactose (LUCKOW; DELAHUNTY, 2004).

Isolada primeiramente a partir da lichia, a levedura *Saccharomyces boulardii* é considerada probiótica e tem sido empregada no tratamento de diarreia do viajante, diarreia associada a antibióticos, gastroenterite aguda em adultos e crianças, diarreia em pacientes intubados e diarreia crônica em pacientes HIV positivos, além de possuir efeito protetivo contra *Clostridium*

difficile, *Vibrio cholerae*, *Shigella*, *E. coli* (EPEC) e *Salmonella entérica* Typhimurium (CZERUCKA, RAMPAL, 2002; KÜHLE; SKOVGAARD; JESPERSEN, 2005; MARTINS et al., 2013; LAZO-VÉLEZ et al., 2018)

Pesquisas indicam a possibilidade de aplicação da *S. boulardii* em diversas matrizes alimentícias, como sorvete à base de soja (HEENAN et al., 2004), sucos de tomate (FRATIANNI et al., 2013), berries (FRATIANNI et al., 2014), tomate com cenoura (SIVUDU et al., 2016), bebidas à base de rabanete, de beterraba e de cenoura (DEĞIRMENCIOĞLU; GURBUZ; SAHAN, 2016), além de polpa de maçã (FARINAZZO et al., 2017), entre outros. Fratianni et al. (2014) comentam que apesar de apresentar potencial aplicação em bebidas, esta levedura não tem sido explorada comercialmente.

Na literatura não foram encontrados estudos com a aplicação da *S. boulardii* em bebidas mistas de lichia e erva-mate objetivando o desenvolvimento de bebida fermentada probiótica.

Assim, este estudo teve como objetivos desenvolver uma bebida probiótica de lichia e erva-mate, empregando a levedura *Saccharomyces boulardii* e avaliar o efeito do armazenamento refrigerado sobre características físico-químicas, atividade antioxidante, a viabilidade celular e aceitação sensorial.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Reagentes

Os reagentes glicose, frutose, sacarose, estaquiose, manitol, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, ácido ascórbico, ácido gálico, ácido protocateúico, teobromina, paraxantina, epigallocatequina, catequina, epicatequina, quercetina, ácido caféico, cafeína, rutina, kaempferol, ácido clorogênico, ácido p-cumárico, ácido ferrúlico, ácido sinápico, miricetina e trigonelina, além de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), TPTZ (2,4,6-tripiryridyl-S-triazina), ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-

sulfônico), Folin-Ciocalteu, Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) foram adquiridos junto à Sigma-Aldrich (St Louis, EUA), contendo grau de pureza $\geq 99\%$. A acetonitrila grau HPLC foi adquirida da J.T. Baker (Xalostoc, México). Já o etanol e os demais reagentes foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O Sistema Milli-Q® (Simplicity 185, Millipore, MA, EUA) foi empregado para a extração da água ultrapura utilizada no preparo das soluções padrão.

2.1.2 Cultura probiótica de *S. boulardii*

A levedura utilizada foi obtida de produto comercial na forma liofilizada (Floratil®Merck S.A. Brazil) sendo que cada capsula de 100 mg continha ao menos $0,5 \times 10^9$ células de *S. boulardii*-17.

A cultura liofilizada foi reativada por meio da adição desta em 100 mL de caldo YPD (extrato de levedura 10 g/L; peptone bacteriológica, 20 g/L; dextrose, 20 g/L) previamente esterilizada por autoclavagem (121 °C/20 min), e mantida a 30 °C, 120 rpm, por 24 h em uma estufa com shaker rotatório (CT-712 Cientec, Brazil).

Após a incubação, a biomassa da levedura foi centrifugada a 14000g/15 min à 10 °C (Eppendorf 5804 R, Alemanha) e lavada por duas vezes com solução salina 0,85% (p/v) estéril para remoção por centrifugação do YPD residual. Em seguida a biomassa foi ressuspensa em 50 mL de solução salina 0,85% (p/v) estéril para ser obter a cultura probiótica ativada.

2.1.3 Erva-mate e lichia

Folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint-Hilaire) foram colhidas em Campina do Simão, Paraná, Brasil (25°4'8" S; 51°49'31"O e altitude: 963 m) em março de 2015. Cerca de 65 kg de folhas foram lavadas em água potável, secas em estufa com circulação forçada por 24 h a 45 °C e moídas em moinho de facas até atingir tamanho de partícula menor que 3,5 mm. As folhas moídas foram armazenadas em sacos de polietileno e recobertos com papel alumínio, a -18 °C (MURAKAMI et al., 2011).

A infusão de erva-mate foi preparada a partir da adição de 150 mL de água à 85 °C a 1,5 g de folhas desidratadas e moídas. A infusão foi mantida por 15 min, filtrada (papel Whatman nº 1) e o volume completado com água até 150 mL, para recuperar a água perdida durante o preparo (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007). Este procedimento foi realizado no mesmo dia do preparo das bebidas.

As lichias (*Litchi chinensis* Sonn.) da variedade Bengal, cerca de 195 kg, provenientes da safra de 2014, foram obtidas de produtores da região de Umuarama, Paraná, Brasil (23°45'57"S; 53°19'30"O e altitude de 442 m). Os frutos foram sanitizados (hipoclorito de sódio à 100 ppm v/v por 5 min), descascados manualmente e despulpados em despulpadeira (F. Silva, modelo MS-200, Brasil). A polpa (15,8 °Brix) foi acondicionada em sacos de polietileno e armazenada à -15 °C até o momento da utilização e análises. Para o preparo das bebidas, a polpa foi descongelada a 4 °C e filtrada em peneiras de 200 mesh obtendo-se o suco.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Preparo da bebida probiótica fermentada de lichia e erva-mate

Para preparo das bebidas probióticas (Figura 1) foram misturados suco de lichia e infusão de erva-mate na proporção de 70:30 (suco de lichia: infusão de erva-mate). Adicionou-se sacarose em quantidade suficiente para ajuste do teor de sólidos solúveis (SST) em 12 °Brix e ácido cítrico 20% (p/v) para correção do pH para 4,5. As bebidas foram acondicionadas em garrafas de vidro de 500 mL e pasteurizadas em banho-maria por 20 min/80 °C com imediato resfriamento em banho de gelo. Confirmou-se que a bebida pasteurizada atendia aos padrões microbiológicos da legislação vigente (BRASIL, 2001) por meio de pesquisa de Coliformes a 45 °C e de *Salmonella sp.*

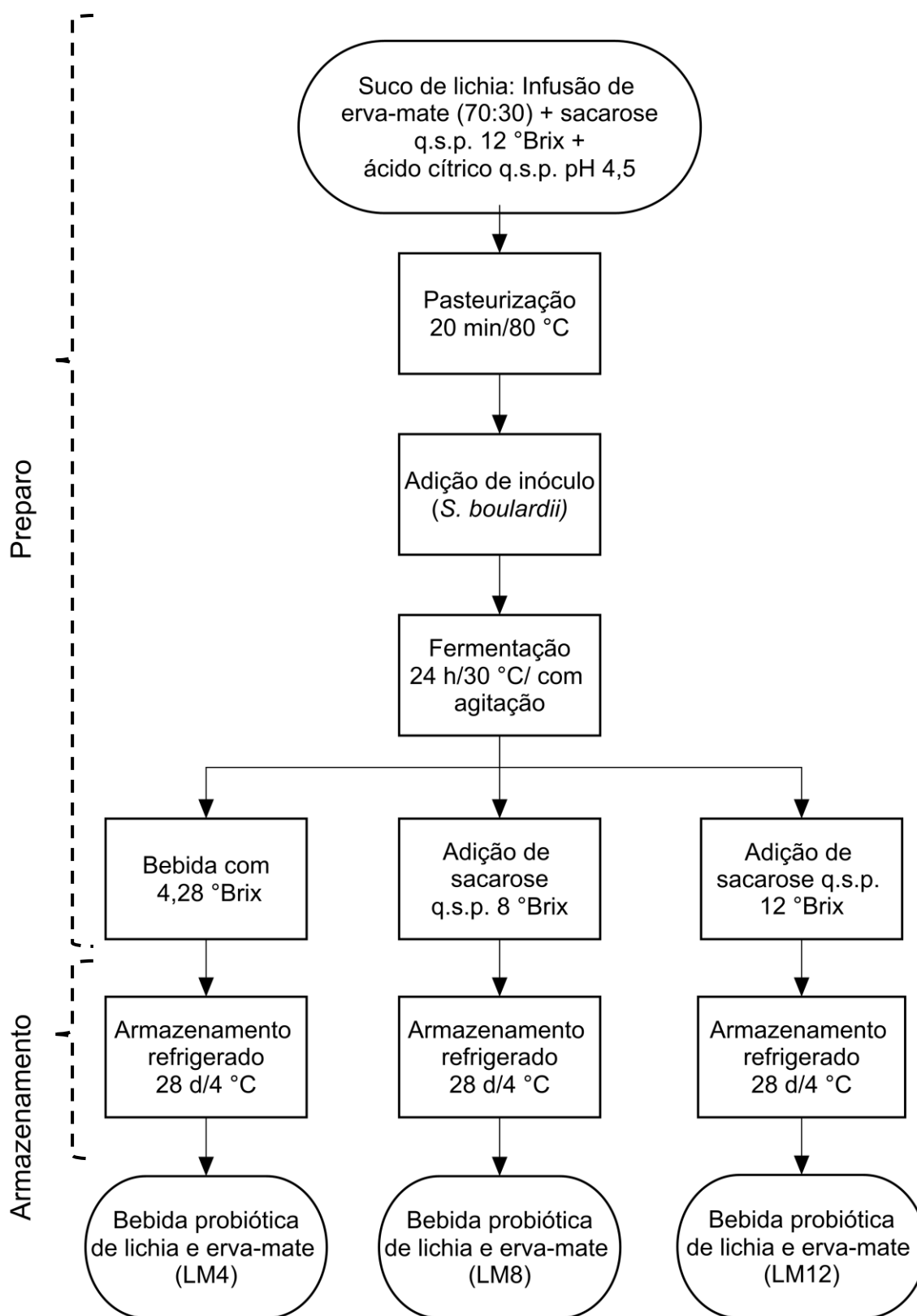


Figura 1 – Etapas de produção das bebidas probióticas de lichia e erva-mate
q.s.p.: quantidade suficiente para; h: hora; d: dia.

Adicionou-se o inóculo de *S. boulardii* em quantidade suficiente para 10^5 células/mL de suco e permitiu a fermentação sob agitação (120 rpm), por 24 h/30 °C. A bebida fermentada, com conteúdo de sólidos solúveis de 4,28 °Brix, foi dividida em três partes: a primeira permaneceu com conteúdo de sólidos solúveis original, sendo denominada de bebida de lichia com 4 °Brix (LM4), outra recebeu adição de sacarose em quantidade suficiente para 8 °Brix, denominada como LM8, e a última porção, recebeu a adição de sacarose até 12 °Brix e foi denominada como LM12. As bebidas fermentadas foram armazenadas em refrigerador à 4 °C durante 28 dias, com coletas a cada 7 dias para análises. As bebidas foram preparadas em duas repetições.

2.2.3 Análises físicas e químicas das bebidas

O conteúdo de sólidos solúveis totais (SST) em °Brix foi determinado em refratômetro digital (modelo Pocket Pal-1; Atago, Tokyo, Japão) e o pH foi determinado utilizando um pHmetro (modelo HI 3221; Hanna Instruments Inc., Woonsocket, RI, USA).

Para determinar o conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT) seguiu-se metodologia proposta por Singleton; Orthofer; Lamuela-Raventos (1999), com algumas modificações. Foram adicionados 0,5 mL do reativo de Folin-Ciocalteu 0,9 N e 0,5 mL de solução de carbonato de sódio 10% (m/v) em uma alíquota de 0,5 mL de bebida ou padrão. Após repouso por 30 min em ambiente escuro, a absorbância foi lida à 760 nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S22, Reino Unido). A água foi usada como branco. A partir da curva padrão de ácido gálico (4 a 24 µg/mL) obteve-se a concentração de CFT. Os resultados foram expressos em µg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por mL.

A atividade antioxidante (AA) foi avaliada pelos métodos de redução do cátion ABTS^{•+}, do DPPH e pela capacidade de redução do Fe³⁺ em Fe²⁺ (FRAP), conforme Sánchez-González, Jiménez-Escrig e Saura-Calixto (2005).

O radical ABTS^{•+} foi produzido pela reação da solução de ABTS 7 mM com solução de persulfato de potássio 2,45 mM, em ambiente escuro por 16 h. O ABTS^{•+} foi diluído em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4) até absorbância de 0,700 à 730 nm. Em tubo contendo 4 mL da solução ABTS^{•+} diluída, adicionou-se uma

alíquota de 10 μL da amostra ou padrão. Após 6 min de reação a absorvância foi lida à 730 nm.

Para o ensaio DPPH, adicionou-se em um tubo 1 mL de tampão acetato 100 mM, pH 5,5; 1 mL de etanol; 0,5 mL de solução etanólica de DPPH 250 μM e 50 μL de bebida ou padrão. Após 15 min de incubação à temperatura ambiente e no escuro, leu-se a absorvância à 517 nm em espectrofotômetro. O controle positivo não continha amostra e o branco foi constituído de 1 mL de tampão acetato e 1,5 ml de etanol.

O reagente de FRAP foi preparado no momento da análise, sendo obtido pela combinação de 25 mL de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL de solução de TPTZ (10 mM de TPTZ em HCl 40 mM) e 2,5 mL de cloreto de ferro 20 mM. Após reação em ambiente escuro à 37 °C/30 minutos de 30 μL de amostra com 900 μL do reagente FRAP e 70 μL de água destilada, a absorvância foi lida à 595 nm em espectrofotômetro. Utilizou-se água como branco.

Soluções de Trolox em etanol 80% em diferentes faixas de concentração foram empregadas para se obter as curvas padrão: 0,75 a 7,5 μM (ABTS) e de 50 a 600 μM (DPPH e FRAP). Os resultados da atividade antioxidante foram expressos para cada método em μmol de equivalentes de Trolox (TEAC) por mL de amostra.

2.2.3.1 Preparo das amostras para análises cromatográficas

Para realização das análises cromatográficas 1 mL de cada amostra foi homogeneizada em 10 mL de água e centrifugada à 9056 g por 15 min. O sobrenadante foi recolhido e filtrado em membrana de PVDF 0,22 μm (Millipore, Cork, Ireland).

2.2.3.2 Determinação de açúcares e ácidos orgânicos

Empregou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC 20 A (Shimadzu Co., Kyoto, Japão) composto de uma bomba de alta pressão (LC-20AT), injetor automático (SIL-20AC HT), forno de coluna (CTO-20A) e detectores de arranjo de fotodiodos (PDA, modelo SPD-M20A) e índice de refração (RID-

10A) acoplados em série (HPLC-PDA-RID). As análises cromatográficas foram isocráticas.

Na Tabela 1 estão descritas as condições cromatográficas para a determinação de açúcares e ácidos orgânicos. Fixou-se o comprimento de onda do RID em modo varredura de 200 a 400nm e do PDA em 215nm (PAULI; CRISTIANO; NIXDORF, 2011). A aquisição dos dados e a integração dos picos cromatográficos foram realizadas no software LC Solutions (Shimadzu Co., Kyoto, Japão). As análises foram realizadas em duplicata (n = 2), com os resultados expressos em mg/mL.

Tabela 1– Condições cromatográficas empregadas para a determinação de açúcares e de ácidos orgânicos 1

	Açúcares	Ácidos Orgânicos
Fase móvel	100% Água ultrapura	100% Tampão fosfato 25mM pH 2.4
Coluna	Aminex HPX-87P (7,8 x 300 mm; (Biorad, CA, USA)	CapCell Pak C18 (250 x 4,6mm x 5µm; Shiseido Co., Ltd., Japão)
Temperatura do forno (°C)	85	40
Temperatura do detector (°C)	40	40
Vazão (mL/min)	1,0	1,0
Volume de injeção (µL)	20	20

Fonte: Pauli, Cristiano e Nixdorf (2011)

2.2.3.3 Determinação de ácidos fenólicos, metilxantinas e flavonoides

Para a determinação da composição de compostos fenólicos e metilxantinas das bebidas probióticas de lichia e erva-mate empregou-se cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência (UHPLC) (Acquity UPLC I Class Waters®, Waters Corporation, Milford, MA, USA) com coluna HSS C18 1,8 µm 2,1x100 mm (Waters), utilizando duas fases móveis – A: Água Ultrapura e B: Metanol (JT Backer, HPLC grade), acidificadas com 0,05% e 0,1% de ácido fórmico, respectivamente. O volume de injeção foi de 1,0 µL no modo *partial loop*

with needle overfill, vazão de 0,4 mL/min, e a separação foi realizada na condição de gradiente utilizando curva de concentração (tempo de 0,00–10,00 min: 95% da fase A e 5% da fase B; tempo de 10,00–10,10 min: 5% da fase A e 95% da fase B; tempo de 10,10–13,00 min: 95% da fase A e 5% da fase B). O detector de arranjo de fotodiodos (PDA) foi utilizado para realizar a varredura dos comprimentos de ondas entre 190 e 700 nm, e a leitura fixada nos canais de 270 e 320 nm. O tempo total de análise foi de 13 minutos, considerando as etapas de separação, limpeza da coluna e equilíbrio das condições iniciais do gradiente. Para aquisição dos dados e a integração dos picos cromatográficos empregou-se o software Empower 3 (Waters). A separação e quantificação foram realizadas em duplicata (n = 2). Os resultados foram expressos em mg/L de amostra.

2.2.3.4. Determinação de etanol

Para identificação e quantificação de etanol empregou-se cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas (CG-MS, QP2010-SE-Shimadizu). As condições cromatográficas empregadas foram: coluna capilar Restek Rtx-5MS, (30 m x 0,25 mm; diâmetro interno de 0,25 µm); hélio como gás de arraste com fluxo de 0,7 mL/min; pressão e temperatura da coluna de 23,3 kPa e 35 °C, respectivamente. A rampa da temperatura do forno foi de 35-280 °C, sendo: de 1-5 min a uma taxa de 30 °C/min; e de 5-7,5 min a 50 °C/min; e uma temperatura constante mantida por 7,5-9,43 min; temperatura do injetor de 150 °C; temperatura do detector de 200 °C, temperatura de interface de 280 °C, operando em modo Scan 30-100 (m/z) com impacto eletrônico de 70 eV. Injeção de um volume de 500 µL em razão de split de 1:20 (BAGEWADI; MULLA; NINNEKAR, 2016).

Os resultados foram obtidos por análise dos tempos de retenção e áreas dos picos dos cromatogramas das amostras, após comparação com curva padrão de etanol grau HPLC, e expressos em percentual do volume de bebida probiótica de lichia e erva-mate (v/v).

2.2.4 Viabilidade da *S. boulardii*

As amostras foram coletadas e diluídas adequadamente em água peptonada 0,1% (p/v) (Oxoid®). Após o plaqueamento em ágar YPD à 37 °C/ 48 h procedeu-se a contagem com resultados expressos em UFC/ mL de amostra (FARINAZZO et al., 2017).

2.2.5. Teste de aceitação sensorial

Os testes sensoriais de aceitação de laboratório foram realizados em cabines individuais sob luz branca. As amostras (30 mL) foram servidas à 7 ± 2 °C em copos plásticos codificados com números aleatórios de três dígitos. As amostras foram aleatorizadas e apresentadas sequencialmente para cada avaliador. Água potável à temperatura ambiente e biscoitos água e sal foram servidos para limpeza da cavidade oral. Os procedimentos foram aprovados por Comitê de ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (certificado CAAE n° 56478316.8.0000.5231).

No teste sensorial empregaram-se 53 usuais ou potenciais consumidores de bebidas à base de frutas e/ou bebidas funcionais (83% declararam saber o conceito de bebida funcional, relatando um consumo médio de 2,5 litros de bebidas de frutas por mês). A equipe foi composta por 33 mulheres e 20 homens, com alta escolaridade (85% possuíam graduação ou pós-graduação) e jovens (76% com idade entre 18 a 39 anos). Utilizou-se escala híbrida estruturada de dez centímetros (0 = desgostei muitíssimo; 10 = gostei muitíssimo) para a avaliação dos atributos de cor, aroma, textura, sabor e aceitação global (VILLANUEVA; PETENATE; DA SILVA, 2005).

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi conduzido duas vezes usando delineamento inteiramente ao acaso. Os parâmetros físico-químicos e microbiológicos foram determinados em triplicata em cada repetição do experimento, a cada 7 dias, por um período de 28 dias. Um esquema de parcelas subdivididas foi empregado, onde o tratamento principal foi o conteúdo de sólidos solúveis na bebida e o

secundário foi o tempo de armazenamento. Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de Tukey ($\alpha = 5\%$). O programa Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2014) foi utilizado para análises estatísticas.

Os experimento sensorial foi de blocos completos casualizados, e os dados da aceitação sensorial foram submetidos à ANOVA de dois fatores (bebidas e avaliadores). Para comparação das médias empregou-se o teste de Tukey ($\alpha = 5\%$). Empregou-se o programa Statistica 7.1 (STATSOFT, 2006) para as análises.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. VIABILIDADE DA CULTURA E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA BEBIDA MISTA DE LICHIA E ERVA-MATE FERMENTADA

Houve uma variação na viabilidade da *S. boulardii* e no conteúdo de SSTs da bebida após a fermentação (Figura 2). Com a fermentação por 24 h, houve um aumento significativo na viabilidade ($p \leq 0,05$) da levedura, passando a apresentar $3,23 \times 10^6$ UFC/mL. A viabilidade da *S. boulardii* observada após a fermentação permite classificar a bebida mista como uma bebida probiótica, segundo Lee e Salminen (1995). Salienta-se que, considerando a viabilidade observada após a etapa de fermentação, a bebida mista fermentada apresentou em torno de $6,4 \times 10^8$ UFC/porção de 200 mL, valor que é próximo ao observado em medicamentos à base de *S. boulardii* (WGO, 2011) e indica o potencial probiótico da bebida. Demonstra-se também que a etapa de fermentação é necessária para a produção de uma bebida de lichia e erva-mate com potencial probiótico.

