



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ
IFCE *CAMPUS* LIMOEIRO DO NORTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
MESTRADO ACADÊMICO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

KENNEDY KELVIK OLIVEIRA CAMINHA

MALVARISCO COMO DIFERENCIAL INOVADOR NO DESENVOLVIMENTO DE
KOMBUCHA

Limoeiro do Norte

2025

KENNEDY KELVIK OLIVEIRA CAMINHA

**MALVARISCO COMO DIFERENCIAL INOVADOR NO DESENVOLVIMENTO DE
KOMBUCHA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Tecnologia de Alimentos do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) – *Campus Limoeiro do Norte*, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Virna Luiza de Farias

Coorientadora: Profa. Dra. Mayara Salgado Silva

Limoeiro do Norte

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Instituto Federal do Ceará - IFCE
Sistema de Bibliotecas - SIBI
Ficha catalográfica elaborada pelo SIBI/IFCE, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C183m Caminha, Kennedy Kelvik Oliveira.

MALVARISCO COMO DIFERENCIAL INOVADOR NO DESENVOLVIMENTO DE
KOMBUCHA / Kennedy Kelvik Oliveira Caminha. - 2025.

114 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Federal do Ceará, Mestrado em Tecnologia de Alimentos, Campus
Limoeiro do Norte, 2025.

Orientação: Profa. Dra. Virna Luiza de Farias.

Coorientação: Profa. Dra. Mayara Salgado Silva.

1. Bebida fermentada. 2. Compostos bioativos. 3. Perfil sensorial. 4. Condições fermentativas. I. Título.

CDD 664



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ
Rua Estevão Remígio de Freitas, 1145 - Bairro Centro - CEP 62930-000 - Limoeiro do Norte - CE - www.ifce.edu.br

ANEXO

KENNEDY KELVIK OLIVEIRA CAMINHA

MALVARISCO COMO DIFERENCIAL INOVADOR NO DESENVOLVIMENTO DE KOMBUCHA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará *Campus* Limoeiro do Norte como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Aprovado em: 25/02/2025

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Virna Luiza de Farias (Orientadora)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - (IFCE)
Campus Limoeiro do Norte

Profa. Dra. Mayara Salgado Silva (Coorientadora)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - (IFCE)
Campus Limoeiro do Norte

Prof. Dr. Laércio Galvão Maciel (Membro Interno Titular)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - (IFCE)
Campus Limoeiro do Norte

Profa. Dra. Raquel Macedo Dantas Coelho (Membra Externa Titular)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte - (IFRN)
Campus Currais Novos

Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro (Membro Externo Titular) Universidade
Estadual de Campinas - UNICAMP



Documento assinado eletronicamente por **Virna Luiza de Farias, Professora do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico**, em 27/02/2025, às 16:59, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mayara Salgado Silva, Professora do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico**, em 16/04/2025, às 17:26, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Macedo Dantas Coelho, Usuário Externo**, em 22/04/2025, às 08:20, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **LAERCIO GALVAO MACIEL, Usuário Externo**, em 22/04/2025, às 14:37, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ruann Janser Soares de Castro, Usuário Externo**, em 24/04/2025, às 17:59, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade do documento pode ser conferida no site https://sei.ifce.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0 informando o código verificador **7112040** e o código CRC **CD9C0E9D**.

“Investigar é dar sentido ao caos; é ordenar o que,
por definição, ainda não se entende.”

Pierre Bourdieu

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) *campus* Limoeiro do Norte e ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos (PGTA).

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Funcap), pela concessão da bolsa de mestrado.

À Prof^ª Dr^ª. Virna Luiza de Farias, pela amizade, suporte, confiança e ensinamentos.

À Prof^ª Dr^ª. Mayara Salgado Silva, pela confiança durante toda a caminhada.

À Prof^ª Dr^ª. Renata Chastinet Braga, por todo o carinho e conhecimento compartilhado.

Ao Pós doutorando Laércio Galvão Maciel, pelos ensinamentos, conselhos e amizade.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos pelos ensinamentos.

Aos Laboratórios de Bioensaios Químico-Farmacológico e Ambiental (LABQFAM) e Química de Produtos Naturais (LQPN) da Universidade Estadual do Ceará *campus* Itaperi, Fortaleza-CE, pela parceria e realização das análises toxicológicas e cromatográficas da pesquisa.

Ao Instituto Municipal de Meio Ambiente de Limoeiro do Norte (IMMAB), pelo fornecimento das amostras e pelo apoio ao projeto.

Aos meus pais, Karla Renata de Oliveira e José Diniz Caminha, por todo incentivo e amor.

Aos meus avós Basílio Crisóstomo de Oliviera e Maria Zuleide de Oliveira (*in memoriam*), por todo amor e carinho.

À minha namorada Joyce Keller Freire dos Santos, pelo apoio em todos os momentos.

A todos os amigos que conheci durante a pós-graduação, pela ajuda, conversas, risadas e conhecimento compartilhado.

A todos aqueles, que de alguma forma contribuíram nesta jornada, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Kombucha é uma bebida resultante da fermentação de chá adoçado, tradicionalmente elaborada a partir da *Camellia sinensis*. Seu consumo tem sido associado a efeitos benéficos à saúde humana, atribuídos à presença de compostos bioativos. A adição de matérias-primas à kombucha origina bebidas com características químicas e sensoriais únicas. O presente estudo teve como objetivo elaborar e caracterizar kombuchas com adição de malvarisco, saborizadas com sucos de frutas. Foram determinadas as características físico-químicas, os compostos fenólicos e a capacidade antioxidante das folhas de malvarisco. Utilizando-se planejamento experimental, foram definidas as formulações da bebida para o estudo. Com base nas condições de tempo e concentração de malvarisco, em função dos parâmetros fermentativos, foi definida a formulação da kombucha base - KB (com malvarisco), e para fins de comparação, a kombucha controle - KC (sem malvarisco). KB foi adicionada de sucos de abacaxi (KA), de pitaya (KP) e de melancia (KM). As bebidas foram avaliadas quanto aos parâmetros físico-químicos, teor de compostos fenólicos, perfil antioxidante, toxicidade, padrões microbiológicos e características sensoriais. As folhas de malvarisco apresentaram 94,30 g 100 g⁻¹ de umidade, 5,2% de acidez total, 4,7 de pH, 2,8 °Brix para sólidos solúveis e 1,14 g 100 g⁻¹ para cinzas. Os parâmetros de cor indicaram que as folhas apresentam coloração verde intensa com alta saturação. Foram obtidos para o malvarisco 17,81 e 15,68 mg AGE 100g⁻¹ de compostos fenólicos, 1,71 mg QE 100g⁻¹ de flavonoides, 46,03% de inibição de DPPH, 39,60% de inibição pelo método de DPPH modificado, e 46,36 mg Fe (II) E 100 g⁻¹ de atividade antioxidante por FRAP. As bebidas saborizadas apresentaram aumento do pH após adição dos sucos, com valores de 3,72 para KA, 4,33 para KM e 4,15 para KP. O maior valor de acidez volátil (45,75 mEq. L⁻¹) foi observado para KA. Os parâmetros de cor CIELab foram influenciados significativamente ($P < 0,05$) pelo suco de pitaya na KP. Dentre as bebidas fermentadas, KA se destacou das demais bebidas saborizadas nos ensaios de compostos fenólicos por Folin-Ciocalteu (312,33 mg AGE L⁻¹), por Azul da Prússia (306,57 mg AGE L⁻¹) e por FRAP (1248,26 mg Fe (II)E L⁻¹). Oito compostos fenólicos foram detectados nas kombuchas, com maior concentração para o ácido ferúlico em KB, e os ácido clorogênico e ácido gálico em KA. As formulações testadas não apresentaram toxicidade nas concentrações de 4; 20 e 40 mg Kg⁻¹ nos testes toxicológicos no modelo *zebrafish*, assim como atenderam aos padrões microbiológicos vigentes. As médias dos atributos sensoriais de KA para sabor (7,00), aroma (6,80) e aceitação global (7,06) foram maiores e diferiram significativamente ($P < 0,05$) dos outros tratamentos, refletindo uma boa intenção de compra pelos avaliadores e índice de aceitabilidade satisfatório. Dessa forma, o malvarisco consiste em uma matéria-prima viável na fermentação da kombucha, e sua saborização com suco de frutas, principalmente de abacaxi, contribui para a melhor aceitação sensorial.

Palavras-chave: Bebida fermentada, Compostos bioativos, Perfil sensorial, Condições fermentativas.

ABSTRACT

Kombucha is a drink resulting from the fermentation of sweetened tea, traditionally made from *Camellia sinensis*. Its consumption has been associated with beneficial effects on human health, attributed to the presence of bioactive compounds. The addition of raw materials to kombucha produces drinks with unique chemical and sensory characteristics. The aim of this study was to produce and characterize kombuchas with added malvarisco, flavored with fruit juices. The physicochemical characteristics, phenolic compounds and antioxidant capacity of malvarisco leaves were determined. Using experimental planning, the drink formulations for the study were defined. Based on the time conditions and concentration of malvarisco, depending on the fermentative parameters, the formulation of the base kombucha - BK (with malvarisco) was defined, and for comparison purposes, the control kombucha - CK (without malvarisco). BK was added with pineapple juice (AK), pitaya juice (PK) and watermelon juice (MK). The drinks were evaluated in terms of physicochemical parameters, phenolic compound content, antioxidant profile, toxicity, microbiological standards and sensory characteristics. The malvarisco leaves had 94.30 g 100 g⁻¹ of moisture, 5.2% total acidity, 4.7 pH, 2.8 °Brix soluble solids and 1.14 g 100 g⁻¹ of ash. The color parameters indicated that the leaves were an intense green color with high saturation. Malvarisco obtained 17.81 and 15.68 mg GAE 100g⁻¹ of phenolic compounds, 1.71 mg QE 100 g⁻¹ of flavonoids, 46.03% DPPH inhibition, 39.60% inhibition by the modified DPPH method, and 46.36 mg Fe (II) E 100 g⁻¹ of antioxidant activity by FRAP. The flavored drinks showed an increase in pH after adding the juices, with values of 3.72 for AK, 4.33 for MK and 4.15 for PK. The highest volatile acidity value (45, 75 mEq. L⁻¹) was observed for AK. CIELab color parameters were significantly influenced ($P < 0.05$) by pitaya juice in PK. Among the fermented drinks, AK stood out from the other flavored drinks in the tests for phenolic compounds by Folin-Ciocalteu (312.33 mg GAE L⁻¹), Prussian Blue (306.57 mg GAE L⁻¹) and FRAP (1248.26 mg Fe (II)E L⁻¹). Eight phenolic compounds were detected in the kombuchas, with the highest concentration for ferulic acid in BK, and chlorogenic acid and gallic acid in AK. The formulations tested showed no toxicity at concentrations of 4; 20 and 40 mg Kg⁻¹ in the toxicology tests on the zebrafish model, as well as meeting current microbiological standards. The averages of the sensory attributes of AK for flavor (7.00), aroma (6.80) and overall acceptability (7.06) were higher and differed significantly ($P < 0.05$) from the other treatments, reflecting a good intention to buy by the evaluators and a satisfactory acceptability index. Thus, malvarisco is a viable raw material for fermenting kombucha, and its flavoring with fruit juice, especially pineapple, contributes to better sensory acceptance.

Keywords: Fermented drink, Bioactive compounds, Sensory profile, Fermentation conditions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica de <i>P. amboinicus</i> na América do Sul	21
Figura 2 - Metabolismo microbiano na fermentação da kombucha	27
Figura 3 - Rota metabólica simplificada dos metabólitos secundários em vegetais	32
Figura 4 - (A) Local de coleta do malvarisco e (B) imagem ampliada da folha de malvarisco	33
Figura 5 - Diagrama de cor no espaço CIELab	36
Figura 6 - Esquema para obtenção do extrato aquoso das folhas de malvarisco.....	37
Figura 7 - Fluxograma de produção das kombuchas	41
Figura 8 - Kombuchas acondicionada nos recipientes de fermentação	42
Figura 9 - Resíduos depositados no fundo da proveta após refrigeração do suco de melancia com o tratamento enzimático.....	44
Figura 10 - Esquema montado para padronização das condições de iluminação e resolução das imagens obtidas. A - Captura de imagem; B – Fonte de luz; C – Amostra.....	46
Figura 11 - Diagrama de cromacidade da folha de <i>P.amboinicus</i>	55
Figura 12 - Efeitos dos fatores tempo e concentração de <i>Plectranthus amboinicus</i> nas variáveis de acompanhamento da fermentação. A – pH; B – Acidez total; C – Sólidos solúveis	61
Figura 13 - Efeito da combinação dos fatores tempo e concentração de <i>P. amboinicus</i> nas variáveis de acompanhamento da fermentação. A – pH; B - Acidez total; C – Sólidos solúveis	63
Figura 14 - Imagens das kombuchas utilizadas para análise de cor. A – kombucha controle (sem malvarisco); B – kombucha melancia; C – kombucha base (com malvarisco); D – kombucha abacaxi; E – kombucha pitaya	68
Figura 15 - Quantificação de compostos fenólicos nas kombuchas por HPLC (mg g ⁻¹ de amostra liofilizada)	74
Figura 16 - Efeito das amostras kombucha controle – KC e kombucha base (malvarisco) – KB no edema abdominal induzido por κ -Carragenina 1,5% em zebrafish adulto, analisado durante o período da quarta hora de teste	76
Figura 17 - Análise de Correspondência para o teste CATA	82
Figura 18 - Análise de Componentes Principais (ACP) das kombuchas pelo RATA.....	85
Figura 19 - Distribuição da frequência de intenção de compra das kombuchas	88
Figura 20 - Índice de aceitabilidade por atributos para as amostras de kombucha	89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Nomenclatura e classificação filogenética de <i>Plectranthus amboinicus</i>	22
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fitoquímicos reportados em diferentes extratos de <i>P. amboinicus</i>	24
Tabela 2 – Composição química da kombucha elaborada com diferentes substratos	27
Tabela 3 - Diferentes denominações para kombucha, segundo a Instrução Normativa nº 41 de 2019 do MAPA.....	29
Tabela 4 - Parâmetros analíticos para kombucha	29
Tabela 5 - Matriz do delineamento fatorial 3 ² , com níveis reais e codificados das variáveis ..	40
Tabela 6 - Caracterização físico-química, fitoquímica e atividade antioxidante da folha de <i>P. amboinicus</i>	54
Tabela 7 - Teor de compostos bioativos, atividade antioxidante e compostos fenólicos por HPLC nas folhas de <i>P. amboinicus</i>	56
Tabela 8 - Análise dos parâmetros fermentativos da kombucha associada ao planejamento experimental	58
Tabela 9 - Coeficientes de regressão obtidos para modelar os efeitos dos parâmetros na fermentação	62
Tabela 10 - Parâmetros físico-químicos das kombuchas.....	66
Tabela 11 - Parâmetros de cor das kombuchas.....	69
Tabela 12 - Parâmetros de percepção de cor e taxa de escurecimento das kombuchas	70
Tabela 13 - Fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante das kombuchas	71
Tabela 14 - Teste de toxicidade da kombucha controle (sem malvarisco) e kombucha base (com malvarisco) – KB em peixe-zebra adulto	75
Tabela 15 - Lista de descritores utilizados para avaliação sensorial das kombuchas.....	77
Tabela 16 - Informações demográficas referente aos 120 avaliadores do teste sensorial	78
Tabela 17 - Resultado do teste Q de Cochran referente aos atributos e à frequência de seleção por tratamento.....	80
Tabela 18 - Valores médios para intensidade dos atributos sensoriais pelo teste RATA	84
Tabela 19 - Valores médios e desvios-padrão para os atributos sensoriais das kombuchas	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABKOM	Associação Brasileira de Kombucha
ACP	Análise de Componentes Principais
AGE	Ácido Gálico Equivalente
AOAC	<i>Association of Analytical Communities</i> (Associação de Comunidades Analíticas)
BI	<i>Browning Index</i> (índice de escurecimento)
BOD	<i>Biological Oxygen Demand</i> (demanda biológica de oxigênio)
C*	Chroma
CATA	<i>Check-All-That-Apply</i> (marque tudo o que se aplica)
DMSO	Dimetilsufóxido
DPPH	<i>2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl</i>
EREs	Espécies Reativas de Enxofre
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Alimentos e Medicamentos)
h*	Ângulo hue
HACCP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i> (análise de pontos críticos de controle)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida de alta eficiência)
i.p	Intraperitonal
KA	Kombucha Abacaxi
KB	Kombucha Base
KC	Kombucha Controle
KM	Kombucha Melancia

KP	Kombucha pitaya
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
OMS	Organização Mundial da Saúde
PIQs	Parâmetros de Identidade e Qualidade
QE	Quercetina Equivalente
RATA	<i>Rate All That Apply</i> (classificar tudo o que se aplica)
SCOBY	<i>symbiotic culture of bacteria and yeast</i> (cultura simbiótica de bactérias e leveduras)
SIBBR	Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira
v.o	via oral
ΔE^*	Percepção de cor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	Objetivo geral.....	20
2.2	Objetivos específicos.....	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1	Malvarisco	21
3.1.1	<i>Fitoquímicos</i>	23
3.2	Kombucha	25
3.2.1	<i>Histórico da kombucha</i>	25
3.2.2	<i>Elaboração e comportamento fermentativo da kombucha</i>	25
3.2.3	<i>Processo metabólico</i>	26
3.2.4	<i>Legislação e parâmetros de identidade e qualidade da kombucha</i>	28
3.2.5	<i>Mercado da kombucha</i>	30
3.3	Compostos bioativos e antioxidantes	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	Obtenção da matéria-prima	33
4.2	Caracterização físico-química, cor, fitoquímicos e atividade antioxidante das folhas de <i>P. amboinicus</i>	34
4.2.1	<i>Umidade</i>	34
4.2.2	<i>pH</i>	34
4.2.3	<i>Cinzas</i>	34
4.2.4	<i>Sólidos solúveis</i>	35
4.2.5	<i>Acidez total</i>	35
4.2.6	<i>Cor</i>	35
4.3	Determinação de compostos bioativos e da atividade antioxidante das folhas de <i>P. amboinicus</i>	36
4.3.1	<i>Preparo do extrato</i>	36
4.3.2	<i>Fenólicos totais</i>	37
4.3.3	<i>Flavonoides totais</i>	38
4.3.4	<i>Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)</i>	38
4.3.5	<i>Atividade antioxidante pelo método 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)</i>	39

4.3.6	<i>Atividade antioxidante pelo método 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) modificado</i>	39
4.4	Planejamento experimental para determinação dos parâmetros fermentativos	40
4.5	Elaboração das kombuchas	40
4.5.1	<i>Preparo do chá verde</i>	41
4.5.2	<i>Inoculação da cultura</i>	41
4.5.3	<i>Adição do malvarisco</i>	42
4.5.4	<i>Fermentação</i>	42
4.5.5	<i>Seleção da formulação base</i>	43
4.5.6	<i>Preparo dos sucos</i>	43
4.5.7	<i>Saborização</i>	44
4.6	Caracterização físico-química das kombuchas.....	44
4.6.1	<i>Teor alcoólico</i>	44
4.6.2	<i>Acidez total</i>	45
4.6.3	<i>Acidez volátil</i>	45
4.6.4	<i>pH</i>	45
4.6.5	<i>Sólidos solúveis</i>	46
4.7	Cor	46
4.8	Determinação de compostos bioativos e atividade antioxidante das kombuchas	47
4.8.1	<i>Fenólicos totais</i>	47
4.8.2	<i>Flavonoides totais</i>	47
4.8.3	<i>Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)</i>	47
4.8.4	<i>Atividade antioxidante pelo método 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)</i>	48
4.8.5	<i>Atividade antioxidante pelo método 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) modificado</i>	48
4.9	Determinações cromatográficas	48
4.9.1	<i>Amostras e preparo dos padrões</i>	48
4.9.2	<i>Equipamento e análises</i>	48
4.10	Toxicidade e inflamação.....	49
4.10.1	<i>Modelo animal Zebrafish</i>	49
4.10.2	<i>Protocolo geral</i>	50
4.10.3	<i>Tratamentos</i>	50

4.10.4	Indução de edema abdominal por κ -Carragenina 1,5%	50
4.10.5	Toxicidade aguda 96h	51
4.11	Análises microbiológicas	51
4.12	Análise sensorial	51
4.13	Análise estatística.....	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	Caracterização físico-química e cor das folhas de <i>P. amboinicus</i>	54
5.2	Compostos bioativos, atividade antioxidante e HPLC das folhas de <i>P. amboinicus</i>	55
5.3	Determinação das condições fermentativas da kombucha	58
5.4	Caraterização físico-química das kombuchas saborizadas	65
5.5	Análise de cor das kombuchas.....	68
5.6	Análise de compostos bioativos e atividade antioxidante das kombuchas	71
5.7	Identificação e quantificação dos compostos fenólicos nas kombuchas por HPLC	73
5.8	Toxicidade aguda e Indução de edema abdominal por κ -Carragenina 1,5% ..	75
5.9	Análises microbiológicas	77
5.10	Análise sensorial	77
5.10.1	Grupo focal.....	77
5.10.2	Teste sensorial	78
5.10.3	Check all that apply (CATA).....	79
5.10.4	Rate all that apply (RATA)	83
5.10.5	Aceitação e intenção de compra das kombuchas.....	86
6	CONCLUSÕES.....	90
	REFERÊNCIAS.....	91
	APÊNDICE A – Parecer para realização da análise sensorial das kombuchas.....	101
	APÊNDICE B – Quantificação de compostos fenólicos nas kombuchas por HPLC (mg g ⁻¹ de amostra liofilizada)	102
	APÊNDICE C – Parecer da Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA).....	103
	APÊNDICE D – Ficha da análise sensorial	104
	APÊNDICE E – Gráfico de radar para a intensidade dos atributos pelo teste RATA.	
	107	
	APÊNDICE F – Cromatogramas dos ensaios em HPLC.....	108

APÊNDICE G – Acompanhamento fermentativo da kombucha nas concentrações de 15, 10 e 5% de malvarisco durante 10 dias.....	114
---	------------

1 INTRODUÇÃO

A fermentação é uma prática antiga para preservar e modificar alimentos. Além de melhorar a durabilidade, a segurança e as características sensoriais, a fermentação pode ainda aumentar o valor nutricional dos alimentos (Marco *et al.*, 2017). Durante a fermentação, os microrganismos produzem vitaminas que atuam facilitando a regulação e absorção de minerais, assim como moléculas bioativas que reduzem a permeabilidade da barreira intestinal e favorecem a absorção dos nutrientes nos alimentos (Şanlıer; Gökçen; Sezgin, 2019).

Os compostos bioativos são substâncias originadas dos metabólitos secundários das plantas, produzidas por meio de vias metabólicas secundárias. Embora não sejam classificados como nutrientes, desempenham um papel importante na redução dos riscos de doenças, contribuindo, assim, para a promoção da saúde dos indivíduos. (Bao *et al.*, 2019). A exemplo, pode-se citar os isoprenóides, compostos fenólicos, ácidos graxos e aminoácidos essenciais, fibras, entre outros. Esses compostos exercem várias ações do ponto de vista biológico, tais como: atividade antioxidante, modulação de enzimas de destoxificação, estimulação do sistema imune, redução da agregação plaquetária, atividade antibacteriana e antiviral (Siró *et al.*, 2008).

Antioxidantes podem ajudar na prevenção e na reparação de prejuízos causados pelo estresse oxidativo, que ocorre quando os radicais livres (moléculas instáveis) produzidos em excesso superam as defesas naturais do organismo, resultando em danos ao DNA, reações com lipídios das membranas celulares (contribuindo para doenças cardiovasculares) e modificações estruturais das proteínas, favorecendo o envelhecimento celular e o desenvolvimento de doenças crônicas. Ou seja, os antioxidantes possuem a capacidade de reagir com os radicais livres por meio da doação de elétrons, resultando na sua estabilização sem se tornarem instáveis ou livres, protegendo o organismo do estresse oxidativo (Jayabalan *et al.*, 2014).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que 80% da população mundial faz uso de plantas na amenização ou cura de doenças (Zeni *et al.*, 2017). Assim, nos últimos anos, tem-se verificado um grande avanço científico no entendimento do mecanismo de ação de compostos presentes nas plantas de potencial medicinal, como, por exemplo, os flavonoides, alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos e lignanas. Dentre as plantas populares e não convencionais encontra-se o malvarisco.

Popularmente conhecido como malvarisco, malvariço, hortelã da folha grossa, hortelã da folha graúda, orégano e orégano francês, o *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, pertencente à família Lamiaceae, é comumente encontrado em trópicos quentes como Ásia e África, com boa adaptação no Brasil. Possui fitoquímicos que têm muitos efeitos positivos para

a humanidade e apresenta propriedades antioxidantes, antitumorais, antiepilépticas, cicatrizantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e analgésicas (Arumugam; Swamy; Sinniah, 2016; Donno *et al.*, 2021; Nguyen *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020).

A pesquisa das espécies pertencentes ao gênero *Plectranthus* concentra-se principalmente no isolamento de diterpenóides e na análise de suas propriedades farmacológicas. A presença constante de ácido caféico e ácido clorogênico é observada na família Lamiaceae, sendo o ácido clorogênico considerado universal nessa família, enquanto o ácido rosmarínico ocorre de forma mais restrita, limitando-se à subfamília Nepetoideae. Além disso, o gênero *Plectranthus* é notável por sua abundância de óleos essenciais (Abdel-Mogib *et al.*, 2002; Lukhoba *et al.*, 2005). Esses compostos bioativos têm despertado interesse devido aos potenciais benefícios à saúde, não apenas em fitoterápicos, mas também em alimentos e bebidas funcionais.

Além das plantas, muitos alimentos fermentados apresentam características bioativas, como a kombucha, uma bebida fermentada reconhecida por seus potenciais benefícios à saúde. A kombucha é uma bebida resultante da fermentação de chá adoçado, tradicionalmente preparado com folhas de *Camellia sinensis*. O processo fermentativo utiliza uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras, conhecida como SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*), que atua como inóculo para a fermentação (Coelho *et al.*, 2020).

O consumo de kombucha tem sido associado a diversos efeitos na saúde, tais como: a redução dos níveis de colesterol e pressão arterial, redução da propagação do câncer, a melhoria do fígado, do sistema imunológico e das funções gastrointestinais. Os efeitos benéficos da kombucha são atribuídos à presença de compostos bioativos que atuam sinergicamente (Aryaeian *et al.*, 2021; Leal *et al.*, 2018; Permatasari *et al.*, 2022).

A utilização de diferentes matérias-primas na produção de kombucha resulta na criação de novas bebidas com características químicas e sensoriais únicas, além de proporcionar benefícios adicionais, como maior quantidade de compostos bioativos, capacidade antioxidante, efeitos anti-inflamatórios e atividade antibacteriana (Abuduaibifu; Tamer, 2019; Lopes; Santos; Prentice-Hernández, 2021; Ziemlewska *et al.*, 2021),

Com base nesse cenário, a proposta do presente estudo é atrelar o uso de *Plectranthusamboinicus* (Lour.) ao processo fermentativo da kombucha, visando agregar o potencial de compostos bioativos do malvarisco à bebida, além de promover a obtenção de um produto com atributos sensoriais satisfatórios por meio da saborização com sucos de frutas. O estudo possui caráter único e inovador, uma vez que não há registros na literatura que contemplem esta abordagem.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Elaborar e caracterizar kombuchas com adição de malvarisco saborizadas com sucos de frutas.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar características físico-químicas, compostos fenólicos e capacidade antioxidante das folhas de malvarisco;
- Elaborar diferentes formulações de kombuchas com adição de folhas de malvarisco, conforme um delineamento experimental;
- Caracterizar as kombuchas fermentadas quanto aos parâmetros de pH, acidez total titulável e sólidos solúveis;
- Selecionar a formulação base da kombucha adicionada de malvarisco;
- Saborizar a kombucha base com sucos de abacaxi, pitaya e melancia;
- Determinar as características físico-químicas, concentração de compostos bioativos e capacidade antioxidante das bebidas;
- Determinar a composição fenólica das bebidas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- Avaliar a toxicidade aguda e a capacidade anti-inflamatória das bebidas, utilizando o modelo de *zebrafish*;
- Realizar análises microbiológicas de *Escherichia coli* e *Salmonella* nas kombuchas;
- Avaliar o perfil sensorial das bebidas obtidas por meio de testes de aceitação, intenção de compra, CATA e RATA.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Malvarisco

Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng., também descrito na literatura como *Plectranthus Aromamus* Roxb., *Coleus Aromamus* Benth. e *Coleus amboinicus* Lour., pertence à família Lamiaceae (Labiatae) e ao gênero o *Coleus*, conhecido atualmente como *Plectranthus*, apresentando cerca de 200 gêneros. O nome “amboinicus” faz referência a Ambon, uma ilha montanhosa e fértil situada nas Ilhas Molucas, próximo à Indonésia. A planta se espalhou a partir de Ambon para as Índias Orientais e África, sendo posteriormente naturalizada na América Latina pelos espanhóis, que a chamaram de “orégano de la Hoja Ancha” (Kumar, Singh e Kumar, 2020; Lukhoba, Simmonds; Paton, 2006). A Figura 1 apresenta os locais de maior incidência da planta.

Figura 1 - Distribuição geográfica de *P. amboinicus* na América do Sul



Fonte: Antar (2020).

A distribuição geográfica de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., conforme ilustrado no mapa, destaca uma presença marcante nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil, com uma maior concentração ao longo da costa. Além disso, o mapa revela incidências dessa planta em outros países sul-americanos, refletindo sua adaptabilidade a diferentes climas e ambientes. No entanto, é no Brasil que se observa a maior concentração, o que evidencia suas condições climáticas favoráveis (SIBBR, 2020). Maiores informações da nomenclatura e classificação filogenética da planta estão dispostas no Quadro 1.

Quadro 1 - Nomenclatura e classificação filogenética de *Plectranthus amboinicus*

	
REINO	Plantae
DIVISÃO	Magnoliophyta
CLASSE	Magnoliopsida
SUB CLASSE	Asteridae
ORDEM	Lamiales
TRIBO	Ocimae
FAMÍLIA	Lamiaceae
SUBFAMÍLIA	Nepetoidea
GÊNERO	<i>Plectranthus</i>
ESPÉCIE	<i>Plectranthus amboinicus</i>
AUTORIA	(Lour.) Spreng
NOMES COMUNS	Brasil: Malvarisco, Hortelã-da-folha-grossa, Hortelã-da-índia, Hortelã-graúda. Índia: Ajwain Patta, Patharchur, Indian Borage, Indian Mint, Karpooravalli. Filipinas: Oregano, Suganda, Cuban Oregano. Jamaica: Cuban Oregano, Mexican Mint, Spanish Thyme. Malásia: Bangun-bangun, Daun bangun-bangun, Daun kuban.