Ainda, verificou-se diminuição no conteúdo de SSTs de 12 °Brix para 4,28 °Brix com a fermentação (Tabela 2), devido a metabolização dos açúcares presentes na bebida formulada para a multiplicação da levedura probiótica (NELSON; COX, 2014).

A *S. boulardii*, assim como as demais leveduras, tem como produto principal do seu metabolismo o CO₂ e etanol, mas também podem produzir, além de outras substâncias, pequenas quantidades de ácidos orgânicos (ESTELA-ESCALANTE et al., 2012; NELSON; COX, 2014; LAZO-VÉLEZ et al., 2018).

Assim justifica-se a diminuição do pH (de 4,5 para 3,77) além da produção de etanol (2,7%) e CO₂ (Tabela 2). Esta redução do pH também foi verificada por Değirmencioğlu, Gurbuz e Sahan (2016) em sucos fermentados de vegetais por *S. boulardii*. Lourens-Hattingh e Viljoen (2001) observaram produção de etanol em produtos lácteos fermentados por esta levedura.

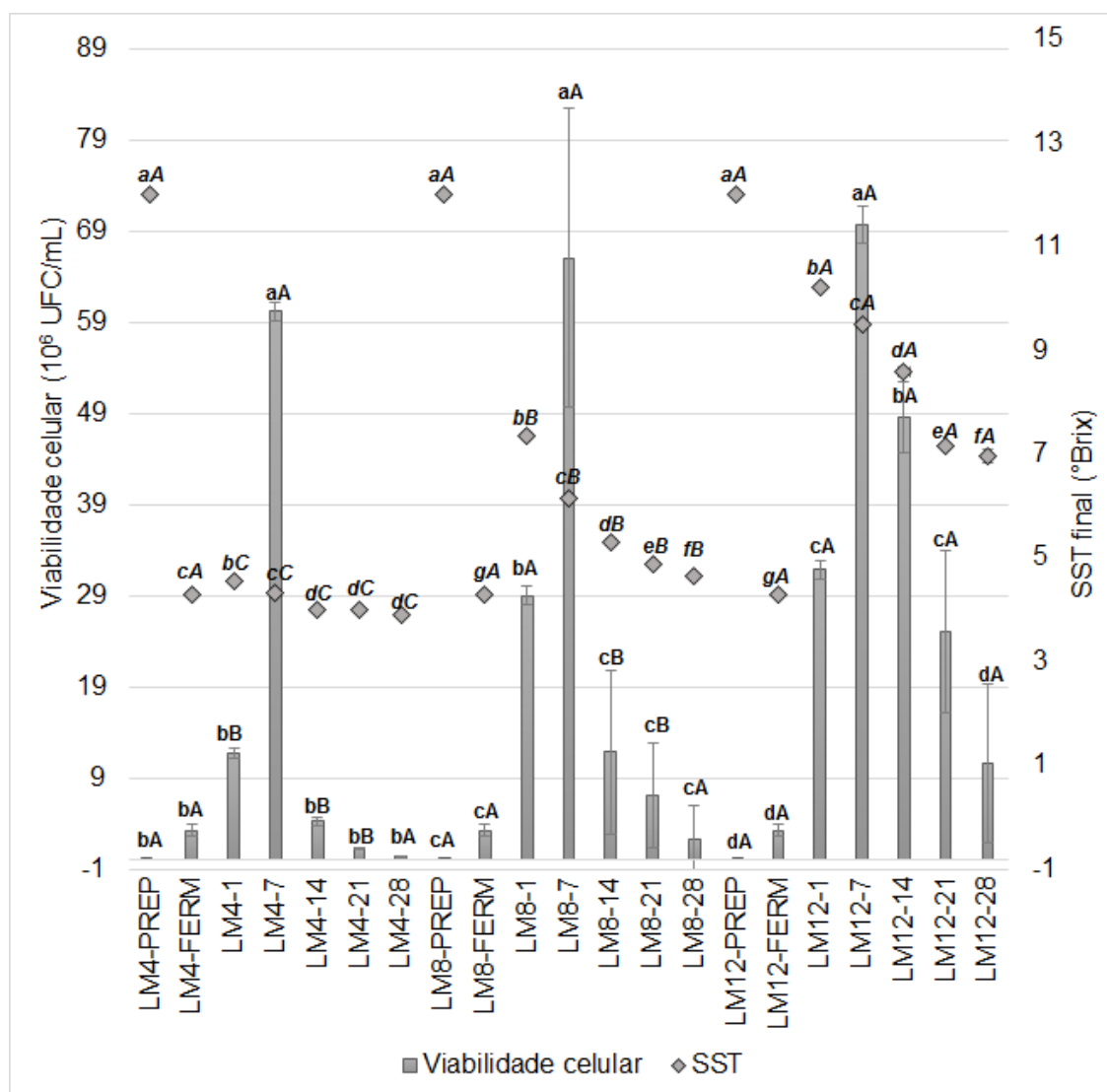


Figura 2 – Viabilidade da levedura *S. boulardii* e conteúdo de sólidos solúveis totais das bebidas probióticas de lichia e erva-mate fermentadas e armazenadas (4 °C) por 28 dias

As barras de erro representam o desvio padrão (n = 6). Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística a $p \leq 0,05$ para a mesma formulação ao longo do armazenamento. Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre formulações, no mesmo tempo de armazenagem. Formulações: LM-4 (bebida probiótica de lichia e erva-mate fermentada por 24 h); LM-8 (bebida probiótica de lichia e erva-mate fermentada por 24 h ajustada para 8 °Brix); e LM-12 (bebida probiótica de lichia e erva-mate fermentada por 24 h ajustada para 12 °Brix).

Tabela 2 – Variação nas características físico-químicas das bebidas mistas probióticas de lichia e erva-mate, avaliados ao longo do armazenamento refrigerado por 28 dias ¹

Parâmetros	Etapa	Tempo	Formulações ²		
			LM-4	LM-8	LM-12
pH	Preparo ³	0 h	4,50 ± 0,00 ^{aA}	4,50 ± 0,00 ^{aA}	4,50 ± 0,00 ^{aA}
		24 h	3,77 ± 0,06 ^{bA}	3,77 ± 0,06 ^{bA}	3,77 ± 0,06 ^{bA}
	Armaze- namento (4 °C)	1 d	3,74 ± 0,01 ^{bcA}	3,74 ± 0,06 ^{bA}	3,71 ± 0,02 ^{bA}
		7 d	3,73 ± 0,01 ^{bcA}	3,73 ± 0,01 ^{bA}	3,70 ± 0,01 ^{bA}
		14 d	3,68 ± 0,56 ^{cA}	3,65 ± 0,01 ^{cA}	3,60 ± 0,04 ^{cB}
		21 d	3,43 ± 0,01 ^{dB}	3,53 ± 0,01 ^{dA}	3,50 ± 0,03 ^{dA}
		28 d	3,42 ± 0,06 ^{dB}	3,48 ± 0,02 ^{dA}	3,44 ± 0,02 ^{dAB}
Etanol (%)	Preparo ³	0 h	0,00 ± 0,00 ^{dA}	0,00 ± 0,00 ^{gA}	0,00 ± 0,00 ^{gA}
		24 h	2,71 ± 0,09 ^{cA}	2,71 ± 0,09 ^{fA}	2,71 ± 0,09 ^{fA}
	Armaze- namento (4 °C)	1 d	5,6 ± 0,07 ^{bB}	5,89 ± 0,03 ^{eA}	6,05 ± 0,15 ^{eA}
		7 d	6,03 ± 0,00 ^{aC}	6,45 ± 0,01 ^{dB}	7,72 ± 0,14 ^{dA}
		14 d	6,05 ± 0,03 ^{aC}	6,75 ± 0,04 ^{cB}	8,28 ± 0,15 ^{cA}
		21 d	6,09 ± 0,01 ^{aC}	7,24 ± 0,06 ^{bB}	8,90 ± 0,03 ^{bA}
		28 d	6,26 ± 0,04 ^{aC}	7,92 ± 0,04 ^{aB}	9,58 ± 0,38 ^{aA}
CFT (µg de EAG/mL)	Preparo ³	0 h	1260,3 ± 20,1 ^{bA}	1260,3 ± 20,1 ^{bA}	1260,3 ± 20,1 ^{bA}
		24 h	1385,1 ± 24,2 ^{aA}	1385,1 ± 24,2 ^{aA}	1385,1 ± 24,2 ^{aA}
	Armaze- namento (4 °C)	1 d	602,5 ± 1,7 ^{cB}	609,6 ± 2,53 ^{cB}	663,1 ± 4,7 ^{cA}
		7 d	533,9 ± 9,0 ^{dC}	559,0 ± 3,6 ^{dB}	603,0 ± 7,8 ^{dA}
		14 d	483,8 ± 3,4 ^{eC}	514,7 ± 7,2 ^{eB}	593,9 ± 2,7 ^{dA}
		21 d	494,2 ± 1,2 ^{deB}	473,3 ± 8,9 ^{efC}	595,6 ± 4,8 ^{dA}
		28 d	428,7 ± 2,4 ^{fC}	449,2 ± 1,3 ^{fB}	512,1 ± 4,2 ^{eA}

¹Resultados expressos como média (n = 6) ± desvio padrão. Médias acompanhadas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna ou maiúscula na mesma linha diferem significativamente entre si (p ≤ 0,05). ² Formulações: LM-4 (bebida probiótica de lichia e erva-mate fermentada por 24 h); LM-8 (bebida probiótica de lichia e erva-mate fermentada por 24 h ajustada para 8 °Brix); e LM-12 (bebida probiótica de lichia e erva-mate fermentada por 24 h ajustada para 12 °Brix). ³ Preparo: incluindo a fermentação por 24h/30 °C sob agitação e ajuste do SSTs (°Brix).

O conteúdo de CFTs da bebida de lichia e erva-mate aumentou em quase 10% com a fermentação (Tabela 2), possivelmente em função da interação entre a levedura e os compostos fenólicos (DEĞIRMENCIOĞLU; GURBUZ; SAHAN, 2016). Durante a fermentação, por ação da levedura, parte dos compostos fenólicos que compõe a parede celular da lichia e/ou erva-mate podem ser liberados, também, com o consumo dos açúcares fermentescíveis, que possam estar anteriormente ligados às moléculas de compostos fenólicos. Este resultado está de acordo com o observado por Değirmencioğlu, Gurbuz e Sahan (2016), em sucos fermentados de rabanete, de cenoura preta e de beterraba. Já outros autores observaram uma diminuição no conteúdo de CFTs após fermentação por *S. boulardii* em suco de berries (FRATIANNI et al., 2013) e em suco de tomate (FRATIANNI et al., 2014).

3.2 EFEITO DO CONTEÚDO DE AÇÚCARES E DO ARMAZENAMENTO A 4 °C SOBRE AS BEBIDAS MISTAS PROBIÓTICAS DE LICHIA E ERVA-MATE

3.2.1 Viabilidade da *S. boulardii* e conteúdo de SSTs

Com um dia de armazenamento houve um aumento na viabilidade da levedura nas bebidas LM8 e LM12 (Figura 2), em função da adição de sacarose logo após a fermentação e consequente aumento no conteúdo de SSTs, que permitiu sua multiplicação. Na LM4 a viabilidade manteve-se constante com um dia, ocorrendo um aumento na contagem de leveduras com sete dias de armazenamento. Observou-se, também, um acréscimo na viabilidade da levedura probiótica para as bebidas LM8 e LM12 com sete dias de armazenamento. Este incremento na contagem aos setes dias ocorreu em função da adaptação do metabolismo celular da levedura após o início do armazenamento refrigerado associado a disponibilidade de açúcares fermentescíveis presentes nas bebidas (NELSON; COX, 2014; LAZO-VÉLEZ et al., 2018).

Para a bebida LH4, aos 14 dias de armazenamento, houve diminuição da viabilidade da levedura e conteúdo de SSTs, mantendo-se constantes até o 28º dia.

Ao longo do armazenamento, notou-se que a viabilidade manteve-se constante para a LM8 e diminuiu para a LM12. Já o conteúdo de SSTs decresceu

para ambas, assumindo 4,66 e 6,95 °Brix (LM8 e LM12, respectivamente). Este aumento da viabilidade e consequente diminuição do teor de SST está em concordância com o verificado em Lourens-Hattingh e Viljoen (2001) em bebidas lácteas fermentadas por *S. boulardii*. Lazo-Vélez et al. (2018) citam que a *S. boulardii* metaboliza primeiramente os monossacarídeos e dissacarídeos como sua principal fonte de carbono visando multiplicação celular e reduzindo, assim, o conteúdo dos SSTs nas bebidas.

Comparando-se as formulações, com relação a viabilidade da *S. boulardii* ao longo do armazenamento, verifica-se que, de forma geral, apenas as bebidas suplementadas com sacarose (LM8 e LM12) mantiveram contagem maior do que 10^6 UFC/mL até o 28º dia. E que ao final dos 28 dias a bebida LM12 apresentou maior viabilidade da levedura. Este resultado está em concordância com Gaboardi et al. (2018), que observaram um aumento na viabilidade desta levedura em efluentes suplementados por sacarose, indicando a preferência por este açúcar para a multiplicação e manutenção celular.

Desta forma, como verificou-se uma correlação significativa e positiva entre a viabilidade e o teor de sólidos solúveis iniciais ($r = 0,547$, $p \leq 0,05$), um maior conteúdo de SSTs da bebida LM12 resultou em maior viabilidade e população da *S. boulardii* na bebida probiótica de lichia e erva-mate.

A capacidade da *S. boulardii* manter-se viável e em quantidade $> 10^6$ UFC/mL nas bebidas de lichia e erva-mate LM8 e LM12 até o 28º dia de armazenamento, torna estas bebidas adequadas, dentre as testadas, para o desenvolvimento de uma bebida probiótica mista de lichia e erva-mate.

3.2.2. Conteúdo de etanol

As bebidas no início do armazenamento apresentaram um acréscimo no conteúdo de etanol de 5,6; 5,9; e 6,1% (LM4, LM8 e LM12, respectivamente) (Tabela 2). Mesmo comportamento foi verificado ao longo do armazenamento. Comparando-se o início e final do armazenamento notou-se que as bebidas tiveram um acréscimo de 11,8% (LM4), 34,5% (LM8) e 58,3% (LM12). Esse comportamento pode ser justificado pela *S. boulardii* ser uma levedura produtora de CO₂ e etanol a partir da fermentação da glicose (NELSON; COX, 2014; LAZO-VÉLEZ et al., 2018). Desta forma, ao consumir os SSTs, especialmente glicose,

ao longo do armazenamento refrigerado, a levedura gerou etanol como produto do metabolismo.

De forma geral, a partir do 7º dia de armazenamento, notou-se que o teor alcoólico das bebidas era decrescente na seguinte ordem: LM12 > LM8 > LM4 e que havia uma correlação significativa e positiva entre o teor alcoólico e conteúdo de SSTs da bebida ($r = 0,721$, $p \leq 0,05$) e também entre teor alcoólico e o tempo de armazenamento ($r = 0,572$, $p \leq 0,05$).

3.2.3 pH e ácidos orgânicos

Com relação ao pH (Tabela 2), houve um decréscimo neste parâmetro ao longo do período de armazenamento, passando de 3,74 (LM4, LM8) e 3,71 (LM12) para 3,42 (LM4), 3,48 (LM8) e 3,44 (LM12) aos 28 dias de armazenamento. Apesar dos ácidos orgânicos não serem os principais produtos do metabolismo da levedura *S. boulardii*, estes podem ser produzidos em pequenas quantidades (NELSON; COX, 2014; LAZO-VÉLEZ et al., 2018), mas suficiente para a redução no pH.

Identificou-se na bebida fermentada de lichia e erva-mate a presença de ácido málico, ácido acético e ácido cítrico (Figura 3). Apesar de ter sido adicionada uma pequena quantidade de ácido cítrico durante o preparo da bebida de lichia e erva-mate, segundo Nelson; Cox (2014) e Datta; Timson; Annapure (2017) estes ácidos orgânicos são de ocorrência natural e derivam-se de substâncias envolvidas durante as etapas da glicólise das células das leveduras.

O conteúdo de ácido málico manteve-se constante ao longo do armazenamento em todas as bebidas fermentadas (Figura 3). Também foi constante o conteúdo de ácido acético para as bebidas LM4 e LM12 e houve um decréscimo de 17,5% ao final de 28 dias para a bebida LM8. Observou-se acréscimo de 19%, 34%, e 65% após 28 dias de armazenamento no teor de ácido cítrico para as bebidas LM4, LM8 e LM12, respectivamente. Maiores conteúdos de ácido cítrico foi observado nas bebidas fermentadas com maior adição de sacarose.

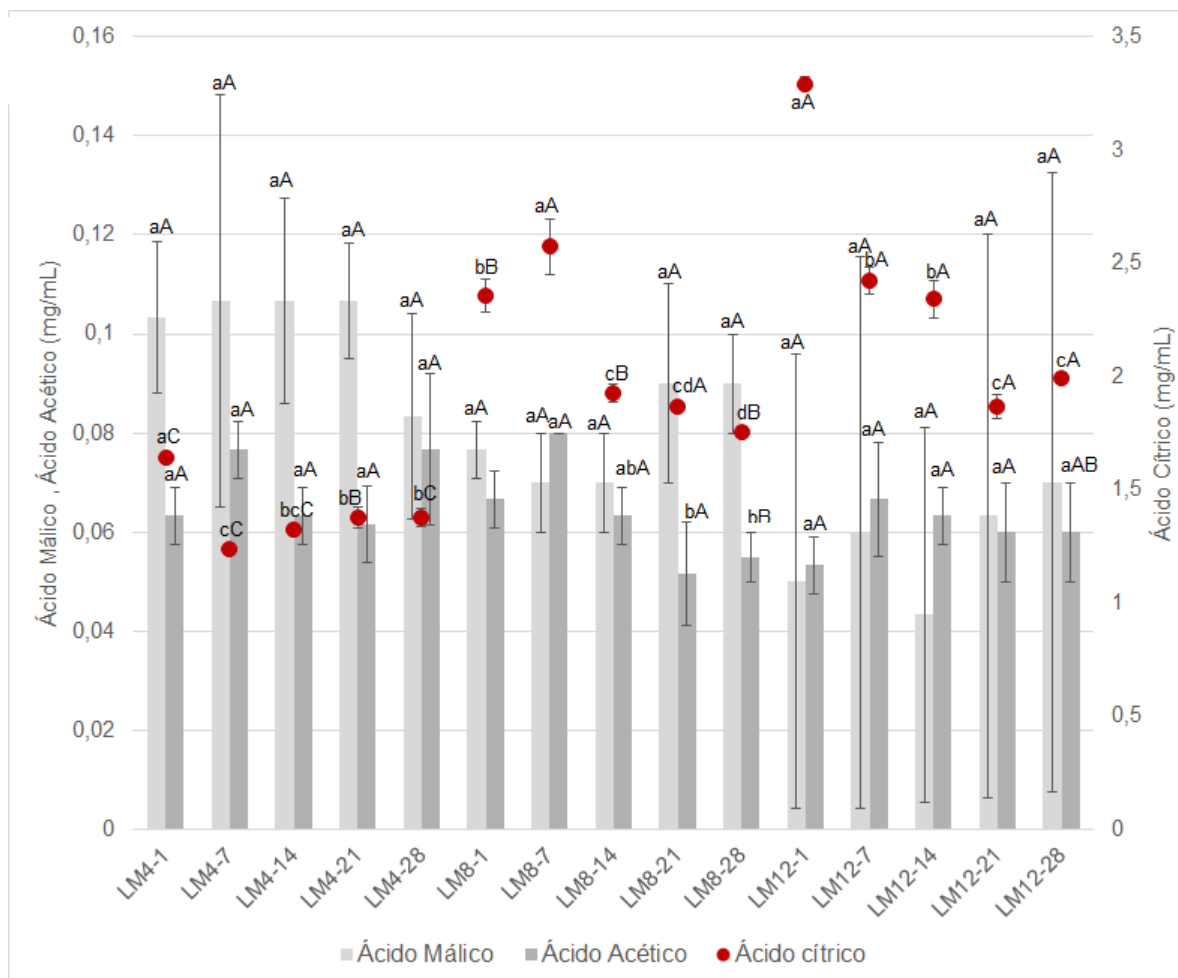


Figura 3 – Conteúdo de ácido málico, ácido acético, e ácido cítrico (mg/mL) em bebidas mistas probióticas de lichia e erva-mate (LM-4, LM-8 e LM-12) estocados sob refrigeração (4 °C) por 28 dias

As barras de erro representam o desvio padrão (n = 4). Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística a $p \leq 0,05$ para a mesma formulação em ao longo do periodo tempo de armazenagem. Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística a $p \leq 0,05$ entre diferentes formulações, no mesmo tempo de armazenagem. Formulações: LM-4 (bebida probiótica de lichia e erva-mate fermentada por 24 h); LM-8 (bebida probiótica de lichia e erva-mate fermentada por 24 h ajustada para 8 °Brix); e LM-12 (bebida probiótica de lichia e erva-mate fermentada por 24 h ajustada para 12 °Brix).