	África do Sul: Wild Borage, Broad-leaved Thyme. Indonésia: Daun lampunai, Kembang Bugang. Tailândia: Plu kao, Phak khao thong.
SINÔNIMOS	<i>Coleus amboinicus</i> , <i>Coleus aromaticus</i> , <i>Coleus carnosus</i> , <i>Coleus crassifolius</i> , <i>Coleus subfrutescens</i> , <i>Coleus suborbicularis</i> , <i>Coleus suganda</i> , <i>Coleus vaalae</i> , <i>Coleus amboinicus</i> var. <i>violaceus</i>

Fonte: Kumar; Singh; Kumar, (2020); Indiabiodiversity, (2020).

Trata-se de uma herbácea angiosperma dicotiledônea que exibe um crescimento colunar e uma vida perene, especialmente em climas tropicais. A planta pode alcançar uma altura de 0,3 m a 0,6 m e se espalhar lateralmente entre 0,6 m e 1,2 m. Essa planta é uma erva ereta com um hábito de crescimento espalhado, podendo alcançar até 45 cm de altura. A polinização da planta é realizada de forma biótica, por meio da fauna local. Para um crescimento saudável, a planta prefere condições de semi-sombra e requer regas moderadas, com uma taxa de crescimento moderada. Suas folhas são verdes, grossas, com pelos e amplamente ovais, com margens recortadas de cor branca a creme, e, quando esmagadas, exalam uma fragrância semelhante ao orégano. Os caules possuem uma seção transversal aproximadamente quadrada (National Parks, 2023).

3.1.1 Fitoquímicos

A quantidade de estudos investigando a composição química e as propriedades medicinais de *P. amboinicus* é diversa. Diferentes pesquisas relatam a presença de várias categorias de compostos naturais, o que inclui compostos voláteis e não voláteis Tabela 1. O foco das pesquisas tem sido associado ao isolamento de compostos bioativos específicos da planta e à compreensão de seu valor terapêutico. No entanto, a composição química e a distribuição dos componentes bioativos em diferentes partes da planta, bem como o teor de óleo essencial, podem variar de acordo com diversos fatores, como localização geográfica, clima e estágio de colheita da matéria-prima. Entre os solventes mais comumente empregados estão água, etanol e metanol. Esses solventes são utilizados de forma isolada ou em combinações específicas, variando as proporções para otimizar a extração dos compostos bioativos (Arumugam; Swamy; Sinniah, 2016).

Tabela 1 – Fitoquímicos reportados em diferentes extratos de *P. amboinicus*

Compostos	Solvente de extração	Teores (mg 100 g ⁻¹)	Referências
Quercetina	Água	225,69	(Donno <i>et al.</i> , 2021)
Quercitrina	Água	90,26	
(-) Epicatequina	Água	31,30	
Ácido clorogênico	Água	131,43	
Ácido cumárico	Água	53,55	
Ácido ferúlico	Água	325,72	
Ácido elágico	Água	63,50	
Limoneno	Água	194,16	
Sabineno	Água	6,87	
Terpinoleno	Água	6,62	
Ácido ascórbico	Água	15,71	
Ácido málico	Água	9,24	
Ácido tartárico	Água	64,47	
Ácido gálico	Etanol	113,45	(Rodrigues <i>et al.</i> , 2021)
Catequina	Etanol	189,43	
Ácido clorogênico	Etanol	406,23	
Ácido cafeico	Etanol	215,00	
Rutina	Etanol	109,00	
Quercitrina	Etanol	183,00	
Quercetina	Etanol	165,22	
Kaempferol	Etanol	28,00	(Taher <i>et al.</i> , 2021)
Ácido clorogênico	Metanol	0,102	
Ácido vanílico	Metanol	38,90	
Ácido cafeico	Metanol	5,10	
Ácido siríngico	Metanol	94,60	
Ácido p-cumárico	Metanol	8,00	
Ácido ferúlico	Metanol	4,90	
Ácido salicílico	Metanol	4,30	
Ácido rosmarínico	Metanol	102,10	
Ácido elágico	Metanol	72,10	
Miricetina	Metanol	60,60	
Rutina	Metanol	11,00	

Fonte: Autor (2025).

A variedade de compostos bioativos, identificados em *P. amboinicus*, destaca sua ampla investigação em processos inflamatórios e propriedades antibacterianas. É importante destacar que o perfil químico e a distribuição de constituintes bioativos variam consideravelmente em diferentes partes da planta. Essa variação é influenciada por inúmeros fatores, como

características geográficas, estação do ano, clima e método de extração (Swamy; Sinniah, 2015).

Dentre a riqueza de fitoquímicos oriundos da flora, o grupo que contempla os compostos fenólicos se destaca por sua maior variedade. Nesse contexto, *P. amboinicus* apresenta uma composição diversificada com compostos como ácidos cinâmicos, catequinas, monoterpenos, ácidos terpênicos, flavonóis e vitamina C.

3.2 Kombucha

3.2.1 Histórico da kombucha

O chá de kombucha é uma bebida fermentada originária do nordeste da China por volta de 220 a.C., disseminando-se no Japão em 414 d.C. como medicamento, espalhando-se por rotas comerciais para a Rússia e a Europa oriental (Jayabalan *et al.*, 2014).

Relatos históricos em diferentes culturas a descrevem como “Divine Che (remédio da imortalidade)” devido às suas propriedades medicinais, desintoxicantes e energizantes, bem como ao seu consumo associado ao tratamento e prevenção de doenças (Kim, Adhikari, 2020).

Durante a Segunda Guerra Mundial, essa bebida foi introduzida pela Alemanha. Nos anos 1950, ela chegou à França e às regiões do Norte da África sob domínio francês, onde seu consumo se tornou amplamente popular. Paralelamente, o hábito de consumir o chá fermentado resultou em uma escassez de folhas de chá e açúcar durante o período de guerra, levando à diminuição de seu consumo (Jayabalan; Malbaša; Sathishkumar, 2016).

3.2.2 Elaboração e comportamento fermentativo da kombucha

A produção típica da kombucha tem como base o chá preto, verde ou *oolong* obtidas da planta *Camellia sinensis*. Para sua produção utilizam-se 10 g de folhas de chá por litro de água, e, como substrato para bactérias e leveduras fermentadoras do chá, adiciona-se açúcar. Essa mistura forma um chá açucarado, ao qual adiciona-se a Cultura Simbiótica de Bactérias e Leveduras SCOBY (Leal *et al.*, 2018). As leveduras presentes na mistura são isoladas de uma kombucha pré-existente; dessa forma, elas pertencem a diversas espécies, sendo que as osmotolerantes, as fermentativas e as produtoras de ácido são as espécies presentes em maior quantidade. As bactérias predominantes na kombucha são as acéticas, principalmente dos gêneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter* (Coelho *et al.*, 2020).

O período de fermentação do chá de kombucha é de 3 a 7 dias, com um máximo de 14 dias. Sua fermentação é realizada em temperatura ambiente, otimizando o tempo de fermentação. Durante o processo fermentativo, ácidos orgânicos são produzidos, favorecendo a redução do pH do chá, levando à falta de oxigênio induzida pela acidez. Apesar de ser uma bebida de origem microbiana, devido à maior acidez do meio, o número de possíveis células microbianas patogênicas, se houver, diminui, resultando em uma bebida segura para o consumo (Leal *et al.*, 2018; Watawana *et al.*, 2015).

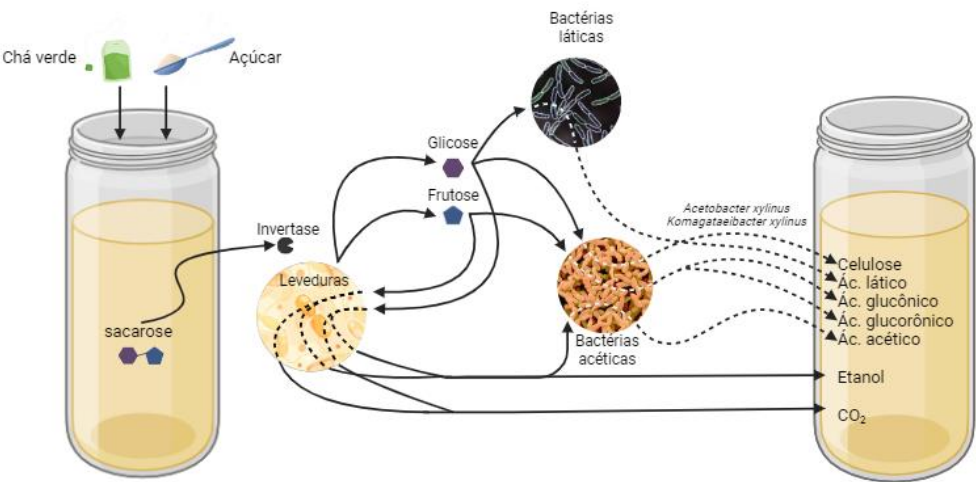
Os chás base destacam-se devido ao teor de cafeína que apresentam, e que é necessário para o desenvolvimento da cultura. Porém, é possível obter essa bebida utilizando outras matérias-primas base, nas quais a cultura simbiótica se desenvolve adequadamente (Coelho *et al.*, 2020).

3.2.3 Processo metabólico

O processo metabólico da produção do chá de kombucha ocorre de forma complementar entre leveduras e bactérias, ocorrendo duas fermentações até a obtenção do produto final. Inicialmente, por meio da enzima invertase, as leveduras hidrolisam a sacarose adicionada ao chá em frutose e glicose, que servirão como substrato para os micro-organismos durante o processo fermentativo, resultando na formação de etanol e dióxido de carbono, configurando o processo denominado fermentação alcoólica. Posteriormente, as bactérias presentes realizam a fermentação acética da mistura, processo que é caracterizado pela transformação do álcool em ácido acético, conferindo o sabor característico de vinagre ao produto, conforme descrito na Figura 2. Na fermentação do chá de kombucha, as bactérias acéticas realizam a conversão da glicose em ácido glucônico e a frutose em ácido acético (Villarreal-Soto *et al.*, 2018).

Além da produção de ácido acético e ácido glucônico, outras substâncias bioativas são geradas durante a fermentação, como ácidos orgânicos, vitaminas do complexo B e compostos fenólicos, que podem conferir benefícios à saúde. Durante o processo, a formação de celulose bacteriana também ocorre, resultando na camada gelatinosa conhecida como biofilme ou SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast). Esse biofilme atua como um suporte físico para a comunidade microbiana e pode ser reutilizado em novas fermentações (Villarreal-Soto *et al.*, 2019).

Figura 2 - Metabolismo microbiano na fermentação da kombucha



Fonte: adaptado de May *et al.* (2019).

Diante das variações de bactérias e leveduras utilizadas no processo, além da obtenção do produto das fermentações, a composição química da kombucha é muito variável, sendo dependente de diversos fatores, como por exemplo, o tipo de substrato utilizado e o tempo de fermentação (Tabela 2).

Tabela 2 – Composição química da kombucha elaborada com diferentes substratos

Substratos	Composição química					Referências
	pH	Ácido acético mg mL ⁻¹	Sólidos solúveis (°Brix)	Etanol (%)	Tempo de Fermentação (dias)	
Rooibos	-	4,89	-	1,14	14	(Gaggia <i>et al.</i> , 2018)
Chá verde e erva-mate	2,92	2,88	4,8	-	9	(Wanderley <i>et al.</i> , 2023)
Folhas de hibisco	2,30	-	-	1,97	10	(Mendonça <i>et al.</i> , 2023)
Chá preto	-	9,18	-	5,83	14	(Gaggia <i>et al.</i> , 2018)
Pimenta preta	3,49	1,42	6,0	0,30	8	(Alderson <i>et al.</i> , 2021)
Lúpulo	3,72	1,21	6,2	0,20	8	(Alderson <i>et al.</i> , 2021)
Kawakawa	3,50	1,55	6,0	0,40	8	(Alderson <i>et al.</i> , 2021)
Folhas de mamão	3,09	1,62	7,0	0,10	4	(Sharifudin <i>et al.</i> , 2021)

Fonte: autor (2025).

Em geral, a kombucha é composta por diversos ácidos orgânicos, como acético, glucônico, glucurônico, cítrico, láctico, málico, tartárico, entre outros. Além disso, contém

monossacarídeos, como sacarose, glicose e frutose, além de vitaminas como B1, B2, B6, B12 e C. Também são encontrados glicerol, aminoácidos, amins biogênicas, purinas, pigmentos, lipídeos, proteínas, algumas enzimas hidrolíticas, etanol e compostos com propriedades antibióticas (Jayabalan *et al.*, 2014; VillarreaL-Soto *et al.*, 2019).

A cultura simbiótica de leveduras e bactérias empregada para a fermentação da kombucha possui composição microbiológica variável de acordo com sua origem, clima, localização geográfica e meio utilizado para o processo de fermentação (Watawana *et al.*, 2015). No entanto, há uma série de espécies identificadas na kombucha de ocorrência na maioria das culturas, entre as quais se destacam espécies de leveduras dos seguintes gêneros: *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Pichia*, *Brettanomyces*, *Dekkera*, *Saccharomyces*, *Lachancea*, *Saccharomycoides*, *Schizosaccharomyces* e *Kluyveromyce* (Chakravorty *et al.*, 2016).

A composição da kombucha é altamente influenciada pelo tipo de chá utilizado na fermentação e pelos parâmetros de fermentação, como o tempo e a temperatura (Kapp; Sumner, 2019).

3.2.4 Legislação e parâmetros de identidade e qualidade da kombucha

A legislação brasileira, por meio da Instrução Normativa nº 41 de 17 de setembro de 2019, regulamentada pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, que estabelece os critérios de qualidade e composição da kombucha no país, a define da seguinte forma: “Kombucha é a bebida fermentada obtida através da respiração aeróbia e fermentação anaeróbia do mosto obtido pela infusão ou extrato de *Camellia sinensis* e açúcares por cultura simbiótica de bactérias e leveduras microbiologicamente ativas (SCOBY)” (BRASIL, 2019).

A legislação descreve ainda os ingredientes opcionais, tais quais: frutas; vegetais; especiarias; mel; melado; açúcares de origem vegetal; gás carbônico (CO₂); fibras, vitaminas, sais minerais e outros nutrientes; e aromatizantes e corantes naturais. Diante disso, a denominação da kombucha varia conforme os ingredientes adicionados e os processos de elaboração (Tabela 3). A adição de outros ingredientes como infusões de plantas em água, hortaliças, frutas, especiarias, mel, melaço e outros tipos de açúcares vegetais é facultativa (Brasil, 2019).

Tabela 3 - Diferentes denominações para kombucha, segundo a Instrução Normativa n° 41 de 2019 do MAPA.

Processo	Denominação
Adição de espécie[s] vegetal[is] antes da fermentação, associada a <i>Camellia sinensis</i> .	Kombucha de (nome da[s] espécie[s] vegetal[is])
Adição de ingrediente[s] opcional[is]	Kombucha com (nome do[s] ingrediente[s] opcional[is])
Adição de aromatizante natural	Kombucha com aroma de (nome do aromatizante natural)
Adição de gás carbônico	Kombucha gaseificada
Se contiver álcool acima de 0,5% v/v	Kombucha com álcool ou Kombucha alcoólica

Fonte: Brasil (2019).

No que diz respeito aos parâmetros microbiológicos para a bebida, a Instrução Normativa n° 41 deixa explícito apenas que não é permitida a adição dos microrganismos após a fermentação do produto. Já para os parâmetros físico-químicos, a IN n. 41 dispõe de limites mínimos e máximos, conforme a exposto na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros analíticos para kombucha

Parâmetro	Mínimo	Máximo
pH	2,5	4,2
Graduação alcoólica (% v/v) kombucha sem álcool	-	0,5
Graduação alcoólica (% v/v) kombucha com álcool	0,6	8,0
Acidez volátil (mEq/L)	30	130
Pressão (atm a 20 °C) na kombucha adicionada de CO ₂	1,1	3,9

Fonte: Brasil (2019).

Nos Estados Unidos, a kombucha é definida como bebida fermentada obtida por processo especializado, sendo necessária para sua fabricação a apresentação de um plano de Análise de Riscos e Pontos Críticos de Controle (HACCP). Não há um documento que regule a kombucha. Desse modo, a *Food and Drug Administration* (FDA) isenta bebidas fermentadas e alimentos enlatados acidificados. Portanto, parâmetros microbiológicos para essa bebida também não são reportados (FDA, 2009).

3.2.5 Mercado da kombucha

O setor de bebidas funcionais está em ascensão no que se refere aos alimentos voltados para o bem-estar. O aumento na busca dos consumidores por opções alimentares e bebidas que promovam a saúde impulsiona significativamente o crescimento da procura pelos alimentos funcionais. Para além de sua função primordial de fornecer nutrição essencial, esses produtos são reconhecidos por oferecer um ou mais benefícios, com respaldo científico, à saúde (Sääksjärvi; Holmlund; Tanskanen, 2009).

Conforme indicado por Grand View Research (2020), o mercado mundial da kombucha foi estimado em US\$ 1,67 bilhão em 2019 e espera-se uma expansão em um CTCA (Composto Taxa de Crescimento Anual) de 19,7% durante 2021–2026.

Atualmente, a principal região consumidora de kombucha é a América do Norte, seguida pela Europa. No entanto, prevê-se que o mercado da Ásia-Pacífico apresente um crescimento ainda mais acelerado, impulsionado pelo interesse crescente dos consumidores por alimentos e bebidas saudáveis, além do aumento da urbanização na região. No cenário competitivo, destacam-se empresas líderes como GT's Living Foods, Kevita, Health-Ade, Humm Kombucha e Revive Kombucha. Adicionalmente, marcas tradicionais de bebidas carbonatadas adentraram o mercado de kombucha por meio de aquisições e parcerias estratégicas com produtores especializados (Zanardi, 2023).

Em 2018, surgiu, no Brasil, a Associação Brasileira de Kombucha (ABKOM), reunindo cerca de quarenta e nove fabricantes. Um dos propósitos dessa empreitada foi estabelecer dados de comércio e normas para a bebida, assegurando que todas as marcas adotem um padrão uniforme de identidade e qualidade em virtude da falta de legislação para o produto nesse período (ABKOM, 2020).

De acordo com a associação, no Brasil, estima-se que são produzidos 1,6 milhão de litros de kombucha anualmente, com um faturamento de R\$ 18,9 milhões (ABKOM, 2020). Prevê-se que o mercado mantenha seu crescimento, impulsionado principalmente pelo interesse crescente dos consumidores em probióticos, bem como pela diversidade de sabores e marcas de kombucha disponíveis (Zanardi, 2023).

3.3 Compostos bioativos e antioxidantes

Os compostos bioativos têm uma relevância significativa no combate e/ou prevenção de diversas doenças e têm despertado grande interesse nos últimos anos devido aos seus potenciais

benefícios à saúde humana, como propriedades antimicrobianas, anticancerígenas, antioxidantes e melhora do sistema cardiovascular (Muñoz *et al.*, 2020).

As espécies reativas, ou radicais livres apresentam extrema resistência e grande potencial para reações químicas com outras moléculas, sendo os compostos mais conhecidos oxigênio, nitrogênio e enxofre. Esses elementos dão origem às espécies reativas de oxigênio (EROs), de nitrogênio (ERNs) e de enxofre (EREs), respectivamente. Estes compostos são produzidos naturalmente a partir do metabolismo celular, além de serem estimulados por fatores como tabagismo, poluição ambiental, radiação, drogas, pesticidas, solventes industriais e ozônio (Mironczuk-Chodakowska *et al.*, 2018).

O desequilíbrio ocasionado pela formação desenfreada de radicais livres, e a tentativa do sistema biológico em neutralizá-los, tende a contribuir para maior produção desses radicais. Moléculas de RNA (ácido ribonucleico), DNA (ácido desoxirribonucleico), proteínas, açúcares e lipídeos são tidos como os alvos principais dessas espécies reativas. Consequentemente, os danos ocasionados pelo ataque a essas moléculas agravam o desenvolvimento de doenças, como câncer, doenças crônicas, disfunções cardiovasculares, dentre outras patologias (Li *et al.*, 2021; Mironczuk-Chodakowska *et al.*, 2018).

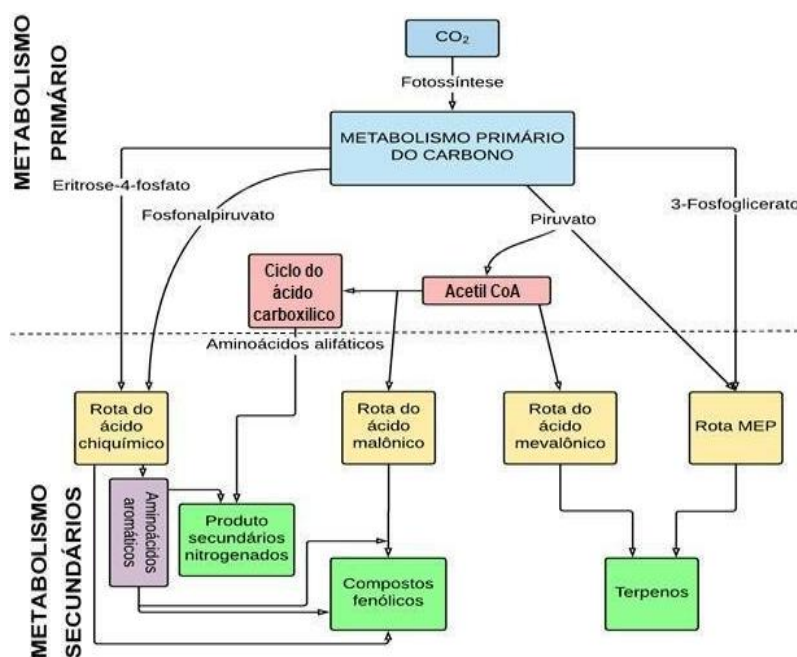
Os compostos bioativos com ação antioxidante podem ajudar na prevenção e na reparação de prejuízos causados pelo estresse oxidativo, que é causado quando os radicais livres produzidos em excesso são superiores às defesas naturais do organismo. Ou seja, os antioxidantes possuem a capacidade de reagir com os radicais livres e assim proteger o organismo dos seus efeitos maléficos (Jayabalan *et al.*, 2014).

Dentre o leque de compostos bioativos, o grupo dos compostos fenólicos estão amplamente distribuídos na natureza, contam com mais de 8 mil estruturas descritas, sendo um dos principais grupos de componentes dietéticos não essenciais produzidos pelas plantas como metabólitos secundários em condições normais e de estresse (Oroian; Escriche, 2015; Rodríguez-Pérez; Segura-Carretero; Del Mar Contreras, 2017).

A biossíntese de compostos fenólicos nas plantas envolve principalmente duas vias: a via do ácido chiquímico e a via do ácido malônico, sendo a primeira a principal. A via do chiquimato abrange sete etapas reacionais, iniciando-se com uma condensação aldólica entre o ácido fosfoenolpirúvico (PEP), proveniente da via glicolítica, e o D-eritrose-4-fosfato, do ciclo da pentose fosfato, resultando na formação do ácido 3-desoxi-D-arabino-heptulosônico 7-fosfato (DAHP). Um ponto de ramificação crucial dessa via é o ácido corísmico, que é o produto do caminho do chiquimato. Esses compostos fenólicos são produzidos, em grande parte, como mecanismos de defesa contra patógenos, para proteção contra radiação ultravioleta excessiva e

para atrair polinizadores. Além disso, os compostos fenólicos mais complexos desempenham um papel essencial na estrutura das plantas (Francenia Santos-Sánchez *et al.*, 2019). Um esquema simplificado da rota metabólica dos compostos secundários nos vegetais é descrito na Figura 3.

Figura 3 - Rota metabólica simplificada dos metabólitos secundários em vegetais



Fonte: Cavalcante, Fernandes e Santos (2022).

Frutas e outros vegetais (incluindo sucos 100% naturais, néctares, fatias de frutas secas e pó) que contêm compostos bioativos, como carotenoides, amins bioativas, ácido ascórbico e fenólicos, têm sido considerados alimentos potencialmente funcionais (Apak *et al.*, 2016).

A kombucha é rica em diversas substâncias bioativas, cuja presença está relacionada ao teor de polifenóis da matéria-prima utilizada, especialmente do chá. Além disso, os microrganismos presentes na fermentação conseguem realizar transformações enzimáticas de compostos orgânicos, gerando metabólitos eficientes como ácidos orgânicos, vitaminas, etanol, aminoácidos, enzimas hidrolíticas e minerais. A associação de leveduras e bactérias permite a utilização de substratos em diferentes vias metabólicas, resultando em uma variedade de compostos bioativos presentes na bebida (Jakubczyk *et al.*, 2020; Kitwetcharoen *et al.*, 2023). Diante disto, a kombucha apresenta uma composição bioativa que lhe confere possíveis efeitos na saúde, tais como ações antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, imunomoduladora e hepatoprotetora, conforme estudos prévios realizados em modelos animais (Saimaiti *et al.*, 2022).

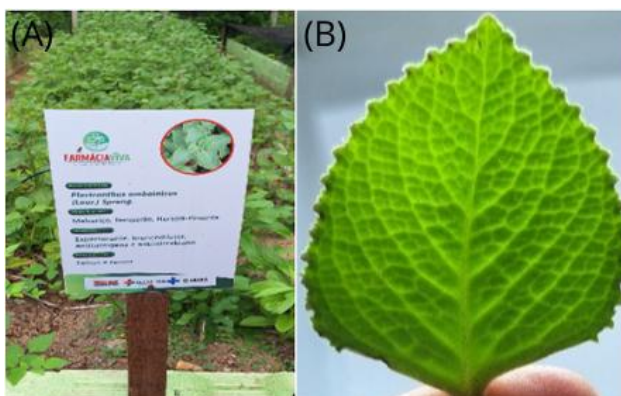
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção da matéria-prima

As folhas de malvarisco foram coletadas em campo mediante parceria com Instituto Municipal de Meio Ambiente – IMMAB, junto à farmácia viva presente na cidade de Limoeiro do Norte, localizada no Vale do Jaguaribe, no estado do Ceará. A amostra adquirida foi identificada anteriormente e possui exsicata disponível no Herbário Prisco Bezerra, Fortaleza, Ceará, Brasil. Coordenadas municipais: latitude: -5.153039853766158, longitude: -38.0961391966285, com código: EAC0054393. As coletas foram realizadas sempre no mesmo canteiro e horário (06:00), visando minimizar possíveis variações, em especial, de compostos bioativos na amostra.

O chá de arranque ou *starter*, os frutos (melancia - *Citrullus lanatus* Thunb. Mansf.; abacaxi - *Ananas comosus* (L.) Merrill.; pitaya - *Hylocereus costaricensis*.) e demais ingredientes necessários para elaboração, fermentação e saborização das kombuchas foram adquiridos no mercado local da cidade de Limoeiro do Norte - CE.

Figura 4 - (A) Local de coleta do malvarisco e (B) imagem ampliada da folha de malvarisco



Fonte: Autor (2025).

As folhas de malvarisco, frutos e demais utensílios utilizados foram sanitizados com solução clorada (150 ppm) por 15 minutos. Após enxágue com água, o material foi deixado dentro de formas plásticas perfuradas, para que o excesso de água escoasse. Posteriormente, foi utilizado na elaboração das bebidas.

Todas as etapas que envolveram a produção das kombuchas foram realizadas na Planta Piloto de Frutas e Hortaliças (PPFH) do Instituto de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) *Campus* Limoeiro do Norte.

4.2 Caracterização físico-química, cor, fitoquímicos e atividade antioxidante das folhas de *P. amboinicus*

4.2.1 Umidade

A determinação da umidade foi realizada por meio da técnica de secagem direta em estufa, conforme a metodologia descrita pela *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC, 2005).

Inicialmente, cadinhos de porcelana foram previamente secos em estufa (Heraeus®, UT6P) a 105 °C/1 hora e depois pesou-se 3 g das folhas. Em seguida, secou-se a amostra em estufa a 105 °C/6 horas. Após a secagem, os cadinhos foram resfriados em dessecador e devidamente pesados. Posteriormente à primeira pesagem, os cadinhos retornaram para a estufa por mais 1 hora, repetindo-se as etapas de resfriamento e pesagem até a verificação do peso constante. O resultado foi expresso em g 100 g⁻¹ de planta.

4.2.2 pH

A determinação do pH foi realizada pelo método potenciométrico, conforme a técnica descrita pela AOAC (2005).

Com o auxílio de balança analítica, 2 g da amostra foram pesados em um béquer de 50 mL e em seguida diluídos em 20 mL de água destilada. Procedeu-se com a leitura em potenciômetro (Yoke Instrument®, PHS-3C), previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

4.2.3 Cinzas

A determinação do teor de resíduo mineral fixo (cinzas) foi realizada pelo método gravimétrico, de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (2005).

Inicialmente 2 g da amostra foram pesados em cadinhos de porcelana previamente incinerados em forno mufla (Linn Elektro Therm®, AK) a 550 °C/1 hora. As amostras foram

carbonizadas em chapa aquecedora e em seguida incineradas em forno mufla a 550 °C/6 horas. Após a incineração, os cadinhos transferidos para estufa (Heraeus®, UT6P) a 105 °C/1 hora, e em seguida deixados resfriar em dessecador para posterior pesagem. Após a primeira pesagem, os cadinhos retornaram para estufa por mais 1 hora, repetindo-se as etapas de resfriamento e pesagem até a verificação do peso constante. O resultado foi expresso em g 100 g⁻¹ de planta.

4.2.4 Sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis foi determinado por meio do método refratométrico, segundo metodologia descrita pela AOAC (2005).

Com auxílio de balança analítica, 5 g da amostra foram pesados e diluídos em 20 mL de água destilada. O material foi centrifugado em centrífuga (Eppendorf®, 5804R) a 3000 rpm por 5 minutos. Utilizando pipeta de Pasteur, três gotas do sobrenadante foram colocadas sobre o prisma do refratômetro digital (Abbé®, Q767BD), e em seguida a leitura foi realizada, sendo expressa em °Brix. Posteriormente, o valor obtido foi corrigido em relação à temperatura ambiente por comparação com tabelas de referência.

4.2.5 Acidez total

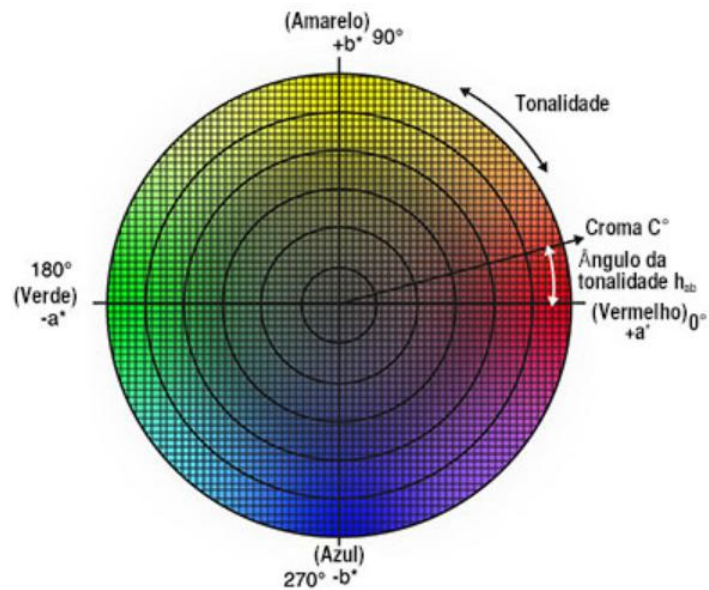
A determinação da acidez total foi realizada pelo método titulométrico, conforme a técnica descrita pela AOAC (2005).

Com o auxílio de balança analítica, foram pesados 3 g da amostra em um béquer de 250 mL, que foram posteriormente diluídos em 50 mL de água destilada e adicionados de 3 gotas de fenolftaleína (1%). Em seguida, titulou-se com uma solução de NaOH 0,1 M até mudança de cor para róseo claro. Os resultados foram expressos em porcentagem de acidez (% v/m).

4.2.6 Cor

A coloração das folhas de malvarisco foi determinada por leitura direta realizada a partir de um colorímetro MiniScan EZ 4500L spectrophotometer HunterLab®. Os resultados foram expressos de acordo com os valores do sistema de cor CIELab International Commission on Illumination (Figura 5).

Figura 5 - Diagrama de cor no espaço CIELab



Fonte: Konica Minolta (2023).

O Chroma, C^* (saturação ou intensidade da cor), e ângulo Hue, h^* foram obtidos por meio das Equações 1 e 2, respectivamente:

$$\text{Chroma} = (a^2 + b^2)^{1/2} \quad \text{Eq 1}$$

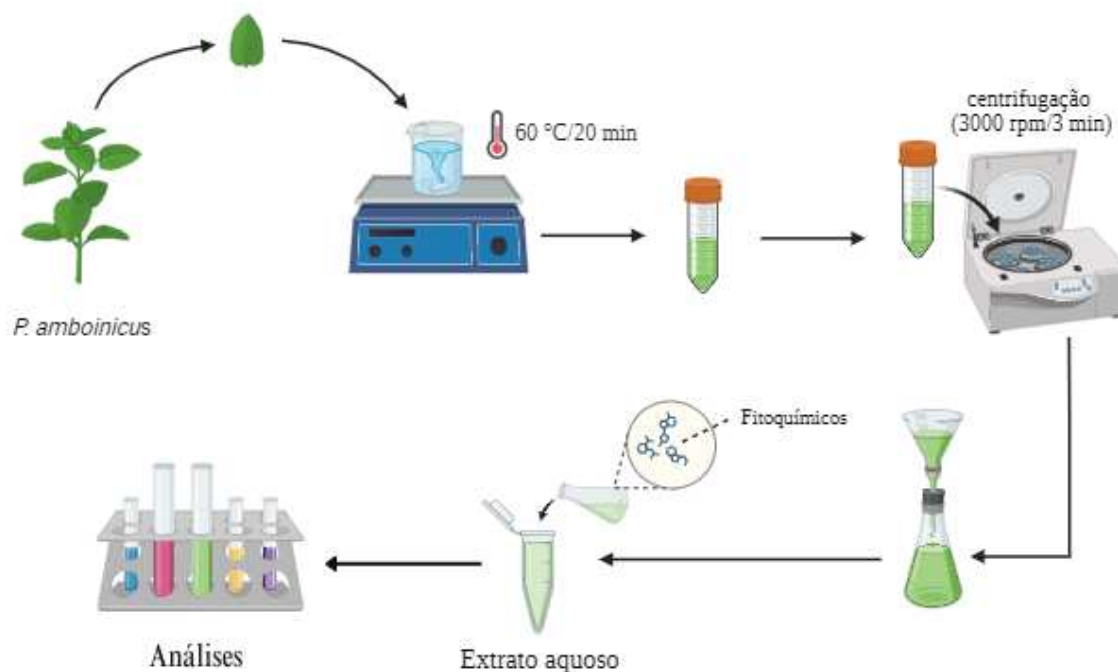
$$\text{Hue} = \text{arco tangente } (b/a) \quad \text{Eq 2}$$

4.3 Determinação de compostos bioativos e da atividade antioxidante das folhas de *P.amboinicus*

4.3.1 Preparo do extrato

O extrato foi obtido conforme o método descrito por Bassani *et al.* (2014) para infusões, com adaptações, de acordo com a Figura 6.

Figura 6 - Esquema para obtenção do extrato aquoso das folhas de malvarisco



Fonte: Autor (2025).

Inicialmente, 4 g das folhas de malvarisco *in natura*, previamente trituradas, foram pesadas em um béquer de 100 mL e submetidas a infusão com água ultrapura a 60 °C durante 20 minutos, com agitação em agitador magnético (CIENLAB®, CE-1540/A15) a 1000 rpm. Após esse tempo, o material foi centrifugado a 3.000 rpm em centrífuga (Eppendorf®, 5804R) durante 3 minutos, e então o sobrenadante foi recolhido. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em papel filtro qualitativo (Whatman n. 1). Com o extrato pronto, realizou-se uma diluição (1:10 em água ultrapura), obtendo-se um material com a concentração de 8000 mg L⁻¹, utilizado nas análises de compostos bioativos e atividade antioxidante.

4.3.2 Fenólicos totais

Os fenólicos totais nas folhas de malvarisco foram estimados conforme o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton; Rossi, 1965). Foram adicionados em tubos de ensaio 455 µL de Folin-Ciocalteu (2,0 N), seguidos de 3636 µL de água ultrapura, a 455 µL de amostra. Após 5 minutos, 455 µL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 0,943 mol L⁻¹ foram adicionados ao complexo. Os tubos permaneceram no escuro a 25 °C por 60 minutos e a absorbância foi registrada em espectrofotômetro (Biospectro®, SP-220) no comprimento de

onda de 725 nm. O branco consistiu em água ultrapura em substituição da amostra no meio reacional. O conteúdo de compostos fenólicos foi determinado a partir da curva padrão de ácido gálico e os dados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por 100 g (mg AGE 100 g⁻¹).

Os fenólicos totais das kombuchas também foram estimados utilizando o método do Azul da Prússia (Price; Butler, 1977). Em tubos de ensaio, foram adicionados 1000 µL de cloreto férrico hexahidratado (FeCl₃.6H₂O) 0,5 mmol L⁻¹, juntamente a 1000 µL do extrato das folhas de malvarisco (1:10 em água ultrapura), deixando reagir por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 1000 µL da solução de ferricianeto de potássio (K₃[Fe (CN)₆]) 0,5 mmol L⁻¹, e então a mistura foi agitada por 20 segundos, seguindo-se o repouso de 15 minutos a 25 °C no escuro. A absorbância foi registrada em comprimento de onda de 725 nm contra um branco (água ultrapura em substituição a amostra no meio reacional). O conteúdo de compostos fenólicos foi determinado a partir da curva padrão de ácido gálico e os dados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por 100 g (mg AGE 100 g⁻¹).

4.3.3 Flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi estimado pelo método colorimétrico proposto por Zhishen; Mengcheng; Jianming, (1999). Em tubos de ensaio adicionaram-se 250 µL de amostra previamente diluída (1:10 em água ultrapura), 2720 µL de etanol 30% e 120 µL da solução de nitrito de sódio (NaNO₂) 0,5 mol L⁻¹, com posterior agitação em vórtex. Aguardou-se a reação por 5 minutos e adicionaram-se 120 µL da solução de cloreto de alumínio hexahidratado (AlCl₃.6H₂O) 0,3 mol L⁻¹. Após agitação de mistura em vórtex e repouso por 5 minutos, 800 µL da solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol L⁻¹ foi adicionada ao meio reacional e misturada. Após 5 minutos de reação e estabilização da cor, o material foi lido em espectrofotômetro (Biospectro®, SP-220) no comprimento de onda de 510 nm. O meio reacional foi substituído pela água ultrapura, representando o controle negativo do ensaio. O conteúdo de flavonoides totais foi determinado a partir da curva padrão de quercetina e os dados foram expressos em mg de quercetina equivalente por 100g (mg QE 100 g⁻¹).

4.3.4 Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

O poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) foi realizada de acordo com Benzie e Strain (1996). A solução FRAP foi preparada a partir da junção de 2,5 mL da solução TPTZ

(10 mmol L⁻¹) diluída com ácido clorídrico 40 mmol L⁻¹, 2,5 mL de cloreto férrico hexahidratado (FeCl₃. 6 H₂O) 20 mmol L⁻¹ e 25 mL de tampão de acetato de sódio 0,3 mol L⁻¹ (pH 3,6). O experimento ocorreu a 37 °C e sob condições ácidas (pH 3,6). Foram adicionados 90 µL da amostra previamente diluída (1:10 em água ultrapura) juntamente a 270 µL de água ultrapura e 2700 µL de reagente FRAP em tubo de ensaio. As amostras reagiram por 30 minutos a 37 °C, e em seguida a absorbância foi registrada em espectrofotômetro (Biospectro[®], SP-220) no comprimento de onda de 595 nm. O poder de redução do ferro foi determinado a partir da curva padrão de sulfato de ferro II heptahidratado (FeSO₄. 7 H₂O) e os dados foram expressos em mg Fe (II) equivalente 100 g⁻¹ (mg Fe(II) E 100g⁻¹).

4.3.5 Atividade antioxidante pelo método 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)

A determinação da atividade antioxidante pelo método 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) foi realizada segundo Brand-Williams *et al.* (1995). Uma alíquota de 660 µL da amostra e 4333 µL de uma solução etanólica de DPPH 0,10 mM foram adicionadas aos tubos de ensaio. A mistura permaneceu no escuro a 25 °C por 30 minutos e a absorbância foi registrada em espectrofotômetro (Biospectro[®], SP-220) a 517 nm. A capacidade de captura do radical foi estimada pelo seu consumo no meio reacional e os resultados expressos em percentual de inibição, conforme a Equação 3:

$$\% \text{ atividade antioxidante} = [1 - (A_{517} \text{ amostra} / A_{517} \text{ branco})] \times 100 \quad \text{Eq 3}$$

4.3.6 Atividade antioxidante pelo método 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) modificado

A determinação da atividade antioxidante pelo método 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) modificado foi realizada segundo Staško *et al.* (2007). Alíquotas de 400 µL da amostra diluída (1:10 amostra: água ultrapura) foram transferidas para tubos de ensaio. 2600 µL de uma solução de DPPH 0,10 mM solubilizada em etanol e solução tampão fosfato de sódio monobásico 50 mM (pH 6,0) na proporção 1:1 foram adicionados à solução. Deixou-se a mistura reagir no escuro a 25 °C por 30 minutos e a diminuição da absorbância foi medida a 525 nm utilizando um espectrofotômetro (Biospectro[®], SP-220). A água ultrapura foi utilizada como branco e uma solução de DPPH sem amostra representou o controle do ensaio. A

capacidade de captura do radical foi estimada pelo seu consumo no meio reacional e os resultados expressos em percentual de inibição, conforme a Equação 4:

$$\% \text{ atividade antioxidante} = [1 - (A_{517} \text{ amostra} / A_{517} \text{ controle})] \times 100 \quad \text{Eq 4}$$

4.4 Planejamento experimental para determinação dos parâmetros fermentativos

Mediante ensaios prévios sobre o comportamento fermentativo da kombucha adicionada do malvarisco (Apendice G), utilizou-se um delineamento fatorial completo 3^2 , composto de 11 ensaios, sendo 9 ensaios em triplicata mais 3 pontos centrais, para avaliar o efeito das combinações de 2 variáveis independentes (tempo de fermentação e concentração de malvarisco) e suas interações nas respostas: pH, acidez total e sólidos solúveis. Os valores codificados e reais para os fatores estão representados na Tabela 5.

Tabela 5 - Matriz do delineamento fatorial 3^2 , com níveis reais e codificados das variáveis

Ensaios	Concentração de malvarisco (% m/v)	Tempo (dias)
A	5 (-1)	2 (-1)
B	5 (-1)	6 (0)
C	5 (-1)	10 (1)
D	10 (0)	2 (-1)
E*	10 (0)	6 (0)
F	10 (0)	10 (1)
G	15 (1)	2 (-1)
H	15 (1)	6 (0)
I	15 (1)	10 (1)
J*	10 (0)	6 (0)
K*	10 (0)	6 (0)

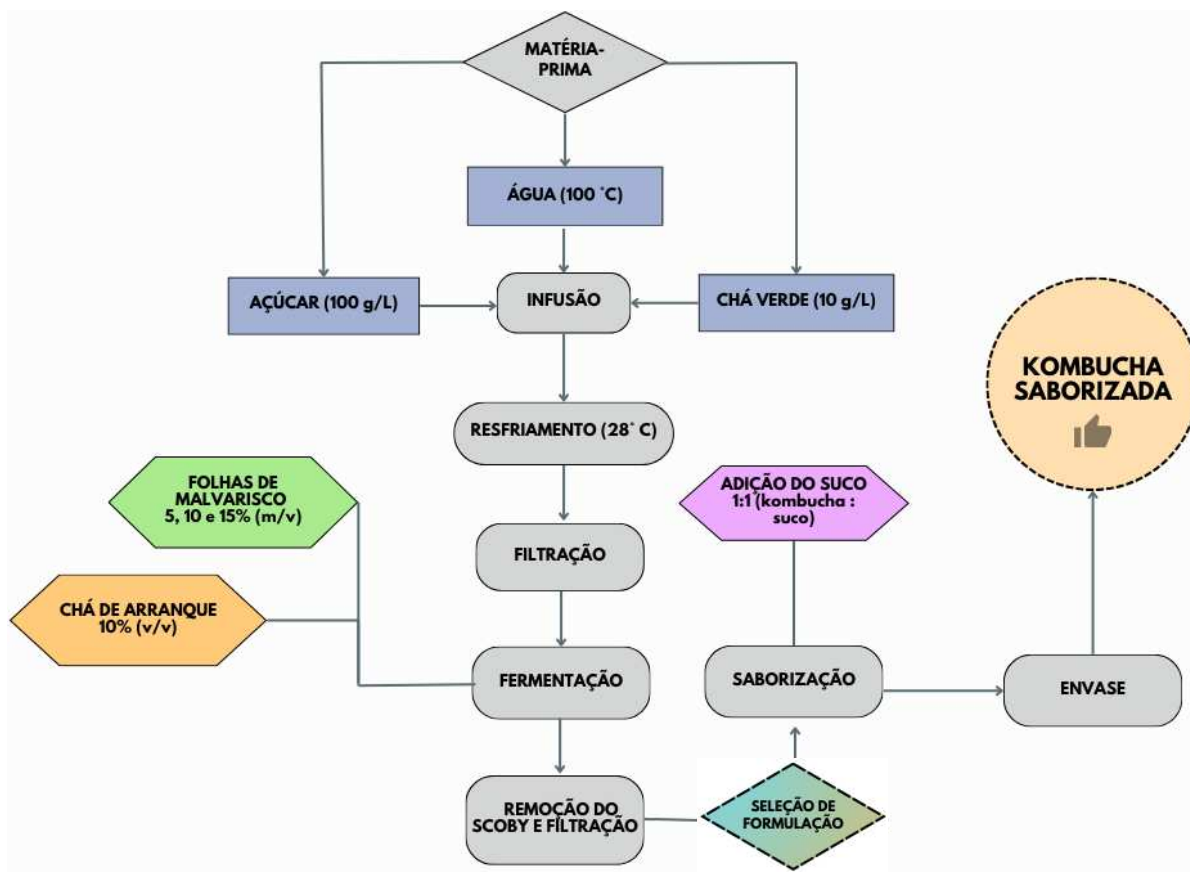
*Pontos centrais.

4.5 Elaboração das kombuchas

As bebidas foram elaboradas seguindo-se a metodologia descrita por Morales *et al.* (2023), com adaptações. Os ensaios foram realizados de acordo com o modelo proposto pelo delineamento, por meio de combinações entre concentração de malvarisco e tempo de fermentação da bebida. As etapas que compreendem sua produção, desde o preparo da infusão,

adição do malvarisco, fermentação e pós-fermentação, podem ser observadas no fluxograma apresentado na Figura 7.

Figura 7 - Fluxograma de produção das kombuchas



Fonte: Autor (2025).

4.5.1 Preparo do chá verde

O chá foi preparado por meio do processo de infusão. Após o aquecimento da água a 100 °C, foram adicionados 100 g/L de açúcar e 10 g/L de folhas secas de chá verde (*Camellia sinensis*), deixando-os em infusão por 10 minutos. Após esse tempo, o chá foi resfriado até 28 °C e coado em filtro de pano para retenção das folhas.

4.5.2 Inoculação da cultura

Posteriormente, transferiu-se o chá para recipientes de vidro com volume de 3 litros e 9,5 centímetros de diâmetro de abertura, previamente lavados e sanitizados. Além desses processos, antes da transferência do chá, foi realizada uma lavagem dos potes com vinagre de

álcool, com o objetivo de condicionar o meio para os microrganismos fermentadores. Em seguida, realizou-se a inoculação das bebidas com o chá de arranque 10% (v/v), que consiste em uma porção de uma kombucha já pronta e que contém a cultura responsável pela fermentação da bebida. O chá de arranque, também chamado *starter*, auxilia na redução do pH do meio, tornando-o favorável para que os processos fermentativos ocorram de maneira mais acelerada, bem como para a multiplicação da cultura.

4.5.3 Adição do malvarisco

Após a inoculação da cultura, seguindo as combinações propostas pelo delineamento, adicionaram-se as folhas de malvarisco trituradas, previamente sanitizadas. As aberturas dos recipientes foram cobertas com tecido de microfibra, que foi preso com elástico de borracha. Logo em seguida, os recipientes foram acondicionados para fermentação.

4.5.4 Fermentação

A fermentação foi conduzida com o acondicionamento dos recipientes em B.O.D. (*Biological Oxygen Demand*) (SolidSteel, SSBODu 342L) em temperatura constante de 30 °C com duração de 2, 6 e 10 dias, conforme modelo proposto no delineamento experimental. Durante os dias de fermentação, foram retiradas alíquotas das amostras para as análises de acompanhamento do processo (pH, acidez total e sólidos solúveis).

Figura 8 - Kombuchas acondicionada nos recipientes de fermentação



Fonte: Autor (2025).

Após a fermentação, removeu-se o SCOBY e a bebida foi filtrada com auxílio de filtro de pano, para garrafas de polietileno com tampa, devidamente sanitizadas. Após essa etapa, a bebida foi refrigerada a 8 °C.

4.5.5 Seleção da formulação base

A formulação base foi selecionada com o objetivo de se obter uma kombucha com melhores parâmetros físico-químicos, usando como base o acompanhamento fermentativo, previamente realizado (Apêndice G) e os limites mínimos e máximos estabelecidos para os padrões de identidade e qualidade da kombucha (BRASIL, 2019). Essa seleção também teve como objetivo, em conjunto com a etapa de saborização, desenvolver uma bebida com boa aceitação sensorial.

Com a obtenção da formulação base (KB), procedeu-se com a elaboração da bebida nessas condições. Nessa etapa, elaborou-se em paralelo uma kombucha controle (KC), sem adição de malvarisco, nas mesmas condições de tempo de fermentação da formulação base. Posteriormente, a formulação base foi saborizada com sucos de frutas.

4.5.6 Preparo dos sucos

Nessa etapa, utilizou-se as frutas abacaxi (*Ananas comosus*), pitaya (*Hylocereus costaricensis*) e melancia (*Citrullus lanatus*). Os sucos de pitaya e de abacaxi foram elaborados na proporção de 1:2 (polpa: água m/v), enquanto para o suco de melancia utilizou-se apenas a polpa do fruto. Não foi realizada adição de açúcar. Após o preparo, os sucos de abacaxi e pitaya foram filtrados, em filtro de pano, para reter o excesso de resíduos sólidos.

Para o suco de melancia, foi realizado um tratamento enzimático de clarificação, com adição de pectinase (Pectinex Ultra SP-1®) 0,1% (v/v) ao suco e incubação a 40 °C em B.O.D. durante 90 minutos. Após esse tempo, o suco foi transferido para provetas de 1 L e mantido sob refrigeração durante 24 horas, a fim de decantar o restante dos sólidos em suspensão (Figura 9). Passado esse tempo, o suco foi pasteurizado a 70 °C por 15 minutos. Após o resfriamento rápido, foi utilizado com os demais sucos para a saborização da kombucha base (KB). O processo se fez necessário mediante testes prévios, em que a utilização do suco de melancia sem o tratamento enzimático comprometia a estabilidade da bebida armazenada sob refrigeração, tornando-a susceptível à uma rápida degradação microbiológica.

Figura 9 - Resíduos depositados no fundo da proveta após refrigeração do suco de melancia com o tratamento enzimático



Fonte: Autor (2025).

4.5.7 Saborização

Após o processo fermentativo, a kombucha base foi saborizada separadamente com o suco de melancia clarificado, suco de pitaya e suco de abacaxi, na proporção 1:1 (kombucha:suco). Após homogeneização, obteve-se três bebidas: kombucha de abacaxi (KA), kombucha de pitaya (KP) e kombucha de melancia (KM). Em seguida, as kombuchas saborizadas foram envazadas em garrafas de polietileno com tampa e armazenadas a 8 °C para posteriores análises. Assim como as kombuchas saborizadas, a kombucha base de malvarisco (KB) e a kombucha controle (KC) também foram analisadas.

4.6 Caracterização físico-química das kombuchas

4.6.1 Teor alcoólico

O teor alcoólico das bebidas elaboradas foi determinado por ebulliometria, utilizando-se ebuliômetro (Toscolab), conforme as orientações do fabricante.

Inicialmente, a calibração do equipamento foi realizada adicionando-se uma alíquota de 50 mL de água destilada em sua caldeira, com o objetivo de determinar o ponto de ebulição da

água. Após o aquecimento, o ponto de ebulição foi verificado com o auxílio de termômetro digital acoplado ao equipamento. Em seguida, desprezou-se a água e adicionaram-se 50 mL da amostra na caldeira visando a determinação do seu ponto de ebulição. Os resultados foram expressos de porcentagem de álcool na amostra.

4.6.2 *Acidez total*

A determinação da acidez total foi realizada pelo método titulométrico, conforme a técnica descrita pela AOAC (2005).

Com o auxílio de uma pipeta graduada, foram transferidos 5 mL da amostra para um béquer de 250 mL, que foram posteriormente diluídos em 50 mL de água destilada e adicionados de 3 gotas de fenolftaleína (1%). Em seguida, titulou-se com uma solução de hidróxido de sódio NaOH 0,1 M até mudança de cor para róseo claro. Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido acético.

4.6.3 *Acidez volátil*

A determinação da acidez volátil foi realizada pelo método titulométrico, mediante a destilação da amostra por arraste a vapor, conforme a técnica descrita pela AOAC (2005).

Com auxílio de pipetas volumétricas, transferiram-se 10 mL da amostra para um tubo de ensaio, posteriormente acoplado no aparelho destilador. Em seguida, aqueceu-se a caldeira com água destilada para que o vapor entrasse em contato com a amostra e realizasse o arraste dos ácidos voláteis presente na mesma. Após o processo de condensação, recolheram-se cerca de 100 mL da amostra em Erlenmeyer de 250 mL previamente adicionados de 20 mL de água destilada. Em seguida, adicionaram-se 5 gotas do indicador fenolftaleína 1% e procedeu-se com a titulação da amostra com a solução padronizada de NaOH 0,1 N até a coloração rosa persistente. Os resultados foram expressos em mEq.L^{-1} .

4.6.4 *pH*

A análise foi realizada conforme descrito no tópico 4. 2. 2.

4.6.5 Sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis foi determinado por leitura direta em refratômetro digital (Abbé®, Q767BD), de acordo com metodologia descrita pela AOAC (2005).

4.7 Cor

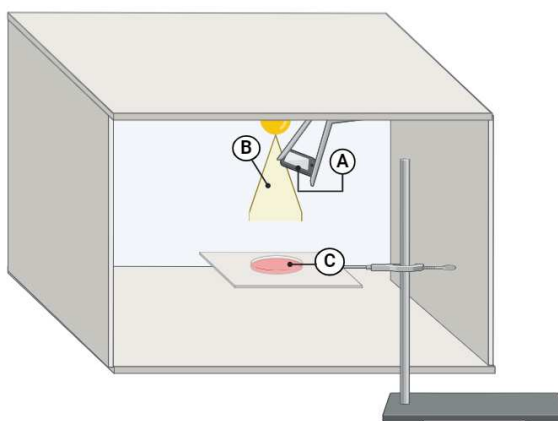
Para análise dos parâmetros de cor, foi utilizado um sistema conforme descrito por León *et al.* (2006), com adaptações, representado na Figura 10.

As amostras foram fotografadas com um smartphone Galaxy A54 5G, configurado com uma resolução de 1884×4080 pixels (8MP), ISO 64, distância focal de 23 mm, abertura de f/1.8, exposição de 0,0ev e tempo de exposição de 1/120s, assegurando a alta qualidade necessária para a análise.

Para garantir a consistência das condições de iluminação, foi utilizado um dispositivo que controlava a luz ambiente, direcionando-a de forma oposta à lente da câmera. Um filtro especial foi empregado para minimizar reflexos na superfície do líquido, garantindo a captura de imagens digitais adequadas para o processamento.

Para as fotos, 15 mL de cada uma das amostras foram colocados em recipientes com 15 mm de altura e realizou-se o ajuste da iluminação especificamente para a fotografia.

Figura 10 - Esquema montado para padronização das condições de iluminação e resolução das imagens obtidas. A - Captura de imagem; B – Fonte de luz; C – Amostra



Fonte: Autor (2025).

As imagens foram processadas utilizando um script em Python, no qual foram centralmente cortadas para um tamanho específico e as médias das cores calculadas nos espaços

de cor CIELab e RGB, onde, L^* = luminosidade, a^* = coordenada vermelho / verde e b^* = coordenada amarela / azul. Por fim, os valores médios de L^* , a^* , b^* e R, G, B foram armazenados em um DataFrame e exportados para um arquivo CSV. Para cada amostra, as medições foram realizadas em cinco zonas distintas e não sobrepostas, e a média dos valores foi utilizada para determinar os parâmetros Chroma C^* (saturação ou intensidade da cor) e ângulo Hue.

O *browning index* (BI) foi avaliado conforme reportado por Mohapatra *et al.* (2010), utilizando a Equação 5; e a diferença total de cor (ΔE^*) foi calculada por meio da Equação 6:

$$BI = 100 \times \left(\frac{x-0,31}{0,17} \right) \quad \text{Eq 5}$$

$$\text{onde, } x = \frac{(a^*+1,75L^*)}{(5,645L^*+a^*-3,012b^*)}$$

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{Eq 6}$$

4.8 Determinação de compostos bioativos e atividade antioxidante das kombuchas

4.8.1 Fenólicos totais

O teor de fenólicos totais nas kombuchas foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu proposto por Singleton e Rossi (1965) e Azul da Prússia proposto por Price e Butler (1977), conforme descrito no tópico 4.3.2.

4.8.2 Flavonoides totais

Os flavonoides totais foram determinados de acordo com método descrito por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999), com base na capacidade dos flavonoides em formar um complexo colorido com cloreto de alumínio ($AlCl_3$), conforme descrito no tópico 4.3.3.

4.8.3 Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

A determinação da atividade antioxidante foi realizada pelo método espectrofotométrico descrito por Benzie e Strain (1996), com base na redução do complexo férrico-tripiridiltriazina

(Fe^{III}-TPZ) em complexo ferroso (Fe^{II}-TPZ) por antioxidantes em condições ácidas, conforme relatado no tópico 4.3.4.

4.8.4 Atividade antioxidante pelo método 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)

A determinação da atividade antioxidante foi realizada por meio do método espectrofotométrico descrito por Brand-Williams *et al.* (1995), com base na captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, conforme descrito no tópico 4.3.5.

4.8.5 Atividade antioxidante pelo método 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) modificado

O potencial antioxidante foi determinado pelo método de DPPH adaptado por Staško *et al.* (2007), com base na capacidade de medir o efeito de transferência de elétrons tanto de antioxidantes hidrofílicos quanto lipofílicos para o radical DPPH, conforme descrito no tópico 4.3.6.

4.9 Determinações cromatográficas

4.9.1 Amostras e preparo dos padrões

Para a análise foram selecionadas as amostras das kombuchas KC, KB, KM, KA, KP e o extrato de malvarisco - EM obtido no item 4.3.1.

Os padrões analíticos foram adquiridos na Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Os solventes usados para a extração foram de grau analítico (Vetec®) e, para as análises, de grau HPLC (J.T. BAKER®). A água foi purificada com um sistema Milli-Q (UV Direct3). As amostras (liofilizadas) e soluções preparadas para análises foram filtradas em membrana de náilon de 0,45 µm e filtro de membrana de 0,22 µm (Millipore), respectivamente, antes do uso. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.9.2 Equipamento e análises

A cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC-DAD) foi realizada no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) da Universidade Estadual do Ceará, *campus* Itaperi,

Fortaleza-CE, com um sistema de HPLC Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com bombas alternativas Shimadzu LC-20AD conectadas a um degaseificador DGU 20A5 com um CBM 20A integrador, detector de matriz de diodos SPD-M20A e software LC Solution 1.22 SP1. As análises cromatográficas foram realizadas em uma coluna de fase reversa Shim-pack (CLC) ODS GOLD (4,6x250mm, 5 μ m). As fases móveis C e D foram acetonitrila e água Milli-Q acidificada com ácido fosfórico (pH 2,8), respectivamente, com o seguinte gradiente de solvente: 0-15 minutos, uma eluição isocrática com C:D (20:80 v/v); 17-25 minutos, variação linear até C:D (40:60 v/v); 25-40 minutos, uma eluição isocrática com C:D (20:80 v/v). A vazão foi de 1,0 mL minutos⁻¹, com volume de injeção de 20 μ L e comprimento de onda de 350 nm. Foi preparada uma solução estoque de referência de cada padrão em metanol HPLC em uma faixa de concentração de 0,0001–1,0 mg mL⁻¹. Os picos da cromatografia foram confirmados comparando o seu tempo de retenção com o do padrão de referência e por espectros DAD (200 a 400 nm). As amostras foram analisadas em triplicata e medidas as áreas médias dos picos.