3.2.4 Conteúdo de açúcares

Nas bebidas não foi detectada a presença de sacarose ao longo do armazenamento (Figura 4), demonstrando que este nutriente já havia sido metabolizado pela levedura na etapa de fermentação. Durante o armazenamento, verificou-se apenas pequeno conteúdo de glicose na bebida LM4 no 7º dia, além

de um decréscimo no conteúdo deste açúcar nas bebidas LM8 e LM12 até o 14^o dia de armazenagem (Figura 4).

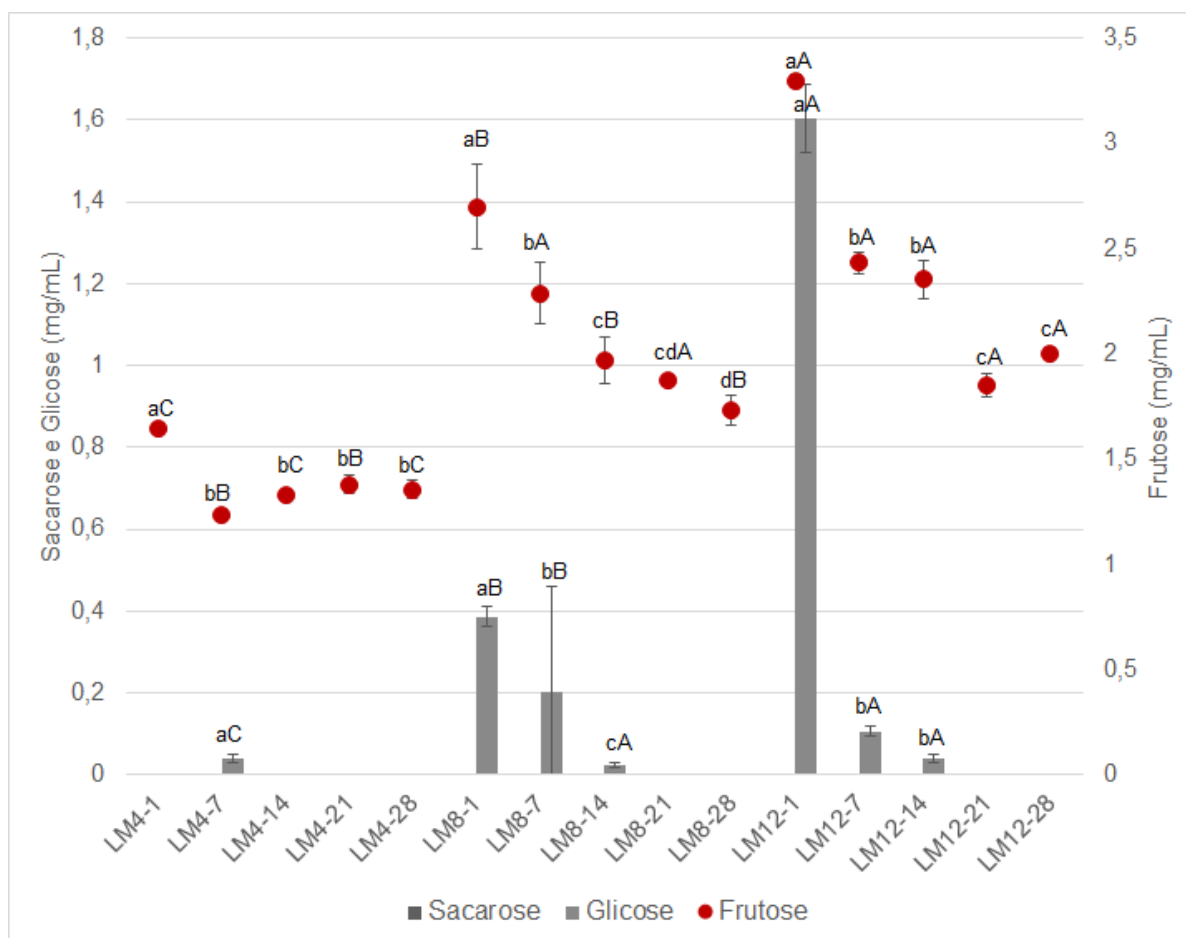


Figura 4 - Conteúdo de sacarose, glicose, e frutose (mg/mL) em bebidas mistas probióticas de lichia e erva-mate (LM-4, LM-8 e LM-12) estocados sob refrigeração (4 °C) por 28 dias

As barras de erro representam o desvio padrão (n = 4). Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística a $p \leq 0,05$ para a mesma formulação em ao longo do período tempo de armazenagem. Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística a $p \leq 0,05$ entre diferentes formulações, no mesmo tempo de armazenagem. Formulações: LM-4 (bebida probiótica de lichia e erva-mate fermentada por 24 h); LM-8 (bebida probiótica de lichia e erva-mate fermentada por 24 h ajustada para 8 °Brix); e LM-12 (bebida probiótica de lichia e erva-mate fermentada por 24 h ajustada para 12 °Brix).

Observou-se que havia frutose em todas as bebidas até o final do período de armazenamento (Figura 4), com uma redução de cerca de 18% (LM4), 31% (LM8), e 39% (LM12) ao longo dos 28 dias. Este resultado está em concordância ao observado em xaropes açucarados de tamareira fermentados por *S. cerevisiae*, onde após a fermentação ocorreu uma maior redução no teor de sacarose e de

glicose e, em contrapartida, menor de frutose (SULIEMAN et al., 2018). Desta forma, pode-se inferir que a levedura *S. boulardii* não metaboliza facilmente a frutose.

O fato das bebidas conterem frutose até o final do armazenamento, as mais doces, podendo contribuir para a aceitação pelos consumidores, uma vez que este monossacarídeo tem uma doçura relativa de 1,3 quando comparada à sacarose, que tem índice 1 (PARKER; SALAS; NWOSU, 2010).

3.2.5 Conteúdo de Ácido Ascórbico

As bebidas apresentaram no primeiro dia de armazenamento teor de ácido ascórbico de cerca de 135 (LM4), 157 (LM8) e 152 mg/L de ácido ascórbico, e redução de 11%, 21%, e 15% aos 28 dias (LM4, LM8 e LM12, respectivamente) (Tabela 3). Esta diminuição no conteúdo de vitamina C está relacionada às atividades enzimáticas como a ação das enzimas ascorbato oxidase e peroxidase, além da presença de oxigênio e luz (SANTHIRASEGARAM et al., 2015). Outros autores também observaram redução no conteúdo de ácido ascórbico ao longo do armazenamento refrigerado: cerca de 87% em lichias Bengal (DA SILVA et al., 2011), 64% em suco de lichia tratado termicamente (GUO et al., 2015), 33% em gel de aloe vera (SABERIAN et al., 2013), de 100% em sucos mistos de beterraba e laranja adicionados de *L. acidophilus* (PORTO et al., 2018) e de 37 e 62% em suco de laranja tratado por alta pressão e por pasteurização convencional (POLYDERA et al., 2013).

Dentre as formulações testadas, as bebida adicionadas de sacarose (LM8 e LM12) apresentaram maior conteúdo de ácido ascórbico no início e ao final do armazenamento. Como estas bebidas, além de maior teor de SSTs também apresentaram maior conteúdo de CFTs (Tabela 2), possivelmente os compostos fenólicos reagiram oxidando-se em lugar do ácido ascórbico, conferindo um efeito protetivo ao ácido ascórbico ao longo do armazenamento (MILLER; RICE-EVANS, 1997). Maior conteúdo de ácido ascórbico foi observado na bebida LM8 no início do armazenamento (Tabela 3). Segundo Nelson e Cox (2014), a presença de alguns açúcares como a frutose podem aumentar a taxa de degradação desta vitamina. A bebida LM8 continha menor conteúdo de frutose e sacarose em relação a LM12.

Tabela 3 – Variação no conteúdo de ácido ascórbico das bebidas mistas probióticas de lichia e erva-mate, avaliados ao longo do armazenamento refrigerado por 28 dias¹

Parâmetros	Tempo de estocagem (dias)	Formulações ²		
		LM-4	LM-8	LM-12
Ácido Ascórbico (mg/L)	1	134,52 ± 0,47 ^{bC}	156,76 ± 0,35 ^{bA}	151,56 ± 0,29 ^{bB}
	7	163,33 ± 1,54 ^{aC}	165,70 ± 0,41 ^{aB}	170,70 ± 0,25 ^{aA}
	14	110,87 ± 0,79 ^{eC}	134,49 ± 0,46 ^{cA}	133,18 ± 0,23 ^{cB}
	21	123,58 ± 0,44 ^{cB}	129,28 ± 0,46 ^{dA}	130,10 ± 0,23 ^{dA}
	28	119,42 ± 0,52 ^{dC}	123,69 ± 0,25 ^{eB}	128,78 ± 0,19 ^{dA}

¹Resultados expressos como média (n = 4) ± desvio padrão. Médias acompanhadas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna ou maiúscula na mesma linha diferem significativamente entre si (p ≤ 0,05). ² Formulações: LM-4 (bebida probiótica de lichia e erva-mate fermentada por 24 h); LM-8 (bebida probiótica de lichia e erva-mate fermentada por 24 h ajustada para 8 °Brix); e LM-12 (bebida probiótica de lichia e erva-mate fermentada por 24 h ajustada para 12 °Brix).

3.2.6. Conteúdo de Compostos Fenólicos Totais (CFTs) e a Atividade Antioxidante (AA)

Com um dia de armazenamento foram observados conteúdos de CFTs de 602,5; 609,6; e 663,1 µg de EAG/mL (LM4, LM8 e LM12, respectivamente) (Tabela 2). Estes valores foram inferiores aos determinados em alguns produtos fermentados por *S. boulardii*: cervejas artesanais fermentadas (310,3 mg EAG/mL) (CAPECE et al., 2018) e em suco de cenouras pretas, de rabanetes-melancia e de beterrabas (69,7; 20,6; e 53,28 mg EAG/mL, respectivamente) (Değirmencioğlu et al., 2016).

No início no armazenamento a bebida LM12 apresentou maior teor de CFTs e AA avaliada por DPPH e FRAP, uma vez que haviam mais açúcares fermentescíveis em sua composição. Segundo Jacobek (2015) e Aguiar et al. (2007), em processos como a fermentação e a adição de açúcares podem ocorrer alterações na solubilidade e polaridade dos compostos fenólicos, já que a levedura metaboliza preferencialmente os açúcares disponíveis em solução e então inicia o consumo dos açúcares ligados aos compostos fenólicos, permitindo interações destes compostos com outras moléculas presentes nas bebidas.

Houve um decréscimo, de forma geral, no conteúdo de CFTs (Tabela 2) e na AA (Tabela 4) ao longo do armazenamento para todas as bebidas. Entre o conteúdo de CFTs e o tempo de armazenamento houve correlação negativa e significativa ($r = -0,779$, $p \leq 0,05$), bem como entre o tempo de armazenamento e a AA por DPPH, FRAP e ABTS ($r = -0,772$; $r = -0,939$; e $r = -0,817$, respectivamente, $p \leq 0,05$).

Também notou-se uma correlação significativa entre o conteúdo de CFTs e AA avaliada pelos três métodos, comprovando que a maior parte da AA observada provém dos CFTs presentes nas bebidas ($r = 0,926$; $r = 0,831$; e $r = 0,544$, para DPPH, FRAP e ABTS, respectivamente, $p \leq 0,05$).

Comparando-se o conteúdo de CFTs no início e ao final do armazenamento, observou-se uma redução de 29%, 26%; e 23%, para as bebidas LM4, LM8 e LM12, respectivamente. Esta redução no conteúdo de CFTs ao longo do armazenamento por 28 dias, em sucos adicionados de *S. boulardii*, também foi observada em suco de berry (7,8%) (FRATIANNI et al., 2014) e em suco de tomate (3,6%) (FRATIANNI et al., 2013).

Segundo o ensaio do DPPH, houve uma redução de 49% (LM4); 49% (LM8); e 35% (LM12) na AA das bebidas ao final do armazenamento. Houveram maiores taxa de redução pelo método ABTS e menores reduções por meio do FRAP. Dentre as bebidas propostas, a LM12 apresentou durante o armazenamento maior conteúdo de CFTs. Ainda, ao final dos 28 dias, esta bebida continha o maior teor de CFTs e maior AA avaliada pelos métodos DPPH e FRAP em relação a LM4 e LM8. O ensaio do ABTS mostrou semelhança de AA das bebidas ao final do armazenamento.

3.2.7 Conteúdo de ácidos fenólicos, flavonoides e metilxantinas

Por meio da análise cromatográfica foram isolados e identificados na bebida probiótica de lichia e erva-mate 21 compostos bioativos, presentes por ordem crescente de tempo de retenção: trigonelina, ácido ascórbico, ácido nicotínico, ácido gálico, ácido protocatecúico, teobromina, paraxantina, teofilina, epigalocatequina, catequina, ácido clorogênico, ácido caféico, cafeína, epicatequina, ácido p-cumárico, ácido ferrúlico, ácido sinápico, rutina, miricetina, quercetina e kaempferol.

Tabela 4 – Variação na atividade antioxidante das bebidas mistas probióticas de lichia e erva-mate, avaliados ao longo do armazenamento refrigerado por 28 dias ¹

Parâmetros	Tempo de estocagem (dias)	Formulações ²		
		LH-4	LH-8	LH-12
DPPH ³	1	2,71 ± 0,25 ^{aB}	2,71 ± 0,26 ^{aB}	3,16 ± 0,03 ^{aA}
	7	2,06 ± 0,13 ^{bB}	2,06 ± 0,13 ^{bB}	2,99 ± 0,03 ^{aA}
	14	1,73 ± 0,11 ^{cB}	1,73 ± 0,11 ^{cB}	2,45 ± 0,08 ^{bA}
	21	1,45 ± 1,02 ^{dB}	1,45 ± 0,2 ^{dB}	2,14 ± 0,04 ^{cA}
	28	1,37 ± 0,04 ^{dB}	1,38 ± 0,05 ^{dB}	2,06 ± 0,05 ^{cA}
FRAP ³	1	4,76 ± 0,09 ^{aB}	4,84 ± 0,03 ^{aB}	4,98 ± 0,06 ^{aA}
	7	4,38 ± 0,04 ^{bB}	4,58 ± 0,02 ^{bA}	4,45 ± 0,02 ^{bAB}
	14	4,26 ± 0,02 ^{bcA}	4,04 ± 0,10 ^{cB}	4,15 ± 0,08 ^{cAB}
	21	4,17 ± 0,03 ^{cA}	3,71 ± 0,04 ^{dC}	4,01 ± 0,04 ^{cB}
	28	3,45 ± 0,016 ^{dB}	3,45 ± 0,12 ^{eB}	3,85 ± 0,11 ^{dA}
ABTS ³	1	8,45 ± 0,02 ^{bA}	7,76 ± 0,05 ^{bB}	8,20 ± 0,30 ^{bAB}
	7	12,29 ± 0,21 ^{aB}	13,23 ± 0,47 ^{aA}	12,29 ± 0,36 ^{aB}
	14	7,19 ± 0,09 ^{cA}	7,59 ± 0,00 ^{bA}	7,46 ± 0,23 ^{bA}
	21	1,77 ± 1,64 ^{dA}	1,84 ± 0,09 ^{cB}	2,53 ± 0,15 ^{cA}
	28	2,08 ± 0,00 ^{dA}	1,81 ± 0,30 ^{cA}	1,64 ± 0,07 ^{dA}

¹Resultados expressos como média (n = 6) ± desvio padrão. Médias acompanhadas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna ou maiúscula na mesma linha diferem significativamente entre si (p ≤ 0,05). ² Formulações: LM-4 (bebida probiótica de lichia e erva-mate fermentada por 24 h); LM-8 (bebida probiótica de lichia e erva-mate fermentada por 24 h ajustada para 8 °Brix); e LM-12 (bebida probiótica de lichia e erva-mate fermentada por 24 h ajustada para 12 °Brix). ³Resultados expressos como equivalente de Trolox por mL de amostra ($\mu\text{mol TEAC/mL}$).

Para fim de facilitar a discussão dos dados, os compostos foram agrupados em três classes ácidos fenólicos, flavonoides e metilxantinas e tiveram as concentrações somadas, com exceção da trigonelina, ácido ascórbico e ácido nicotínico. Foram classificados como ácidos fenólicos: ácido gálico, ácido protocatecúico, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferrúlico e ácido sinápico. Os flavonoides eram: epigallocatequina, catequina, epicatequina, rutina, miricetina, quercetina e kaempferol. Já as metilxantinas foram cafeína, teobromina, paraxantina e teofilina.

Observou-se que houve, para LM4 e LM8, uma redução no conteúdo das metilxantinas no 7º dia de armazenamento. Já para a LM12, notou-se uma redução aos 7 e 14 dias, seguido de aumento aos 21 dias (Figura 5).

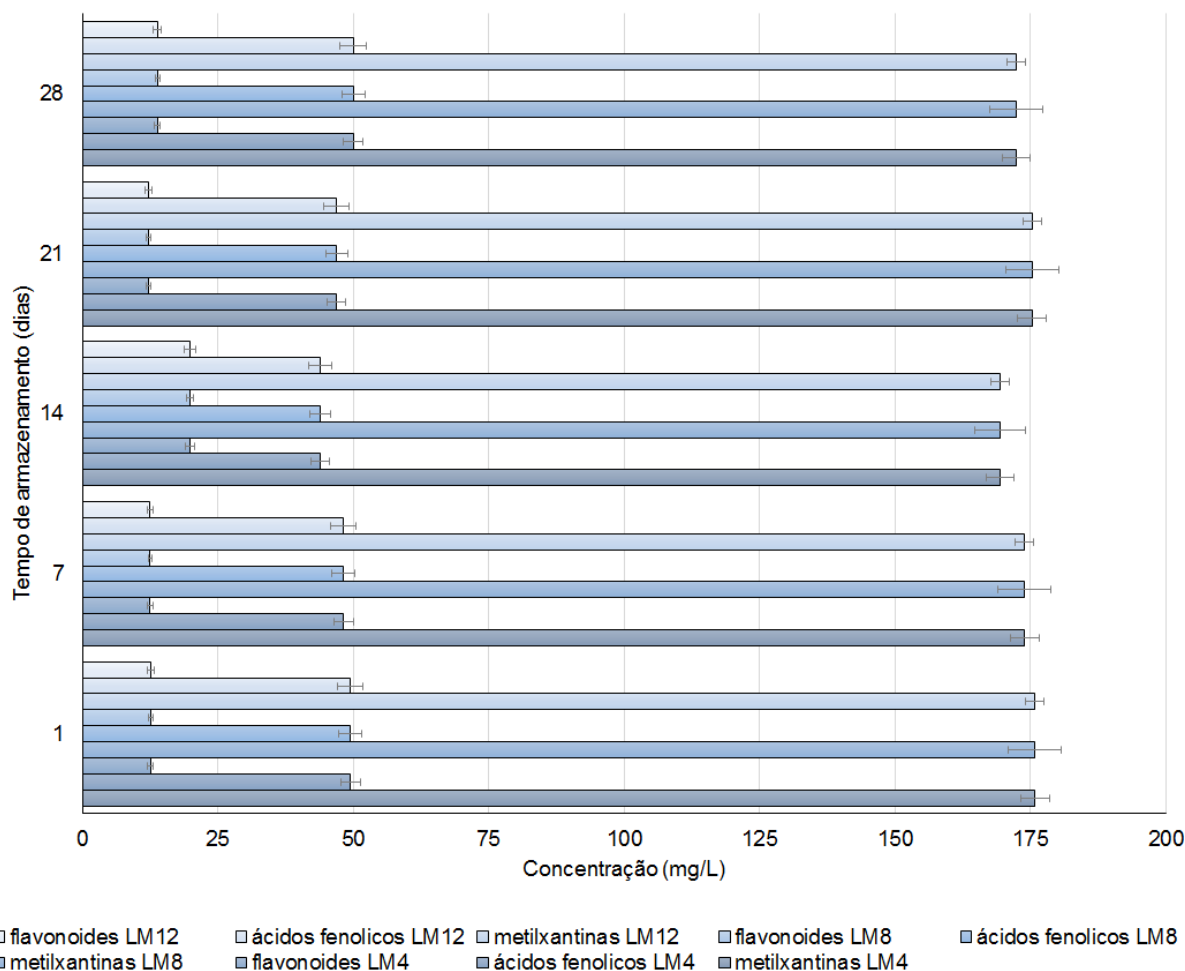


Figura 5– Variação no conteúdo de ácido fenólicos, flavonoides e metilxantinas presentes nas bebidas probióticas de lichia LM4, LM8, e LM12, ao longo do período de armazenamento de 28 dias

As barras de erro representam o desvio padrão (n = 4). Formulações: LM-4 (bebida probiótica de lichia e erva-mate fermentada por 24 h); LM-8 (bebida probiótica de lichia e erva-mate fermentada por 24 h ajustada para 8 °Brix); e LM-12 (bebida probiótica de lichia e erva-mate fermentada por 24 h ajustada para 12 °Brix).

Com relação ao teor dos ácidos fenólicos (Figura 5), para todas as bebidas houve durante o armazenamento, um decréscimo no conteúdo aos 7 (LM4 e LM8) ou 14 dias (LM12), com aumento aos 21 (LM8 e LM12) e/ou 28 dias (LM4 e LM8).

O conteúdo dos flavonoides (Figura 5) foi acrescido aos 14 dias, para todas as bebidas, com posterior diminuição aos 21 dias seguido de manutenção na concentração, com exceção da LM4, onde houve novo incremento aos 28 dias.