4.10 Toxicidade e inflamação

Com o objetivo de verificar se a concentração de *P. amboinicus* utilizada para elaboração das kombuchas apresentava alguma toxicidade para a bebida, foram selecionadas amostras da kombucha controle (KC) e kombucha base (KB) nos testes de toxicidade e inflamação aguda em doses de 4, 20 e 40 mg Kg⁻¹ em modelo *zebrafish*.

4.10.1 Modelo animal Zebrafish

Zebrafish adulto (*Danio rerio*) silvestre, de ambos os sexos (idade de 90 a 120 dias; 0,4 $\pm$ 0,1 g, 3,5 $\pm$ 0,5 cm), foram adquiridos em uma loja local da cidade de Fortaleza-CE. Os peixes foram mantidos em um aquário de vidro (30 $\times$ 15 $\times$ 20 cm) de 9 L ($n = 3/L$), a uma temperatura de 25 $\pm$ 2 °C e pH 7,0, em ciclo circadiano 10 - 14 h (claro/escuro) com água tratada (ProtecPlus®) e bomba de ar com filtros submersos. Os peixes receberam ração (*Spirulina*®) *ad libitum* até 24 h antes dos experimentos. Antes das aplicações dos tratamentos, os animais foram anestesiados em água gelada e após os experimentos, os animais foram sacrificados por imersão em água gelada (2 e 4 °C) por 10 minutos até a perda dos movimentos operculares. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do

Ceará (CEUA-UECE; n. 04983945/2021), estando de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal.

4.10.2 Protocolo geral

Peixes adultos de ambos os sexos foram escolhidos aleatoriamente nos experimentos, transferidos para uma esponja úmida, tratados com a amostra teste ou controles. Os tratamentos foram realizados por via intraperitoneal (i.p.) ou via oral (v.o.), com base nas metodologias propostas por Bezerra *et al.* (2021). Em seguida, os animais foram acondicionados individualmente em recipiente (500 mL) contendo 350 mL de água do aquário e mantidos em repouso. Para tratamentos intraperitoneais foram utilizadas seringas de insulina (0,5 mL; UltraFine® BD) com agulha de calibre 30G, e para tratamento via oral foi utilizada micropipetadora automática monocal (10 – 100 µL).

4.10.3 Tratamentos

No teste de inflamação os animais ($n = 6/\text{grupo}$) foram tratados com as amostras de KC e KB (4; 20 e 40 mg Kg^{-1} ; 20 µL; v.o.); ibuprofeno (100 mg Kg^{-1} ; 20 µL; v.o. - controle positivo); κ - Carragenina (1,5%; 10 µL, i.p. - controle negativo) ou veículo (solução de DMSO a 3%; 20 µL; v.o.).

4.10.4 Indução de edema abdominal por κ -Carragenina 1,5%

Durante o teste de inflamação, foram observados o desenvolvimento ou a ausência de edema abdominal e a variação de peso dos peixes induzidos pela κ -Carragenina 1,5%, ao longo de um período de 4 horas. Os peixes sem tratamento foram inicialmente identificados e pesados e, em seguida, 3 grupos ($n = 6$) foram tratados com KC e KB (4; 20 e 40 mg Kg^{-1} ; 20 µL; v.o.), outro grupo com ibuprofeno (100 mg Kg^{-1} ; 20 µL; v.o. - controle positivo) e um grupo sem tratamento foi incluso (solução de DMSO a 3%, 20 µL; v.o. - controle negativo). Após o período de 1 hora em repouso, todos os grupos receberam uma aplicação intraperitoneal de κ -Carragenina 1,5%, permanecendo em repouso por mais 1 hora. Após esse período, os peixes foram pesados a cada hora, continuamente, durante 4 horas seguidas. Os dados foram representados graficamente, calculando-se a diferença entre o peso inicial dos peixes sem tratamento e o peso registrado a cada hora após a aplicação da κ -Carragenina.

4.10.5 Toxicidade aguda 96h

Neste teste, os peixes ($n = 6$ / grupo) foram tratados por via oral (v.o.) com cada amostra de KC e KB (4; 20 e 40 mg Kg⁻¹; 20 µL) ou veículo (controle: DMSO a 3 %; 20 µL; v.o.). Após os tratamentos, os animais foram deixados em repouso para análise da taxa de mortalidade por um período de 96h, e a cada 24h registrou-se o número de peixes mortos em cada grupo, sendo observada a dose letal capaz de matar 50% dos animais (DL₅₀), determinado pelo método matemático Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95%.

4.11 Análises microbiológicas

Os Padrões de Identidade e Qualidade – PIQ's para kombucha descritos na Instrução Normativa n. 41, de 17 de setembro de 2019, não estabelecem parâmetros microbiológicos para esse tipo de produto. No que diz respeito aos microrganismos, a instrução normativa relata apenas que aqueles provenientes da formação do SCOBY podem estar presentes na bebida, entretanto proíbe a adição dos mesmos ao produto final (Brasil, 2019).

No entanto, as análises microbiológicas de contagem para *Escherichia coli* e detecção de *Salmonella* foram realizadas nas bebidas conforme metodologias descritas por Silva *et al.* (2017), e comparadas aos parâmetros descritos na Consolidação das Normas de Bebidas, Fermentado Acético, Vinho e Derivados da Uva e do Vinho, que têm como objetivo consolidar, em documento único, as normas brasileiras que tratam do Registro, dos PIQ's, da Classificação, da Rotulagem, da Importação e da Exportação de Bebidas, Fermentado Acético, Vinho e Derivados da Uva e do Vinho, bem como estabelecer os Parâmetros Analíticos Exigíveis em função do Laudo/Certificado a ser emitido e da finalidade da análise (Brasil, 2024).

4.12 Análise sensorial

A kombucha controle (KC) e as kombuchas saborizadas: kombucha pitaya (KP), kombucha abacaxi (KA) e kombucha melancia (KM), foram selecionadas para a avaliação sensorial. Foi realizado um grupo de foco composto por 8 indivíduos (4 mulheres e 4 homens, com idade média de 26 anos) discentes de pós-graduação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) e Universidade Estadual do Ceará (UECE), em 2 sessões de 40 minutos, nas quais as quatro amostras foram apresentadas e seus descritores estabelecidos.

Posteriormente, foi aplicado o teste sensorial com 120 avaliadores não treinados, no laboratório de Análise Sensorial do IFCE - *Campus* Limoeiro do Norte, em cabines individuais e sob luz branca, por meio dos testes de aceitação por escala hedônica estruturada de 9 pontos, atitude de compra, frequência de consumo, CATA (*check-all-that-apply*) e RATA (*rate-all-that-apply*) (Dutcosky, 2019; Meyners, *et al.*, 2016).

Foi utilizado um delineamento balanceado em blocos completos casualizados. Aproximadamente 30 mL das amostras foram servidos em copos de plástico, codificados com números aleatórios de 3 dígitos, a 20 °C. Os provadores foram instruídos a ingerir água e biscoito tipo água e sal, para limpeza do paladar entre as amostras, assim como degustar as amostras uma por vez e no momento preencher a ficha do teste sensorial disponibilizada.

As análises que ocorreram mediante a participação de seres humanos só foram iniciadas após aprovação pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos com Parecer n. 7.084.791 em cumprimento à Resolução n. 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde (Brasil, 2013).

4.13 Análise estatística

A estatística da pesquisa foi aplicada por meio de técnicas paramétricas para a modelagem matemática de processos, utilizando um delineamento fatorial completo 3^2 (Equação 7), seguido de uma análise de regressão múltipla. Também foram analisados os critérios de ajuste, a qualidade e a previsibilidade dos modelos obtidos. Foi verificado se os dados atendiam aos requisitos de parametricidade e homocedasticidade. A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk, enquanto a homocedasticidade foi examinada com o teste de Brown-Forsythe.

$$Y_{n(x)} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon \quad \text{Eq 7}$$

Onde: Y_n é a resposta prevista; β_0 é o modelo de intercepto; β_1 e β_2 são os coeficientes do efeito linear, β_{11} e β_{22} coeficientes do efeito quadrático; β_{12} o coeficiente de interação dos efeitos; X_1 e X_2 representam as variáveis independentes codificadas (concentração de malvarisco e tempo de fermentação, respectivamente); ε representa o erro experimental.

Os resultados das análises físico-químicas, dos compostos bioativos e das análises microbiológicas foram apresentados como médias e desvio padrão dos experimentos

independentes realizados em triplicata ($n = 3$). Os dados foram então submetidos a uma análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Fisher LSD, com um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Para as médias dos valores hedônicos obtidos na análise sensorial, dos dados de toxicidade e de inflamação aguda ($n = 6$) também se utilizou a ANOVA seguida do teste de Tukey a 5% de significância. Para CATA foi aplicado o Teste Q de Cochran com o objetivo de identificar diferenças significativas em cada atributo e o teste das Comparações múltiplas pareadas McNemar (Bonferroni) para avaliar diferenças significativas entre os tratamentos. A análise de correspondência também foi utilizada com o objetivo de observar como os tratamentos se distribuíram de acordo com os descritores selecionados.

As pontuações RATA foram calculadas somando as pontuações fornecidas pelos consumidores que selecionaram o termo como “aplicável” para descrever os tratamentos. As médias de intensidade foram avaliadas por meio da ANOVA e as diferenças significativas entre os tratamentos utilizando-se teste das Comparações múltiplas pareadas McNemar (Bonferroni).

A análise de Componentes Principais (ACP) também foi aplicada com o objetivo de observar como os tratamentos se distribuíram de acordo com os descritores selecionados e suas intensidades.

Os dados foram processados utilizando os softwares Statistica v. 10.0 (StatSoft Inc., EUA), Microsoft Office Excel® v. 2016 (Microsoft Inc., EUA), GraphPad Prism v. 8.0 e Action v.2.6 (Statcamp, Brasil).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química e cor das folhas de *P. amboinicus*

O malvarisco, por se tratar de uma herbácea suculenta, possui características distintas quando comparadas com outras plantas, tendo em vista sua facilidade de adaptação às condições ambientais, bem como suas características aromáticas associadas à sua matriz de composição. A Tabela 6 apresenta os dados de caracterização da planta.

Tabela 6 - Caracterização físico-química, fitoquímica e atividade antioxidante da folha de *P. amboinicus*

Parâmetros	<i>P. amboinicus</i> (malvarisco)
Umidade (g 100 g ⁻¹)	94,30 ± 0,07
Acidez total titulável (%)	5,20 ± 0,00
pH	4,72 ± 0,00
Sólidos solúveis (°Brix)	2,80 ± 0,05
Cinzas (g 100 g ⁻¹)	1,14 ± 0,01
Cor instrumental	
L*	40,45 ± 0,10
a*	-28,48 ± 0,13
b*	16,21 ± 0,09
Hue° h*	150,4 ± 0,05
Chorma C*	22,41 ± 0,07

L*, a* e b* - parâmetros CIELab; C*- chroma; h*- ângulo hue.

Fonte: Autor (2025).

O resultado para análise de umidade revelou o valor de 94,3 g 100 g⁻¹, aproximando-se dos valores obtidos por Castillo-Téllez *et al.* (2024), de 87 g 100 g⁻¹, em seu estudo sobre cinética comparativa de secagem de folhas de *P. amboinicus*.

O pH de 4,72 apresentado pela amostra configura um caráter ligeiramente ácido para as folhas do malvarisco. Esse comportamento pode ser atribuído aos ácidos orgânicos presentes e se relaciona ao valor de 5,2% obtido na análise de acidez total. Para o parâmetro de sólidos solúveis, o valor 2,8 °Brix mostra um comportamento já esperado para a amostra com base na baixa disponibilidade de sólidos dissolvidos presentes nas folhas das plantas.

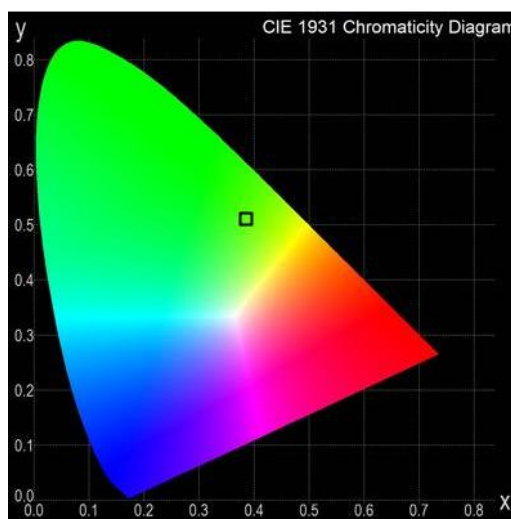
O teor de cinzas (1,14 g 100 g⁻¹) difere dos resultados obtidos por Patel *et al.* (2010), em que o teor encontrado foi de 7,5 g 100 g⁻¹. De acordo com Vieira *et al.* (2018), fatores como

localização geográfica, tipo de solo e especialmente adução podem influenciar no teor de cinzas.

Com relação à coloração das folhas de *P. amboinicus*, a intensidade da cor mediante os valores de L^* 40,45 mostram que as folhas tendem parcialmente a tons mais claros. A amostra apresentou -28,48 para o parâmetro a^* (tons esverdeados) e 16,21 para b^* (tons amarelados), configurando uma tonalidade esverdeada característica das folhas. Os resultados se confirmam com os valores observados de C^* (croma) e h^* (ângulo de hue), demonstrando que a amostra apresenta tonalidade esverdeada moderadamente vibrante, decorrente da presença de clorofila. Castillo-Téllez *et al.* (2024) observaram características semelhantes para os parâmetros analisados, com valores de 45,6; -9,9; 23,50 e 25,50 para L^* , a^* , b^* e C^* respectivamente.

O gráfico de cromaticidade obtido por meio dos parâmetros CIELab fornece uma visualização detalhada das variações de cor que ocorrem na amostra, permitindo uma análise precisa das nuances e tonalidades presentes, conforme mostrado da Figura 11.

Figura 11 - Diagrama de cromaticidade da folha de *P. amboinicus*



Fonte: Autor, (2025).

5.2 Compostos bioativos, atividade antioxidante e HPLC das folhas de *P. amboinicus*

O teor de compostos bioativos, atividade antioxidante e compostos fenólicos por HPLC nas folhas de malvarisco são apresentados na Tabela 7.

Os compostos fenólicos são uma classe extremamente significativa de fitoquímicos e apresentam fontes abundantes em toda a flora. Dentre os principais compostos encontrados no malvarisco destacam-se ácidos cinâmicos (ferúlico, clorogênico, cumárico), ácido benzoico

(elágico), flavonóis (quercetina, quercitrina), catequinas ((-)-Epicatequina), monoterpenos (limoneno, sabinense, terpinole) e vitamina C (ácido ascórbico, ácido desidroascórbico) (Donno *et al.*, 2021).

Tabela 7 - Teor de compostos bioativos, atividade antioxidante e compostos fenólicos por HPLC nas folhas de *P. amboinicus*

Parâmetros	<i>P. amboinicus</i> (malvarisco)
Polifenóis por Folin-Ciocalteu (mg AGE 100g ⁻¹)	17,81 ± 0,03
Polifenóis por Azul da Prússia (mg AGE 100g ⁻¹)	15,68 ± 0,03
Flavonoides totais (mg QE 100g ⁻¹)	1,71 ± 0,00
DPPH (% Inibição)*	46,03 ± 0,10
DPPH modificado (% Inibição)*	39,60 ± 0,10
FRAP (mg Fe(II) E 100g ⁻¹)	46,36 ± 0,70
Ácido Gálico (mg g ⁻¹)	1,99 ± 0,12
Ácido Clorogênico (mg g ⁻¹)	7,14 ± 0,73
Ácido Cafeico (mg g ⁻¹)	1,16 ± 0,85
Ácido Vinílico (mg g ⁻¹)	0,52 ± 0,36
Ácido Ferúlico (mg g ⁻¹)	5,62 ± 0,21

AGE – Ácido Gálico Equivalente; QE – Quercetina Equivalente; Fe (II) E – Ferro (II) Equivalente. * % de inibição na contração de 8000 mg L⁻¹ do extrato.

Fonte: Autor (2025).

A concentração de compostos fenólicos medida pelo método Azul da Prússia foi ligeiramente menor, de 15,68 mg AGE 100g⁻¹, quando comparada com o conteúdo de fenólicos estimados por meio da metodologia de Folin-Ciocalteu (17,81 mg AGE 100g⁻¹). Essa diferença pode ser atribuída às variações metodológicas entre os ensaios de Folin e Prússia, que podem detectar diferentes subgrupos de fenólicos ou serem influenciados por outras substâncias presentes nas amostras (Granato *et al.*, 2016).

O teor de compostos fenólicos presente no malvarisco tem sido reportado em diferentes estudos (Donno *et al.*, 2021; Nguyen *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020). Dentre os solventes mais comumente empregados para extração dos compostos bioativos estão a acetona, éter de petróleo, água, etanol e metanol. Esses solventes são utilizados de forma isolada ou em combinações específicas, variando as proporções para otimizar a extração dos compostos bioativos. A escolha do solvente ou da mistura de solventes baseia-se nas características químicas dos compostos de interesse, bem como na eficiência desejada do processo de extração (Patel *et al.*, 2010).

El-Hawary *et al.* (2012) determinaram fenólicos totais em diferentes frações de *P. amboinicus* (caule, folhas e raízes) por ensaios de Folin-Ciocalteu e Folin-Denis em extrato etanólicos. Os autores constataram teores de fenólicos de 960; 840 e 540 mg AGE 100g⁻¹, respectivamente. Nos estudos realizados por Alakolanga, Usna e Samarasinghe (2020), sobre a identificação de possíveis benefícios obtidos por 5 infusões de ervas medicinais do Sri Lanka, os autores obtiveram em seus resultados valores de 12,74 mg AGE 100g⁻¹ para a infusão de *P. amboinicus*. Já De Medeiros *et al.* (2021), observando o efeito das variações sazonais no conteúdo de fenólicos na amostra, obtiveram valores de 16.470 mg AGE 100g⁻¹, e flavonoides variando de 3.946 a 4.424 mg QE 100g⁻¹ para extratos brutos da planta, utilizando etanol 96% como solvente de extração. Nguyen *et al.* (2020), em estudos sobre a avaliação de compostos biativos em *P. amboinicus*, relataram para fenólicos totais valores de 2684 mg AGE 100g⁻¹, e para flavonoides 1214 mg QE 100g⁻¹ para extratos etanólicos.

Os resultados da capacidade antioxidante de *P. amboinicus* estão apresentados na Tabela 7. A atividade antioxidante determinada pelo método de captura do radical DPPH por meio das análises de DPPH convencional, DPPH modificado e capacidade redutora do ferro FRAP apresentou resultados de 46,03%, 39,6% e 46,36 mg Fe(II) E 100g⁻¹, respectivamente.

Conforme apresentado anteriormente, o malvarisco detém uma rica diversidade de compostos fenólicos, como ácidos cinâmicos, benzoicos, flavonóis, catequinas, monoterpenos e vitamina C (Donno *et al.*, 2021). Esses compostos podem ser associados ao potencial antioxidante da amostra, como observado nos estudos de Sako *et al.* (2023), para ensaios DPPH, ABTS e FRAP expressos em EC₅₀, nos quais se avaliou o potencial antioxidante em extratos metanólicos do gênero *Plectranthus* e obtiveram valores para planta de 5,11, 6,51 e 12,44%, respectivamente. Os autores reportaram no estudo uma forte atividade antioxidante para a espécie *P. amboinicus*, quando comparada ao ácido ascórbico, utilizado como controle positivo do estudo e comumente conhecido por sua atividade antioxidante. Estudos como os de Alakolanga, Usna e Samarasinghe (2020) com valores de 44,73 mg mL⁻¹ e Nguyen *et al.* (2020) com valores 48,23 mg mL⁻¹, também revelam um potencial antioxidante favorável para extratos metanólicos de *P. amboinicus*.

Diversos fatores naturais, como os diferentes cultivares, manejo e ano de colheita, precisam ser considerados para entender as variações entre os estudos. Contudo, os principais desafios aparecem nas comparações metodológicas. Há variações no preparo dos extratos, no tempo de extração, no comprimento de onda usado na leitura nas análises, no padrão analítico para construir a curva de calibração e no tempo de reação das análises. Esses fatores podem

levar a uma possível subestimação ou superestimação do conteúdo fenólico, bem como do potencial antioxidante presente.

5.3 Determinação das condições fermentativas da kombucha

Um planejamento experimental, por meio de utilização de um delineamento fatorial completo 3^2 , foi aplicado para entender o efeito mútuo e isolado dos parâmetros de concentração de malvarisco e tempo de fermentação nas respostas pH, acidez e sólidos solúveis nas condições do processo fermentativo da kombucha. Os resultados são apresentados na Tabela 8. A normalidade dos dados obtidos foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk e por meio do teste de *one-factor* ANOVA ($p < 0,001$). Observaram-se diferenças significativas entre as amostras para todas as variáveis de resposta.

Tabela 8 - Análise dos parâmetros fermentativos da kombucha associada ao planejamento experimental

Ensaio	Variáveis dependentes		Variáveis de Resposta		
	Valores reais e codificados		pH	Acidez total (%)	Sólidos solúveis (°Brix)
	<i>P. amboinicus</i> % (m/v)	Tempo (dias)			
A	5 (-1)	2 (-1)	$4,26 \pm 0,03^c$	$0,08 \pm 0,00^h$	$10,0 \pm 0,00^a$
B	5 (-1)	6 (0)	$4,48 \pm 0,01^b$	$0,08 \pm 0,00^h$	$9,60 \pm 0,00^b$
C	5 (-1)	10 (1)	$4,57 \pm 0,01^a$	$0,09 \pm 0,01^g$	$9,40 \pm 0,00^c$
D	10 (0)	2 (-1)	$3,35 \pm 0,01^f$	$0,24 \pm 0,01^f$	$9,40 \pm 0,00^c$
E	10 (0)	6 (0)	$3,54 \pm 0,00^d$	$0,34 \pm 0,00^e$	$8,63 \pm 0,06^d$
F	10 (0)	10 (1)	$3,48 \pm 0,00^e$	$0,45 \pm 0,00^d$	$7,90 \pm 0,17^e$
G	15 (1)	2 (-1)	$3,20 \pm 0,01^g$	$0,64 \pm 0,00^c$	$8,60 \pm 0,00^d$
H	15 (1)	6 (0)	$3,17 \pm 0,00^h$	$0,86 \pm 0,00^b$	$7,37 \pm 0,06^f$
I	15 (1)	10 (1)	$2,95 \pm 0,00^i$	$1,04 \pm 0,01^a$	$6,30 \pm 0,00^g$
J	10 (0)	6 (0)	$3,52 \pm 0,00^d$	$0,34 \pm 0,00^e$	$8,67 \pm 0,06^d$
K	10 (0)	6 (0)	$3,50 \pm 0,00^d$	$0,34 \pm 0,00^e$	$8,59 \pm 0,07^d$
p-valor (Brown–Forsythe)			0,254	0,649	0,748
p-valor (ANOVA)			< 0,001	< 0,001	< 0,001

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Fisher ($p < 0,05$). Fonte: Autor (2025).

Por meio da combinação dos fatores de tempo e concentração de planta, os parâmetros avaliados apresentaram variação estatística significativa ($p < 0,05$), com valores variando de 2,95 a 4,57 para pH, de 0,08 a 1,04% para acidez total e de 6,30 a 10,0 °Brix para sólidos

solúveis. Por meio da análise de regressão linear, foi possível observar a significância dos modelos com valores de $p < 0,05$; $R^2_{\text{pH}} = 0,995$; $R^2_{\text{acidez total}} = 0,999$ e $R^2_{\text{sólidos solúveis}} = 0,996$. Os resíduos foram analisados por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, revelando uma boa adequação dos valores ($p_{\text{pH}} 0,002$; $p_{\text{acidez total}} < 0,001$ e $p_{\text{sólidos solúveis}} < 0,001$). Consequentemente, observou-se que os dados experimentais não apresentaram falta de ajuste.

Com os resultados apresentados na Tabela 8 é possível observar variações do pH entre as diferentes combinações de tempo e concentração de planta. Conforme mencionado, o pH variou significativamente ($p < 0,05$) de 2,95 a 4,57 do segundo ao décimo dia de fermentação. Essa redução do pH é observada mediante o aumento de concentração da planta e pode estar associada à maior disponibilidade de substrato disponível para as reações bioquímicas e teor de metabólitos secundários presentes na própria matéria-prima. De acordo com VillarreaL-Soto *et al.* (2019), o tipo e composição do substrato utilizado para fermentação da kombucha é um fator relevante na influência nos parâmetros fermentativos da bebida.

Gaggia *et al.* (2018), em estudo comparativo de kombuchas elaboradas com diferentes substratos, observaram a influência do substrato rooibos nos teores de ácidos orgânicos em relação ao tempo de fermentação. Os autores obtiveram resultados de 1,70 a 2,87 mg mL⁻¹ de ácido glucorônico e de 1,65 a 4,89 mg mL⁻¹ de ácido acético do sétimo ao décimo quarto dia de fermentação.

Os resultados de acidez total apresentaram uma variação total de 0,08 a 1,04% entre os ensaios, entretanto não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) para os ensaios A e B. Os valores iguais, de 0,08% em ambos os ensaios, podem ser atribuídos ao fator inicial de adaptação dos microrganismos fermentativos, bem estabelecido na literatura, em que a cultura sofre influência do ambiente fermentativo a fim de se obter o equilíbrio do meio, antes mesmo de iniciar as biotransformações.

Com exceção dos ensaios A e B já citados, todos os demais apresentaram aumento significativo da acidez com o aumento da concentração de substrato e dias de fermentação. Esse comportamento é explicado por meio do perfil ácido que as folhas de malvarisco possuem contribuindo para o aumento da acidez no produto. A atuação dos microrganismos presentes tanto no SCOBY como também no chá de arranque (*starter*) e que, durante a fermentação, produzem ácidos orgânicos, como o acético e o láctico, também contribui, por consequência, no aumento da acidez na bebida (Jakubczyk *et al.*, 2020).

Ainda sobre a acidez, o valor 0,34% obtido para o ensaio E (6 dias) apresenta similaridade com o resultado de 0,36% obtido por Cardoso *et al.* (2020) para kombucha de chá verde fermentada por 10 dias.

A legislação brasileira, por meio da Instrução Normativa n. 41, que estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade das kombuchas no Brasil, não descreve o parâmetro de acidez total titulável dentre os requisitos de qualidade para a bebida (Brasil, 2019).

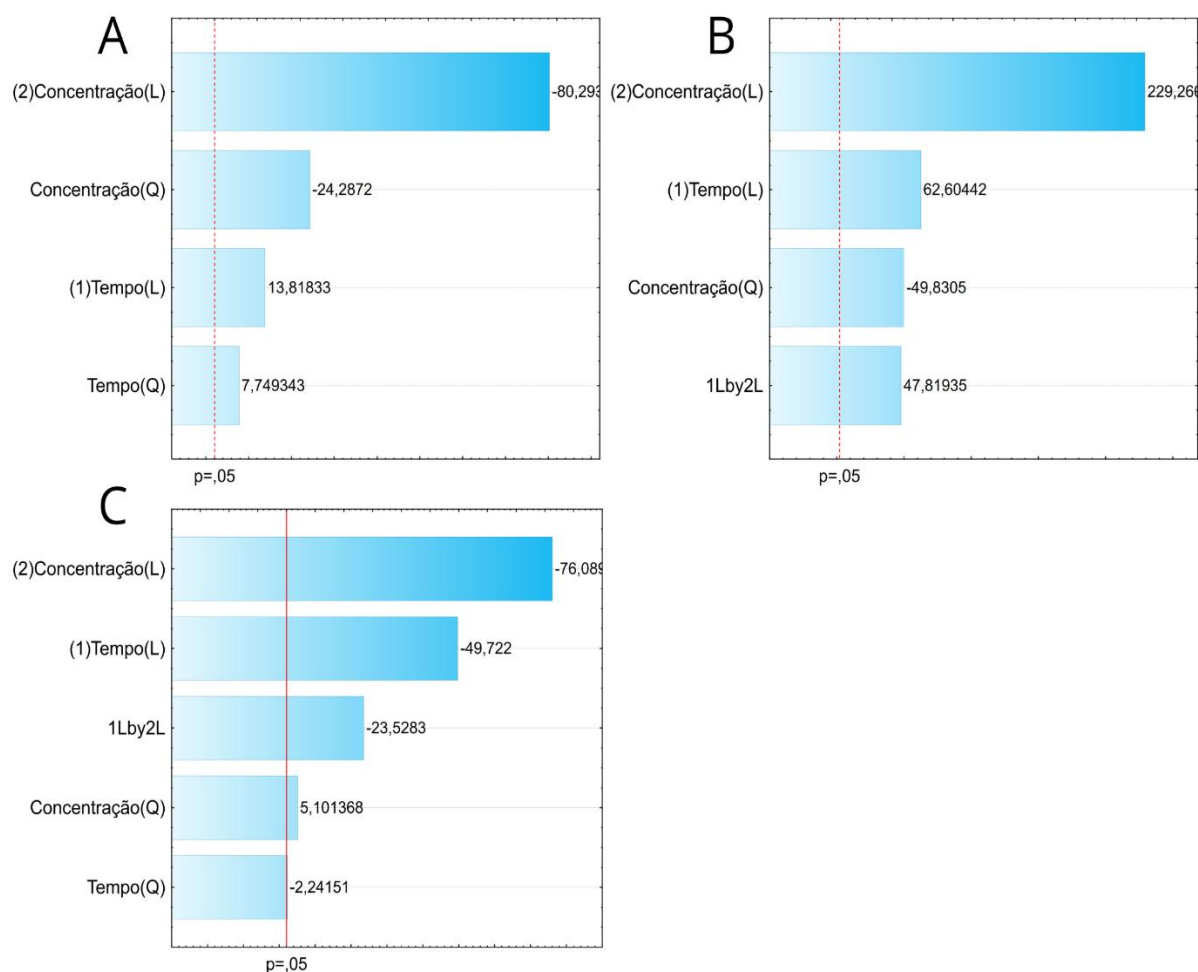
Para a KOMBUCHA BREWERS INTERNATIONAL (2021), conforme descrito no Código de Prática da Kombucha, essa bebida deve apresentar, ao final do processo fermentativo, uma concentração variando de 2,7 a 20,3 g de ácido acético por litro.