Observou-se diferença no conteúdo dessas três classes de compostos bioativos ao longo do armazenamento refrigerado. A adição de diferentes proporções de sacarose originaram bebidas com composição distintas, que ao longo do armazenamento promoveram diferenças na viabilidade e consequente conteúdo de etanol, açúcares e ácidos orgânicos. Değirmencioglu, Gurbuz e Sahan (2016), Tiwari e Cummins (2013) e Wiczowski et al. (2015) indicam, dentre outros fatores, que condições de processamento como fermentação e atividade do micro-organismo, armazenamento, presença e concentração de oxigênio interferem no perfil e conteúdo dos compostos fenólicos. Assim, distintas interações devem ter ocorrido entre a levedura probiótica e os compostos bioativos provenientes dos componentes de cada uma das bebidas, ao longo do armazenamento.

Ao final do armazenamento, a bebida LM4 apresentou maior conteúdo de metilxantinas que as demais. As formulações propostas foram semelhantes com relação ao conteúdo de ácidos fenólicos e flavonoides.

3.3 ACEITABILIDADE SENSORIAL DA BEBIDA PROBIÓTICA DE LICHIA E ERVA-MATE

A bebida probiótica LM12 foi escolhida para avaliação da aceitabilidade por apresentar maior viabilidade da *S. boulardii*, além de maior conteúdo de SST e de CFTs e maior AA por DPPH e FRAP ao final do período de armazenamento estudado.

Nesta pesquisa empregou-se como critério de exclusão as bebidas LH12 cuja viabilidade de levedura $< 1 \times 10^6$ UFC/mL. Assim a LM12 foi escolhida por apresentar viabilidade $> 10,5 \times 10^6$ UFC/mL até os 28 dias de armazenamento. Determinou-se a aceitação nas bebidas com 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento, denominadas LM12/1, LM-12/7, LM-12/14, LM-12/21 e LM-12/28, respectivamente.

Desta forma, a cada sete dias a bebida foi preparada, para que ao final de 28 dias todas estivessem prontas para o teste sensorial. Na Tabela 5 está

apresentada a aceitação das bebidas quanto os atributos de cor, aroma, sabor, textura e global.

Tabela 5 – Aceitabilidade sensorial da bebida probiótica de lichia e erva-mate ¹

Formulações ²	Parâmetros				
	Cor	Aroma	Sabor	Textura	Aceitação global
LM-12/1	7,1 ± 1,9 ^b	7,6 ± 1,8 ^a	8,1 ± 1,7 ^a	8,0 ± 1,4 ^a	8,1 ± 1,4 ^a
LM-12/7	8,0 ± 2,0 ^a	7,7 ± 2,0 ^a	8,2 ± 1,9 ^a	8,2 ± 1,9 ^a	8,2 ± 1,7 ^a
LM-12/14	8,5 ± 1,6 ^a	8,3 ± 1,5 ^a	7,9 ± 1,8 ^a	8,4 ± 1,7 ^a	8,1 ± 1,7 ^a
LM-12/21	8,2 ± 2,0 ^a	8,0 ± 1,5 ^a	7,9 ± 2,1 ^a	8,4 ± 1,4 ^a	8,1 ± 1,9 ^a
LM 12/28	8,5 ± 1,7 ^a	7,7 ± 2,2 ^a	8,1 ± 2,0 ^a	8,5 ± 1,3 ^a	8,0 ± 1,9 ^a

Valores hedônicos (cor, aroma, sabor, textura e aceitação global) são como segue: 0 = desgostei muitíssimo; 10 = gostei muitíssimo. ¹ Médias ± desvio padrão na mesma coluna seguida da mesma letra não diferem a $p \leq 0,05$. ² LM-12: bebida probiótica de lichia e erva-mate fermentada por 24 h ajustada para 12 °Brix; 1, 7, 14, 21 e 28: dias de armazenamento à 4 °C.

Todas as bebidas analisadas foram aceitas em relação aos atributos avaliados (notas médias > 7,0, Tabela 5). Não houve diferença significativa entre as bebidas quanto a aceitação de aroma, sabor, textura e global.

Com relação a cor, as bebidas com mais de 7 dias de armazenamento foram as mais aceitas em relação a LM-12/1.

Os avaliadores relataram apreciar a presença de bolhas nas bebidas, o que contribuiu para a aceitação da textura das bebidas. Estas bolhas são de CO₂ e produto do metabolismo da *S. boulardii* (LAZO-VÉLEZ et al., 2018). Destacam-se que os avaliadores gostaram da “cor amarelada/dourada”, aroma e sabor “semelhantes ao de um fricante” e “sabor de lichia”, presentes nas bebidas. Outro aspecto comentado pelos provadores é de que o sabor residual da erva-mate conferiu à bebida uma ligeira semelhança ao “vinho branco” e que esta característica tornou o produto atrativo.

Değirmencioğlu, Gurbuz e Sahan (2016), concluíram que havia semelhança sensorial entre sucos de vegetais fermentados por *S. boulardii* ou *S. cerevisiae* com relação aos atributos de cor, aroma, sabor, textura e global. Estes

autores apontaram uma aceitação global média de 8,5 (escala de 1 a 9) para sucos de cenoura preta fermentados por *S. boulardii*.

Já em produtos lácteos a presença do CO₂ e etanol produzido pela *S. boulardii* não foi apreciada sensorialmente pelos avaliadores, inviabilizando a aplicação desta levedura nestes produtos (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001). Outro aspecto depreciado sensorialmente em sorvete probiótico de soja adicionados de *S. boulardii* foi que esta levedura conferiu sabores residuais indesejáveis ao produto (HEENAN et al., 2004).

4 CONCLUSÕES

Este trabalho demonstra que bebidas mistas de lichia e erva-mate com diferentes teores de sólidos solúveis totais e fermentadas por *Saccharomyces boulardii*, apresentam características físico-químicas, propriedades antioxidantes, teor de compostos fenólicos adequados para o consumo.

Um menor conteúdo de sólidos solúveis totais proporciona uma viabilidade celular menor que 1×10^6 UFC/mL no 21º dia de armazenamento refrigerado.

A viabilidade celular da levedura *S. boulardii* torna-se adequada ($> 1 \times 10^6$ UFC/mL) nas bebidas que tem maior teor de sólidos solúveis totais, assim elas podem ser consideradas potencialmente probióticas. Ao longo do armazenamento refrigerado da bebida probiótica de lichia e erva-mate há diminuição no conteúdo de compostos fenólicos totais, vitamina C e na atividade antioxidante, além de aumento no teor alcoólico. Em bebidas probióticas de lichia e erva-mate adicionadas de sacarose há de crécimo no conteúdo de sólidos solúveis totais ao longo do armazenamento.

Bebidas de lichia e erva-mate preparadas com um maior teor de sólidos solúveis totais e fermentadas por *S. boulardii* têm ao final de 28 dias de armazenamento maior teor alcoólico, conteúdo de sólidos solúveis totais e de compostos fenólicos totais, ácido ascórbico, além de uma maior atividade antioxidante.

As bebidas fermentadas pela *S. boulardii* e contendo mais açúcar são aceitas pelo consumidor e apresentam características físico-químicas adequadas

e viabilidade de cultura que confere à bebida potencial probiótico, ao longo dos 28 dias de armazenamento refrigerado à 4 °C.

5 REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; TSAI, S. M.; PARK, Y. K. Transformações enzimáticas de flavonóides. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 61-76, 2007.

ALVES, J. A.; LIMA, L. C. O.; DIAS, D. R.; NUNES, C. A.; SCHWAN, R. F. Effects of spontaneous and inoculated fermentation on the volatile profile of lychee (*Litchi chinensis* Sonn) fermented beverages. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.45, n. 11, p.2358-2365, 2010.

ALVES, J. A.; LIMA, L. C. O.; NUNES, C. A.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Chemical, physical-chemical, and sensory characteristics of lychee (*Litchi chinensis* Sonn) Wines. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 76, n. 5, p. S330–S336, 2011.

BAGEWADI, Z.; MULLA, S.; NINNEKAR, H. Z. Purification and characterization of endo b-1,4-D-glucanase from *Trichoderma harzianum* strain HZN11 and its application in production of bioethanol from sweet sorghum bagasse. **3 Biotech**, Basel, v. 6, n. 1, art. 101, 2016.

BOAVENTURA, B. C. B.; MURAKAMI, A. N. N.; PRUDENCIO, E. S., MARASCHIN, M.; MURAKAMI, F. S.; AMANTE, E. R.; AMBONI, R. D. M. C. Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) through freeze concentration technology. **Food Research International**, Essex, v. 53, n. 2, p. 686-692, 2013.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, Essex, v.40, n.3, p.393-405, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 10 jan. 2001. Seção 1, p. 45.

CZERUCKA, D.; RAMPAL, P. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. **Microbes and Infection**, Paris, v.4, n.7, p. 733–739, 2002.

DARTORA, N.; SOUZA, L. M.; SANTANA-FILHO, A. P.; IACOMINI, M.; VALDUGA, A. T.; GORIN, P. A. J; SASSAKI, G. L. UPLC-PDA-MS Evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth

conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**, Barking, v. 129, n.4, p. 1453-1461, 2011.

DA SILVA, D. F. P.; SALOMÃO, L. C. C.; CABRINI, E. C.; ALVES, R. R.; STRUIVING, T. B. Prevenção do escurecimento do pericarpo de lichia através do uso de ácidos e filmes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, volume especial, E., p. 519-527, 2011.

DATTA, S.; TIMSON, D. J.; ANNAPURE, U. S. Antioxidant properties and global metabolite screening of the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 97, n. 9, p. 3039-3049, 2017.

CAPECE, A.; ROMANIELLO, R.; PIETRAFESA, A.; GABRIELLA, S.; PIETRAFESA, R.; ZAMBUTO, M.; ROMANO, P. Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value added. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 284, p.22-30, 2018.

DEĞIRMENCIOĞLU, N.; GURBUZ, O.; SAHAN, Y. S. The monitoring, via an in vitro digestion system, of the bioactive content of vegetable juice fermented with *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bouardii*. **Journal of Food Processing and Preservation**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 798-811, 2016.

ESTELA-ESCALANTE, W. D.; RYCHTERA, M.; MELZUCH, K.; HATTA, B. Effect of aeration on the fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae* cultured in apple juice. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, Distrito Federal, v. 11, n. 2, p. 211-226, 2012.

FARINAZZO, F. S.; FARINAZZO, E. S.; SPINOSA, W. A.; GARCIA, S. *Saccharomyces bouardii*: optimization of simultaneous saccharification and fermentation of cell production in organic and conventional apple substrate pulp. **Food science and biotechnology**, Seoul, v. 26, n. 4, p. 969-977, 2017.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FRATIANNI, F.; CARDINALE, F.; RUSSO, I.; IULIANO, C. CUCCINIELLO, A. C.; MAIONE, M.; D'ACIERNO, A.; NAZZARO, F. Fermentation of tomato juice with the probiotic yeast *Saccharomyces bouardii*. In: ROBINSON A.; EMERSON D. (eds). **Functional Foods: Sources, Biotechnology Applications, and Health Challenges**. New York, USA: Nova Science Publisher, 2013. p. 143–152

FRATIANNI, F.; CARDINALE, F.; RUSSO, I.; IULIANO, C.; TREMONTE, P.; COPPOLA, R. NAZZARO, F. Ability of synbiotic encapsulated *Saccharomyces cerevisiae bouardii* to grow in berry juice and to survive under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 31, n. 3, p. 299-305, 2014.

FRIZON, C. N. T.; OLIVEIRA, G. A.; PERUSSELLO, C. A.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; CAMLOFSKI, A. M. O.; ROSSA, U. B.; HOFFMANN-RIBANI, R. Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*)

combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 60, n. 2, p.795-801, 2015.

GABOARDI, G.; DOS SANTOS, D. G.; MENDES, L.; CENTENO, L.; MEIRELES, T.; VARGAS, S.; GRIEP, E.; SILVA, A. C. J.; MOREIRA, A. N.; CONCEIÇÃO, F. R. Bioremediation and biomass production from the cultivation of probiotic *Saccharomyces boulardii* in parboiled rice effluent. **Journal of Environmental Management**, London, v. 226, p. 180–186, 2018.

GUO, H.; YU, Y.; XIAO, G.; XU, Y.; WU, J. Changes in quality attributes during storage of litchi juice treated with dimethyl dicarbonate (DMDC) and nisin. **Journal of Food Research**, Toronto, v. 4, n. 4, p. 81-91, 2015.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, n. 9, p. R138-R151, 2007.

HEENAN, C.N.; ADAMS, M.C.; HOSKEN, R.W.; FLEET, G.H. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 37, n. 4, p. 461–466, 2004.

JAKOBEK, L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. **Food Chemistry**, Barking, v. 175, p. 556-567, 2015.

JAYACHANDRAN, L. E.; CHAKRABORTY, S.; RAO, P. S. Effect of high pressure processing on physicochemical properties and bioactive compounds in litchi based mixed fruit beverage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Wageningen, v. 28, n. 1, p. 1–9, 2015.

KALITA, D.; SAIKIA, S.; GAUTAM, G.; MUKHOPADHYAY, R. Characteristics of synbiotic spray dried powder of litchi juice with *Lactobacillus plantarum* and different carrier materials. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 87, p. 351-360, 2018.

KÜHLE, A. A.; SKOVGAARD, K.; JESPERSEN, L. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.101, n.1, p.29– 39, 2005.

LAZO-VÉLEZ, M. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; ROSALES-MEDINA, M. F.; TINOCO-ALVEAR, M.; BRIONES-GARCIA, M. Application of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in food processing: a review. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 125, n. 4, p. 943-951, 2018.

LEE, Y. L.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 6, p. 241–245, 1995.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. **Food Research International**, Essex, v. 34, n. 9, p. 791-796, 2001.

LUCKOW, T.; DELAHUNTY, C. Which juice is 'healthier'? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. **Food Quality and Preference**, Barking, v.15, n.7-8, p.751-759, 2004.

MARTINS, F. S.; VIEIRA, A. T.; ELIAN, S. D. A.; ARANTES, R. M. E.; TIAGO, F. C. P.; SOUSA, L. P.; ARAUJO, H. R. C.; PIMENTA, P. F.; BONJARDIM, C. A.; NICOLI, J. R. TEIXEIRA, M. M. Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. **Microbes and Infection**, Paris, v. 15, n. 4, p. 270-279, 2013.

MELLO, A. C. B.; DE FREITAS, R. J. S.; WASZCZYNSKYJ, N., KOEHLER, H. S.; WILLE, G. M. F. C.; BERTÉ, K. A. S. Bebida gaseificada de erva-mate verde. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 27, n. 1, p. 19-26, 2009.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. **Food Chemistry**, Barking, v. 60, n. 3, p. 331-337, 1997.

MURAKAMI, A.N. N.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDENCIO, E. S.; AMANTE, E. R.; ZANOTTA, L. M.; MARASCHIN, M.; PETRUS, J. C. C.; TEOFILLO, R. F. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 44, n. 10, p. 2211-2216, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger** (tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga...et al.); revisão técnica: Carlos Termignoni... (et al.), 6ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2014, 900 p.

PARKER, K.; SALAS, M.; NWOSU, V. C. High fructose corn syrup: production, uses and public health concerns. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, Lagos, v. 5, n. 5, p. 71-78, 2010.

PAULI, E. D.; CRISTIANO, V.; NIXDORF, S. L. Método para determinação de carboidratos empregado na triagem de adulterações em café. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 689-694, 2011.

POLYDERA, A. C.; STOFOROS, N. G.; TAOUKIS, P. S. Comparative shelf-life study and vitamin C loss kinetics in pasteurized and high pressure processed reconstituted orange juice. **Journal of Food Engineering**, London, v. 60, n. 1, p. 21-29, 2003.

PORTO, M. R. A.; OKINA, V. S.; PIMENTEL, T. C.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Beet and Orange mixed juices added with *Lactobacillus acidophilus*. **Nutrition and Food Science**, London, v. 48, n. 1, p. 76-87, 2018.

SABERIAN, H.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; ABASSI, S. Effect of pasteurization and storage on bioactive components of Aloe vera gel. **Nutrition & Food Science**, London, v. 43, n. 2, p. 175-183, 2013.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). **Food Chemistry**, Barking, v. 90, n. 1-2, p. 133-139, 2005.

SANTHIRASEGARAM, V.; RAZALI, Z.; GEORGE, D. S.; SOMASUNDRAM, C. Comparison of UV-C treatment and thermal pasteurization on quality of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. **Food and bioproducts processing**, Rugby, v. 94, p. 313–321, 2015.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, New York, v. 299, p. 152-178, 1999.

SIVUDU, N.; RAMESH, B.; UMAMAHESH, K.; REDDY, O. V. S. Probiotication of tomato and carrot juices for shelf-life enhancement using micro-encapsulation. **Journal of Food Biosciences and Technology**, Tehran, v. 6, n. 2, p. 13-22, 2016.

STATSOFT. **STATISTICA for Windows: computer program manual**. Versão 7.1. Tulsa: Software Inc., 2006.

SU, D.; TI, H.; ZHANG, R.; ZHANG, M.; WEI, Z.; DENG, Y. GUO, J. Structural elucidation and cellular antioxidant activity evaluation of major antioxidant phenolics in lychee pulp. **Food Chemistry**, Barking, v. 158, p. 385–391, 2014.

SULIEMAN, A. K.; PUTRA, M. D; ABASAEED, A. E.; GAILY, M. H.; AL-ZAHRANI, S. M.; ZEINELABDEEN. Kinetic modeling of the simultaneous production of ethanol and fructose by *Saccharomyces cerevisiae*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 34, p. 1–8, 2018.

TIWARI, U.; CUMMINS, E. Factors influencing levels of phytochemicals in selected fruit and vegetables during pre- and post-harvest food processing operations. **Food Research International**, Essex, v. 50, n. 2, p. 497-506, 2013.

VILLANUEVA, N. D. M.; PETENATE, A. J.; DA SILVA, M. A. A. P. Performance of hybrid hedonic scale as compared to the traditional hedonic, self-adjusting and ranking scales. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 16, n. 8, p. 691–703, 2005.

WGO. Organização Mundial de Gastroenterologia. **Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia: Probióticos e prebióticos**. 2011. Disponível em:
http://www.worldgastroenterology.org/assets/export/userfiles/Probiotics_FINAL_pt_2012.pdf. Acesso em: 11 jun. 2018.

ZENG, X. A.; CHEN, X. D.; QIN, F. G. F.; ZHANG, L. Composition analysis of litchi juice and litchi wine. **International Journal of Food Engineering**, Berlin, v. 4, n. 4, p.1-16, 2008.

ZHANG, R. F.; ZENG, Q. S.; DENG, Y. Y.; ZHANG, M. W.; WEI, Z. C.; ZHANG, Y.; TANG, X. J. Phenolic profiles and antioxidant activity of litchi pulp of different

cultivars cultivated in Southern China. **Food Chemistry**, Barking, v. 136, n. 3-4, p. 1169–1176, 2013.

ZHENG, X.; YU, Y.; XIAO, G.; XU, Y.; WU, J.; TANG, D.; ZHANG, Y. Comparing product stability of probiotic beverages using litchi juice treated by high hydrostatic pressure and heat as substrates. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Wageningen, v. 23, p. 61–67, 2014.

ARTIGO CIENTÍFICO 6: Bebida de lichia *tipo* vinho fermentada por *Saccharomyces boulardii*: influência da adição de erva-mate nas características físico-químicas e sensoriais

RESUMO

Nesta pesquisa foram desenvolvidas bebidas de lichia (LHF) e de lichia com erva-mate (LMF), fermentadas em duas etapas pela levedura probiótica *Saccharomyces boulardii*. As bebidas foram caracterizadas física, química e sensorialmente, além de determinados os conteúdos de compostos fenólicos totais (CFTs), metilxantinas, ácidos fenólicos e flavonoides e a atividade antioxidante (AA). A levedura apresentou viabilidade $> 2 \times 10^7$ UFC/mL nas bebidas LHF e LMF ao final do preparo, demonstrando o potencial probiótico das bebidas propostas. A *S. boulardii* metabolizou os açúcares presentes nas bebidas, gerando etanol e CO₂. As bebidas LHF apresentaram maior conteúdo de vitamina C, cor mais clara, sabor alcoólico, adocicado e de fruta doce. Maiores conteúdos de CFTs, metilxantinas, ácidos fenólicos e flavonoides e AA por DPPH, FRAP e ABTS foram observados nas bebidas contendo erva-mate (LMF), comprovando que a adição deste extrato vegetal proporciona potencial antioxidante à bebida fermentada. A erva-mate proporcionou nas bebidas LMF coloração marrom, ocre, amarelada, de mel e escura, aroma fermentado, além de gosto amargo, sabor de mate e de fermentado, sabor residual amargo, e maior viscosidade na boca. As bebidas fermentadas de lichia foram, de forma geral, mais aceitas sensorialmente. Uma maior preferência foi observada na LHF fermentada por 15 dias à 10 °C, durante a segunda fermentação.

Palavras-chave: fermentação, *Litchi chinensis*, *Ilex paraguariensis*, potencial probiótico

1 INTRODUÇÃO

A lichia (*Litchi chinensis* Sonn) é uma fruta originária da China, rica em açúcares fermentescíveis, de aroma e sabor agradáveis (ZHANG et al., 2013).

Principalmente em função do escurecimento casca (LIANG et al., 2015; PANDEY et al., 2013), possui pequena vida útil e uma alternativa ao excedente de produção é o processamento industrial da lichia, por meio do enlatamento, desidratação, congelamento, na forma de sucos e também de produtos fermentados (CHEN, 2014, ZHENG et al., 2014; JAYACHANDRAN, CHAKRABORTY; RAO, 2015).