Os resultados obtidos para sólidos solúveis não apresentaram diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre os ensaios C (9,40 °Brix), D (8,63 °Brix), e entre E (8,60 °Brix) e G (8,60 °Brix). Entretanto, quando observado isoladamente o tempo máximo de fermentação (10 dias) para cada concentração de planta utilizada, é visualizada uma redução no teor de sólidos solúveis mediante o aumento da concentração de planta, com valores de (9,4 °Brix) para ensaio C, (7,90 °Brix) para o ensaio F e (6,30 °Brix) para o ensaio I. De acordo com Chakravorty *et al.* (2019), a sacarose, bem como os outros açúcares contidos no meio fermentativo, é consumida pelos microrganismos presentes na kombucha (bactérias e leveduras) resultando, assim, na redução do teor de sólidos solúveis ao longo do processo fermentativo. A ausência de diferença significativa observada entre os ensaios pode ser associada à complexidade da cultura fermentativa assim como às interações, ainda não bem elucidadas, que os muitos microrganismos desempenham na fermentação, em que o consumo de açúcares ocorre em tempos de fermentação diferentes (VillarreaL-Soto *et al.*, 2018). Portanto, quando observados isoladamente os ensaios extremos A e I, com resultados de 10,0 e 6,30 °Brix, respectivamente, é possível observar uma variação no teor de sólidos solúveis de 3,7 °Brix, podendo ser associada às diferenças no consumo de açúcares ao longo da fermentação.

Alderson *et al.* (2021) observaram teores de sólidos solúveis de 6,0, 6,8 e 6,1 °Brix para kombuchas preparadas com pimenta preta, lúpulo e kawakawa fermentadas por 7 dias. Os autores concluíram que os diferentes substratos apresentaram semelhança para esse parâmetro, e que apenas a bebida com o substrato de lúpulo diferiu das demais amostras quanto ao seu conteúdo de açúcares.

Na Figura 12 são apresentados gráficos de Pareto para as variáveis resposta, a fim de expressar as principais variáveis e correlações, assim como seus efeitos no processo fermentativo. Por meio dos gráficos, é possível identificar efeitos mais significativos. Portanto, pode-se realizar uma análise da dimensão e relevância de cada efeito e suas interações geradas. Nota-se que as barras (variáveis) que excedem a linha de significância no gráfico ($p < 0,05$) exercem uma influência estatisticamente significativa nos parâmetros de tempo e concentração de malvarisco na fermentação.

Figura 12 - Efeitos dos fatores tempo e concentração de *Plectranthus amboinicus* nas variáveis de acompanhamento da fermentação. A – pH; B – Acidez total; C – Sólidos solúveis



Fonte: Autor (2025).

Após a realização do estudo detalhado sobre as interações existentes entre as variáveis independentes do processo, prosseguiu-se com a etapa de ajuste dos modelos polinomiais, os quais foram empregados com o intuito de descrever de forma mais precisa o comportamento dos parâmetros fermentativos da bebida kombucha. Essa modelagem matemática teve como objetivo principal compreender a resposta dos parâmetros avaliados frente às variações nas condições experimentais, permitindo uma análise mais robusta e fundamentada dos dados obtidos (Tabela 9).

Tabela 9 - Coeficientes de regressão obtidos para modelar os efeitos dos parâmetros na fermentação

Variável de resposta	Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t-valor	p-valor	-95% Confiança	95% Confiança
pH	Constante	3,530	0,010	339,213	<0,001	3,508	3,551
	X ₁	0,114	0,008	13,818	<0,001	0,097	0,131
	X ₁ ²	-0,098	0,012	-7,749	<0,001	-0,124	-0,072
	X ₂	-0,665	0,008	-80,293	<0,001	-0,681	-0,648
	X ₂ ²	0,309	0,012	24,287	<0,001	0,283	0,335
	R ²	0,9961					
	R ² ajustado	0,9955					
	P-valor (modelo)	<0,001					
	P-valor (normalidade dos resíduos)	0,002					
	P _{Lack of Fit}	0,032					
Acidez total (%)	Constante	0,343	0,001	188,119	<0,001	0,339	0,346
	X ₁	0,104	0,001	62,604	<0,001	0,100	0,107
	X ₂	0,381	0,001	229,260	<0,001	0,378	0,385
	X ₂ ²	0,123	0,002	49,830	<0,001	0,117	0,128
	X ₁ X ₂	0,097	0,002	47,819	<0,001	0,093	0,101
	R ²	0,9995					
	R ² ajustado	0,9994					
	P-valor (modelo)	<0,001					
	P-valor (normalidade dos resíduos)	<0,001					
	P _{Lack of Fit}	<0,001					
Sólidos solúveis (°Brix)	Constante	8,626	0,018	465,466	<0,001	8,588	8,664
	X ₁	-0,733	0,014	-49,722	<0,001	-0,763	-0,703
	X ₁ ²	0,050	0,022	2,241	0,033	0,004	0,097
	X ₂	-1,122	0,014	-76,089	<0,001	-1,152	-1,091
	X ₂ ²	-0,115	0,022	-5,101	<0,001	-0,162	-0,069
	X ₁ X ₂	-0,425	0,018	-23,528	<0,001	-0,462	-0,387
	R ²	0,9969					
	R ² ajustado	0,9963					
	P-valor (modelo)	<0,001					
	P-valor (normalidade dos resíduos)	<0,001					
	P _{Lack of Fit}	0,016					

X₁: Tempo linear; X₁²: Tempo quadrático; X₂: Concentração linear; X₂²: Concentração quadrática.

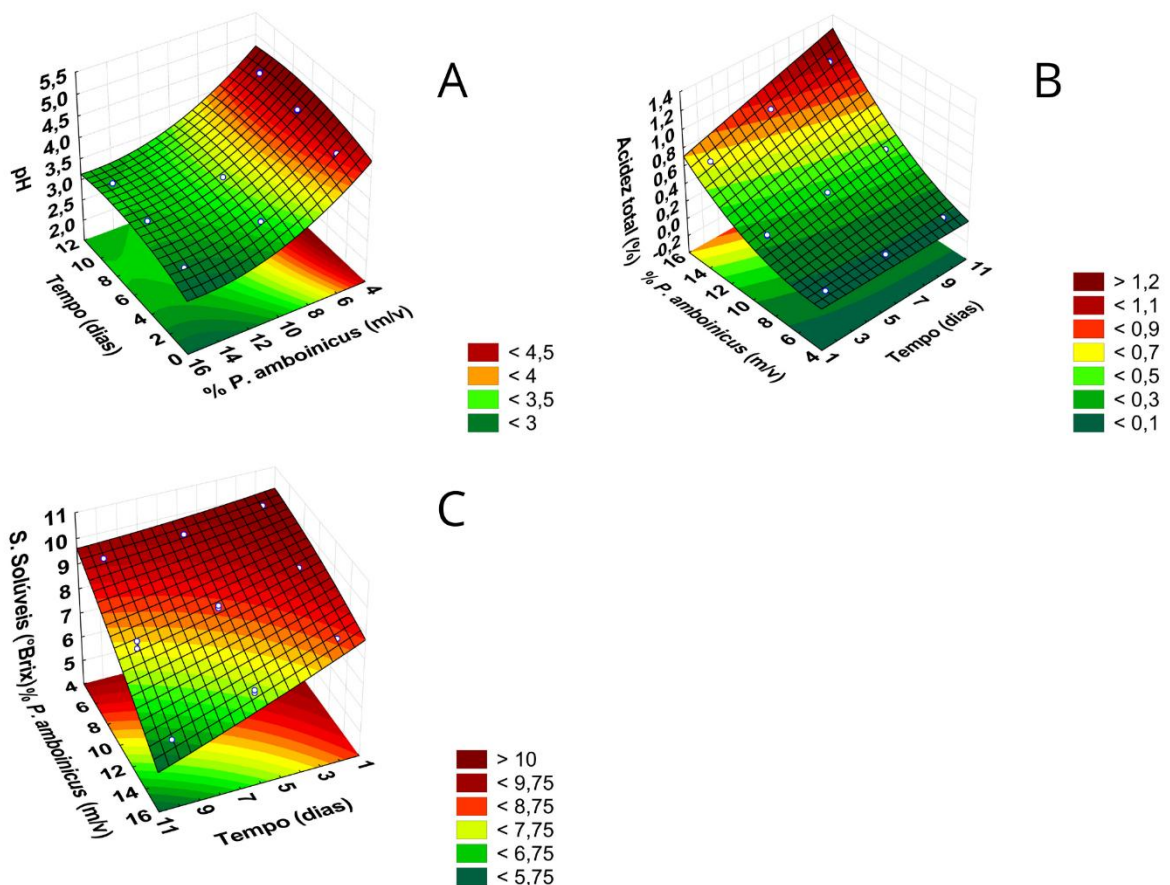
Fonte: Autor (2025).

É possível observar que todas as variáveis de resposta sofreram maior influência da concentração linear. O tempo, bem como e a interação entres seus fatores linear e quadrático, também se revelaram significativos para as condições do processo fermentativo. A escolha das

variáveis de resposta selecionadas para o estudo se deu mediante a praticidade e a eficiência de resposta para o controle das condições desses parâmetros, uma vez que é um procedimento comumente utilizado em estudos acerca das condições fermentativas da kombucha (Diez-Ozaeta; Astiazaran, 2022; Jakubczyk *et al.*, 2020; VillarreaL-Soto *et al.*, 2019).

Os diferentes tempos de fermentação, assim como a variação na concentração de planta adicionada, deram origem a modelos polinomiais de segunda ordem, possibilitando o desenvolvimento de superfícies de respostas, apresentados na Figura 13. Por meio desses gráficos, é possível observar a relação estabelecida entre as respostas do estudo e suas variáveis independentes.

Figura 13 - Efeito da combinação dos fatores tempo e concentração de *P. amboinicus* nas variáveis de acompanhamento da fermentação. A – pH; B - Acidez total; C – Sólidos solúveis



Fonte: Autor (2025)

A concentração em seu termo linear é o fator mais significativo para todas as variáveis de resposta, mostrando-se como o fator primordial para se estabelecer as condições desejáveis de fermentação da bebida.

De acordo com a Figura 13 A, para o parâmetro pH há um efeito negativo forte, o que indica que à medida que a concentração de malvarisco aumenta, o pH diminui. Isso implica no possível estímulo do malvarisco no processo fermentativo. Quando observado o efeito da concentração quadrática, é possível notar que com o aumento da concentração há uma curvatura nas respostas dessa variável, revelando que o efeito da concentração sobre essa resposta se dá de forma mais acentuada com o aumento da concentração de malvarisco. No início do processo fermentativo, há uma alta disponibilidade de açúcares, o material vegetal e um ambiente favorável para as leveduras e bactérias produzirem ácidos rapidamente, resultando em uma queda acentuada do pH. No entanto, à medida que os açúcares são consumidos e os ácidos se acumulam, o ambiente torna-se menos propício para a atividade microbiana, levando a uma desaceleração na produção de ácidos e, conseqüentemente, a uma menor diminuição do pH (Fabricio *et al.*, 2023). Vale ressaltar que, conforme observado no gráfico, o tempo linear sugere que menores tempos de fermentação podem estar associadas a um pH final mais baixo.

Para acidez total, novamente a concentração linear é o fator mais influente, mas desta vez com um efeito positivo significativo, indicando que a acidez aumenta conforme o aumento da concentração de malvarisco, apresentando comportamento contrário quando comparado ao pH, mas sendo algo esperado devido à produção de ácidos durante a fermentação (Sharifudin *et al.*, 2021). O tempo linear também tem um efeito positivo considerável, demonstrando que um maior tempo de fermentação sugere um aumento da acidez. Esse comportamento reforça as interações que o tempo e a concentração de planta exercem sobre a variável pH, discutida anteriormente. Assim como no pH, o efeito da concentração quadrática negativa demonstra uma possível estabilização da acidez quando alcançada maiores concentrações de planta, podendo estar relacionada ao esgotamento de substrato ou morte celular.

Assim como nas demais variáveis, a concentração linear se mostrou o efeito mais significativo para sólidos solúveis, com efeito negativo, sendo algo esperado devido ao maior consumo de açúcares disponíveis no meio durante o tempo de fermentação. Também é possível inferir, por meio do valor significativo negativo para o tempo linear, que o tempo de fermentação demonstra maior eficiência para essa variável de resposta quando a bebida é fermentada por mais dias. Vale ressaltar que os ácidos orgânicos, bem como outros metabólicos presentes no meio durante a fermentação, também são fatores que contabilizam o teor de sólidos solúveis (Sharifudin *et al.*, 2021).

De modo geral, a concentração de malvarisco se destacou como o fator mais significativo do processo. Seus efeitos lineares e quadráticos apresentam forte influência nas variáveis pH, acidez total e sólidos solúveis. As interações e efeitos quadráticos sugerem que o

sistema de fermentação é complexo e que o tempo de fermentação desempenha um papel relevante em determinadas variáveis, destacando, assim, a importância do equilíbrio destes fatores, para alcançar as características desejáveis de fermentação da kombucha.

Com base no comportamento fermentativo da kombucha frente às diferentes concentrações de malvarisco e aos tempos de fermentação, observados por meio das análises dos parâmetros de pH, acidez total e sólidos solúveis, foi possível estabelecer uma compreensão mais ampla do processo de fermentação da kombucha. Essa análise foi fortalecida pelo conhecimento prévio acerca da cinética de fermentação (Apêndice G), o que permitiu interpretar de forma mais aprofundada as alterações ocorridas ao longo do tempo. Além disso, as inferências extraídas a partir da interpretação dos gráficos de Pareto e das superfícies de resposta associadas ao delineamento experimental, contribuíram significativamente para a definição da formulação ideal da kombucha base (KB).

Dessa forma, a formulação selecionada foi aquela correspondente ao tempo de 4 dias de fermentação e à concentração máxima de malvarisco (15%), uma vez que essa combinação apresentou os melhores resultados em termos dos parâmetros físico-químicos analisados (pH = 3,35; acidez = 0,74%; sólidos solúveis = 8,77 °Brix). Essa formulação, proporciona um produto com pH dentro dos limites mínimos e máximos para as características de identidade e qualidade estabelecidos pela legislação vigente (BRASIL, 2019).

Além disso, os resultados obtidos corroboram com estudos prévios, como o de Bressani *et al.* (2024), sobre adição de inhame em kombuchas fermentadas durante 5 dias, resultando em um valor de pH de 3,9, o qual esteve associado a uma boa aceitação sensorial do produto. Tal correlação reforça a relevância do pH como parâmetro determinante na avaliação da qualidade sensorial da bebida, servindo como indicativo da acidez ideal para o equilíbrio entre aceitação sensorial e segurança microbiológica.

5.4 Caraterização físico-química das kombuchas saborizadas

Com relação aos parâmetros físico-químicos, conforme mostra a Tabela 10, as kombuchas saborizadas com o suco de pitaya (KP), abacaxi (KA) e melancia (KM) apresentaram para análise de pH um comportamento semelhante após a saborização, com o aumento significativo do pH ($p < 0,05$) de 4,15 para KP, de 3,72 para KA, e de 4,23 para KM, em comparação com a kombucha base de malvarisco (KB), que apresentou aumento de 3,35.

Tabela 10 - Parâmetros físico-químicos das kombuchas

Amostras	pH	Acidez total titulável (%)	Acidez volátil (mEq.L ⁻¹)	Sólidos solúveis (°Brix)	Teor alcoólico (%)
KC	3,70 ^d ± 0,00	0,12 ^e ± 0,00	16,46 ^e ± 0,58	9,60 ^a ± 0,00	0,10 ^b ± 0,00
KB	3,35 ^e ± 0,01	0,74 ^a ± 0,00	51,74 ^a ± 0,57	8,77 ^b ± 0,06	0,20 ^a ± 0,00
KA	3,72 ^c ± 0,01	0,21 ^b ± 0,01	45,75 ^b ± 0,00	6,80 ^d ± 0,00	0,20 ^a ± 0,00
KM	4,23 ^a ± 0,00	0,16 ^d ± 0,01	34,54 ^d ± 0,55	7,10 ^c ± 0,00	0,20 ^a ± 0,00
KP	4,15 ^b ± 0,00	0,18 ^c ± 0,00	42,24 ^c ± 0,65	6,40 ^e ± 0,10	0,20 ^a ± 0,00

KC – kombucha controle (sem malvarisco); KB – kombucha base (com malvarisco); KA – kombucha abacaxi
KM – kombucha melancia; KP – kombucha pitaya.

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa de acordo com análise de variância e teste de Fisher a 5% de significância ($p < 0,05$).

Fonte: Autor (2025)

Esse comportamento ocorrido após adição do suco pode ser atribuído ao fato de que os sucos de frutas geralmente contêm menos ácido em comparação com a kombucha fermentada, diluindo os ácidos presentes e, conseqüentemente, elevando o pH da bebida.

Estudos realizados por Mendonça *et al.* (2023), em kombuchas elaboradas com caule e folhas de *Hibiscus sabdariffa* saborizadas com suco de uva, revelaram aumento nos valores de pH em 3,08 e 2,70, respectivamente, após a saborização.

Vale ressaltar que os valores de pH obtidos por todas as kombuchas estavam dentro do que preconiza a legislação para esse parâmetro, que deve variar entre 2,5 e 4,2.

Para os resultados de acidez total titulável expressos em % de ácido acético, todas as amostras mostraram-se significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$), com variação de 0,12 a 0,74%. Os maiores valores de acidez apresentados foram da amostra KB, enquanto os menores valores obtidos foram de KC.

É possível observar que os valores elevados de acidez para todas as amostras saborizadas, assim como o maior valor para a amostra KB em comparação a KC, demonstram o favorecimento nos parâmetros fermentativos em função da adição do malvarisco, apresentando-se superior à kombucha controle.

Wanderley *et al.* (2023), em seus estudos sobre a influência da adição de polpa de araçá no teor de compostos bioativos em kombuchas com erva-mate, observaram aumento da acidez em g de ácido acético por litro após o processo de saborização, com valores de (2,48 g L⁻¹) para chá verde, de (3,28 g L⁻¹) para chá verde 0,75% e mate 0,25%, e de (3,20 g L⁻¹) para chá verde 0,5% e mate 5%. Valores superiores ao das kombuchas avaliadas no presente estudos foram

obtidos por Cardoso *et al.* (2020) para kombuchas de chá preto (0,32%) e chá verde (0,36%), fermentadas durante 10 dias.

A Instrução Normativa n. 41, que estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade das kombuchas no Brasil, não descreve a acidez total como um parâmetro de qualidade (Brasil, 2019a). Já a KOMBUCHA BREWERS INTERNATIONAL (2021), por meio do Código de Prática da Kombucha, informa que acidez final da kombucha deve estar entre 2,7 e 20,3 g de ácido acético por litro da bebida.

A acidez volátil apresentou diferença significativa para as diferentes kombuchas avaliadas ($p < 0,05$), com maior valor obtido na amostra KB (51,74 mEq L⁻¹). Dentre as kombuchas, KA (45,75 mEq L⁻¹), KP (42,24 mEq L⁻¹) e KM (34,54 mEq L⁻¹), foi observada uma semelhança no comportamento de redução dos valores de acidez após a saborização. O processo de diluição com a adição do suco, e, conseqüentemente, a redução da acidez nas kombuchas, pode ser resultado da diluição dos íons H⁺ presentes na kombucha base, acarretando assim valores de acidez mais baixos.

O valor de acidez volátil apresentado pela amostra KB pode ser associado aos constituintes do malvarisco, em especial, à maior disponibilidade de substrato com a presença da planta, uma vez que durante as biotransformações que ocorrem durante a fermentação da kombucha podem conferir aumento da produção do ácido acético, elevando a acidez da bebida (Villarreal-Soto *et al.*, 2019).

Pereira *et al.* (2021) obtiveram valores inferiores para kombucha à base de chá verde durante o terceiro dia de fermentação, com um teor acidez volátil de 7,04 mEq L⁻¹. Já no sétimo dia, seus valores aumentaram para 32,67 mEq L⁻¹.

De acordo com a Instrução Normativa n. 41, que estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade das kombuchas no Brasil, os valores de acidez volátil devem estar entre 30 e 130 mEq L⁻¹ (Brasil, 2019). Desse modo, todas as bebidas elaboradas estavam de acordo com o que estabelece a legislação para esse critério.

Para sólidos solúveis, houve diferença significativa ($p < 0,05$) em todas as amostras. Na Tabela 10 é possível observar que os teores variam de 6,80 °Brix (KA) a 9,60 °Brix (KC). Nota-se uma diminuição no teor de sólidos solúveis quando se compara as amostras KC e KB com as kombuchas saborizadas KA, KM e KP. Pode-se inferir que a saborização com os sucos também exerceu influência nesse parâmetro, diluindo a kombucha e, conseqüentemente, reduzindo esse teor de sólidos solúveis, uma vez que não houve uma segunda fermentação. Outro ponto muito relevante é que, quando analisadas KC e KB isoladamente, evidencia-se um menor teor para a amostra KB.

A sacarose, assim como outros tipos de açúcares presentes no meio fermentativo, é consumida pelas bactérias e leveduras da kombucha, resultando na diminuição do teor de sólidos solúveis ao longo da fermentação (Chakravorty *et al.*, 2019). Portanto, pode-se associar o menor teor na KB a uma característica de melhor fermentação, tendo em vista o maior consumo de açúcar.

Os teores alcoólicos das kombuchas determinados por ebulliometria revelam uma menor produção de álcool para a amostra KC (0,1%). As demais amostras não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), com valores de 0,2%. Vale ressaltar que os teores de 0,2% observados para KB, KP, KM e KA podem ser associados à influência que o malvarisco exerce na fermentação da bebida, conforme observado nos parâmetros de pH, acidez total e acidez volátil discutidos anteriormente.

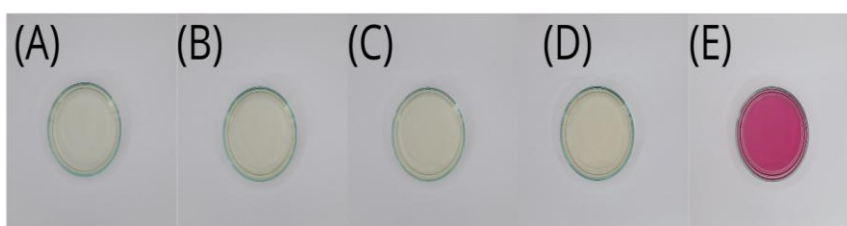
Portanto, todas as amostras apresentaram teores inferiores ao preconizado pela legislação, se enquadrando como não alcoólicas, uma vez que a bebida é classificada como alcoólica quando contém entre 0,6% e 8,0 % de álcool, e não alcoólica quando contém menos de 0,5% de álcool (Brasil, 2019).

Pereira *et al.* (2021), em estudos sobre a identificação dos parâmetros físico-químicos e colorimétricos de kombucha de chá verde durante 10 dias de fermentação, obtiveram os valores de teor alcoólico de 2,01% no terceiro dia e de 3,02% no sétimo dia de fermentação.

5.5 Análise de cor das kombuchas

Os resultados da análise de cor nas kombuchas são apresentados na Tabela 11. Por meio dos dados obtidos foi possível verificar mudanças no padrão de coloração entre as amostras. As amostras avaliadas estão dispostas na Figura 14.

Figura 14 - Imagens das kombuchas utilizadas para análise de cor. A – kombucha controle (sem malvarisco); B – kombucha melancia; C – kombucha base (com malvarisco); D – kombucha abacaxi; E – kombucha pitaya



Fonte: Autor (2025).

Tabela 11 - Parâmetros de cor das kombuchas

Amostras	Parâmetros de cor				
	L*	a*	b*	C*	h*
KC	71,18 ^c ± 0,05	-1,56 ^b ± 0,01	5,16 ^d ± 0,00	5,40 ^e ± 0,00	106,8 ^b ± 0,14
KB	70,90 ^d ± 0,05	-1,98 ^e ± 0,00	7,40 ^b ± 0,04	7,66 ^c ± 0,04	105,0 ^c ± 0,09
KA	72,44 ^a ± 0,01	-1,75 ^d ± 0,03	9,81 ^a ± 0,05	9,97 ^b ± 0,06	100,1 ^c ± 0,15
KM	71,36 ^b ± 0,05	-1,68 ^c ± 0,04	6,62 ^c ± 0,05	6,83 ^d ± 0,06	104,0 ^d ± 0,23
KP	43,83 ^e ± 0,08	50,65 ^a ± 0,06	-0,92 ^c ± 0,10	50,65 ^a ± 0,06	359,0 ^a ± 0,11

KC – kombucha controle; KB – kombucha base; KA – kombucha abacaxi; KM – kombucha melancia; KP – kombucha pitaya.

L*, a* e b* - parâmetros CIELab; C* - chroma; h* - ângulo hue.

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa de acordo com análise de variância e teste de Fisher a 5% de significância ($p < 0,05$).

Fonte: Autor (2025).

Os parâmetros da análise de cor foram influenciados significativamente ($p < 0,05$) pelos tratamentos aplicados nas amostras, conforme observado na Tabela 11. Para o indicador de luminosidade (L*), as amostras apresentaram valores variando de 43,83 (KP) a 72,44 (KA). O valor mais baixo de luminosidade da amostra KP demonstra a tendência a tons mais escuros, possivelmente oriundo da intensa pigmentação da pitaya, atribuída ao suco e, conseqüentemente, à kombucha, devido à presença de betalaínas. Desse modo, configura uma coloração mais escura e vibrante, apresentando-se como um diferencial para a bebida por meio do apelo visual mais atrativo quando comparada com as características de cor da bebida tradicional.

Já para as demais amostras, o efeito de L* foi diferente, porém esperado, onde os valores superiores revelaram a tendência para tons mais claros, sendo possível observar esse comportamento na Figura 14. Isso se dá pela menor contribuição de pigmentos presentes nos sucos utilizados na saborização. Vale ressaltar a importância do processo de clarificação realizado suco de melancia, devido à tendência de sedimentação dos pigmentos presentes no suco.

Como esperado, a variável a* positiva para KP reforça a tendência da coloração para tons mais avermelhados, característica da pitaya. Já os valores positivos em b* para as demais amostras tendem para tonalidades mais amareladas, de acordo com a Figura 14. O valor de b* para KA (9,81) sugere a influência dos pigmentos (carotenoides) presentes no abacaxi, realçando os tons amarelos (Hamidin *et al.*, 2022).

Os parâmetros de saturação (C*) e ângulo de matiz (h*) foram influenciados significativamente ($p < 0,05$) pela saborização das kombuchas (Tabela 11). Para C*, o valor

obtido para KP (50,65) ressalta novamente a coloração vibrante atribuída pela pitaya. Intensidades de cor inferiores foram observadas nas demais amostras, sendo KA (9,97) a de maior média entre elas. Notou-se diferenças para a variável C* nas amostras KM e KA quando comparadas com a bebida base KB, onde a saborização conferiu redução na intensidade de cor para KM e aumento para KA. Essa redução pode ser relacionada ao processo de clarificação realizado no suco de melancia, conforme Figura 9, reduzindo significativamente a sua pigmentação, além de promover uma diluição da cor da kombucha base após a mistura. Já o aumento em KA relaciona-se à maior presença de pigmentos presentes no suco de abacaxi adicionado.

De acordo com as coordenadas de cor no espaço CIELab, o ângulo de matiz para as amostras KB, KC, KM e KA variou de 100,1° a 106,8°, confirmando as tonalidades de amarelo claro já observadas. A amostra KP (359°) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com as demais amostras, por influência direta da coloração do suco de pitaya.

O ΔE foi calculado em função da bebida base (KB), utilizando-a como base para avaliar as mudanças na percepção de cor com relação às demais amostras. Na Tabela 12 é possível observar que as diferenças na percepção da cor para todas as amostras, exceto KP, são inferiores ao limiar de discriminação visual humana ($\Delta E > 3$), sendo assim imperceptíveis visualmente pelo olho humano (Pathare; Opara; Al-Said, 2013). A amostra KP, devido à sua intensa pigmentação, apresentou o valor de 438,75, sendo sua distinção facilmente observada.

Tabela 12 - Parâmetros de percepção de cor e taxa de escurecimento das kombuchas

Amostras	Parâmetros	
	ΔE (Percepção de cor)	BI (<i>Browning Index</i>)
KC	0,96 ^c $\pm$ 0,05	5,73 ^e $\pm$ 0,02
KB	-	8,68 ^c $\pm$ 0,00
KA	1,627 ^b $\pm$ 0,01	12,40 ^b $\pm$ 0,01
KM	0,51 ^d $\pm$ 0,05	7,75 ^d $\pm$ 0,01
KP	438,75 ^a $\pm$ 0,08	66,66 ^a $\pm$ 0,01

KC – kombucha controle; KM – kombucha melancia; KP – kombucha pitaya; KB – kombucha base; KA – kombucha abacaxi. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa de acordo com análise de variância e teste de Fisher a 5% de significância ($p < 0,05$).

Fonte: Autor (2025).

O *Browning Index* (BI) complementa o aspecto visual da bebida. Com base nos resultados observados, nota-se que os valores obtidos para KB são superiores à amostra KC, representando um aumento de 51,48%. Percebe-se que a adição de malvarisco influenciou diretamente esse parâmetro, possivelmente associada ao aumento do teor de sólidos totais e variações de pH na bebida (Suh *et al.*, 2003).

5.6 Análise de compostos bioativos e atividade antioxidante das kombuchas

O conteúdo de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante das kombuchas elaboradas são apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13 - Fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante das kombuchas

Análises	Amostras				
	KC	KB	KA	KM	KP
Folin-Ciocalteu (mg AGE L ⁻¹)	267,73 ^d ± 1,66	532,09 ^a ± 3,82	312,33 ^b ± 3,82	288,40 ^c ± 2,73	165,11 ^e ± 3,49
Azul da Prússia (mg AGE L ⁻¹)	257,26 ^c ± 13,83	430,91 ^a ± 7,13	306,57 ^b ± 23,74	275,71 ^c ± 17,27	135,91 ^d ± 1,83
Flavonoides (mg QE L ⁻¹)	79,50 ^b ± 1,02	214,55 ^a ± 1,78	56,00 ^c ± 2,23	81,43 ^b ± 1,02	14,94 ^d ± 0,44
DPPH (% Inibição) *	62,12 ^b ± 1,25	85,28 ^a ± 0,46	61,78 ^b ± 0,62	61,04 ^b ± 0,74	40,00 ^c ± 0,58
DPPH mod. (% Inibição) *	66,09 ^b ± 0,43	83,46 ^a ± 0,06	56,87 ^d ± 0,26	64,99 ^c ± 0,17	36,34 ^e ± 0,22
FRAP (mg Fe (II)E L ⁻¹)	940,90 ^d ± 7,07	2364,93 ^a ± 4,63	1248,26 ^b ± 40,12	1116,98 ^c ± 19,29	374,07 ^e ± 9,64

KC – kombucha controle; KB – kombucha base; KA – kombucha abacaxi; KM – kombucha melancia; KP – kombucha pitaya. * % de inibição na amostra diluída em água ultrapura na proporção 1:10. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa de acordo com análise de variância e teste de Fisher a 5% de significância ($p < 0,05$).