Por se tratar de uma fruta de sabor agradável e com boa aceitabilidade pelos consumidores, a lichia pode ser empregada na fabricação de bebidas mistas, como as adicionadas de frutas e extratos vegetais (JAYACHANDRAN, CHAKRABORTY; RAO, 2015). Na medicina tradicional chinesa é comum o consumo de produtos que combinam lichia a extratos de flores e folhas, fermentados ou não, como por exemplo adicionado de chá verde (*Camelia sinensis*) (YU, 2014; DURMISHKHANOVNA, 2009). Uma planta cujas folhas têm atividade antioxidante e composição de compostos biativos semelhantes ao do chá verde é a erva-mate (*Ilex paraguariensis*, Saint-Hilaire) (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007).

As folhas de erva-mate contêm substâncias com propriedades estimulantes e com potencial antioxidante como metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina), ácidos fenólicos (ácido caféico, ácido clorogênico, ácido ferrúlico, etc) e flavonoides (catequina, kaempferol, epicatequina, etc) (HECK; DE MEJIA, 2007; DARTORA et al., 2011; BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007). Usualmente a erva-mate é consumida na forma de chimarrão e tereré e possui potencial aplicação em bebidas gaseificadas, energéticas, com extrato de soja e com suco de frutas (MELLO et al., 2009; BOAVENTURA et al., 2013; FRIZON ET AL., 2015; XINCHANG COUNTY MADAI TEA INDUSTRY CO. LTD, 2015).

Estudos apontam a viabilidade da produção de bebida fermentada de lichia empregando-se *Saccharomyces cerevisiae* e outras leveduras comumente empregadas na fabricação de vinhos (ZENG et al., 2008; ALVES et al., 2010; ALVES et al., 2011; WU et al., 2011; CHEN; CHIA; LIU, 2014; CHEN; YAP; LIU, 2015; CHEN; LIU, 2016a; CHEN; LIU, 2016b), mas em nossas buscas não foram localizados trabalhos que avaliassem a combinação do suco de lichia com a erva-mate visando preparo de bebidas fermentadas alcoólicas.

Assim como a *S. cerevisiae*, usualmente empregada na fabricação de bebidas alcoólicas, a levedura *Saccharomyces boulardii*, que primeiramente foi

isolada da lichia, produz etanol e CO₂ a partir de açúcares (CZERUCKA; PICHE, RAMPAL, 2007; LAZO-VELEZ et al., 2018). Esta levedura possui efeito probiótico sendo empregada como medicamento no tratamento de diarreias (CZERUCKA; PICHE; RAMPAL, 2007; HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002). Pesquisas indicam que a *S. boulardii* pode ser utilizada na fermentação de sucos de frutas e vegetais, com boa aceitação sensorial (FRATIANNI et al., 2013; FRATIANNI et al., 2014; DEĞIRMENCIOĞLU; GURBUZ; SAHAN, 2016).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma bebida de lichia fermentada pela levedura *Saccharomyces boulardii*, além de avaliar o efeito da adição da erva-mate nas características físico-químicas, conteúdo de fenólicos totais, atividade antioxidante e propriedades sensoriais da bebida proposta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Cultura fermentadora

A *Saccharomyces boulardii* foi obtida de produto comercial na forma liofilizada (Floratil®Merck S.A. Brazil). Cada cápsula de 100 mg continha ao menos $0,5 \times 10^9$ células de *S. boulardii*-17.

2.1.2 Suco de lichia, folhas e infusão de erva-mate

Para o preparo do mosto empregou-se 195 kg de lichias da variedade Bengal, provenientes de Umuarama, Paraná, Brasil (23°45'57"S; 53°19'30"O e altitude de 442 m). Os frutos foram sanitizados (hipoclorito de sódio à 100 ppm v/v, por 5 min), descascados e despulpados em despulpadeira (F. Silva, modelo MS-200, Brasil). Acondicionou-se a polpa (15,8 °Brix) em sacos de polietileno com armazenamento à -15 °C. Para obter-se o suco de lichia, após descongelamento a mesma foi filtrada em peneiras de 200 mesh.

Folhas de erva-mate (cerca de 65 kg) foram colhidas em Campina do Simão, Paraná, Brasil (25°4'8" S; 51°49'31"O e altitude: 963 m). Estas folhas foram lavadas, secas em estufa com circulação forçada (24 h/45 °C), moídas em moinho de facas (tamanho de partícula < 3,5 mm), armazenadas em sacos de polietileno e recobertos com papel alumínio, a -18 °C (MURAKAMI et al., 2011).

Para o preparo da infusão de erva-mate adicionaram-se 150 mL de água à 85 °C a 1,5 g de folhas desidratadas e moídas. A infusão foi mantida por 15 min, filtrada (papel Whatman nº 1) e o volume completado com água até 150 mL, para recuperar a água perdida durante o preparo (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007). Este procedimento foi realizado no mesmo dia do preparo das bebidas.

2.1.3 Reagentes

Os reagentes glicose, frutose, sacarose, estaquiose, manitol, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, ácido ascórbico, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), TPTZ (2,4,6-tripiridyl-S-triazina), ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), Folin-Ciocalteu, Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), ácido gálico, ácido protocateúico, teobromina, paraxantina, epigalocatequina, catequina, epicatequina, quercetina, ácido caféico, cafeína, rutina, kaempferol, ácido clorogênico, ácido p-cumárico, ácido ferrúlico, ácido sinápico, miricetina e trigonelina apresentaram pureza $\geq 99\%$ e foram provenientes da Sigma-Aldrich (St Louis, EUA). A acetonitrila grau HPLC foi adquirida da J.T. Baker (Xalostoc, México) e o etanol e os demais reagentes foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). No preparo das soluções padrão e extrações empregou-se água ultrapura produzida pelo Sistema Milli-Q® (Simplicity 185, Millipore, MA, EUA).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Preparação do inóculo da *S. boulardii*

A levedura liofilizada foi reativada em 100 mL de caldo YPD (extrato de levedura 10 g/L; peptona bacteriológica, 20 g/L; dextrose, 20 g/L) estéril, incubada

a 30 °C, 120 rpm, por 24 h em uma estufa com shaker rotatório (CT-712 Cientec, Brazil).

Após incubação a biomassa da levedura foi centrifugada a 14000g/15 min à 10 °C (Eppendorf 5804 R, Alemanha) e lavada por duas vezes com solução salina 0,85% (p/v) estéril para remoção por centrifugação do YPD residual. A biomassa foi ressuspensa em 50 mL de solução salina 0,85% (p/v) estéril, obtendo-se assim a cultura de *Saccharomyces boulardii* ativada.

2.2.2 Preparo das bebidas fermentadas de lichia (LHF) e de lichia com erva-mate (LMF)

As Figuras 1A e 1B mostram as principais etapas de preparo das bebidas fermentadas, propostas a partir de testes preliminares. Para o preparo do mosto da bebida fermentadas de lichia, o suco de lichia foi diluído com água potável até um conteúdo de sólidos solúveis totais (SSTs) de 12 °Brix. Já para preparar a bebida fermentadas de lichia e erva-mate, foram misturados suco de lichia e infusão de erva-mate na proporção de 70:30 (suco de lichia: infusão de erva-mate), com adição de sacarose em quantidade suficiente para ajuste do SSTs em 12 °Brix. O pH dos mostos foi corrigido para 4,5 por meio da adição de solução de ácido cítrico 20% (p/v).

As amostras foram acondicionadas em garrafas de vidro de 500 mL e pasteurizadas em banho-maria por 20 min/80 °C com imediato resfriamento em banho de gelo. Por meio de pesquisa de Coliformes a 45 °C e de *Salmonella sp*, confirmou-se que o mosto pasteurizado atendia aos padrões microbiológicos da legislação vigente (BRASIL, 2001).

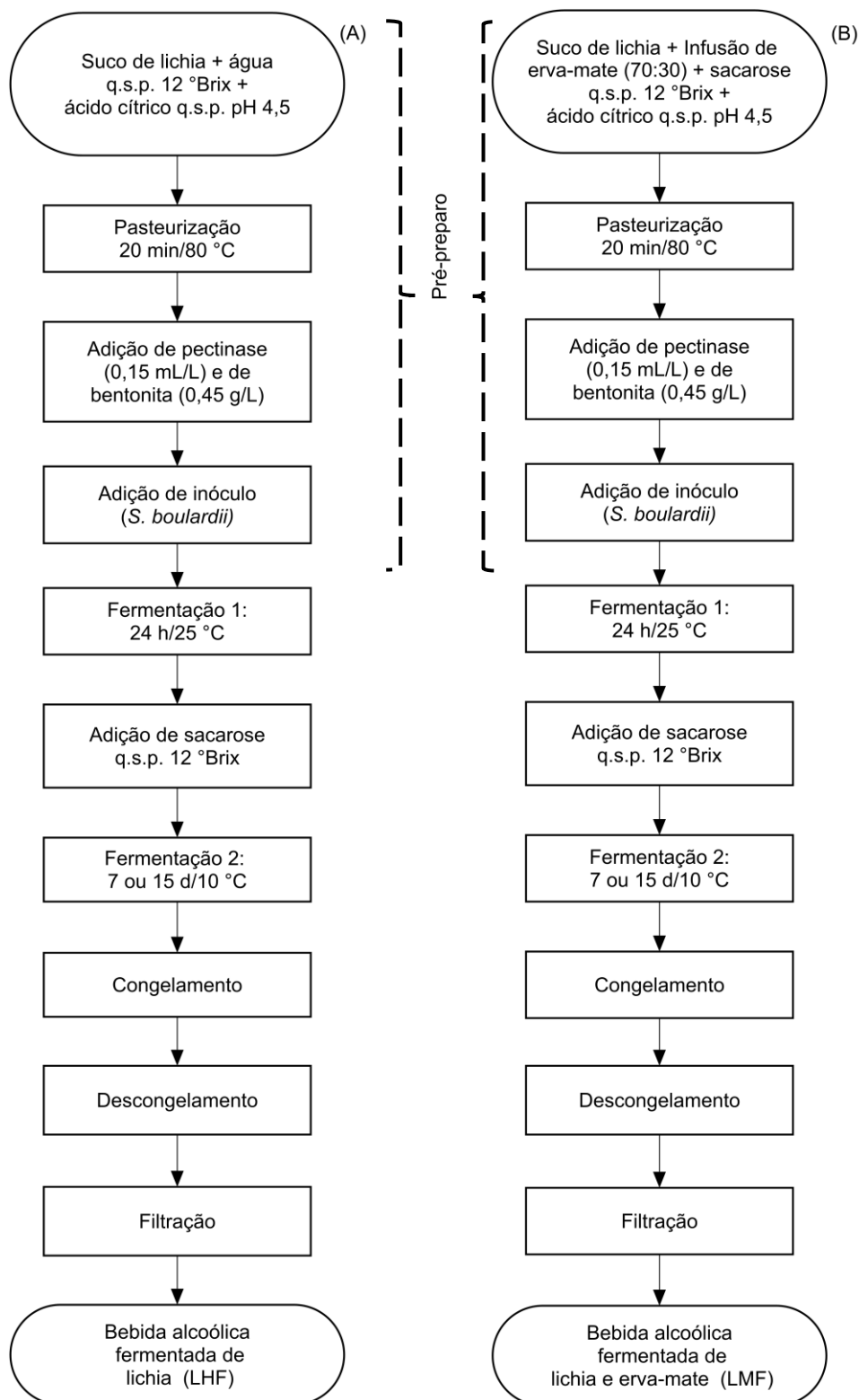


Figura 1 - Etapas de preparo das bebidas fermentadas de: (A) lichia (LHF), e (B) lichia com erva-mate (LMF)

De acordo com o proposto por Caliari, Panceri e Rosier (2015), cada um dos mostos fermentados recebeu a adição da enzima pectinase (0,15 mL/L)

(Novozym® 33095, Novozymes, Dinamarca), de bentonita (0,45 g/L) e do inóculo de *S. boulardii* em quantidade suficiente para 10^3 células/mL de mosto. Os mostos foram fermentados por 24 h à 25 °C em estufa (Fanem 002CB, São Paulo, Brasil), filtrados e adicionados de sacarose em quantidade suficiente para 12 °Brix, acondicionados em recipientes de vidro fechados, seguidos de segunda fermentação por 7 e 15 dias à 10°C. As bebidas fermentadas foram congeladas por 24 h para precipitação da borra depositada no fundo do recipiente, descongeladas e filtradas para análises (RIZZON; MENEGUZZO; ABARZUA, 2000). As bebidas fermentadas de lichia e de lichia com erva-mate foram preparadas em duas repetições.

2.2.3 Determinação da viabilidade da *S. boulardii* durante etapas de preparo das bebidas fermentadas

A viabilidade da cultura de *S. boulardii* foi determinada após coleta e diluição das amostras em água peptonada 0,1% (p/v) (Oxoid®), realizada conforme descrito em Farinazzo et al. (2017), seguida de plaqueamento em ágar YPD à 37 °C/ 48 h. Os resultados foram expressos em UFC/ mL de amostra.

2.2.4 Análises físicas e químicas das bebidas durante as etapas de preparo das bebidas fermentadas

O pH foi determinado utilizando um pHmetro (modelo HI 3221; Hanna Instruments Inc., Woonsocket, RI, USA). O conteúdo de sólidos solúveis totais (SSTs) em °Brix foi determinado em refratômetro digital (modelo Pocket Pal-1; Atago, Tokyo, Japão).

O teor de compostos fenólicos totais (CFT) foi determinado conforme método de Singleton; Orthofer; Lamuela-Raventos (1999), com algumas modificações. A concentração dos CFTs foi calculada por meio de curva padrão de ácido gálico (4 a 24 µg/mL) e os resultados expressos em µg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por mL.

A atividade antioxidante (AA) foi avaliada pela redução do radical livre 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), do cátion ABTS^{•+} (2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) e pela capacidade de redução do Fe³⁺ em

Fe²⁺ conforme Sánchez-González, Jiménez-Escrig e Saura-Calixto (2005). Curvas padrão de soluções de Trolox em etanol 80% em diferentes faixas de concentração (0,75 a 7,5 µM para ABTS e de 50 a 600 µM para DPPH e FRAP) foram empregadas. Os resultados da AA foram expressos em cada método em µmol de equivalentes de Trolox (TEAC) por mL de amostra.

2.2.4.1 Análises cromatográficas por HPLC e UHPLC

A identificação e quantificação dos açúcares, ácidos orgânicos, ácidos fenólicos, metilxantinas e flavonoides foram feitas por análises cromatográficas em HPLC e UHPLC. Uma alíquota (1 mL) de cada amostra foi homogeneizada em 10 mL de água e centrifugada à 9056 g por 15 min. O sobrenadante foi recolhido e filtrado em membrana de PVDF 0,22 µm (Millipore, Cork, Ireland).

Para determinação de açúcares e ácidos orgânicos empregou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC 20 A (Shimadzu Co., Kyoto, Japão) composto de uma bomba de alta pressão (LC-20AT), injetor automático (SIL-20AC HT), forno de coluna (CTO-20A) e detectores de arranjo de fotodiodos (SPD-M20A) e índice de refração (RID-10A) acoplados em série (HPLC-PDA-RID). As análises cromatográficas foram isocráticas.

As condições cromatográficas para a determinação de açúcares e ácidos orgânicos estão descritas na Tabela 1. Fixou-se o comprimento de onda do RID em modo varredura de 200 a 400nm e do PDA em 215nm (PAULI; CRISTIANO; NIXDORF, 2011). A aquisição dos dados e a integração dos picos cromatográficos foram realizadas no software LC Solutions (Shimadzu Co., Kyoto, Japão), com os resultados expressos em mg/mL.

Os compostos fenólicos e metilxantinas foram determinados em cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência (UHPLC) (Acquity UPLC I Class Waters©) com coluna HSS C18 1,8 µm 2,1×100 mm (Waters), utilizando duas fases móveis – A: Água Ultrapura e B: Metanol (JT Backer, HPLC grade), acidificadas com 0,05% e 0,1% de ácido fórmico, respectivamente. O volume de injeção foi de 1,0 µL no modo *partial loop with needle overfill*, vazão de 0,4 mL/min, e a separação foi realizada na condição de gradiente utilizando curva de concentração (tempo de 0,00–10,00 min: 95% da fase A e 5% da fase B; tempo de 10,00–10,10 min: 5% da fase A e 95% da fase B; tempo de 10,10–13,00 min:

95% da fase A e 5% da fase B). Empregou-se detector de arranjo de fotodiodos (Detector de Arranjo de Diodos – DAD) para varredura dos comprimentos de ondas entre 190 e 700 nm, com leitura fixada nos canais de 270 e 320 nm. O tempo total de análise foi de 13 min, considerando as etapas de separação, limpeza da coluna e equilíbrio das condições iniciais do gradiente. O software Empower 3 (Waters) foi utilizado para aquisição dos dados e a integração dos picos cromatográficos. Os resultados foram expressos em µg/mL de infusão.

Tabela 1 – Condições cromatográficas empregadas para a determinação de açúcares e de ácidos orgânicos ¹

	Açúcares	Ácidos Orgânicos
Fase móvel	100% ultrapura	Água 100% Tampão fosfato 25mM pH 2,4
Coluna	Aminex HPX-87P (7,8 x 300 mm; Biorad, CA, USA)	CapCell Pak C18 (250 x 4,6mm x 5µm; Shiseido Co., Ltd., Japão)
Temperatura do forno (°C)	85	40
Temperatura do detector (°C)	40	40
Vazão (mL/min)	1,0	1,0
Volume de injeção (µL)	20	20

Fonte: Pauli, Cristiano e Nixdorf (2011)

Para identificação e quantificação de etanol empregou-se cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas (CG-MS, QP2010-SE-Shimadizu). As condições cromatográficas empregadas foram: coluna capilar Restek Rtx-5MS, (30 m x 0,25 mm; diâmetro interno de 0,25 µm); hélio como gás de arraste com fluxo de 0,7 mL/min; pressão e temperatura da coluna de 23,3 kPa e 35 °C, respectivamente. A rampa da temperatura do forno foi de 35-280 °C, sendo: de 1-5 min a uma taxa de 30 °C/min; e de 5-7,5 min a 50 °C/min; e uma temperatura constante mantida por 7,5-9,43 min; temperatura do injetor de 150 °C; temperatura do detector de 200 °C, temperatura de interface de 280 °C, operando em modo Scan 30-100 (m/z) com impacto eletrônico de 70 eV. Injeção de um volume de 500 µL em razão de split de 1:20 (BAGEWADI; MULLA; NINNEKAR, 2016). Os resultados foram obtidos por análise dos tempos de retenção e áreas

dos picos dos cromatogramas das amostras, após comparação com curva padrão de etanol grau HPLC, e expressos em percentual do volume de amostra (v/v).

2.2.5 Análise sensorial das bebidas fermentadas durante a segunda fermentação

As bebidas com sete e quinze dias foram submetidas ao teste descritivo e de aceitação. Os testes sensoriais foram realizados em cabines individuais sob luz branca, com procedimentos aprovados por Comitê de ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (certificado CAAE nº 56478316.8.0000.5231). As amostras (30 mL) foram servidas à 7 ± 2 °C em copos plásticos codificados com números aleatórios de três dígitos. Água potável à temperatura ambiente e biscoitos água e sal foram servidos com as amostras.

Para a análise descritiva por Perfil Flash seguiu-se o descrito por Terhaag e Benassi (2011) empregando uma sessão individual para cada avaliador e utilizando uma equipe de 17 avaliadores não treinados. As bebidas foram apresentadas simultaneamente para levantamento de atributos, e solicitou-se que os avaliadores listassem as similaridades e diferenças entre amostras em relação a aparência, aroma, sabor e textura. Foi elaborada uma ficha de avaliação para cada avaliador contendo os atributos e suas definições. As amostras foram apresentadas em ordem aleatória e solicitada a ordenação das mesmas em ordem crescente de intensidade para cada atributo.

Para avaliação da aceitação a equipe foi composta por 101 usuais ou potenciais consumidores de bebidas fermentadas alcoólicas, em sua maioria mulheres (55 %) jovens (90% tinha menos de 39 anos) e com alta escolaridade (75% possuíam graduação ou pós-graduação). Os avaliadores receberam as amostras em ordem aleatória e de forma monádica para avaliar os atributos de cor, aroma, sabor, textura e aceitação global, empregando escala híbrida estruturada de dez centímetros (0 = desgostei muitíssimo; 10 = gostei muitíssimo) (VILLANUEVA; PETENATE; DA SILVA, 2005).

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento de preparo das bebidas foi executado por duas vezes, empregando-se delineamento inteiramente ao acaso. Os parâmetros físico-

químicos e microbiológicos foram realizados em triplicata em cada repetição do experimento ($n = 6$), enquanto que as análises cromatográficas foram feitas em duplicata ($n = 4$). As análises foram feitas após o pré-preparo, logo após a primeira fermentação, após a adição de sacarose, com sete dias da segunda fermentação e com quinze dias da segunda fermentação. Um delineamento de parcelas subdivididas foi empregado, onde o tratamento principal foram as formulações (com e sem erva-mate) e o secundário as etapas de preparo das bebidas. Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de Tukey ($\alpha = 5\%$). O programa Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2014) foi utilizado para análises estatísticas.

Os dados do Perfil flash foram analisados por Análise Procrustes Generalizada (APG), utilizando-se o programa Senstools Versão 2.3.28 (OP & P PRODUCT RESEARCH, 1998). Os dados da aceitação sensorial foram submetidos à ANOVA de dois fatores (bebidas e avaliadores). Para comparação das médias empregou-se o teste de Tukey ($\alpha = 5\%$). Empregou-se o programa Statistica 7.1 (STATSOFT, 2006) para estas análises.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EFEITO DA ADIÇÃO DA ERVA-MATE NAS ETAPAS DE PREPARO DAS BEBIDAS FERMENTADAS DE LICHIA

3.1.1 Viabilidade da *S. boulardii* e conteúdo de SSTs

Houve um aumento na viabilidade da *S. boulardii* até o sétimo dia da segunda fermentação das duas bebidas (com e sem erva-mate) (Figura 2). Observou-se um decréscimo no número de leveduras no 15º dia da segunda fermentação, de 38 e 62 x10⁶ UFC/mL para 28 e 31x10⁶ UFC/mL para as bebidas LHF e LMF, respectivamente. Lee e Salminen (1995) apontam que a ingestão diária mínima de 10⁶-10⁹ UFC de micro-organismos probióticos pode proporcionar efeito benéfico a saúde. Desta forma, o consumo de uma porção de 200 mL/dia das bebidas fermentadas por sete ou quinze dias atenderiam a este requisito, já

que nesta porção teriam $7,6 \times 10^9$ UFC (sete dias) e $5,6 \times 10^9$ UFC (quinze dias) na LHF, e $1,2 \times 10^{10}$ UFC (sete dias) e $6,2 \times 10^9$ UFC (quinze dias) na LMF.

Ao longo do preparo das bebidas notou-se que na primeira fermentação (Figura 1) ocorreu uma diminuição no conteúdo de SSTs nas duas formulações das bebidas, uma vez que as leveduras metabolizam os açúcares fermentescíveis disponíveis nas bebidas para a sua multiplicação. Após a primeira fermentação os SSTs foram corrigidos pela adição de sacarose, aumentando assim seu conteúdo, que novamente, com o advento da segunda fermentação (Figura 1), tornou a decrescer, assumindo os menores valores aos 15 dias (Figura 2). Esse comportamento é esperado, uma vez que a *S. boulardii* metaboliza os açúcares como sua principal fonte de carbono necessários para a multiplicação celular (NELSON; COX, 2014; LAZO-VÉLEZ et al., 2018).

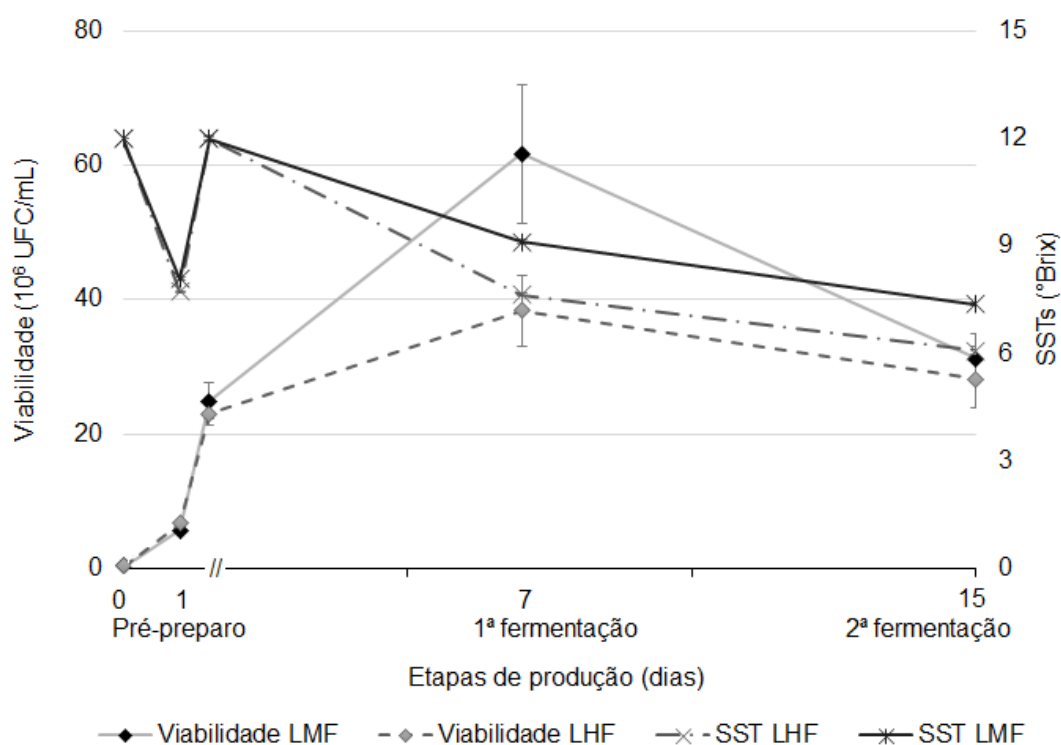


Figura 2 – Viabilidade da *S. boulardii* e conteúdo de SSTs ao longo das etapas de preparo das bebidas LHF e LMF ¹

¹ Formulações: LHF (bebida fermentada de lichia); LMF (bebida fermentada de lichia com erva-mate)

A adição da erva-mate ao suco de lichia não alterou a viabilidade da *S. boulardii* mas retardou o consumo dos SSTs pela levedura, já que tanto com a

primeira fermentação, quanto aos sete e quinze dias da segunda fermentação, haviam menos SSTs nas bebidas contendo apenas lichia. Este resultado se deve a inferência de que os compostos fenólicos presentes na erva-mate causam no metabolismo de açúcares da *S. boulardii*, já que estes compostos tem a capacidade de modular a expressão de genes que codificam proteínas, desta forma, interferem na atividade de enzimas celulares da levedura (HUANG; FERRARO, 1992; OLIVEIRA; BASTOS, 2011). Tal redução no metabolismo de açúcares em presença de alguns ácidos fenólicos também foi observada por Campos et al. (2009) nas bactérias *Oenococcus oeni* e *Lactobacillus hilgardii*.

3.1.2. Conteúdo de açúcares e de etanol

A *S. boulardii* metaboliza açúcares e leva a à formação de etanol além de CO₂ e outras substâncias como produtos finais (NELSON; COX, 2014; LAZO-VÉLEZ et al., 2018). Desta forma, houve a formação de etanol ao longo da fermentação das duas bebidas, que apresentaram 7,8% (LHF) e 7,6% (LMF) de etanol no 15º dia da segunda fermentação (Figura 3A e Figura 3B).

Avaliando-se o consumo dos açúcares pela levedura, tanto na LHF quanto na LMF, houve um esgotamento no conteúdo de sacarose ao final da primeira fermentação (Figura 3A e Figura 3B), o que se repetiu após a suplementação com sacarose, ao longo da segunda fermentação (Figura 1). Comportamento similar foi observado em todas as amostras em relação ao conteúdo de glicose, onde houve um consumo total deste açúcar pela levedura na primeira fermentação. Já com relação a frutose, observou-se a presença deste açúcar mesmo com a primeira fermentação, para todas as amostras (Figura 3A e Figura 3B).

Apesar da adição da sacarose notou-se aumento no conteúdo de glicose e frutose ao longo da segunda fermentação, chegando a 2,5 e 3,7 mg/mL de glicose e 2,6 e 3,4 mg/mL de frutose aos 15 dias, para LHF e LMF, respectivamente. Estes resultados indicam que houve hidrólise da sacarose, provavelmente por ação da invertase extracelular secretada pela *S. boulardii* (ANDJELKOVIĆ et al., 2015) e que há uma menor afinidade da levedura pela frutose (BOLES; HOLLENBERG, 1997). Em efluentes de arroz Gaboardi et al. (2018) verificaram preferência da *S. boulardii* pela sacarose adicionada em relação a outros açúcares presentes naturalmente no meio.

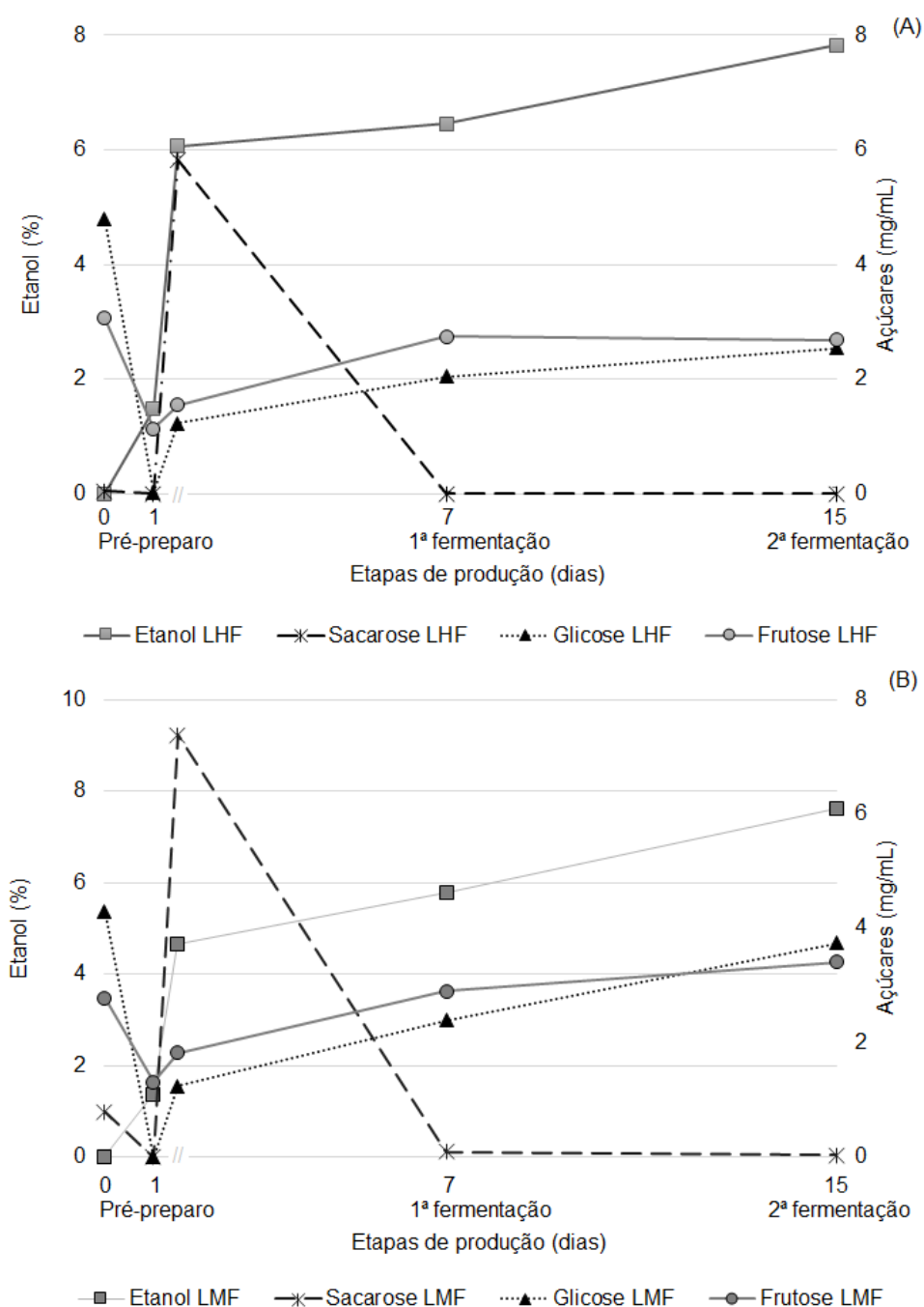


Figura 3 – Conteúdo de etanol e de sacarose, glicose e frutose ao longo das etapas de preparo das bebidas: (A) LHF, e (B) LMF ¹

¹ Formulações: LHF (bebida fermentada de lichia); LMF (bebida fermentada de lichia com erva-mate)

Na LMF, aos sete e quinze dias da segunda fermentação, maiores conteúdos de glicose e frutose nas bebidas fermentadas (Figura 3A e Figura 3B), proporcionando bebidas mais doces (Figura 2). Este resultado permite supor que

os compostos fenólicos e bioativos provenientes da erva-mate podem interferir no metabolismo da *S. boulardii* (HUANG; FERRARO, 1992), retardando o consumo dos monossacarídeos.

3.1.3 Conteúdo de ácidos orgânicos e pH

Na Tabela 2 está apresentada a variação do conteúdo dos ácidos orgânicos e do pH ao longo da preparação das bebidas LHF e LMF. Com a primeira fermentação, como produto do metabolismo da levedura (NELSON; COX, 2014), além de etanol e CO₂, também foram geradas pequenas quantidades de ácido málico e ácido cítrico, a partir do consumo dos açúcares. Ao final da segunda fermentação, as bebidas LHF e LMF apresentaram mesmo conteúdo de ácido málico (0,07 e 0,06 mg/mL, respectivamente) e de ácido cítrico (1,33 e 1,40 mg/mL, respectivamente). A formação destes ácidos orgânicos proporcionou uma diminuição no pH das bebidas ao longo do preparo, assumindo ao final um pH de 3,57 (LHF) e de 3,58 (LMF). A maior redução observada na LHF ocorreu em função da ausência de erva-mate, uma vez que este ingrediente contém compostos que interferem no metabolismo celular das leveduras (OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

3.1.4 Conteúdo de CFTs, ácido ascórbico, metilxantinas, ácidos fenólicos e flavonoides

A bebida LMF apresentou maior teor de CFTs, metilxantinas, ácidos fenólicos e flavonoides em relação a que continha apenas lichia (LHF), tanto logo após o pré-preparo quanto ao longo das duas fermentações (Tabela 3). Este conteúdo superior de CFTs era esperado devido a presença da infusão de erva-mate como componente das bebidas LMF, já que esta planta é rica em compostos fenólicos (DARTORA et al., 2011).

Com a primeira fermentação houve aumento no conteúdo de CFTs nas bebidas (Tabela 3), que decresceu com a adição de sacarose e também na segunda fermentação, assumindo teores de 156 e 650 µg de EAG/mL nas bebidas LHF e LMF, respectivamente.

Tabela 2 – Variação no conteúdo de ácidos orgânicos e pH das bebidas fermentadas de lichia e de lichia com erva-mate, ao longo das etapas de preparo ¹

Parâmetros	Etapa de preparo ²	Formulação ³	
		LHF	LMF
Ácido málico (mg/mL)	PRE-P	0,00 ± 0,00 dA	0,00 ± 0,00 dA
	FERM-1	0,10 ± 0,00 aA	0,10 ± 0,01 aA
	SAC	Houve co-eluição	
	FERM-2/7	0,05 ± 0,01 cA	0,04 ± 0,01 cA
	FERM-2/15	0,07 ± 0,01 bA	0,06 ± 0,01 bA
Ácido cítrico (mg/mL)	PRE-P	0,00 ± 0,00 cA	0,00 ± 0,00 bA
	FERM-1	1,27 ± 0,11 aB	1,51 ± 0,05 aA
	SAC	1,00 ± 0,01 bB	1,42 ± 0,14 aA
	FERM-2/7	1,25 ± 0,22 aB	1,49 ± 0,01 aA
	FERM-2/15	1,33 ± 0,08 aA	1,40 ± 0,06 aA
pH	PRE-P	4,50 ± 0,00 aA	4,5 ± 0,00 aA
	FERM-1	3,55 ± 0,01 cB	3,64 ± 0,01 bA
	SAC	3,55 ± 0,01 cbB	3,60 ± 0,01 cA
	FERM-2/7	3,56 ± 0,03 bB	3,58 ± 0,00 cA
	FERM-2/15	3,57 ± 0,01 bA	3,58 ± 0,01 cB

¹Resultados expressos como média (n = 6) ± desvio padrão. Média seguida de letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas a $p \leq 0,05$ entre as formulações na mesma etapa de preparo. Média seguida de letras minúsculas distintas na mesma coluna e para uma mesma característica, indicam diferenças significativas a $p \leq 0,05$ para cada formulação afetada pelas etapas de preparo. ² Etapas de preparo: PRE-P: Pré-preparo; FERM-1: primeira fermentação (24 h/25 °C); SAC: adição de sacarose para correção dos SSTs; FERM-2/7: segunda fermentação (7 d/10 °C); FERM-2/15: segunda fermentação (15 d/10 °C). ³ Formulações: LHF (bebida fermentada de lichia); LMF (bebida fermentada de lichia com erva-mate).

Tabela 3– Variação no conteúdo de CFTs, metilxantinas, ácidos fenólicos, flavonoides e ácido ascórbico das bebidas fermentadas de lichia e de lichia com erva-mate, ao longo das etapas de preparo ¹

Parâmetros (mg/mL)	Etapa de preparo ²	de Formulação ³	
		LHF	LMF
CFTs ³	PRE-P	320,18 ± 23,78 ^{abB}	1194,55 ± 17,39 ^{bA}
	FERM-1	350,00 ± 18,58 ^{aB}	1280,67 ± 27,23 ^{aA}
	SAC	291,57 ± 8,68 ^{bB}	1028,65 ± 7,71 ^{cA}
	FERM-2/7	150,23 ± 0,64 ^{cB}	654,64 ± 0,64 ^{dA}
	FERM-2/15	156,11 ± 3,07 ^{cB}	650,05 ± 4,94 ^{dA}
Metilxantinas	PRE-P	1,43 ± 0,00 ^{eB}	92,52 ± 0,01 ^{dA}
	FERM-1	5,11 ± 0,00 ^{dB}	115,65 ± 0,04 ^{aA}
	SAC	6,92 ± 0,02 ^{bB}	105,52 ± 0,02 ^{cA}
	FERM-2/7	8,10 ± 0,00 ^{aB}	76,32 ± 0,02 ^{eA}
	FERM-2/15	5,73 ± 0,03 ^{cB}	108,90 ± 0,02 ^{bA}
Ácidos fenólicos	PRE-P	8,91 ± 0,01 ^{cB}	104,14 ± 0,03 ^{aA}
	FERM-1	9,81 ± 0,01 ^{bB}	81,34 ± 0,01 ^{bA}
	SAC	10,64 ± 0,03 ^{aB}	72,00 ± 0,00 ^{cA}
	FERM-2/7	8,56 ± 0,05 ^{eB}	35,03 ± 0,02 ^{eA}
	FERM-2/15	8,72 ± 0,02 ^{dB}	66,50 ± 0,01 ^{dA}
Flavonoides	PRE-P	1,86 ± 0,05 ^{eB}	9,52 ± 0,02 ^{eA}
	FERM-1	11,46 ± 0,05 ^{cB}	31,51 ± 0,01 ^{aA}
	SAC	11,35 ± 0,04 ^{dB}	24,6 ± 0,00 ^{bA}
	FERM-2/7	12,45 ± 0,04 ^{bB}	19,81 ± 0,01 ^{cA}
	FERM-2/15	15,46 ± 0,05 ^{aA}	11,60 ± 0,05 ^{dB}
Ácido ascórbico	PRE-P	0,38 ± 0,00 ^{aA}	0,28 ± 0,00 ^{aB}
	FERM-1	0,25 ± 0,00 ^{bA}	0,15 ± 0,00 ^{bB}
	SAC	0,18 ± 0,00 ^{cA}	0,13 ± 0,00 ^{cB}
	FERM-2/7	0,12 ± 0,00 ^{eA}	0,10 ± 0,00 ^{dB}
	FERM-2/15	0,14 ± 0,00 ^{dA}	0,09 ± 0,00 ^{eB}

¹Resultados expressos como média (n = 6 ou n=4) ± desvio padrão. Média seguida de letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas a p ≤ 0,05 entre as formulações na mesma etapa de preparo. Média seguida de letras minúsculas distintas na mesma coluna e para uma mesma característica, indicam diferenças significativas a p ≤ 0,05 para cada formulação afetada pelas etapas de preparo. ² Etapas de preparo: PRE-P: Pré-preparo; FERM-1:

primeira fermentação (24 h/25 °C); SAC: adição de sacarose para correção dos SSTs; FERM-2/7: segunda fermentação (7 d/10 °C); FERM-2/15: segunda fermentação (15 d/10 °C). ³ Formulações: LHF (bebida fermentada de lichia); LMF (bebida fermentada de lichia com erva-mate). ³ Resultados expressos como equivalente de ácido gálico por mL de amostra ($\mu\text{g EAG/ mL}$).

Ao final da segunda fermentação a bebida LHF continha teor de CFTs semelhante ao encontrado em vinho branco (0,19 mg/mL) por Bravo, Goya e Lecumberri (2007). Já o conteúdo de CFTs da bebida LMF foi superior ao observado pelos mesmos autores em vinhos rosé, suco de laranja e infusão de erva-mate (0,41; 0,63; 73-76 mg/mL, respectivamente), comprovando o potencial antioxidante da bebida fermentada de lichia com erva-mate (LMF) em relação a outras bebidas comumente consumidas.

A LHF apresentou, aos sete e quinze dias da segunda fermentação, 8,1 e 5,7 mg/mL de metilxantinas, 8,5 e 8,7 mg/mL de ácidos fenólicos e 12 e 15 mg/mL de flavonoides (Tabela 3). Por conter erva-mate, a LMF, aos sete e quinze dias de fermentação, apresentou 76 e 108 mg/mL de metilxantinas, 35 e 65 mg/mL de ácidos fenólicos e 19 e 11 mg/mL de flavonoides (Tabela 3).

A variação no conteúdo das metilxantinas, ácidos fenólicos e flavonoides ao longo das etapas de pré-preparo e fermentação indica que a *S. boulardii* interferiu na disponibilidade e quantidade destas substâncias, tanto nas bebidas LHF quanto nas LMF. Durante a fermentação, o consumo dos açúcares e consequente liberação de compostos fenólicos das paredes celulares da lichia e da erva-mate (MINNAAR et al., 2017) e a conversão dos flavonoides para a forma aglicona (AGUIAR et al., 2007) levaram à variação no conteúdo de metilxantinas, flavonoides e ácidos fenólicos tanto na LHF quanto na LMF. Alterações qualitativas ocorrem principalmente devido a hidrólise (enzimática ou não), oxidação e complexações, que são causadas por enzimas presentes no micro-organismo ou da fruta empregados (SILVA et al., 2005). Minnaar et al. (2017) aponta que durante a produção de bebida fermentada pode ocorrer a conversão de alguns ácidos fenólicos em fenólicos voláteis (etil fenóis), proporcionando características desejáveis ou não à bebida.