Fonte: Autor (2025).

Os valores de fenólicos totais obtidos nas kombuchas apresentaram uma variação de 165,11 a 532,09 mg AGE L⁻¹ para o ensaio de Folin-Ciocalteu e de 135,91 a 430,91 mg AGE

L⁻¹ para Azul da Prússia. Os resultados revelam que os maiores resultados para fenólicos totais por Folin-Ciocalteu (532,09 mg AGE L⁻¹) e Prússia (430,9 mg AGE L⁻¹), assim como para flavonoides (214,55 mg QE L⁻¹), foram apresentados pela kombucha base (KB). Esse comportamento reforça o efeito positivo que o malvarisco exerce na composição bioativa da bebida. Além disso, quando comparada com a kombucha controle (KC), a bebida base se destaca com um aumento de 98,74 e 67,49% no teor de compostos fólicos por Folin-Ciocalteu e azul da Prússia, respectivamente.

Os compostos fenólicos são reportados por possuírem propriedades antimicrobianas. É provável que a fermentação da amostra KB tenha sido mais modulada, com uma inibição parcial do crescimento de algumas populações microbianas. Essa redução no crescimento pode ter levado a uma maior preservação de antioxidantes e flavonoides, contribuindo para os maiores teores antioxidantes observados (Lobiuc *et al.*, 2023).

Por outro lado, a menor concentração de fenólicos em KC pode ter permitido um crescimento microbiano mais intenso, promovendo a conversão de compostos antioxidantes em outros metabólitos, o que justificaria os valores inferiores nos ensaios de capacidade antioxidante em comparação com KB (Yang *et al.*, 2023).

Nota-se que ambos os ensaios são para quantificação dos fenólicos totais na amostra, entretanto apresentaram resultados diferentes. O ensaio de Folin Ciocalteu apresentou resultado superiores para todas as amostras.

Estudos demonstram que o ensaio de Folin-Ciocalteu não apresenta especificidade para compostos fenólicos. Devido aos mecanismos de reação com bissulfito de sódio, açúcares redutores, ácido ascórbico, aminoácidos redutores (triptofano e tirosina) e alguns metais de transição, uma distorção dos valores reais de fenólicos totais na amostra estudada é ocasionada (Chen; Cheng; Liang, 2015).

O ensaio Azul da Prússia, assim como demais métodos, sofrem influência de possíveis interferentes redutores associados às matrizes alimentares analisadas. Entretanto, o metabissulfito de sódio e a glicose não apresentaram interferência nos estudos de Chen, Cheng e Liang (2015) em suco de uva. De modo geral, o ensaio Azul da Prússia é potencialmente mais seletivo e possui menor tempo de execução (Granato *et al.*, 2016).

Chakravorty *et al.* (2019) ressaltam a presença de açúcares redutores na kombucha, provenientes dos processos metabólicos que as leveduras desempenham na fermentação da kombucha, deste modo os resultados obtidos pelo ensaio Azul da Prússia, se mostram mais sólidos para estimar o teor de fenólicos totais presentes nas kombuchas. Em seus estudos,

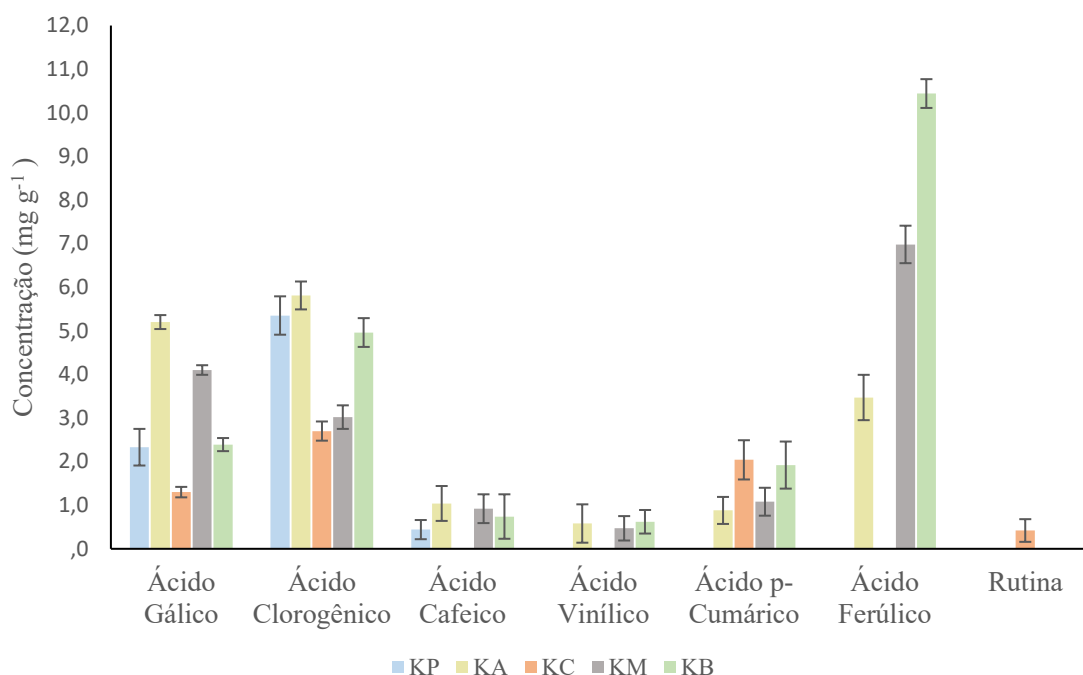
Wanderley *et al.* (2023) obtiveram valores de 184,39 mg AGE 100 mL⁻¹ para kombucha produzida com chá verde e saborizada com polpa de *Psidium cattleianum*.

A atividade de eliminação de radicais livres por meio dos ensaios DPPH e DPPH modificado, bem como o ensaio do poder redutor do ferro por FRAP, demonstraram resultados superiores para a amostra KB, reforçando a associação dos compostos fenólicos presentes com o potencial antioxidante observado na bebida. As amostras KC e KM não apresentaram diferença significativa ($p \geq 0,05$) para o ensaio de DPPH. Pode-se inferir que o processo de clarificação do suco de melancia promoveu uma redução no teor de compostos bioativos presente no suco e, consequentemente, não resultou em diferença significativa no teor desses compostos na bebida.

5.7 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos nas kombuchas por HPLC

A análise cromatográfica por HPLC-DAD possibilitou a identificação de 8 compostos fenólicos das 5 amostras de kombuchas, por meio da comparação dos seus tempos de retenção com os dos padrões utilizados. Os compostos detectados foram quantificados e suas concentrações determinadas em mg/g das amostras de kombucha liofilizadas. Conforme apresentado na Figura 15, foram detectados valores superiores de 3 compostos fenólicos para a amostra KA quando comparados com as demais amostras. Para KA, os compostos detectados em concentração superior foram: ácido gálico (5,20 mg g⁻¹), ácido clorogênico (5,81 mg g⁻¹) e ácido cafeico (1,04 mg g⁻¹), podendo a maior concentração desses compostos na kombucha estar associada à presença dessas substâncias nas folhas de malvarisco adicionadas durante o processo fermentativo, conforme observado nos estudos de Rodrigues *et al.* (2021). Outra hipótese é a própria saborização da bebida por meio da utilização do suco elaborado com o abacaxi (Steingass *et al.*, 2015).

Figura 15 - Quantificação de compostos fenólicos nas kombuchas por HPLC (mg g^{-1} de amostra liofilizada)



KP - kombucha pitaya; KA - kombucha abacaxi; KC - kombucha controle; KM - kombucha melancia; KB - kombucha base.

Fonte: Autor (2025).

O ácido ferúlico foi o composto identificado em maior concentração ($10,44 \text{ mg g}^{-1}$), o que ocorreu na amostra KB, possivelmente pelo fato de essa amostra tratar-se da kombucha base, na qual foi utilizada apenas a adição do malvarisco no processo fermentativo, sem posterior saborização. O ácido ferúlico trata-se de uma molécula presente na constituição das partes aéreas do malvarisco, conforme resultados obtidos nos ensaios cromatográficos realizados nas folhas (Tabela 7) e corroborados por Sulaiman, Deepak e Balachandran (2018) em análise espectroscópica de massa em tandem, realizada em extratos da planta. Logo, o fator diluição também pode estar associado a esse comportamento, uma vez em que foi possível quantificá-lo nas amostras KA e KM, ambas submetidas ao processo de saborização por meio da adição de suco, mas em concentrações inferiores.

Já o composto rutina foi detectado apenas na amostra KC, onde se observou baixas concentrações ($0,42 \text{ mg g}^{-1}$). De maneira geral, a exposição dos compostos fenólicos ao processo de biotransformação durante a fermentação da kombucha, em especial ao consórcio simbiótico de bactérias e leveduras, pode ocasionar uma conversão das estruturas dos polifenóis, originando outros compostos fenólicos por meio da atuação de enzimas secretadas

pela própria microbiota, sendo responsáveis por modificar a concentração desses compostos. (De Miranda *et al.*, 2022; Jayabalan; Marimuthu; Swaminathan, 2007).

5.8 Toxicidade aguda e Indução de edema abdominal por κ -Carragenina 1,5%

5.8.1 Toxicidade aguda

O ensaio de toxicidade aguda foi conduzido com o objetivo de avaliar a segurança da amostra de kombucha base elaborada com a adição de malvarisco, assim como a comparação com a amostra controle. Este teste permitiu verificar se a inclusão da planta, utilizada na concentração de 15% (m/v) no processo de fermentação, poderia influenciar na toxicidade da bebida. Os resultados demonstraram que todas as doses (4; 20 e 40 mg Kg⁻¹) das amostras KB e KC testadas não foram tóxicas para peixes-zebra adultos (DL₅₀ > 40 mg Kg⁻¹) no ensaio de toxicidade aguda, pois não houve morte significativa de animais durante 96 horas de análise (Tabela 14).

Tabela 14 - Teste de toxicidade da kombucha controle (sem malvarisco) e kombucha base (com malvarisco) – KB em peixe-zebra adulto

Amostras	Toxicidade			96h
	4 (mg Kg ⁻¹)	20 (mg Kg ⁻¹)	40 (mg Kg ⁻¹)	DL50 (mg Kg ⁻¹)/ <i>In Vivo</i>
Controle DMSO 3%	0	0	0	> 40
KC	0	0	1	> 40
KB	0	0	0	> 40

Controle (DMSO 3%; 20 µL; i.p.). Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo.

Fonte: Autor (2025).

Estudos de toxicidade, como os realizados por Balasubramanian *et al.* (2020) em extratos de malvarisco por meio de embriões de peixe-zebra e camarão de salmoura, nos quais não se observou toxicidade em concentrações de 3,125-100 µg mL⁻¹, fortalecem os dados obtidos nos ensaios realizados com a kombucha adicionada de malvarisco.

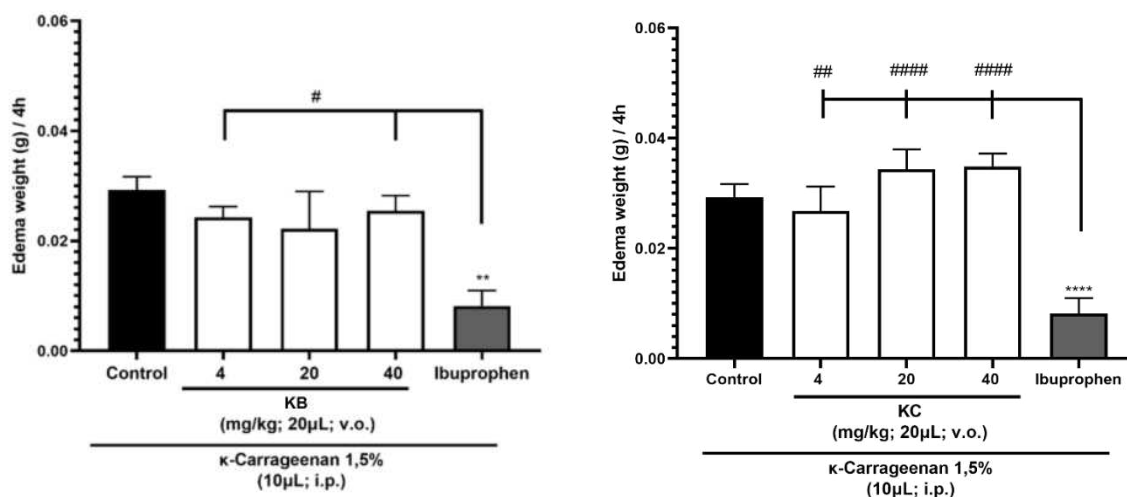
Esses achados são especialmente relevantes, considerando que o malvarisco é uma planta amplamente utilizada por suas propriedades medicinais, mas cujos efeitos em sistemas biológicos específicos, como no peixe-zebra, ainda carecem de estudos mais detalhados. Além disso, os resultados atestam a segurança para consumo da bebida.

5. 8. 2 Indução de edema abdominal por κ -Carragenina 1,5% (teste de inflamação)

O teste de efeito inflamatório induzido pela κ -Carragenina 1,5% têm como princípio a indução de edema abdominal por meio da aplicação do composto. Ressalta-se que o teste é baseado no aumento ou diminuição do peso do animal após o pré-tratamento com a κ -Carragenina 1,5%. Quando a droga não apresenta ação anti-inflamatória, o peixe demonstrará aumento de peso, indicando a formação de edema abdominal, e nas horas subsequentes à sua permanência, indicando que o edema não reduziu (Procedimento Operacional Padrão, 2023).

Com relação ao teste de inflamação, apenas a amostra KM na dose intermediária (20 mg Kg⁻¹) não diferiu do ibuprofeno, porém também não apresentou diferença significativa do controle DMSO 3%, indicando que ainda havia formação de edema. As demais doses (4 e 40 mg Kg⁻¹), demonstraram diferença significativa do controle positivo ($p < 0,05$ vs ibuprofeno) conforme apresentado na Figura 16.

Figura 16 - Efeito das amostras kombucha controle – KC e kombucha base (malvarisco) – KB no edema abdominal induzido por κ -Carragenina 1,5% em zebrafish adulto, analisado durante o período da quarta hora de teste



Cada coluna representa uma média $\pm$ erro padrão da média ($n = 6$ /peixe). *Two-way* ANOVA com teste Tukey (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. DMSO 3%; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ vs. Ibuprofeno).

Fonte: Autor (2025).

Já a amostra KC, nas doses testadas (4; 20 e 40 mg/kg), apresentou diferença significativa com o ibuprofeno (## $p < 0,01$, #### $p < 0,0001$), indicando que ainda existe edema formado no animal, ou seja, a amostra não apresenta um possível efeito anti-inflamatório.

5.9 Análises microbiológicas

Os resultados das análises microbiológicas indicaram ausência de *Salmonella*/25 mL e *Escherichia coli*/mL nas kombuchas testadas, indicando conformidade com os parâmetros microbiológicos estabelecidos para o kombucha *in natura* (Brasil, 2024). Além disso, a kombucha naturalmente possui características específicas que desfavorecem o meio para o desenvolvimento de microrganismos patogênicos, por deter um pH abaixo de 4,5 (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). Com base nesses resultados, o produto configurou-se apto para a avaliação sensorial.

5.10 Análise sensorial

5.10.1 Grupo focal

No grupo focal, após a apresentação das amostras e a degustação pelos participantes, foram selecionados os descritores sensoriais com base nos atributos que melhor caracterizavam as kombuchas, incluindo aparência, aroma, sabor e impressão global. O processo de seleção ocorreu de forma colaborativa, por meio da discussão e consenso entre os participantes, garantindo que os termos escolhidos refletissem com precisão as percepções sensoriais das amostras avaliadas. Ao final, obteve-se 5 descritores de aparência, 12 de aroma e 14 de gosto e sabor, totalizando 31 descritores, conforme Tabela 15.

Tabela 15 - Lista de descritores utilizados para avaliação sensorial das kombuchas

Aparência	Aroma	Sabor
Presença de bolhas	Aroma fermentado	Gosto doce
Presença de espuma	Aroma frutado	Gosto salgado
Brilhante	Aroma doce	Gosto ácido
Translúcida (limpida)	Aroma cítrico	Gosto amargo
Turva (presença de material em suspensão)	Aroma de vinagre	Sabor frutado
	Aroma de abacaxi	Sabor de abacaxi
	Aroma de pitaya	Sabor de pitaya
	Aroma de melancia	Sabor de melancia
	Aroma apodrecido	Sabor de chá
	Aroma fermentado de pão	Sabor de chá verde
	Aroma herbal	Sabor de vinagre

Aroma de malvarisco

Sabor refrescante
Sabor adstringente
Sabor desagradável

Fonte: Autor (2025).

5.10.2 Teste sensorial

A análise sensorial foi conduzida com o objetivo de avaliar as características sensoriais das amostras de kombucha, considerando o perfil da equipe de avaliadores (Tabela 16), os descritores e suas intensidades, previamente selecionadas. Os resultados foram analisados estatisticamente, permitindo identificar as diferenças significativas entre as amostras e compreender a distribuição dos descritores com base na frequência de seleção e na percepção sensorial dos participantes.

Tabela 16 - Informações demográficas referente aos 120 avaliadores do teste sensorial

Informações Demográficas		Frequência relativa (%)
Idade	18 - 20 anos	36
	20 - 30 anos	40
	30 - 40 anos	13
	40 - 50 anos	9
	50 - 60 anos	2
Conhece ou já ouviu falar sobre malvarisco?	Sim	60
	Não	40
Conhece ou já ouviu falar sobre kombucha?	Sim	56
	Não	44
Conhece os benefícios da kombucha?	Sim	35
	Não	65
Já consumiu kombucha?	Sim	17
	Não	83
Com que frequência você consome kombucha?	Sempre (quase todo dia)	0
	Muito (pelo menos 4 vezes por semana)	1
	Moderado (pelo menos 2 vezes por semana)	0
	Pouco (1 vez por mês)	1
	Quase nunca (menos de uma vez por mês)	98

Fonte: Autor (2025).

Os dados demográficos apresentados indicam que a grande maioria dos avaliadores está concentrada entre 18 e 30 anos (76%), sugerindo um público-alvo jovem, mais receptivo a produtos associados à saúde e bem-estar. No entanto, a baixa representatividade de pessoas acima de 30 anos pode limitar o entendimento sobre a aceitação do produto por consumidores mais velhos, considerando que consumidores em idades mais avançadas também têm potencial interesse em produtos funcionais e naturais, como a kombucha.

Em relação ao conhecimento prévio sobre o malvarisco e a kombucha, foi identificado que 60% dos avaliadores já ouviram falar sobre malvarisco, enquanto 40% desconhecem a planta. Isso revela um conhecimento moderado, mas ainda insuficiente, sobre o ingrediente. Analisando o conhecimento sobre kombucha, 56% afirmaram conhecer a bebida, mas apenas 35% compreendem seus benefícios. Essa diferença reforça a ideia de que, embora a kombucha esteja ganhando popularidade, o público em geral ainda carece de informações sobre suas propriedades funcionais e diferenciais em relação a outras bebidas.

Já sobre o consumo da kombucha os números são inferiores, onde somente 17% já consumiram, sendo 98% de forma esporádica (menos de uma vez por mês). Esses dados indicam barreiras como perfil sensorial, preço ou acesso, que dificultam a popularização e consolidação da bebida como hábito alimentar.

5.10.3 Check all that apply (CATA)

O tratamento estatístico possibilitou identificar que, dos 31 atributos avaliados, 9 deles foram significativos ($p < 0,05$) pelo teste Q de Cochran, sendo eles: presença de bolhas, presença de espuma, translúcida (límpida), aroma doce, aroma de pitaya, gosto doce, sabor de abacaxi, sabor de pitaya e sabor de melancia (Tabela 17). O descritor gosto doce foi mencionado para descrever as kombuchas em uma proporção de 80%. Já os descritores translúcida (límpida), aroma doce e sabor de abacaxi foram mencionados nas proporções de 72, 68 e 43%, respectivamente, enquanto os descritores presença de bolhas, presença de espuma, aroma de pitaya, sabor de pitaya e sabor de melancia foram mencionados em proporções abaixo de 20%.

Tabela 17 - Resultado do teste Q de Cochran referente aos atributos e à frequência de seleção por tratamento

Atributos	p-valores	Tratamentos**			
		KC	KP	KA	KM
Presença de bolhas*	0,000	0,235 ^a	0,070 ^b	0,296 ^a	0,104 ^b
Presença de espuma*	0,000	0,035 ^a	0,035 ^a	0,07 ^a	0,061 ^a
Brilhante	0,159	0,835 ^a	0,877 ^a	0,791 ^a	0,843 ^a
Translúcida (Límpida)*	0,001	0,871 ^a	0,482 ^b	0,757 ^a	0,774 ^a
Turva (material em suspensão)	0,316	0,661 ^{ab}	0,421 ^c	0,557 ^{bc}	0,765 ^a
Aroma fermentado	1,000	0,565 ^a	0,465 ^a	0,531 ^a	0,565 ^a
Aroma frutado	0,227	0,461 ^b	0,623 ^{ab}	0,774 ^a	0,583 ^b
Aroma doce*	0,005	0,557 ^b	0,623 ^b	0,843 ^a	0,687 ^{ab}
Aroma cítrico	0,980	0,513 ^{ab}	0,431 ^b	0,635 ^a	0,609 ^a
Aroma vinagre	0,782	0,471 ^a	0,289 ^b	0,374 ^{ab}	0,374 ^{ab}
Aroma abacaxi	0,182	0,252 ^b	0,158 ^b	0,748 ^a	0,252 ^b
Aroma pitaya*	0,000	0,096 ^b	0,412 ^a	0,113 ^b	0,078 ^b
Aroma de melancia	0,330	0,104 ^a	0,096 ^a	0,104 ^a	0,139 ^a
Aroma apodrecido	0,207	0,391 ^a	0,202 ^b	0,261 ^{ab}	0,304 ^{ab}
Aroma fermentado de pão	0,672	0,322 ^a	0,263 ^a	0,243 ^a	0,226 ^a
Aroma herbal	0,980	0,417 ^a	0,447 ^a	0,365 ^a	0,487 ^a
Aroma de malvarisco	1,000	0,487 ^a	0,500 ^a	0,487 ^a	0,557 ^a
Gosto doce*	0,034	0,809 ^{ab}	0,728 ^b	0,870 ^a	0,809 ^{ab}
Gosto salgado	0,237	0,209 ^a	0,193 ^a	0,148 ^a	0,243 ^a
Gosto ácido	0,998	0,504 ^a	0,412 ^a	0,443 ^a	0,417 ^a
Gosto amargo	0,944	0,409 ^a	0,377 ^a	0,33 ^a	0,443 ^a
Sabor frutado	0,453	0,530 ^b	0,667 ^{ab}	0,757 ^a	0,661 ^{ab}
Sabor de abacaxi*	0,000	0,435 ^b	0,158 ^b	0,809 ^a	0,322 ^b
Sabor de pitaya*	0,000	0,043 ^b	0,491 ^a	0,087 ^b	0,087 ^b
Sabor de melancia*	0,000	0,087 ^b	0,079 ^b	0,104 ^b	0,226 ^a
Sabor de chá	0,798	0,704 ^a	0,614 ^a	0,557 ^a	0,678 ^a
Sabor de chá verde	0,951	0,522 ^a	0,430 ^{ab}	0,348 ^b	0,522 ^a
Sabor de vinagre	0,370	0,313 ^a	0,202 ^a	0,217 ^a	0,278 ^a
Sabor refrescante	0,999	0,539 ^a	0,491 ^a	0,583 ^a	0,530 ^a
Sabor adstringente	0,881	0,304 ^a	0,289 ^a	0,252 ^a	0,322 ^a
Sabor desagradável	0,821	0,374 ^a	0,404 ^a	0,287 ^a	0,383 ^a

KC – kombucha controle, KP – kombucha pitaya, KA – kombucha abacaxi, KM – kombucha melancia.

p-valor menor que 0,05 indica significância para o atributo (teste Q de Cochran).

** Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos a 5% de significância, pelo teste de McNemar (Bonferroni).

Fonte: Autor (2025).

Para o descritor presença de bolhas, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para as amostras KC e KA, quando comparadas com KP e KM, porém elas não difeririam entre si ($p > 0,05$), sendo a quantidade de menções do termo para a descrição das amostras de

29,6% para KA, de 23,5% para KC, de 10,4% para KM e de 7% para KP. Esses resultados revelam que a presença de bolhas foi mais perceptível para kombucha de abacaxi e menos perceptível para a kombucha de pitaya, possivelmente devido à viscosidade e à intensidade de cor do suco utilizado no processo de saborização, que pode ter influenciado a visualização das bolhas na amostra KP. Já para presença de espuma, as amostras não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$) e as menções para esse termo foram inferiores a 10%, indicando uma baixa presença de espuma nas amostras submetidas ao teste.

As amostras KC (87,1%), KA (75,7%) e KM (77,4%) foram descritas como mais translúcidas, não apresentando diferença significativa entre si ($p > 0,05$), enquanto KP (47,8%) foi significativamente diferente ($p < 0,05$) das demais amostras e mencionada em menor proporção para este atributo. Isso sugere que o suco de pitaya, utilizado na KP, impactou negativamente a aparência límpida devido à sua coloração intensa e à possível presença de partículas em suspensão.

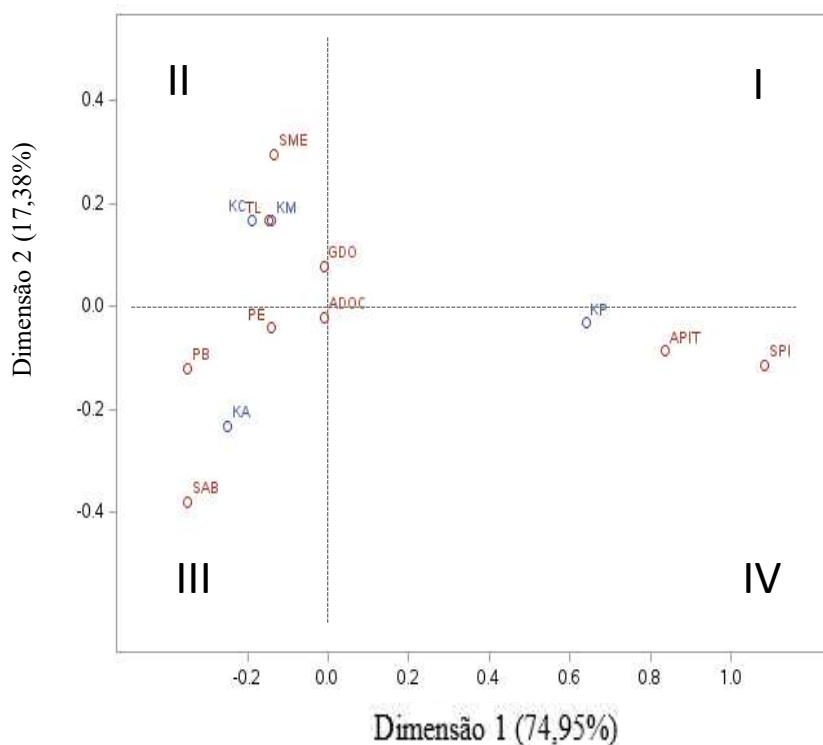
Nos descritores de aroma doce e gosto doce, a amostra KA diferiu significativamente ($p < 0,05$) da amostra KP, assim como também apresentou o maior índice de menções 84,3 e 87%, respectivamente. Para os descritores aroma de pitaya e sabor de pitaya, a amostra KP apresentou diferença das demais amostras, o que já era esperado, devido à predominância do perfil sensorial característico do suco de pitaya em KP.

Dartora *et al.* (2023), na avaliação das características sensoriais de kombuchas elaboradas com chá verde durante 14 dias de fermentação, observaram que no quarto dia acentuaram-se os aspectos de turbidez, aroma de vinagre, frutas cítricas, ácido e alcoólico; e obtiveram uma bebida com sabor azedo, amargo e de vinagre.

As amostras KA e KM apresentaram comportamento similar nos descritores de sabor de abacaxi e sabor de melancia. A amostra KA diferiu significativamente ($p < 0,05$) das demais amostras para o descritor sabor de abacaxi; o mesmo ocorreu para amostra KM no descritor sabor de melancia. Os resultados, já esperados, demonstram que os avaliadores apresentaram facilidade na percepção dos descritores de cada amostra, até mesmo para a amostra KM, em que o suco sofreu o processo de clarificação, perdendo assim, suas características naturais de coloração avermelhada.

A análise de Correspondência foi aplicada aos descritores sensoriais que se mostraram significativos ($p < 0,05$) pelo teste CATA. Assim, observou-se a boa adequação para a explicação da variação dos dados para as diferentes amostras de kombuchas, onde a soma das dimensões 1 (74,95%) e 2 (17,38%) totalizaram 92,33%, como representado na Figura 17.

Figura 17 - Análise de Correspondência para o teste CATA



KC – kombucha controle; KP – kombucha pitaya; KA – kombucha abacaxi KM – kombucha melancia; SME – Sabor de melancia, TL – Translúcida (limpida), GDO – Gosto doce, ADOC – Aroma doce, PE – Presença de espuma, PB - Presença de bolhas, SAB – Sabor de abacaxi, APIT – Aroma de pitaya e SPI – Sabor de pitaya. Fonte: Autor (2025).

A análise do gráfico gerado revela que a maior parte da variabilidade dos dados obtidos (~75%) está sendo explicada pela dimensão 1, sugerindo que os descritores associados a ela apresentam maior relevância para explicar as diferenças entre as amostras. Entretanto, a soma dos dois eixos captura a maior parte da variação sensorial entre as amostras. Isso demonstra que o gráfico é representativo e fornece uma visão confiável das diferenças entre as kombuchas.

O posicionamento disperso das amostras saborizadas na Figura 17 revelou que há características distintas entre elas, perceptíveis no teste sensorial. A amostra KP (Kombucha pitaya), no quadrante 4, associou-se aos vetores APIT (Aroma de pitaya) e SPI (Sabor de pitaya), evidenciando as características sensoriais distintas das demais amostras, atribuídas à bebida pela saborização com o suco de pitaya. Além disso, é a amostra mais afastada do eixo da dimensão 1, reforçando sua distinção.

Conforme Bishop *et al.* (2022), tanto os tipos de chá utilizados como matéria-prima quanto os microrganismos presentes, como leveduras e bactérias, influenciam de forma significativa o perfil aromático, algo também observado em outras bebidas fermentadas.