Dentre os ingredientes utilizados no preparo das bebidas, a lichia naturalmente contém ácido ascórbico (EMANUELE et al., 2007). Assim, maiores

conteúdos de vitamina C foram encontrados nas bebidas que continham apenas suco de lichia (Tabela 3).

De forma geral, as etapas de preparo diminuíram o conteúdo de vitamina C em todas as bebidas. Esta diminuição está relacionada às atividades enzimáticas, como a ação das enzimas ascorbato oxidase e peroxidase, provenientes da lichia, além da presença de luz e de oxigênio não esgotado ao longo da fermentação (SANTHIRASEGARAM et al., 2015; YUSUF et al., 2016).

3.1.5 Atividade antioxidante

A AA das bebidas LHF e LMF, avaliada pelos métodos DPPH, FRAP e ABTS está apresentada na Tabela 4. Observou-se maior AA na bebida que continha erva-mate (LMF).

Houve uma redução na AA das bebidas, comparando-se a medida logo após o preparo e ao final da segunda fermentação (Tabela 4). Na bebida LHF, notou-se redução na AA por DPPH após a adição da sacarose. Por ABTS, além da diminuição observada com a correção dos SSTs, houve novo declínio aos quinze dias da segunda fermentação. Já na avaliação por FRAP notou-se reduções sucessivas com a primeira fermentação, adição da sacarose e aos sete dias da segunda fermentação. A bebida LMF apresentou aumento na AA avaliada por DPPH com primeira fermentação (Tabela 4), seguida de declínio ao longo das demais etapas do preparo. Observou-se que tanto pela avaliação por FRAP quanto por ABTS, a etapa de adição da sacarose promoveu diminuições na AA. Etapas de produção, como o processamento mecânico e a fermentação podem alterar a AA (TOMAS et al., 2017). A adição de ingredientes promove alteração no balanço de massa da bebida, e em conjunto com a agitação proporciona oxigenação e exposição à luminosidade. Já durante a fermentação podem ocorrer hidrólises, modificações e complexações de compostos com AA (SILVA et al., 2005).

Tabela 4– Variação na atividade antioxidante por DPPH, FRAP e ABTS das bebidas fermentadas de lichia e de lichia com erva-mate, ao longo das etapas do preparo ¹

Parâmetros ($\mu\text{mol TEAC/mL}$)	Etapa ²	Formulação ³	
		LHF	LMF
DPPH	PRE-P	1,09 \pm 0,00 ^{aB}	5,20 \pm 0,37 ^{bA}
	FERM-1	1,12 \pm 0,12 ^{aB}	5,65 \pm 0,14 ^{aA}
	SAC	0,83 \pm 0,01 ^{aB}	5,00 \pm 0,31 ^{bA}
	FERM-2/7	0,32 \pm 0,03 ^{bB}	3,61 \pm 0,05 ^{cA}
	FERM-2/15	0,21 \pm 0,01 ^{bB}	3,04 \pm 0,03 ^{dA}
FRAP	PRE-P	1,61 \pm 0,10 ^{bB}	7,02 \pm 0,22 ^{aA}
	FERM-1	2,17 \pm 0,12 ^{aB}	7,14 \pm 0,15 ^{aA}
	SAC	1,37 \pm 0,01 ^{bB}	5,64 \pm 0,15 ^{bA}
	FERM-2/7	0,62 \pm 0,03 ^{cB}	4,92 \pm 0,06 ^{cA}
	FERM-2/15	0,56 \pm 0,01 ^{cB}	4,12 \pm 0,08 ^{dA}
ABTS	PRE-P	4,75 \pm 0,12 ^{aB}	12,34 \pm 0,20 ^{aA}
	FERM-1	4,80 \pm 0,10 ^{aB}	12,92 \pm 0,10 ^{aA}
	SAC	3,65 \pm 0,09 ^{bB}	10,70 \pm 0,26 ^{bA}
	FERM-2/7	3,28 \pm 0,41 ^{bB}	10,19 \pm 0,42 ^{bA}
	FERM-2/15	2,35 \pm 0,23 ^{cB}	6,05 \pm 0,24 ^{cA}

¹Resultados expressos como média (n = 6) \pm desvio padrão. Média seguida de letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas a $p \leq 0,05$ entre as formulações na mesma etapa de preparo. Média seguida de letras minúsculas distintas na mesma coluna e para uma mesma característica, indicam diferenças significativas a $p \leq 0,05$ para cada formulação afetada pelas etapas de preparo. ²Etapas de preparo: PRE-P: Pré-preparo; FERM-1: primeira fermentação (24 h/25 °C); SAC: adição de sacarose para correção dos SSTs; FERM-2/7: segunda fermentação (7 d/10 °C); FERM-2/15: segunda fermentação (15 d/10 °C). ³Formulações: LHF (bebida fermentada de lichia); LMF (bebida fermentada de lichia com erva-mate).

3.2 CARACTERIZAÇÃO E ACEITAÇÃO SENSORIAL DAS BEBIDAS LHF E LMF COM SETE E QUINZE DIAS DA SEGUNDA FERMENTAÇÃO

Segundo Kemp et al. (2017), no preparo de vinhos espumantes tradicionais, duas etapas são consideradas como principais: uma primeira fermentação do suco de uva para convertê-lo em vinho base, e a segunda

fermentação na garrafa após a adição de levedura e açúcar (entre outros), conferindo o sabor e a textura característicos ao produto.

De forma similar, na produção da LHF e da LMF empregou-se estas duas etapas (Figura 1), com algumas modificações, com a segunda fermentação por um período de 15 dias. Como não foram encontrados estudos na literatura que avaliassem sensorialmente a influência do tempo da segunda fermentação na produção de vinho de lichia (LHF) e tampouco em vinho de lichia com erva-mate (LMF), optou-se por analisar sensorialmente as bebidas aos sete e quinze dias da 2ª fermentação. As amostras foram denominadas como LHF-7, LHF-15, LMF-7, e LMF-15. Assim, as bebidas foram preparadas de forma que todas estivessem prontas para os testes sensoriais na mesma data.

3.2.1 Caracterização por Perfil Flash

A configuração bidimensional D1 x D2 da APG dos dados do Perfil Flash está na Figura 4. A Dimensão 1 (D1) e Dimensão 2 (D2) mostraram 63% e 15% de explicação, respectivamente. Os avaliadores ficaram dispersos nestas dimensões e apresentaram uma variância residual associada a cada avaliador que foi considerada baixa (variância residual $< 1,1$), demonstrando consenso entre os mesmos. Dada esta baixa variância, decidiu-se manter os dados de todos os avaliadores. Houve pouca dispersão entre os membros da equipe, comprovando o comportamento semelhante dos avaliadores.

As bebidas fermentadas foram discriminadas pela equipe por meio da D1. As amostras LHF-7 e LHF-15, contendo apenas lichia, estão na região positiva do eixo, e as que continham erva-mate (LMF-7 e LMF-15) na região negativa. Por meio da D2, as amostras com um maior tempo de fermentação (LHF-15 e LMF-15) foram posicionadas no parte positiva, e as demais, na negativa.

Os atributos mais citados pelos provadores e com $r \geq 0,60$ (em módulo), em relação as dimensões estão apresentados na Tabela Suplementar 1. Observa-se que houve um maior número de atributos correlacionados com a D1.

As bebidas fermentadas de lichia (LHF-7 e LHF-15) foram caracterizadas como sendo as mais claras, com sabor alcoólico, adocicado e de fruta doce. A adição da erva-mate proporcionou nas bebidas fermentadas de lichia com erva-mate (LMF-7 e LMF-15) uma coloração marrom, ocre, amarelada, de mel e

escura, aroma fermentado além gosto amargo, sabor de mate e de fermentado, sabor residual amargo. As bebidas LMF-7 e LM-15 também foram consideradas mais encorpadas e viscosas na boca (Figura 4).

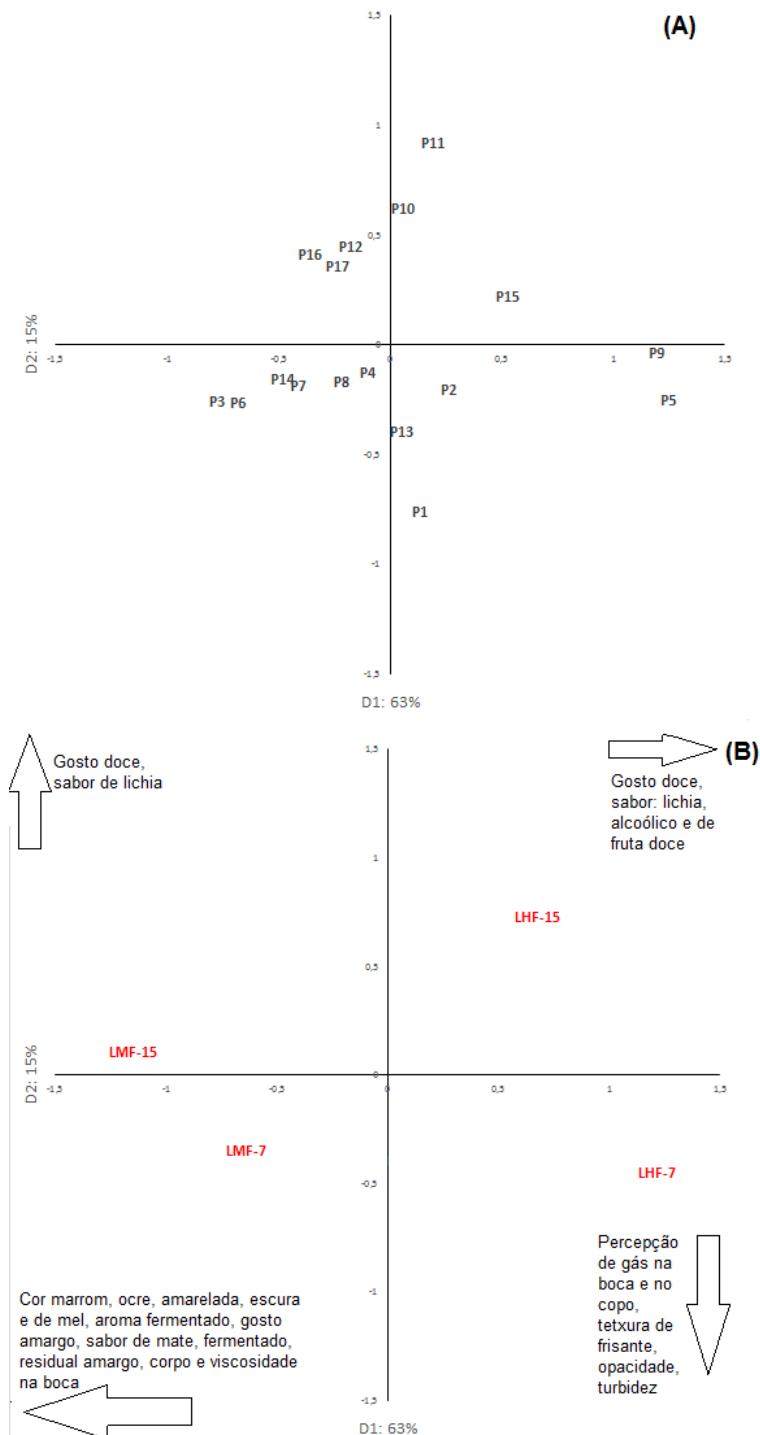


Figura 4 – Configuração geral dos provadores (número de 1-17) (A) e das amostras (LHF-7, LHF-15, LMF-7, LMF-15) (B) listando atributos mais citados e correlacionados com cada dimensão ($r \geq 0,60$), considerando solução bidimensional da APG.

As bebidas com uma fermentação mais curta (LHF-7 e LMF-7) se diferenciaram das demais por apresentarem maior percepção de gás na boca e no copo, textura de frisante, maior opacidade e turbidez (Figura 4). Essas características estão relacionadas à presença de CO₂ proveniente da fermentação da bebida pela *S. boulardii* e em função do menor tempo de fermentação e conseqüentemente haver maior número de leveduras e teor de SSTs nestas bebidas (Figura 2). O aumento no tempo de fermentação proporcionou uma maior doçura e sabor de lichia.

3.2.2 Aceitabilidade

Na Tabela 5 estão apresentados os valores hedônicos médios de cada atributo avaliado. As bebidas obtiveram notas médias $\geq 6,6$ em escala de 10 cm, indicando que as mesmas foram aceitas. Alves et al. (2011) também observaram uma boa aceitação sensorial em bebidas de lichia fermentadas por *S. cerevisiae*, com médias para aceitação global entre 5,32 e 6,24 (escala de nove pontos).

Tabela 5 – Aceitabilidade sensorial das bebidas fermentadas de lichia e de lichia com erva-mate com diferentes tempos de segunda fermentação ¹

Formulações ²	Parâmetros				
	Cor	Aroma	Sabor	Textura	Aceitação global
LHF-7	7,7 a	7,2 a	7,7 a	7,4 ab	7,3 ab
LHF-15	7,8 a	7,4 a	8,0 a	7,8 a	7,7 a
LMF-7	7,3 ab	6,6 b	7,6 a	6,6 c	6,7 b
LMF-15	7,1 b	6,6 b	7,9 a	6,8 bc	6,8 b

Valores hedônicos (cor, aroma, sabor, textura e aceitação global) são como segue: 0 = desgostei muitíssimo; 10 = gostei muitíssimo.

¹Médias \pm desvio padrão na mesma coluna seguida da mesma letra não diferem a $p \leq 0,05$.

²Formulações: LHF (bebida fermentada de lichia); LMF (bebida fermentada de lichia com erva-mate); 7 e 15 dias de segunda fermentação à 10 °C.

As bebidas tiveram aceitação similar em relação ao sabor, com notas médias variando entre 7,6 e 8,0. Em relação a cor, as bebidas contendo apenas lichia (LHF-7 e LHF-15) foram mais aceitas do que a LM-15 e similares a LM-7. A

presença da erva-mate interferiu negativamente no aroma das bebidas fermentadas, já que as amostras LMF-7 e LMF-15 tiveram menores notas médias em relação ao aroma. Com relação a textura e a aceitação global, os avaliadores demonstraram maior aceitação pelas características da amostra LHF-15 em relação às que continham erva-mate, e similaridade em relação a LHF-7, devido às características sensoriais da lichia.

De forma geral, a bebida de lichia fermentada por 15 dias apresentou maiores notas médias, indicando maior aceitação entre as bebidas.

4 CONCLUSÕES

A levedura *Saccharomyces boulardii* é adequada para fermentação do suco de lichia, com produção de uma bebida fermentada aceita sensorialmente com potencial probiótico e características físico-químicas adequadas.

A adição da erva-mate ao suco de lichia e posterior fermentação pela *S. boulardii* proporciona bebida com maior potencial antioxidante, boa aceitação sensorial, potencial probiótico além de apresentar características físico-químicas adequadas.

A bebida de lichia fermentada por *S. boulardii* caracteriza-se como mais clara, sabor alcoólico, adocicado e de fruta doce. A adição da erva-mate confere às bebidas coloração marrom, ocre, amarelada, de mel e escura, aroma fermentado, além de gosto amargo, sabor de mate e de fermentado, sabor residual amargo, e maior viscosidade na boca.

Durante o preparo, uma segunda fermentação por 15 dias à 10 °C promove maior aceitação sensorial às bebidas fermentadas de lichia.

5 REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; TSAI, S. M.; PARK, Y. K. Transformações enzimáticas de flavonóides. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 61-76, 2007.

ALVES, J. A.; LIMA, L. C. O.; DIAS, D. R.; NUNES, C. A.; SCHWAN, R. F. Effects of spontaneous and inoculated fermentation on the volatile profile of lychee (*Litchi chinensis* Sonn) fermented beverages. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.45, n. 11, p.2358-2365, 2010.

ALVES, J. A.; LIMA, L. C. O.; NUNES, C. A.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Chemical, physical–chemical, and sensory characteristics of lychee (*Litchi chinensis* Sonn) Wines. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 76, n. 5, p. S330–S336, 2011.

ANDJELKOVIĆ, U.; MILUTINOVIĆ-NIKOLIĆ A.; JOVIĆ-JOVIČIĆ, N.; BANKOVIĆ, P.; BAJT, T.; MOJOVIĆ, Z.; VUJČIĆ, Z.; JOVANOVIĆ, D. Efficient stabilization of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase by immobilisation on modified beidellite nanoclays. **Food Chemistry**, Barking, v. 168, p. 262-269, 2015.

BAGEWADI, Z.; MULLA, S.; NINNEKAR, H. Z. Purification and characterization of endo b-1,4-D-glucanase from *Trichoderma harzianum* strain HZN11 and its application in production of bioethanol from sweet sorghum bagasse. **3 Biotech**, Basel, v. 6, n. 1, art. 101, 2016.

BOAVENTURA, B. C. B.; MURAKAMI, A. N. N.; PRUDENCIO, E. S., MARASCHIN, M.; MURAKAMI, F. S.; AMANTE, E. R.; AMBONI, R. D. M. C. Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) through freeze concentration technology. **Food Research International**, Essex, v. 53, n. 2, p. 686-692, 2013.

BOLES, E.; HOLLENBERG, C. P. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 85-111, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 10 jan. 2001. Seção 1, p. 45.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, Essex, v.40, n.3, p.393-405, 2007.

CALIARI, V.; PANCERI, C. P.; ROSIER, J. P. Effect of the Traditional, Charmat and Asti method production on the volatile composition of Moscato Giallo sparkling wines. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 61, n. 2, p. 393–400, 2015.

CAMPOS, F. M.; FIGUEIREDO, A. R.; HOGG, T. A.; COUTO, J. A. Effect of phenolic acids on glucose and organic acid metabolism by lactic acid bacteria from wine. **Food Microbiology**, London, v. 26, n. 4, p. 409–414, 2009.

CHEN, D.; CHIA, J. Y.; LIU, S. Q. Impact of addition of aromatic amino acids on non-volatile and volatile compounds in lychee wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* MERIT. ferm. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 170, p.12–20, 2014.

- CHEN, D.; LIU, S. Q. Impact of simultaneous and sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on non-volatiles and volatiles of lychee wines. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 65, p. 53–61, 2016.
- CHEN, D.; LIU, S. Q. Transformation of chemical constituents of lychee wine by simultaneous alcoholic and malolactic fermentations. **Food Chemistry**, Barking, v. 196, p. 988–995, 2016.
- CHEN, D.; YAP, Z. Y.; LIU, S. Evaluation of the performance of *Torulaspora delbrueckii*, *Williopsis saturnus*, and *Kluyveromyces lactis* in lychee wine fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 206, p. 45–50, 2015.
- CZERUCA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 26, n. 6, p. 767-778, 2007.
- DARTORA, N.; SOUZA, L. M.; SANTANA-FILHO, A. P.; IACOMINI, M.; VALDUGA, A. T.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. UPLC-PDA–MS Evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**, Barking, v. 129, n.4, p. 1453-1461, 2011.
- DEĞIRMENCIOĞLU, N.; GURBUZ, O.; SAHAN, Y. S. The monitoring, via an in vitro digestion system, of the bioactive content of vegetable juice fermented with *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. **Journal of Food Processing and Preservation**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 798-811, 2016.
- DURMISHKHOVNA, M. I. Ooo Agri. **Method of producing natural semisweet pop wine**. RU20080114608 20080417. Depósito:17 abr. 2008. Concessão: 27 set. 2009.
- EMANUELE, S.; LAURICELLA, M.; CALVARUSO, G.; D'ANNEO, A.; GIULIANO, M. *Litchi chinensis* as a functional food and a source of antitumor compounds: an overview and a description of biochemical pathways. **Nutrients**, Basel, v. 9, n. 9, art. 992, 2017.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014
- FRATIANNI, F.; CARDINALE, F.; RUSSO, I.; IULIANO, C.; TREMONTE, P.; COPPOLA, R. NAZZARO, F. Ability of synbiotic encapsulated *Saccharomyces cerevisiae boulardii* to grow in berry juice and to survive under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 31, n. 3, p. 299-305, 2014.
- FRATIANNI, F.; CARDINALE, F.; RUSSO, I.; IULIANO, C. CUCCINIELLO, A. C.; MAIONE, M.; D'ACIERNO, A.; NAZZARO, F. Fermentation of tomato juice with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. In: Robinson A., Emerson D., editors. **Functional Foods: Sources, Biotechnology Applications, and Health Challenges**. Nova Science Publisher; New York, USA: 2013. pp. 143–152.

FRIZON, C. N. T.; OLIVEIRA, G. A.; PERUSSELLO, C. A.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; CAMLOFSKI, A. M. O.; ROSSA, U. B.; HOFFMANN-RIBANI, R. Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 60, n. 2, p.795-801, 2015.

GABOARDI, G.; DOS SANTOS, D. G.; MENDES, L.; CENTENO, L.; MEIRELES, T.; VARGAS, S.; GRIEP, E.; SILVA, A. C. J.; MOREIRA, A. N.; CONCEIÇÃO, F. R. Bioremediation and biomass production from the cultivation of probiotic *Saccharomyces boulardii* in parboiled rice effluent. **Journal of Environmental Management**, London, v. 226, p. 180–186, 2018.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, n. 9, p. R138-R151, 2007.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILINGER, U. 2002. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, Essex, v. 35, n. 2-3, p. 109-116, 2002.

HUANG, M. T.; FERRARO, T. Phenolic compounds in food and cancer prevention. In **Phenolic compounds in food in the effects of health II: antioxidants and cancer prevention**, eds Huang, M. T., Ho, C. T.; Lee, C. Y., ACS Symposium Series 507, Washington DC: American Chemical Society, p 8-34, 1992.

JAYACHANDRAN, L. E.; CHAKRABORTY, S.; RAO, P. S. Effect of high pressure processing on physicochemical properties and bioactive compounds in litchi based mixed fruit beverage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Wageningen, v. 28, n. 1, p. 1–9, 2015.

KEMP, B.; HOGAN, C.; XU, S.; DOWLING, L.; INGLIS, D. The Impact of Wine Style and Sugar Addition in liqueur d'expedition (dosage) solutions on Traditional Method Sparkling Wine Composition. **Beverages**, Basel, v. 3, n. 7, p. 1-16, 2017.

LAZO-VÉLEZ, M. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; ROSALES-MEDINA, M. F.; TINOCO-ALVEAR, M.; BRIONES-GARCIA, M. Application of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in food processing: a review. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 125, n. 4, p. 943-951, 2018.

LEE, Y. L.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 6, p. 241–245, 1995.

LIANG, Y. S.; WONGMETHA, O.; WUA, P. S.; KE, L. S. Influence of hydrocooling on browning and quality of litchi cultivar Feizixiao during storage. **International Journal of Refrigeration**, Vurrey, v.36, n.3, p. 1173-1179, 2013.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. **Food Research International**, Essex, v. 34, n. 9, p. 791-796, 2001.

MELLO, A. C. B.; DE FREITAS, R. J. S.; WASZCZYNSKYJ, N.; KOEHLER, H. S.; WILLE, G. M. F. C.; BERTÉ, K. A. S. Bebida gaseificada de erva-mate verde. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 27, n. 1, p. 19-26, 2009.

MINNAAR, P. P.; JOLLY, N. P.; PAULSEN, V.; DU PLESSIS, H. W.; VAN DER RIJST, M. *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in sequential fermentations: effect on phenolic acids of fermented Kei-apple (*Dovyalis caffra* L.) juice. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 257, p. 232-237, 2017.

MURAKAMI, A.N. N.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDENCIO, E. S.; AMANTE, E. R.; ZANOTTA, L. M.; MARASCHIN, M.; PETRUS, J. C. C.; TEOFILO, R. F. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 44, n. 10, p. 2211-2216, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger** (tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga...et al.); revisão técnica: Carlos Termignoni... (et al.), 6ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2014, 900 p.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos, **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

OP & P PRODUCT RESEARCH: *Senstools Versão 2.3*. Utrecht: OP & P Product Research, 1995-1998. Conjunto de Programas 1CD room.

PANDEY, N.; JOSHI, S. K.; SING, C. P.; KUMAR, S.; RAJPUT, S.; KHANDAL, R. K. Enhancing shelf life of litchi (*Litchi chinensis*) fruit through integrated approach of surface coating and gamma irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, Amsterdam, v. 85, p. 197-203, 2013.

PAULI, E. D.; CRISTIANO, V.; NIXDORF, S. L. Método para determinação de carboidratos empregado na triagem de adulterações em café. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 689-694, 2011.

RIZZON, L.; MENEGUZZO, J.; ABARZUA, C. E. **Elaboração de vinho espumante na propriedade vitícola**. Documento 29. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2000. 24 p.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). **Food Chemistry**, Barking, v. 90, n. 1-2, p. 133-139, 2005.

SANTHIRASEGARAM, V.; RAZALI, Z.; GEORGE, D. S.; SOMASUNDRAM, C. Comparison of UV-C treatment and thermal pasteurization on quality of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. **Food and bioproducts processing**, Rugby, v. 94, p. 313-321, 2015.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-

ciocalteu reagente. **Methods in enzymology**, New York, v. 299, p. 152-178, 1999.

SILVA, L. R.; ANDRADE, P. B.; VALENTÃO, P.; SEABRA, R. M.; TRUJILLO, M. E.; VELÁZQUEZ, E. Analysis of non-coloured phenolics in red wine: effect of *Dekkera bruxellensis* yeast. **Food Chemistry**, Barking, v. 89, n. 2, p. 185-189, 2005.

STATSOFT. **STATISTICA for Windows: computer program manual**. Versão 7.1. Tulsa: Software Inc., 2006.

TERHAAG, M. M.; BENASSI, M. T. Perfil Flash: uma opção para análise descritiva rápida. **Brazilian Journal and Food Technology**, Campinas, p. 140-151, 2010. 6º SENSIBER, 19-21 ago. 2010.

TOMAS, M.; BEEKWILDER, J.; HALL, R. D.; SAGDIC, O.; BOYACIOGLU, D.; CAPANOGLU, E. Industrial processing versus home processing of tomato sauce: effects on phenolics, flavonoids and in vitro bioaccessibility of antioxidants. **Food Chemistry**, Barking, v. 220, p. 51-58, 2017.

VILLANUEVA, N. D. M.; PETENATE, A. J.; DA SILVA, M. A. A. P. Performance of hybrid hedonic scale as compared to the traditional hedonic, self-adjusting and ranking scales. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 16, n. 8, p. 691-703, 2005.

WU, Y.; ZHU, B.; TU, C.; DUAN, C.; PAN, Q. Generation of volatile compounds in litchi wine during winemaking and short-term bottle storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 9, p. 4923-4931, 2011.

YU, Z. Beihai Dongyu Agricultural Science & Technology Co. Ltd. **Brewing method of low-alcohol lychee wine**. CN20141492304 20140922. Depósito: 22 set. 2014. Concessão: 10 dez. 2014.

YUSUF, A. B.; FUCHS, R.; NICOLAIDES, L. Effect of traditional processing methods on the β -carotene, ascorbic acid and trypsin inhibitor content of orange-fleshed sweet potato for production of amala in Nigeria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 96, n. 7, p.2472-2477, 2016.

XINCHANG COUNTY MADAI TEA INDUSTRY CO. LTD. **Mate nano tea wine**. CN20131532204 20131103. Depósito: 03 nov. 2013. Concessão: 06 mai. 2015.

ZHANG, R. F.; ZENG, Q. S.; DENG, Y. Y.; ZHANG, M. W.; WEI, Z. C.; ZHANG, Y.; TANG, X. J. Phenolic profiles and antioxidant activity of litchi pulp of different cultivars cultivated in Southern China. **Food Chemistry**, Barking, v. 136, n. 3-4, p. 1169-1176, 2013.

ZHENG, X.; YU, Y.; XIAO, G.; XU, Y.; WU, J.; TANG, D.; ZHANG, Y. Comparing product stability of probiotic beverages using litchi juice treated by high hydrostatic pressure and heat as substrates. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Wageningen, v. 23, p. 61-67, 2014.

ZENG, X. A.; CHEN, X. D.; QIN, F. G. F.; ZHANG, L. Composition analysis of litchi juice and litchi wine. **International Journal of Food Engineering**, Berlin, v. 4, n. 4, p.1-16, 2008.

6 MATERIAL SUPLEMENTAR

Material Suplementar: Tabela 1– Atributos melhor correlacionados ($r \geq 0,6$) para as duas primeiras dimensões para cada avaliador por meio do método de Perfil Flash

Avaliador	Dimensão 1 (63%)	Dimensão 2 (15%)
1	Cor marrom (-0,99), turbidez (-0,86), aroma de fermentado (-0,86), aroma de fruta doce (0,99), sabor de fermentado (-0,99), gosto doce (0,73), gosto ácido (-0,86)	Bolhas (-0,90), gosto doce (0,63), sabor refrescante (-0,90), textura de frisante (-0,90), encorpado (0,96)
2	Cor amarelada (0,99), aroma fermentado (0,73), aroma alcoólico (0,99), aroma adocicado (-0,99), aroma de mate (0,99), sabor alcoólico (0,99), sabor de fermentado (0,69), sabor residual de vinho (0,99)	Limpidez (-0,90), aroma fermentado (0,63), sabor de fermentado (0,67),
3	Cor ocre (-0,86), aroma cítrico (0,73), aroma fermentado (-0,73), aroma alcoólico (0,73), sabor refrescante (0,73), sabor residual amargo (-0,86), sabor alcoólico de vinho (0,73)	Translucidez (-0,90), aroma cítrico (0,63), aroma fermentado (-0,63), aroma alcoólico (0,63), sabor refrescante (0,63), sabor alcoólico de vinho (0,63)
4	Cor marrom (-0,99), aroma frutal (-0,99)	Gosto doce (0,96)
5	Turbidez (0,69), cor marrom (-0,99), aroma de lichia (0,99), aroma fermentado (-0,99), sabor de fruta doce (-0,69), sabor de fruta (-0,69), percepção de bolhas (-0,69)	Turbidez (-0,67), sabor de fruta doce (0,67), sabor de fruta (0,67), percepção de bolhas (0,67)
6	Cor âmbar (-0,99), aroma de lichia (0,86), aroma de fermentado (-0,73), sabor de lichia em calda (0,86), sabor residual amargo (-0,86)	Opacidade (-0,90), aroma de fermentado (-0,63), corpo (-0,90)
7	Turbidez (0,69), cor caramelo (-0,99), aroma de fermentado (-0,99), sabor de fermentado (-0,99), gosto amargo (-0,99)	Presença de gás no copo (-0,90), turbidez (-0,67), aroma de lichia (0,75), sabor de lichia (0,75), presença de gás na boca (-0,90)
8	Cor caramelo (-0,86), aroma amadeirado (-0,86), sabor frutado (0,86), amargor residual (-0,86), sabor persistente (-0,99), sabor similar ao vinho (-0,86), corpo da bebida (-0,86)	Presença de bolhas (0,90)
9	Cor caramelo (-0,99), aroma de lichia (-0,99), sabor de lichia (-0,69)	Sabor de lichia (0,67)
10	Cor amarela (-0,99), viscosidade (-0,99), aroma de	

	espumante (-0,99), gosto doce (0,99), gosto amargo (-0,86), viscosidade na boca (0,99)	
11	Cor de mel (-0,99), aroma ácido (-0,99), aroma doce (0,99), sabor amargo de mate (-0,99), gosto doce (0,99)	
12	Cor amarelada (-0,99), presença de gás (-0,86), turbidez (-0,86), aroma ácido (0,86), aroma adocicado frutado (-0,86), aroma alcoólico (0,86), aroma de fruta fermentada (-0,99), sabor alcoólico (0,86), sabor amargo (-0,86), sabor ácido (0,86), sabor adocicado (-0,99), sabor de lichia (0,73), fluidez (-0,86)	Sabor de lichia (0,63)
13	Cor dourada (-0,86), aroma de suco de lichia (0,99), aroma de mate (-0,86), doçura (-0,86), sabor de lichia (0,99), sabor de mate (-0,86)	Corpo (0,61), presença de bolhas (-0,96)
14	Cor escura (-0,99), aroma de lichia (0,86), aroma refrescante (-0,86), sabor adocicado (0,73), gosto amargo (-0,86), sabor de lichia (0,73), corpo (-0,99)	Transparência (0,96), gaseificação (0,75), sabor adocicado (0,63), sabor de lichia (0,63), percepção de bolhas (0,75)
15	Tonalidade amarelada (-0,99), presença de bolhas (0,86), aroma fermentado (0,99), aroma de lichia (-0,99), sabor de lichia (0,73), sabor de mate (-0,99), textura encorpada (-0,99)	Sabor de lichia (0,73)
16	Cor de tijolo (-0,99), aroma de lichia (-0,86), sabor adocicado de fruta (-0,69)	Sabor adocicado de fruta (0,67)
17	Cor caramelo (-0,86), aroma de lichia (0,99), cheiro de terra/mato (-0,86), sabor doce de lichia (0,86)	

DEPÓSITO DE PATENTES

Foram submetidos junto ao Instituto Nacional de Propriedade Nacional (INPI) quatro Pedidos Nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT, conforme segue:

1. Processo número BR 10 2018 075780 6: Bebida probiótica de lichia e seu processo de produção;
2. Processo número BR 10 2018 075779 2: Bebida probiótica de lichia e erva-mate e seu processo de produção;
3. Processo número BR 10 2018 075772 5: Vinho de lichia e seu processo de produção;
4. Processo número BR 10 2018 075782 2: Vinho de lichia e erva-mate e seu processo de produção.

7 CONCLUSÕES

- As folhas de erva-mate do plantio intencional possuem maior conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante do que as das plantas nativas. As folhas de erva-mate do plantio intencional apresentam perfil de açúcares e ácidos orgânicos diferente das nativas;
- Apenas uma fração do conteúdo dos minerais e compostos fenólicos, e da atividade antioxidante são preservados na infusão de erva-mate. Compostos como cafeína, teobromina, ácido ascórbico, epicatequina e ácido clorogênico são lixiviados das folhas para a infusão. Assim a infusão de erva-mate tem potencial efeito benéfico à saúde, seja no consumo direto ou como ingrediente para o desenvolvimento de produtos;
- A lichia é uma fruta rica em frutose e glicose, vitamina C e compostos fenólicos totais. Apresenta atividade antioxidante considerável avaliada pelos métodos de DPPH, FRAP e ABTS. Contém compostos com potencial bioatividade, sendo em maior concentração o ácido ferrúlico, a epicatequina, a quercetina, o kaempferol, o ácido gálico e a rutina;
- Bebidas formuladas com diferentes proporções de lichia e erva-mate apresentam perfis físico-químico e sensorial, propriedades antioxidantes, teor de compostos fenólicos e aceitabilidade adequados para o consumo;
- A pasteurização das bebidas formuladas com diferentes proporções de lichia e erva-mate acarreta alterações na viscosidade mantendo elevada a atividade antioxidante das bebidas;
- Dentre as formulações testadas, bebidas com maiores proporções de erva-mate apresentam maior teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, são sensorialmente mais escuras, marrons, túrbidas e opacas, com aroma e sabor de chá e erva-mate, gosto doce e amargo além de adstringentes. Enquanto que as bebidas contendo maiores proporções de lichia possuem mais aroma e sabor

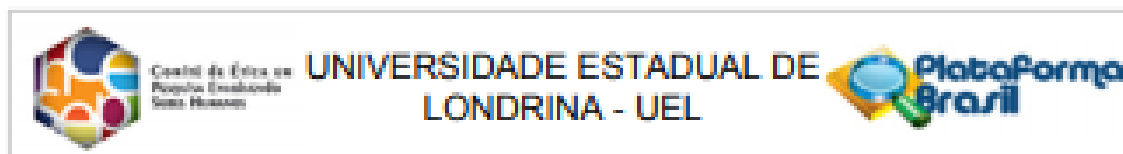
de lichia, sabor adocicado e ácido de fruta, são mais viscosas e contendo partículas em suspensão;

- A proporção de erva-mate tem correlação positiva com o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante. Há uma correlação positiva entre a proporção de lichia e a viscosidade e a aceitação sensorial global;
- Dentre as proporções testadas de lichia e infusão de erva-mate, a bebida contendo 70% de lichia e 30% de infusão de erva-mate apresenta máximo teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, além de uma boa aceitação sensorial;
- A mistura da lichia com erva-mate proporciona bebidas com adequados conteúdos de açúcares, ácidos orgânicos, vitamina C, ácidos fenólicos, metilxantinas e flavonoides;
- As bebidas lichia com erva-mate não pasteurizadas, com maiores proporções de lichia contém mais glicose, frutose, ácido málico e vitamina C. Em maiores proporções de erva-mate as bebidas mistas não pasteurizadas têm mais sacarose, ácido cítrico, ácidos fenólicos, flavonoides e metilxantinas;
- Nas bebidas mistas a pasteurização a 80 °C/20 min reduz o conteúdo de sacarose, ácido cítrico, ácidos fenólicos, flavonoides e metilxantinas. A pasteurização aumenta nas bebidas mistas o teor de glicose e frutose;
- As bebidas mistas com mais de 50% de suco de lichia apresentam alto conteúdo de vitamina C enquanto que aquelas com mais de 70% de infusão de erva-mate mostram maior conteúdo de ácidos fenólicos, metilxantinas e flavonoides;
- Bebidas de lichia adicionadas de *S. boulardii* com diferentes teores de sólidos solúveis totais, apresentam características físico-químicas, propriedades antioxidantes e teor de compostos fenólicos adequados para o consumo;
- As bebidas de lichia contendo *S. boulardii* e menor conteúdo de sólidos solúveis totais apresentam viabilidade de levedura maior do que 1×10^6 UFC/mL durante 14 dias de armazenamento;

- Maior teor de açúcares proporciona na bebida de lichia maior viabilidade da *S. boulardii* ($> 1 \times 10^6$ UFC/mL, podendo ser potencialmente probiótica), além de maior teor de compostos fenólicos totais, sólidos solúveis totais e de etanol, quando armazenadas sob refrigeração, por 21 dias;
- Durante o armazenamento refrigerado da bebida probiótica de lichia há uma diminuição no conteúdo de compostos fenólicos totais e na atividade antioxidante. Em bebidas probióticas de lichia adicionadas de sacarose há um decréscimo no conteúdo de sólidos solúveis totais ao longo do armazenamento;
- A etapa de fermentação pela *S. boulardii* e maior conteúdo de sólidos solúveis proporciona uma bebida de lichia aceita pelo consumidor, com características físico-químicas adequadas e com viabilidade de levedura que confere potencial ação probiótica, ao longo dos 21 dias de armazenamento refrigerado à 4 °C;
- Bebidas probióticas de lichia e erva-mate com diferentes teores de sólidos solúveis totais e preparadas com a etapa de fermentação pela *Saccharomyces boulardii* apresentam características físico-químicas, propriedades antioxidantes, teor de compostos fenólicos totais adequados para o consumo;
- Um menor conteúdo de sólidos solúveis totais no ajuste da formulação das bebidas de lichia e erva-mate proporciona uma viabilidade da levedura menor que 1×10^6 UFC/mL no 21º dia de armazenamento refrigerado;
- A viabilidade da levedura *S. boulardii* assume contagens $> 1 \times 10^6$ UFC/mL nas bebidas de lichia e erva-mate que tem maior teor de sólidos solúveis totais, assim elas podem ser consideradas potencialmente probióticas. Ao longo do armazenamento refrigerado destas bebidas há diminuição no conteúdo de compostos fenólicos totais, vitamina C e na atividade antioxidante, além de aumento no teor alcoólico. Em bebidas probióticas de lichia e erva-mate adicionadas de sacarose há decréscimo no conteúdo de sólidos solúveis totais ao longo do armazenamento;

- Bebidas de lichia e erva-mate preparadas com um maior teor de sólidos solúveis totais e preparadas com etapa de fermentação por *S. boulardii* têm ao final de 28 dias de armazenamento maior teor alcoólico, conteúdo de sólidos solúveis totais e de compostos fenólicos totais, ácido ascórbico, além de uma maior atividade antioxidante;
- As bebidas de lichia e erva-mate fermentadas pela *S. boulardii* e contendo mais açúcar são aceitas pelo consumidor e apresentam características físico-químicas adequadas e viabilidade de cultura que confere à bebida potencial probiótico, ao longo dos 28 dias de armazenamento refrigerado à 4 °C;
- A levedura *Saccharomyces boulardii* é adequada para fermentação do suco de lichia, com produção de uma bebida fermentada, *tipo vinho*, aceita sensorialmente, com potencial probiótico e características físico-químicas adequadas;
- A adição da erva-mate ao suco de lichia e posterior fermentação pela *S. boulardii* proporciona bebida *tipo vinho*, com maior potencial antioxidante, boa aceitação sensorial, potencial probiótico além de apresentar características físico-químicas adequadas;
- A bebida *tipo vinho* de lichia, fermentada por *S. boulardii*, caracteriza-se como mais clara, sabor alcoólico, adocicado e de fruta doce. A adição da erva-mate confere às bebidas *tipo vinho* coloração marrom, ocre, amarelada, de mel e escura, aroma fermentado, além de gosto amargo, sabor de mate e de fermentado, sabor residual amargo, e maior viscosidade na boca;
- Durante o preparo da bebida *tipo vinho*, uma etapa de segunda fermentação por 15 dias à 10 °C proporciona às bebidas *tipo vinho* de lichia maior aceitação sensorial em relação às bebidas *tipo vinho* de lichia e erva-mate;
- A lichia, combinada ou não com a infusão de erva-mate e a *Saccharomyces* processada de forma adequada resulta em diferentes tipos de bebidas sensorialmente agradáveis, potencialmente antioxidante e probióticas.

ANEXOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de bebida mista funcional de lichia e erva-mate

Pesquisador: MARCELA M

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 56478316.8.0000.5231

Instituição Proponente: Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.590.124

Apresentação do Projeto:

Projeto de Pesquisa intitulado "Desenvolvimento de bebida mista funcional de lichia e erva-mate", sob responsabilidade da pesquisadora Marcela M. vinculada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos - UEL.

O objetivo desta pesquisa é desenvolver bebidas funcionais mistas de lichia e erva-mate com potencial antioxidante e probióticas.

Para isso a partir da mistura contendo diferentes proporções de polpa de lichia e infusão de erva-mate serão produzidas cinco formulações de bebidas, com posterior pasteurização (90 °C/1 min) e envase. As bebidas formuladas serão analisadas quanto a aceitação e descrição sensorial, composição centesimal, atividade antioxidante, determinação do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais, além da quantificação de compostos fenólicos específicos.

As bebidas mistas também avaliadas sensorialmente em relação a aceitabilidade e determinado o perfil sensorial. As bebidas serão preparadas seguindo-se as boas práticas de fabricação no Laboratório de Tecnologia de Alimentos e analisada nos Laboratórios de Análises Físico-Químicas, Microbiológicas e Sensoriais do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina. Serão realizados três testes de aceitação sensorial:

(1) cinco amostras de bebida mista de lichia e erva-mate;

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-970

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep200@uel.br

Anexo 1 - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos aprovando o projeto desenvolvido na tese