Já a amostra KA (Kombucha abacaxi), no lado oposto (quadrante 3), correlacionou-se aos vetores SAB (Sabor de abacaxi) e PB (Presença de bolhas), resultando no alinhamento da

bebida ao sabor do abacaxi, bem como revelou uma maior percepção de bolhas, possivelmente atribuída à interação dos compostos presentes no suco com a kombucha base durante a saborização, proporcionando um ambiente mais favorável e estimulando uma maior produção de dióxido de carbono (CO₂), mesmo após a refrigeração. Outro fator que pode estar associado é a coloração clara da bebida após a saborização, assim como sua baixa turbidez, que facilitaram a visualização das bolhas de CO₂.

A amostra KM (Kombucha melancia) e KC (Kombucha controle) apresentaram similaridades nos descritores sensoriais, como a proximidade do vetor TL (Translúcido), indicando que nesse descritor foi observada pouca diferença entre as duas bebidas. Isso está muito associado ao fato de que ambas apresentavam tonalidades claras e translúcidas, em KM pela clarificação do suco de melancia, e em KC por já ser uma característica padrão da bebida e não haver adição de suco. Ainda sobre KM a proximidade com o descritor SME indicou a percepção do sabor de melancia para a amostra, apontando que o processo de clarificação não comprometeu as características de sabor do suco associado à kombucha.

Os descritores GDO (Gosto doce) e ADOC (Aroma doce) estão próximos ao centro (origem), indicando que o dulçor, tanto no sabor quanto no aroma, é uma característica compartilhada por todas as amostras. Os teores de açúcar da kombucha tendem a diminuir com o aumento do sabor ácido, devido ao fato de o SCOBY utilizar o açúcar como substrato para produzir ácidos orgânicos (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). Os descritores de gosto doce e aroma doce observados nas amostras de kombucha podem ser associados ao menor tempo de fermentação (4 dias), onde o consumo de açúcares foi menor do que no tempo de fermentação comumente utilizado (7 – 10 dias), resultando em kombuchas de sabor e aroma mais doce.

5.10.4 Rate all that apply (RATA)

A partir do teste RATA, foi possível identificar a intensidade dos descritores sensoriais utilizados para o teste CATA nas amostras de kombuchas, conforme representado na Tabela 18.

Tabela 18 - Valores médios para intensidade dos atributos sensoriais pelo teste RATA

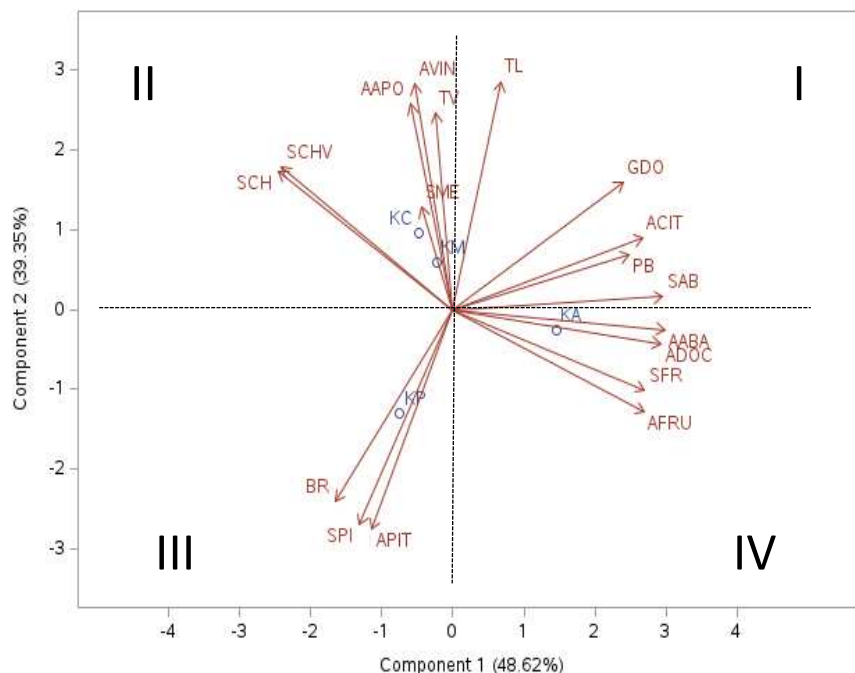
Atributos	Tratamentos**				Pr > Fcl
	KC	KP	KA	KM	
Presença de bolhas*	0,330 ^{ab}	0,105 ^c	0,495 ^a	0,121 ^{bc}	0,000
Presença de espuma	0,043 ^a	0,070 ^a	0,095 ^a	0,086 ^a	0,717
Brilhante*	1,930 ^b	2,649 ^a	1,800 ^b	1,747 ^b	0,000
Translúcida (Límpida)*	2,095 ^b	1,122 ^a	1,730 ^b	1,765 ^b	0,000
Turva (Material em suspensão) *	1,643 ^b	0,991 ^c	1,304 ^{bc}	2,182 ^a	0,000
Aroma fermentado	1,243 ^a	0,903 ^a	1,130 ^a	1,165 ^a	0,210
Aroma frutado*	0,852 ^b	1,315 ^b	2,165 ^a	1,191 ^b	0,000
Aroma doce*	1,200 ^b	1,307 ^b	2,347 ^a	1,547 ^b	0,000
Aroma cítrico*	0,939 ^{bc}	0,745 ^c	1,478 ^a	1,243 ^{ab}	0,000
Aroma vinagre*	0,956 ^a	0,552 ^b	0,652 ^{ab}	0,765 ^{ab}	0,041
Aroma abacaxi*	0,417 ^b	0,280 ^b	2,469 ^a	0,547 ^b	0,000
Aroma pitaya*	0,121 ^b	0,859 ^a	0,217 ^b	0,104 ^b	0,000
Aroma de melancia	0,139 ^a	0,157 ^a	0,173 ^a	0,339 ^a	0,076
Aroma apodrecido*	0,800 ^a	0,350 ^b	0,443 ^b	0,504 ^{ab}	0,003
Aroma fermentado de pão	0,582 ^a	0,500 ^a	0,417 ^a	0,434 ^a	0,530
Aroma herbal	0,930 ^a	1,078 ^a	0,834 ^a	1,313 ^a	0,076
Aroma de malvarisco	1,113 ^a	1,342 ^a	1,121 ^a	1,513 ^a	0,149
Gosto doce*	2,078 ^a	1,561 ^b	2,286 ^a	1,869 ^{ab}	0,000
Gosto salgado	0,330 ^a	0,342 ^a	0,226 ^a	0,347 ^a	0,546
Gosto ácido	0,982 ^a	0,754 ^a	0,843 ^a	0,695 ^a	0,232
Gosto amargo	1,026 ^a	0,903 ^a	0,704 ^a	0,921 ^a	0,328
Sabor frutado*	1,008 ^c	1,385 ^{bc}	2,191 ^a	1,513 ^b	0,000
Sabor de abacaxi*	0,878 ^b	0,263 ^b	2,817 ^a	0,678 ^b	0,000
Sabor de pitaya*	0,069 ^b	1,026 ^a	0,156 ^b	0,113 ^b	0,000
Sabor de melancia*	0,156 ^b	0,140 ^b	0,147 ^b	0,573 ^a	0,000
Sabor de chá*	1,869 ^a	1,535 ^{ab}	1,139 ^b	1,747 ^a	0,002
Sabor de chá verde*	1,208 ^a	0,938 ^{ab}	0,634 ^b	1,113 ^a	0,004
Sabor de vinagre	0,600 ^a	0,385 ^a	0,417 ^a	0,400 ^a	0,256
Sabor refrescante	1,278 ^a	1,166 ^a	1,669 ^a	1,252 ^a	0,061
Sabor adstringente	0,530 ^a	0,535 ^a	0,478 ^a	0,539 ^a	0,960
Sabor desagradável	0,939 ^a	0,964 ^a	0,634 ^a	0,895 ^a	0,235

KC – kombucha controle; KP – kombucha pitaya; KA – kombucha abacaxi; KM – kombucha melancia. *Atributos que apresentaram diferença na intensidade ($p < 0,05$). **Médias nas linhas seguidas por letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos a 5% de significância, pelo teste de McNemar (Bonferroni).

Fonte: Autor (2025).

Por meio da análise estatística, foram identificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na intensidade de 18 descritores, sendo 4 relacionados à aparência, 7 ao aroma e 7 ao sabor. Para considerar a relação entre a intensidade dos descritores e amostras de kombucha, foi realizada a Análise de Componentes Principais (Figura 18).

Figura 18 - Análise de Componentes Principais (ACP) das kombuchas pelo RATA



KC – kombucha controle; KP – kombucha pitaya; KA – kombucha abacaxi; KM – kombucha melancia; SME – Sabor de melancia; TL – Translúcida (límpida), GDO – Gosto doce, ACIT – Aroma cítrico, PB - Presença de bolhas, SAB – Sabor de abacaxi, AABA – Aroma de abacaxi, ADOC – Aroma doce, SFR – Sabor frutado, AFRU – Aroma frutado, APIT – Aroma de pitaya, SPI – Sabor de pitaya, BR – Brilhante, SCH – Sabor de chá, SCHV – Sabor de chá verde, SME – Sabor de melancia, AAPO – Aroma apodrecido, AVIN – Aroma vinagre, TV – Turva (material em suspensão).

Fonte: Autor (2025).

A distribuição da kombuchas no gráfico revela as distinções entre as amostras. Os componentes 1 (48,62%) e 2 (39,35%), que totalizam 87,97%, explicaram a maior parte da variabilidade entre as bebidas.

A amostra KM (kombucha melancia), localizada no quadrante II, apresentou um comportamento similar à amostra controle (KC), por estar mais próxima ao centro e mais próxima aos vetores que caracterizaram a bebida tradicional. Entretanto, mesmo com proximidade às características da kombucha controle, por meio do vetor SME (Sabor de melancia), observou-se uma percepção em menor intensidade por parte dos avaliadores, para caracterizar o sabor de melancia na bebida. Fatores como a ausência de pigmentação, explicada pela maior proximidade com o vetor TL (Translúcida) e uma possível redução no perfil aromático para a amostra KM, decorrentes da clarificação enzimática do suco de melancia, podem ter influenciado na maior distinção da amostra (Riu-Aumatell; López-Tamames; Buxaderas, 2005; Armada; Fernández; Falqué, 2010).

Já para a amostra KA (kombucha abacaxi), localizada no quadrante IV, o comportamento foi oposto, mas já esperado, com KA apresentando forte intensidade para os vetores AABA (Aroma de abacaxi), ADOC (Aroma doce) e SAB (Sabor de abacaxi), que descrevem as características sensoriais da bebida adicionada do suco de abacaxi. Além disso, reforça as correlações observadas para os dados de CATA (Figura 17). A amostra também se destacou pelos vetores ACIT (Aroma cítrico), GDO (Gosto doce), SFR (Sabor frutado), AFRU (Aroma frutado) e PB (Presença de bolhas), indicando a adesão de descritores sensoriais que conferiram um perfil mais leve para a bebida com a saborização e que a difere da kombucha convencional. Ainda sobre KA, o descritor PB indicou que o CO₂ foi perceptível na amostra pelos avaliadores, assim como observado para CATA, diferindo-se das demais bebidas. Mendonça *et al.* (2023), na avaliação sensorial de kombuchas elaboradas com partes do hibisco e saborizadas com suco de uva, não obtiveram diferenças entre as amostras para o descritor presença de bolhas.

O perfil apresentado pela amostra KP (kombucha pitaya) (quadrante III) também reflete sua distinção das demais amostras. Assim como na amostra KA, a intensidade dos vetores APIT (Aroma de pitaya) e SPI (Sabor de pitaya) indicaram boa percepção por parte dos avaliadores para caracterizar a amostra KP, assim como a pigmentação atribuída à kombucha decorrente da presença de betalaínas presente na pitaya configuraram uma aparência distinta para a bebida. O descritor BR (Brilhante), também associado à bebida, reflete as características de intensidade de cor e de viscosidade do suco de pitaya.

A amostra KC (kombucha controle), por sua vez, foi descrita por sua neutralidade, uma vez que não recebeu saborização. Essas características são apontadas por meio dos vetores SCH (Sabor de chá), SCHV (Sabor de chá verde) e AAPO (Aroma apodrecido), que refletem o perfil da bebida tradicional, resultado da presença marcante do sabor de chá atribuído pela *Camellia sinensis* e do aroma de fermentação que comumente se associa ao aroma apodrecido.

5.10.5 Aceitação e intenção de compra das kombuchas

As médias para os atributos sensoriais (aparência, aroma, sabor, aceitação global) das kombuchas avaliadas são apresentadas na Tabela 19.

Tabela 19 - Valores médios e desvios-padrão para os atributos sensoriais das kombuchas

Atributos	Amostras			
	KC	KP	KA	KM
Aparência	5,55 ± 1,68 ^{bc}	7,03 ± 1,67 ^a	6,00 ± 1,42 ^b	5,08 ± 1,53 ^c
Aroma	5,06 ± 1,73 ^c	5,77 ± 1,63 ^b	6,80 ± 1,57 ^a	5,30 ± 1,69 ^c
Sabor	5,38 ± 1,92 ^b	5,24 ± 1,92 ^b	7,00 ± 1,68 ^a	5,39 ± 2,04 ^b
Aceitação global	5,54 ± 1,85 ^b	5,37 ± 1,93 ^b	7,06 ± 1,62 ^a	5,21 ± 2,06 ^b

KC – kombucha controle; KP – kombucha pitaya; KA – kombucha abacaxi; KM – kombucha melancia.

Valores seguidos de letras diferentes, nas linhas, indicam diferença significativa de acordo com análise de variância e teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$).

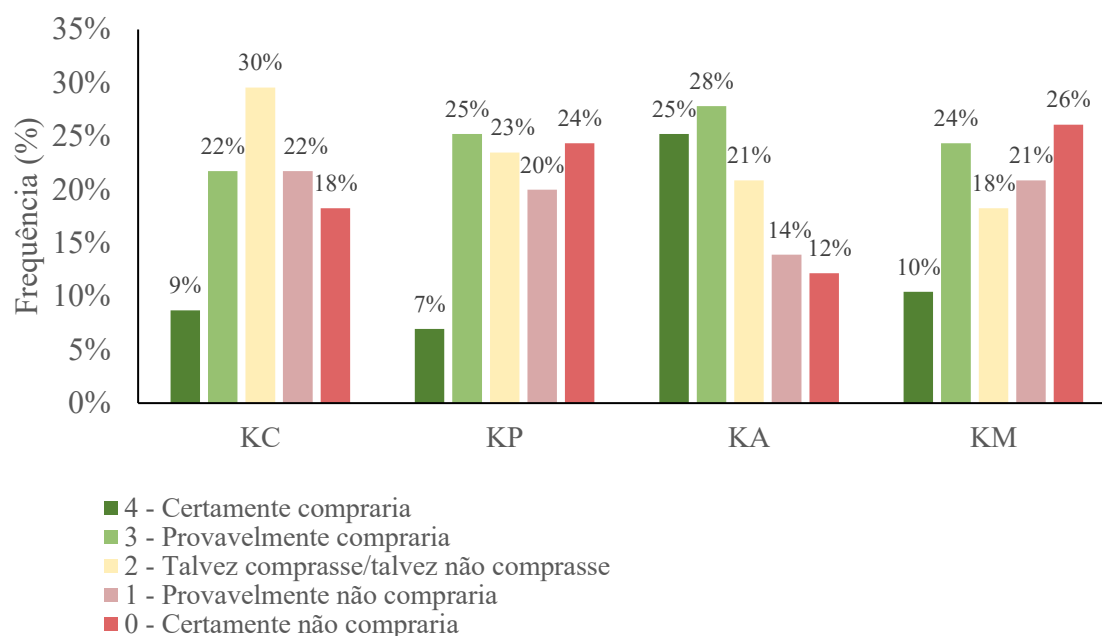
Conforme os dados obtidos, observaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) para todas as amostras de kombucha. Esses resultados revelam que o processo de saborização das bebidas, após a fermentação, apresentou relevância na sua aceitação sensorial. Além disso, por meio dos dados, foi verificado que a utilização do malvarisco durante a fermentação das amostras saborizadas não comprometeu os aspectos sensoriais finais da kombucha, visto que, nos testes CATA (Tabela 17) e RATA (Tabela 18), os descritores relativos à planta não foram significativos. Esses resultados são relevantes, pois apontam que a adição do malvarisco, na concentração de 15% (m/v), o configura como uma matéria-prima viável no processo de elaboração das kombuchas, além do impactar no perfil de compostos bioativos da bebida.

Para o atributo de aparência, a amostra KP (kombucha pitaya) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) das demais amostras, com pontuação classificando-a como “Gostei” na escala hedônica de nove pontos, revelando que as características de cor e brilho da amostra favoreceram sua maior aceitação nesse atributo. A amostra KA (kombucha abacaxi) foi relacionada ao “Gostei pouco”, enquanto KC (kombucha controle) e KM (kombucha melancia) foram associadas ao “Nem gostei nem desgostei”.

Já para os atributos de aroma, sabor e aceitação global, a amostra KA apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) dos demais tratamentos, com pontuações associadas ao “Gostei”, para sabor e aceitação global, e pontuação próxima ao “Gostei” para o atributo de aroma. As maiores pontuações de KA para o atributo de sabor aceitação global refletem a maior influência deles na aceitação das bebidas pelos avaliadores.

De maneira geral, os dados sobre a intenção de compra apresentados na Figura 19 revelaram que a amostra KA obteve as maiores frequências para “Provavelmente compraria” (28%) e “Certamente compraria” (25%), com sua soma superior a 50% dos avaliadores. Esses dados indicam seu destaque na intenção de compra, o que também se relaciona positivamente aos resultados obtidos no teste de aceitação.

Figura 19 - Distribuição da frequência de intenção de compra das kombuchas



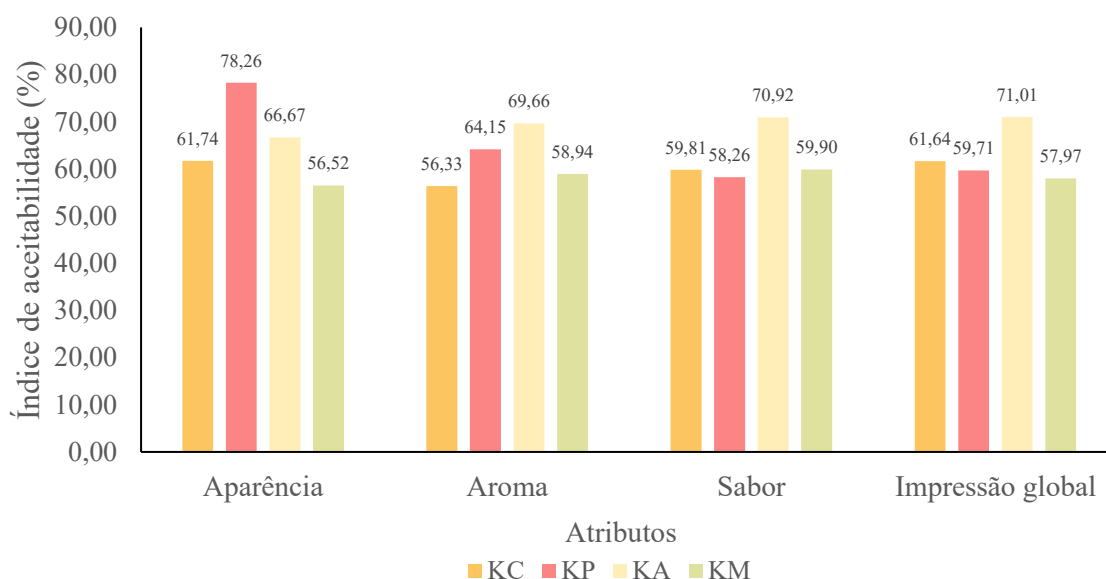
KC – kombucha controle; KP – kombucha pitaya; KA – kombucha abacaxi; KM – kombucha melancia; SME – Sabor de melancia.

Fonte: Autor (2025).

As frequências para “Provavelmente compraria” (25%) e “Certamente não compraria” (24%) destacaram dúvida por parte dos avaliadores em relação à intenção de compra para a amostra KP. Já para amostra KM, foi observada uma maior rejeição ao se somar as frequências para “Provavelmente não compraria” (21%) e “Certamente não compraria” (24%), refletindo 45% dos avaliadores. Para a amostra KC, os avaliadores declararam “Talvez comprasse/talvez não comprasse” (30%), indicando a neutralidade da amostra.

Com o objetivo de avaliar a aceitação comercial das kombuchas, foi calculado o índice de aceitabilidade para os atributos sensoriais (Figura 20).

Figura 20 - Índice de aceitabilidade por atributos para as amostras de kombucha



KC – kombucha controle, KP – kombucha pitaya; KA – kombucha abacaxi; KM – kombucha melancia.
Fonte: Autor (2025).

De acordo com Teixeira *et al.* (1987) e Dutcosky (2019), uma boa aceitação comercial é baseada em índices de aceitação com valores iguais ou superiores a 70%. Para as kombuchas estudadas, apenas a amostra KA (kombucha abacaxi) obteve valores superiores ao estabelecido para os atributos de sabor e impressão global, embora o atributo de aroma tenha apresentado um valor muito próximo a 70%. A amostra KP (kombucha pitaya) apresentou um valor superior apenas para o atributo de aparência, como resultado da coloração marcante da bebida, mas apresentou valores abaixo dos esperados para os demais atributos. Dessa forma, é possível concluir que a amostra KA atende aos requisitos para uma boa aceitação comercial nos atributos de maior impacto para o produto.

6 CONCLUSÕES

As folhas de malvarisco apresentaram características físico-químicas e bioativas positivas, com alta atividade antioxidante, evidenciando seu potencial como ingrediente funcional na fermentação da kombucha.

A kombucha base (KB) demonstrou superioridade sobre a amostra controle (KC) em parâmetros como pH, acidez total e volátil. A saborização promoveu diluição das amostras, resultando em aumento de pH, mas ainda dentro dos limites exigidos pela legislação vigente. A amostra KA destacou-se com os maiores valores de acidez, atribuídos aos ácidos orgânicos e compostos do suco de abacaxi na saborização.

Em relação aos compostos bioativos, a amostra KB apresentou o maior teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante, enquanto nas bebidas saborizadas a amostra KA teve resultados elevados para compostos fenólicos e atividade antioxidante por FRAP. Complementando, a análise cromatográfica identificou oito compostos fenólicos, com destaque para o ácido ferúlico em KB e maior concentração de ácido gálico, clorogênico e cafeico na KA.

As kombuchas não apresentaram toxicidade no modelo *zebrafish* e atenderam aos padrões microbiológicos vigentes.

A kombucha saborizada de abacaxi se destacou dentre as formulações quanto aos atributos sensoriais avaliados, refletindo uma boa intenção de compra e índices de aceitabilidade satisfatórios.

Os resultados obtidos indicaram que o malvarisco se configura como uma matéria-prima viável no processo fermentativo da kombucha. Além disso, a saborização da bebida, com suco de abacaxi, elaborada com adição da planta, contribui para a melhor aceitação sensorial, representa um diferencial promissor para a indústria alimentícia e promove aumento da competitividade no mercado de bebidas.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MOGIB, M.; ALBAR, H. A.; BATTERJEE, S. M. Chemistry of the genus *Plectranthus*. **Molecules**, v. 7, n. 2, p. 271–301, 2002.
- ABUDUAIBIFU, A.; TAMER, C. E. Evaluation of physicochemical and bioaccessibility properties of goji berry kombucha. **Journal of food processing and preservation**, v. 43, n. 9, p. 1-14, 2019.
- ABKOM - **Associação Brasileira de Kombucha**. 2020. Disponível em: <<https://abkom.org.br/>>. Acesso em: 10 maio, 2023.
- ALAKOLANGA, A. G. A. W.; USNA, J. F.; SAMARASINGHE, K. G. B. A. Screening of alpha amylase inhibitory activity and antioxidant activity of selected Sri Lankan medicinal plants and development of herbal tea. **Chemical Science International Journal**, p. 11–18, 2020.
- ALDERSON, H.; LIU, C.; MEHTA, A.; GALA, H. S.; MAZIVE, N. R.; CHEN, Y.; ZHANG, Y.; WANG, S.; SERVENTI, L. Sensory profile of Kombucha brewed with New Zealand ingredients by focus group and word clouds. **Fermentation**, v. 7, n. 3, p. 1-13, 2021.
- ANTAR, G.M. **Plectranthus in Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB23334>>. Acesso em: 24 jun. 2024
- AOAC, (Association of Official Agricultural Chemists) **Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists**. Association of Official Agricultural Chemists, 18. ed. Maryland, USA: 2005.
- APAK, R. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 5, p. 997–1027, 2016.
- ARMADA, L.; FERNÁNDEZ, E.; FALQUÉ, E. Influence of several enzymatic treatments on aromatic composition of white wines. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie [Food science and technology]**, v. 43, n. 10, p. 1–7, 2010.
- ARUMUGAM, G.; SWAMY, M.; SINNIHA, U. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: Botanical, phytochemical, pharmacological and nutritional significance. **Molecules**, v. 21, n. 4, p. 1-26, 2016.
- ARYAEIAN, N.; RASOULI, L.; GORJIAN, M.; NOURBAKHS, M.; AMIRI, F. Evaluation of cytotoxicity and anticancer activity of kombucha and doxorubicin combination therapy on colorectal cancer cell line HCT-116. **Journal of education and health promotion**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2021.

BALASUBRAMANIAN, B.; LIU, W.; PACHIAPPAN, P.; PARAMASIVAM, D.; PARK, S.; ALAGAPPAN, P. *et al.* Phytochemical profiling and biological activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) mediated by various solvent extracts against *Aedes aegypti* larvae and toxicity evaluation. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 13, n. 11, p. 494-502, 2020.

BAO, C.; Jiang, P.; Chai, J.; Jiang, Y.; Li, D.; Bao, W.; Liu, B.; Liu, B.; Norde, W.; Li, Y. The delivery of sensitive food bioactive ingredients: Absorption mechanisms, influencing factors, encapsulation techniques and evaluation models. **Food research international**, v. 120, p. 130–140, 2019.

BASSANI, D. C.; GRANATO, D.; NUNES, D. S. Optimization of phenolics and flavonoids extraction conditions and antioxidant activity of roasted yerba-mate leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquiliaceae) using response surface methodology. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 2, p. 923–934, 2014.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BEZERRA, A. J. N.; SILVA, F. C. O.; SILVA, A. W. da.; FERREIRA, M. K. A.; MARINHO, E. M.; MARINHO, M. M. *et al.* Antinociceptive effect of triterpene acetyl aleuritolic acid isolated from *Croton zehntneri* in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Biochem Biophys Res Commun**, [s. l.], v. 534, p. 478–484, 2021.

BISHOP, P.; ERIC, R. P.; BUDNER, D.; THOMPSON-WITRICK, K. A. Kombucha: Biochemical and microbiological impacts on the chemical and flavor profile, **Food Chemistry Advances**, v. 1, p. 1-9, 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Consolidação das Normas de Bebidas, Fermentado Acético, Vinho e Derivados da Uva e do Vinho**: anexo à Instrução Normativa SDA/MAPA nº 140/2024. 4. ed. Brasília, DF: Ministério da Agricultura e Pecuária, p. 1 – 2286, 15 out. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF: Ministério da Saúde, n. 12, p. 59, 13 jun. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019. Estabelece Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 181, p. 13, 2019.

BRESSANI, A. P. P.; CASIMIRO, L. K. S.; MARTINEZ, S. J.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Kombucha with yam: Comprehensive biochemical, microbiological, and sensory characteristics. **Food research international (Ottawa, Ont.)**, v. 192, n. 114762, p. 1-11, 2024.

CARDOSO, R. R.; NETO, R. O.; D'ALMEIDA, C. T. S.; NASCIMENTO, T. P.; PRESSETE, C. G.; AZEVEDO, L.; MARTINO, H. S. D.; CAMERON, L. C.; FERREIRA, M. S. L.; BARROS, F. A. R. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities, **Food Research International**, v. 128, p. 1-10, 2020.

CASTILLO-TÉLLEZ M, MARTÍNEZ O. S.; MIRANDA-MANDUJANO, E. Solar drying of oregano leaves (*Plectranthus amboinicus*, Lour): Analysis of experimental performance under a tropical climate. **Energy Exploration & Exploitation**, v. 1, p. 1-27, 2024.

CAVALCANTE, S. R. P.; FERNANDES, H. B.; SANTOS, J. S. Uma análise sobre o potencial da cumarina e a sua utilização como fármaco natural. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 16, p. 1-7, 2022.

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

CHAKRAVORTY, S.; BHATTACHARYA, S.; BHATTACHARYA, D.; SARKAR, S.; GACHHUI, R. **Kombucha: A promising functional beverage prepared from tea**. Elsevier Inc., 2019. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815270-6.00010-4>.

CHEN, L.-Y.; CHENG, C.-W.; LIANG, J.-Y. Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. **Food chemistry**, v. 170, p. 10–15, 2015.

COELHO, R. M. D. et al. Kombucha: Review. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 22, n. 1, p. 1-12, 2020.

DARTORA, B. HICKERT, L. R.; FABRICIO, M. F.; AYUB, M. A. Z.; FURLAN, J. M.; WAGNER, R.; PEREZ, K. J. *et al.* Understanding the effect of fermentation time on physicochemical characteristics, sensory attributes, and volatile compounds in green tea kombucha. **Food Research International (Ottawa, Ont.)**, v. 174, n. 1, p. 1 -11, 2023.

DE MEDEIROS GOMES, J.; CAHINO T. M. V.; DO SANTOS, S. G.; SOBRAL DA SILVA, M.; FECHINE TAVARES, J. Seasonal variations of polyphenols content, sun protection factor and antioxidant activity of two Lamiaceae species. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 1, p. 1-16, 2021.

DE MIRANDA, J. F.; RUIZ, L. F.; SILVA, C. B.; UEKANE, T. M.; SILVA, K. A.; GONZALEZ, A. G. M. *et al.* Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. **Journal of Food Science**, v. 87, n. 2, p. 503–527, 2022.

DIEZ-OZAETA, I.; ASTIAZARAN, O. J. Recent advances in Kombucha tea: Microbial consortium, chemical parameters, health implications and biocellulose production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 377, n. 1, p. 1-14, 2022.

DONNO, D.; HASSANI, S.; SOFOINI, T.; MELLANO, MARIA G.; RIONDATO, I.; GAMBA, G.; BECCARO, G. L. Traditional foods and sustainable rural development: Exploiting the case of the Comoros tea as a potential source of bioactive compounds. **Sustainability**, v. 13, n. 11, p. 1-21, 2021.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 5. ed. rev. Curitiba: PUCPRESS, 2019. 540 p.

EL-HAWARY, S. S.; EL-SOFANY, R. H.; ABDEL-MONEM, A. R.; ASHOUR, R. S.; SLEEM, A. Polyphenolics content and biological activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) spreng growing in Egypt (Lamiaceae). **Pharmacognosy Journal**, v. 4, n. 32, p. 45–54, 2012.

FABRICIO, M. F.; VARGAS, B. K.; TISCHER, B.; WAGNER, R.; RIBEIRO, S. R.; CORDEIRO, N.; FLÔRES, S. H.; ZÁCHIA AYUB, M. A. Revamping kombucha production: Achieving consistency and probiotic potential through a tailor-made microbial consortium. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 34, p. 1-12, 2023.

FDA Food and Drug Administration. (2009). **Food code**. Retrieved from fda. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/fda-food-code/food-code-2009>>. Acesso em: 05 de ago. 2024.

FRANCENIA SANTOS-SÁNCHEZ, N.; SALAS-CORONADO, R.; HERNÁNDEZ-CARLOS, B.; VILLANUEVA-CAÑONGO, C. Shikimic acid pathway in biosynthesis of phenolic compounds. In: **Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds**. [s.l.] IntechOpen, 2019.

GAGGIÀ, F.; BAFFONI, L.; GALIANO, M.; NIELSEN, D. S.; JAKOBSEN, R. R.; CASTRO-MEJÍA, J. L.; BOSI, S.; TRUZZI, F.; MUSUMECI, F.; DINELLI, G.; DI GIOIA, D. Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 1-22, 2018.

GRANATO, D.; SANTOS, J. S.; MACIEL, L. G.; NUNES, D. S. Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. **Trends in Analytical Chemistry: TRAC**, v. 80, p. 266–279, 2016.

GRAND VIEW RESEARCH. **Kombucha Market Size, Share & Trends Report, 2022-2030**. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/kombucha-market>. Acesso em: 20.11.2023.

HAMIDIN, N. A. S.; Abdullah, S.; Nor, F. H. M.; Hadibarata, T. Isolation and identification of natural green and yellow pigments from pineapple pulp and peel. **Materials Today: Proceedings**, v. 63, p. 1-5, 2022.

INDIABIODIVERSITY. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. 2020. Disponível em: <https://indiabiodiversity.org/group/plantsindia/observation/show/15648558>. Acesso em: 15 de agosto de 2024.

INTERNATIONAL, Kombucha Brewers. **Kombucha Code of Practice**. 2021. Disponível em: <https://kombuchabrewers.org/kombucha-code-of-practice/>. Acesso em: 15 de agosto de 2024.

JAKUBCZYK, K.; KAŁDUŃSKA, J.; KOCHMAN, J.; JANDA, K. Chemical profile and antioxidant activity of the kombucha beverage derived from white, green, black and red tea. **Antioxidants**, v. 9, n. 5, p. 1-15, 2020.

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

JAYABALAN, R.; MARIMUTHU, S.; SWAMINATHAN, K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 392–398, 2007.

JAYABALAN, R., RADOMIR V., MALBA, ŠA., SATHISHKUMAR, M. Kombucha. **Reference Module in Food Science**, 2016.

KAPP, J. M.; SUMNER, W. Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. **Annals of Epidemiology**, v. 30, p. 66–70, 2019.

KIM, J.; ADHIKARI, K. Current trends in kombucha: Marketing perspectives and the need for improved sensory research. **Beverages**, v. 6, n. 1, p. 15, 2020.

KITWETCHAROEN, H.; PHUNG, L. T.; KLANRIT, P.; THANONKEO, S.; TIPPAYAWAT, P.; YAMADA, M.; THANONKEO, P. Kombucha healthy drink—recent advances in production, chemical composition and health benefits. **Fermentation**, v. 9, n. 1, p. 48, 2023.

KONICA MINOLTA. **Compreendendo o Espaço de Cor CIE L*C*h**. 2023. Disponível em: <<https://sensing.konicaminolta.us/br/blog/compreendendo-o-espaco-de-cor-cie-lch/>>. Acesso em: 16 ago. 2024.

KUMAR, P.; SINGH, S.; KUMAR, N. *Plectranthus amboinicus*: A review on its pharmacological and, pharmacognostical studies. **American Journal of Physiology Biochemistry and Pharmacology**, v. 10, n. 2, p. 55, 2020.

LEAL, J. M.; SUÁREZ, L. V.; JAYABALAN, R.; OROS, J. H.; ESCALANTE- ABURTO, A. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **CYTA - Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 390–399, 2018.

LEÓN, K. et al. Color measurement in L*a*b* units from RGB digital images. **Food Research International**, v. 39, n. 10, p. 1084–1091, 2006.

LI, B.; SUN, C.; LIN, X.; BUSCH, W. The emerging role of GSNOR in oxidative stress regulation. **Trends in Plant Science**, v. 26, n. 2, p. 156–168, 2021.

LOBIUC, A.; PAVĂL, N. E.; MANGALAGIU, I. I.; GHEORGHITĂ, R.; TELIBAN, G. C.; AMĂRIUCĂI-MANTU, D.; STOLERU, V. Future antimicrobials: Natural and functionalized phenolics. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 28, n. 3, p. 1114, 2023.

LOPES, D. R.; SANTOS, L. O.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Antioxidant and antibacterial activity of a beverage obtained by fermentation of yerba-maté (*Ilex paraguariensis*) with symbiotic kombucha culture. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 2, 2021.

LUKHOB, C. W.; SIMMONDS, M. S. J.; PATON, A. J. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 1, p. 1–24. 2005.

MACIEL, L. G.; DO CARMO, M. A. V.; AZEVEDO, L.; DAGUER, H.; MOLOGNONI, L.; DE ALMEIDA, M. M.; GRANATO, D.; ROSSO, N. D. *Hibiscus sabdariffa* anthocyanins-rich extract: Chemical stability, in vitro antioxidant and antiproliferative activities. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 113, n. 1, p. 187–197, 2018.

MARCO, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Folign'e, B., Hutkins, R. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 44, p. 94 - 102, 2017.

MARCUCCI, M. C.; SALATINO, A.; OLIVEIRA, L. F. A. M.; GONÇALVES, C. P. Accessible Methodologies for Quantification of Flavonoids and Total Phenols in Propolis. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 1, p. 61–73, 2021.

MAY, A.; NARAYANAN, S.; ALCOCK, J.; VARSANI, A.; MALEY, C.; AKTIPIS, A. Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. **PeerJ**, v. 7, n. 1, p. 1-22, 2019.

MENDONÇA, G. R.; PINTO, R. A.; PRAXEDES, É. A.; ABREU, V. K. G.; DUTRA, R. P.; PEREIRA, A. F. Kombucha based on unconventional parts of the *Hibiscus sabdariffa* L.: Microbiological, physico-chemical, antioxidant activity, cytotoxicity and sensorial characteristics. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 34, n. 1, p. 1-13, 2023.

MEYNERS, M.; JAEGER, S. R.; ARES, G. On the analysis of Rate-All-That-Apply (RATA) data. **Food Quality and Preference**, v. 49, p. 1–10, 2016.

MIRONCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in Medical Sciences**, v. 63, n. 1, p. 68–78, 2018.

MOHAPATRA, D. Postharvest hardness and color evolution of white button mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, p. 1-7, 2010.

MORALES, D.; GUTIÉRREZ-PENSADO, R.; BRAVO, F. I.; MUGUERZA, B. Novel kombucha beverages with antioxidant activity based on fruits as alternative substrates. **Lwt - Food Science and Technology**, v. 189, p. 1-11, 2023.

MUÑOZ, E. VELÁSQUEZ, P.; RODRIGUEZ, K.; MONTENEGRO, G.; GIORDANO, A. Influence of *Brassica campestris* and *Galega officinalis* on Antioxidant Activity of Bee Pollen. **Revista Brasileira de Farmacognosia: órgão oficial da Sociedade Brasileira de Farmacognosia**, v. 30, n. 3, p. 444–449, 2020.

NATIONAL PARKS. **Web flora e fauna: *Coleus amboinicus* 'Variegatus'**. 2023. Disponível em: <https://www.nparks.gov.sg/florafaunaweb/flora/3/7/3718>. Acesso em: 3 de jun. 2024.

NGUYEN, N. Q.; MINH, L. V.; TRIEU, L. H.; BUI, L. M.; LAM, T. D.; HIEU, V. Q.; KHANG, T. V.; TRUNG, L. N. Y. Evaluation of total polyphenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Plectranthus amboinicus* leaves. **IOP Conference Series. Materials Science and Engineering**, v. 736, p. 1-6, 2020.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10–36, 2015.

PATEL, R.; MAHOBIA, N.; WASEEM, N.; UPWAR, N.; SINGH, S. Phyto-Physicochemical Investigation of Leaves of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. **Pharmacognosy Journal**, v. 2, n. 13, p. 536–542, 2010.

PATHARE, P. B.; OPARA, U. L.; AL-SAID, F. A.-J. Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: A review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 1, p. 36–60, 2013.

PEREIRA, D. M.; SILVA, S. X. S.; LIMA, L. C.; ARAÚJO, L. F. S.; BRITO, I. L. Identificação dos parâmetros físico-químicos e colorimétricos de kombucha de chá verde durante dez dias de fermentação. In: AZERÊDO, G. A. (org.). **A Educação Alimentar e Nutricional como Ferramenta de Atuação do Técnico em Nutrição e Dietética nos Tempos de Pandemia**. [s.l.] Agron Food Academy, 2021. cap 72, p. 319–324.

PERMATASARI, H. K.; PRIJADI, B.; IRNANDI, D. F.; RIAWAN, W.; YUSUF, M.; AMAR, N.; CHANDRA, L. A.; YUSUF, V. M.; SUBALI, A. D.; NURKOLIS, F. Kombucha drink enriched with sea grapes (*Caulerpa racemosa*) as potential functional beverage to contrast obesity: An in vivo and in vitro approach. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 49, p. 232–240, 2022.

PRICE, M. L.; BUTLER, L. G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 1268–1273, 1977.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP IT LAB 001. Universidade Estadual do Ceará, Laboratório de Química de Produtos Naturais e Sintético e Bioensaios com Zebrafish. Abril, 2023.

RIU-AUMATELL, M.; LÓPEZ-TAMAMES, E.; BUXADERAS, S. Assessment of the volatile composition of juices of apricot, peach, and pear according to two pectolytic treatments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 20, p. 1–9, 2005.

RODRIGUES, F. F. G.; BOLIGON, A. A.; MENEZES, I. R. A.; GALVÃO-RODRIGUES, F. F.; SALAZAS, G. J. T.; NONATO, C. F. A.; BRAGA, N. T. T. M *et al.* HPLC/DAD, antibacterial and antioxidant activities of *Plectranthus* species (Lamiaceae) combined with the chemometric calculations. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 24, p. 1-14, 2021.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, C.; SEGURA-CARRETERO, A.; DEL MAR CONTRERAS, M. Phenolic compounds as natural and multifunctional anti-obesity agents: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 1–18, 2017.

SAKO, K. B.; MAKHAFOLA, T. J.; ANTONISSEN, R.; PIETERS, L.; VERSCHAEVE, L.; ELGORASHI, E. E. Antioxidant, antimutagenic and antigenotoxic properties of *Plectranthus* species. **Suid-Afrikaanse tydskrif vir plantkunde [South African journal of botany]**, v. 161, p. 113–125, 2023.

SÄÄKSJÄRVI, M.; HOLMLUND, M.; TANSKANEN, N. Consumer knowledge of functional foods. **The International Review of Retail Distribution and Consumer Research**, v. 19, n. 2, p. 135–156, 2009.

ŞANLIER, N.; GÖKCEN, B. B.; SEZGIN, A. C. Health benefits of fermented foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 3, p. 506–527, 2019

SAIMAITI, A.; HUANG, S. Y.; XIONG, R. G.; WU, S. X.; ZHOU, D. D.; YANG, Z. J. Antioxidant capacities and polyphenol contents of kombucha beverages based on vine tea and sweet tea. **Antioxidants**, v. 11, n. 9, p. 1-15, 2022.

SHARIFUDIN, S. A. HO, W. Y.; YEAP, S. K.; ABDULLAH, R.; KOH, S. P. Fermentation and characterisation of potential kombucha cultures on papaya-based substrates. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie [Food Science and Technology]**, v. 151, n. 1, p. 1-10, 2021.

SIBBR - Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira. **Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil e Lista da Flora do Brasil 2020: *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (malvarisco)**. Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/302574>. Acesso em: 05 ago. 2024.

SILVA, J. M. DOS S.; ALMEIDA, J. R. G. DA SILVA.; ALVES, C. DOS SANTOS C.; NERY, D. A.; DAMASCENO, L. M. O.; ARAÚJO, C. DE SOUZA; ROLIM, L. A.; DE OLIVEIRA, A. P. Antimicrobial Activity from Species *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, a Review. **European Journal of Medicinal Plants**, p. 1–14, 2020.

SILVA, N.; VALÉRIA JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**: 5. ed. São Paulo: Varela, 2017.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology e Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance--a review. **Appetite**, v. 51, n. 3, p. 456–467, 2008.

STAŠKO, A.; BREZOVÁ, V.; BISKUPIČ, S.; MIŠÍK, V. The potential pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solvents. **Free Radical Research**, v. 41, n. 4, p. 379–390, 2007.

STEINGASS, C. B.; GLOCK, M. P.; SCHWEIGGERT, R. M.; CARLE, R. Studies into the phenolic patterns of different tissues of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) infructescence by HPLC-DAD-ESI-MS (n) and GC-MS analysis. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 407, n. 21, p. 6463–6479, 2015.

SUH, H. J. et al. Thermal kinetics of color degradation of mulberry fruit extract. **Die Nahrung**, v. 47, n. 2, p. 132–135, 2003.

SULAIMAN, C. T.; DEEPAK, M.; BALACHANDRAN, I. Spectrophotometric and tandem mass spectroscopic analysis of Indian borage (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.) for its polyphenolics characterization. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 7, n. 4, p. 471–473, 2018.

SWAMY, M.K.; SINNIHA, U.R. A comprehensive review on the phytochemical constituents and pharmacological activities of *Pogostemon cablin* Benth.: an aromatic medicinal plant of industrial importance. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8521–8547, maio. 2015.

TAHER, M.; EL-DALY, N.; EL-KHATEEB, A. Y.; HASSAN, S.; ELSHERBINY, E. A. Chemical Composition, Antioxidant, Antitumor and Antifungal Activities of Methanolic Extracts of *Coleus blumei*, *Plectranthus amboinicus* and *Salvia splendens* (Lamiaceae). **Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology**, v. 12, n. 11, p. 177–187, 2021.

TEIXEIRA, E.; MEINERT, E.; BARBETTA, P. A. **Análise sensorial de alimentos**. Florianópolis: ed. UFSC, 1987. 180p.

VIEIRA, C. R.; WEBER, O. L. DOS S.; SCARAMUZZA, J. F. Adubação nos Teores de Cinzas, Carbono e Relação C/N de Teca. **UNICIÊNCIAS**, v. 22, n. 2, p. 124, 2018.

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

VILLARREAL-SOTO, S. A. BEAUFORT, S.; BOUAJILA, J.; SOUCHARD, J. P.; RENARD, T.; ROLLAN, S.; TAILLANDIER, P. Impact of fermentation conditions on the

production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. **Process Biochemistry**, v. 83, p. 44–54, 2019.

WANDERLEY, B. R. DA S. M.; Lima, M. E. C.; Oliveira, A. K. S.; Sartori, G. V.; Stroschein, M. R. D.; Amboni, R. D. M. C.; Fritzen-Freire, C. B.; Aquino, A. C. M. S. Influence of the addition of strawberry guava (*Psidium cattleianum*) pulp on the content of bioactive compounds in kombuchas with yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Science and Technology**, v. 43, p. 1-5, 2023.

WATAWANA, M. I.; JAYAWARDENA, N.; GUNAWARDHANA, C. B.; WAISUNDARA, V. Y. Health, wellness, and safety aspects of the consumption of Kombucha. **Journal of Chemistry**, v. 2015, p. 1–11, 2015.

YANG, F.; CHEN, C.; NI, D.; YANG, Y.; TIAN, J.; LI, Y.; CHEN, S.; YE, X.; WANG, L. Effects of fermentation on bioactivity and the composition of polyphenols contained in polyphenol-rich foods: A review. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 17, 2023.

ZANARDI, K. **Kombuchas: um mercado de bebidas em expansão**. **CarbonaTech**, 6 mar. 2023. Disponível em: <<https://www.carbonatech.com.br/kombucha-um-mercado-de-bebidas-em-expansao/>>. Acesso em: 22 out. 2023.

ZENI, A. L. B.; PARISOTTO, A. V.; MATTOS, G.; HELENA, E. T. S. Use of medicinal plants as home remedies in Primary Health Care in Blumenau – State of Santa Catarina, Brazil. **Ciencia & Saude Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2703–2712, 2017.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555–559, 1999.

ZIEMLEWSKA, A.; NIZIOŁ-ŁUKASZEWSKA, Z.; BUJAK, T.; ZAGÓRSKA-DZIOK, M.; WÓJCIAK, M.; SOWA, I. Effect of fermentation time on the content of bioactive compounds with cosmetic and dermatological properties in Kombucha Yerba Mate extracts. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2021.

APÊNDICE A – Parecer para realização da análise sensorial das kombuchas

INSTITUTO FEDERAL DE
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DO CEARÁ -
IFCE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ACEITABILIDADE DE KOMBUCHAS PRODUZIDAS COM ADIÇÃO DE MALVARISCO
Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng

Pesquisador: KENNEDY KELVIK OLIVEIRA CAMINHA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 81858124.0.0000.5589

Instituição Proponente: INSTITUTO FEDERAL DE EDUCACAO, CIENCIA E TECNOLOGIA DO CEARA

Patrocinador Principal: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia - Campus Limoeiro do Norte

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 7.084.791

Apresentação do Projeto:

A fermentação é uma técnica antiga que modifica e preserva alimentos, melhorando não apenas sua durabilidade e segurança, mas também suas características sensoriais e valor nutricional. A kombucha é uma bebida fermentada não alcoólica de origem oriental que tem ganhado popularidade no ocidente devido a seus diversos benefícios terapêuticos, como propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anticarcinogênicas. Estudos indicam que, além do chá preto ou verde, outros substratos vegetais podem ser utilizados na produção de kombucha, ampliando suas possibilidades de preparo e explorando suas propriedades sensoriais. Esse estudo tem como objetivo avaliar os padrões microbiológicos, a aceitabilidade sensorial de kombuchas produzidas com a adição de malvarisco *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, em diferentes concentrações. Os ingredientes necessários para produção da bebida serão obtidos por meio do comércio local, e as folhas de malvarisco por meio do Instituto Municipal de Meio Ambiente (IMMAB), junto à farmácia viva localizada na cidade de Limoeiro do Norte, no Vale do Jaguaribe, estado do Ceará. Serão avaliados os parâmetros microbiológicos para garantir que o produto elaborado encontra-se dentro dos padrões estabelecidos em legislação. Posteriormente, se realizará avaliação sensorial por meio de teste afetivo de escala hedônica estruturada de 9 pontos, frequência de consumo, intenção de compra por escala estruturada de 5 pontos e escala (JAR).

Endereço: Rua Jorge Dumar, nº 1703

Bairro: Jardim América

CEP: 60.410-426

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3401-2332

E-mail: cep@ifce.edu.br

APÊNDICE B – Quantificação de compostos fenólicos nas kombuchas por HPLC (mg/g de amostra liofilizada)

Constituintes	Tr(min)	Concentração (mg/g de material)				
		KP	KA	KC	KM	KB
Ácidos fenólicos						
Ácido Gálico	3,54	2,33 ± 0,42	5,20 ± 0,16	1,3 ± 0,12	4,10 ± 0,11	2,39 ± 0,15
Ácido Clorogênico	3,81	5,35 ± 0,44	5,81 ± 0,32	2,7 ± 0,22	3,02 ± 0,27	4,96 ± 0,33
Ácido Cafeico	5,65	0,44 ± 0,22	1,04 ± 0,40	-	0,92 ± 0,33	0,74 ± 0,51
Ácido Vinílico	6,81	-	0,58 ± 0,44	-	0,47 ± 0,28	0,62 ± 0,27
Ácido p-Cumárico	8,32	-	0,88 ± 0,31	2,04 ± 0,45	1,08 ± 0,32	1,92 ± 0,54
Ácido Ferúlico	11,07	-	3,47 ± 0,52	-	6,98 ± 0,43	10,44 ± 0,33
Flavonoides						
Rutina	6,62	-	-	0,42 ± 0,26	-	-
Isoquercitrina	7,83	-	-	-	-	-

Tr - Tempo de retenção; KC - Kombucha Controle; KB - Kombucha Base; KA - Kombucha de abacaxi; KM - Kombucha de melancia; KP - Kombucha de pitaya.

APÊNDICE C – Parecer da Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA)

 UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ	Comissão de Ética para o Uso de Animais Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Itaperi CEP 60740-903 – fone 3101-9890 ceua.uece@uece.br – www.uece.br/ceua	 GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ Secretaria de Ciência, Tecnologia e Educação Superior
---	---	---

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Uso do Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo alternativo para Investigação do potencial farmacológico de produtos naturais e sintéticos” registrado sob o número 04983945/2021, tendo como pesquisador principal Jane Eire Silva Alencar de Menezes, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA – UECE). Este certificado expira-se em 31 de dezembro de 2025.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Project entitled “Use of Zebrafish (*Danio rerio*) as an alternative model for Investigation of the pharmacological potential of natural and synthetic products” registered with the protocol 04983945/2021, under the supervision of Jane Eire Silva Alencar de Menezes, is in agreement with Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation of Ceará State University (CEUA – UECE). This certificate will expire on December 31st, 2025.

RESUMO

Vigência do projeto	Início	Agosto/2023	Fim	31 de dezembro de 2025
Espécie/Linhagem	Danio rerio - Zebrafish (peixe paulistinha)			
Número de animais	6000	Peso	0,5 g	Idade 90-120 dias
Sexo	3000	Feminino	3000	Masculino
Origem	Fornecedor certificado			
Metodologia	X	Adequada		Não adequada
Cronograma	X	Adequado		Ausente/ Não adequado
Ofício de encaminhamento	X	Presente		Ausente/ Não adequado
Orçamento	X	Adequado		Ausente/ Não adequado
Financiamento	Órgão de fomento	Recursos de Pesquisa e Parcerias		
	Edital ou N. processo	N.	-	

Fortaleza, 21 de Julho 2023.

Documento assinado digitalmente


WANIA MARILANDE CECCATTO
 Data: 21/07/2023 08:52:03-0300
 Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Wania Marilande Ceccatto
 Presidente CEUA-UECE

APÊNDICE D – Ficha da análise sensorial



FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL

ACEITABILIDADE DE KOMBUCHAS PRODUZIDAS COM ADIÇÃO DE MALVARISCO

Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng

Nome: _____ Provador: _____
 Gênero: () Masculino () Feminino () Outro Data: ____/____/____
 Escolaridade: () Não estudou () Fundamental incompleto () Fundamental () Médio incompleto
 () Médio () Superior incompleto () Superior () Especialização () Mestrado incompleto
 () Mestrado () Doutorado incompleto () Doutorado
 Faixa Etária: () 18-20 anos () > 20-30 anos () > 30-40 anos () > 40-50 anos () > 50-60 anos
 () > 60 anos

Conhece ou já ouvir falar sobre malvarisco?

- () Sim
 () Não

Conhece ou já ouvir falar sobre kombucha?

- () Sim
 () Não

Se sim, conhece os benefícios da kombucha?

- () Sim
 () Não

Já consumiu kombucha?

- () Sim
 () Não

Se sim, com que frequência você consome kombucha?

- () Sempre (quase todo dia)
 () Muito (pelo menos 4 vezes por semana)
 () Moderado (pelo menos 2 vezes por semana)
 () Pouco (1 vez por mês)
 () Quase nunca (menos de uma vez por mês)



AMOSTRA:

1. Você recebeu uma amostra de kombucha, **OBSERVE-A** e avalie quanto a sua **APARÊNCIA**:

1.1) O quanto você gostou ou desgostou da APARÊNCIA dessa amostra?

1	2	3	4	5	6	7	8	9
								
Desgostei muito	Desgostei muito	Desgostei pouco	Desgostei pouco	Nem gostei nem desgostei	Gostei pouco	Gostei	Gostei muito	Gostei muito

Coloque aqui suas impressões com relação à aparência da bebida:

2. Faça movimentos circulares com o copo e aproxime do nariz, sinta o cheiro da kombucha e avalie o **AROMA**:

2.1) O quanto você gostou ou desgostou do AROMA dessa amostra?

1	2	3	4	5	6	7	8	9
								
Desgostei muitíssimo	Desgostei muito	Desgostei pouco	Nem gostei nem desgostei	Gostei pouco	Gostei muito	Gostei muito	Gostei muitíssimo	

Coloque aqui suas impressões com relação ao aroma da bebida:

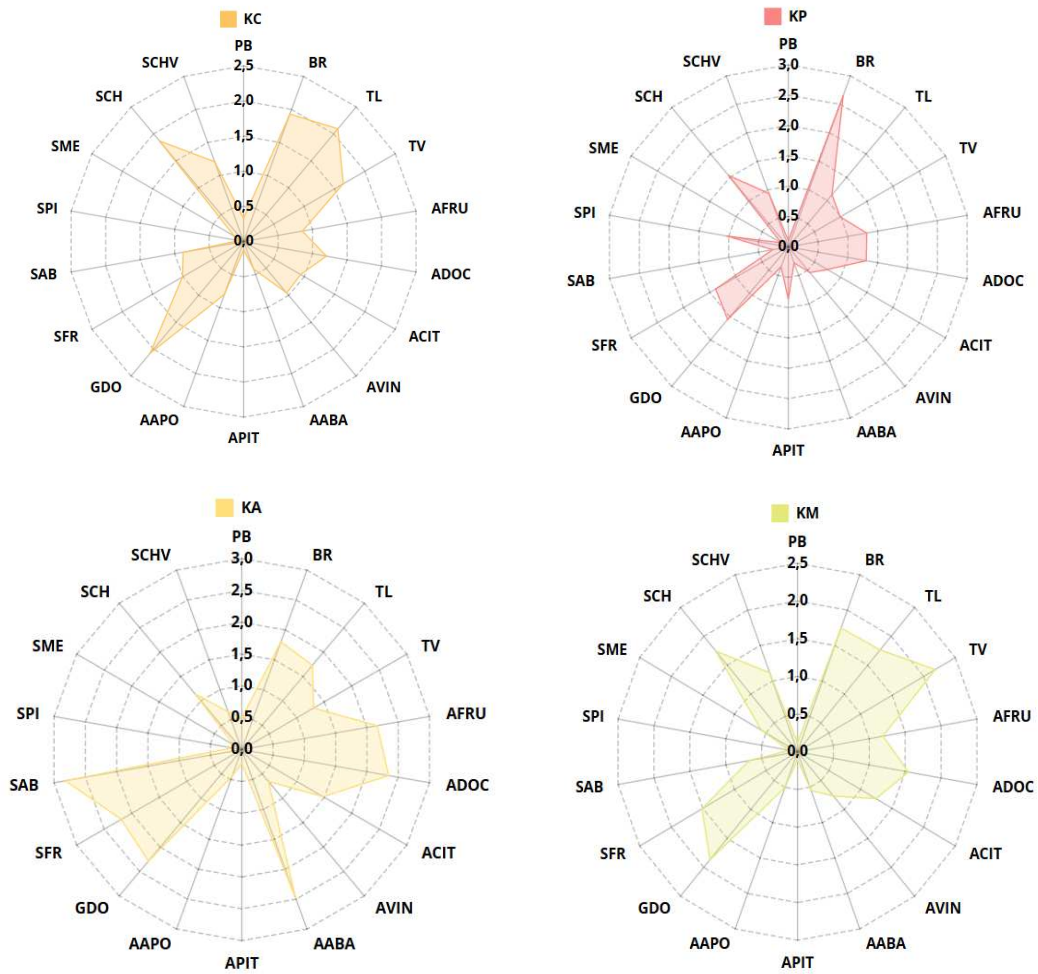
3. Prove a bebida e avalie o SABOR:

3.1) O quanto você gostou ou desgostou do SABOR dessa amostra? 1 2 3 4 5 6 7 8 9 Desgostei muito Desgostei muito Desgostei Desgostei pouco Nem gostei nem desgostei Gostei pouco Gostei Gostei muito Gostei muito	Coloque aqui suas impressões com relação ao sabor da bebida: 																																																																																																									
3.2) Abaixo estão listados vários termos descritores de sabor. OBSERVE a amostra e marque o GRAU DE INTENSIDADE dos termos que a CARACTERIZAM.																																																																																																										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: 0.8em;"> <thead> <tr> <th>Descritores</th> <th>Nada</th> <th>Pouquíssimo</th> <th>Pouco</th> <th>Médio</th> <th>Muito</th> <th>Muitíssimo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Gosto doce</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>Gosto salgado</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>Gosto ácido</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>Gosto amargo</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>Sabor frutado</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>Sabor de abacaxi</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>Sabor de pitaya</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>Sabor de melancia</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>Sabor de chá</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>Sabor de chá verde</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>Sabor de vinagre</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>Sabor refrescante</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>Sabor adstringente</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>Sabor desagradável</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td><td>()</td></tr> </tbody> </table>		Descritores	Nada	Pouquíssimo	Pouco	Médio	Muito	Muitíssimo	Gosto doce	()	()	()	()	()	()	Gosto salgado	()	()	()	()	()	()	Gosto ácido	()	()	()	()	()	()	Gosto amargo	()	()	()	()	()	()	Sabor frutado	()	()	()	()	()	()	Sabor de abacaxi	()	()	()	()	()	()	Sabor de pitaya	()	()	()	()	()	()	Sabor de melancia	()	()	()	()	()	()	Sabor de chá	()	()	()	()	()	()	Sabor de chá verde	()	()	()	()	()	()	Sabor de vinagre	()	()	()	()	()	()	Sabor refrescante	()	()	()	()	()	()	Sabor adstringente	()	()	()	()	()	()	Sabor desagradável	()	()	()	()	()	()
Descritores	Nada	Pouquíssimo	Pouco	Médio	Muito	Muitíssimo																																																																																																				
Gosto doce	()	()	()	()	()	()																																																																																																				
Gosto salgado	()	()	()	()	()	()																																																																																																				
Gosto ácido	()	()	()	()	()	()																																																																																																				
Gosto amargo	()	()	()	()	()	()																																																																																																				
Sabor frutado	()	()	()	()	()	()																																																																																																				
Sabor de abacaxi	()	()	()	()	()	()																																																																																																				
Sabor de pitaya	()	()	()	()	()	()																																																																																																				
Sabor de melancia	()	()	()	()	()	()																																																																																																				
Sabor de chá	()	()	()	()	()	()																																																																																																				
Sabor de chá verde	()	()	()	()	()	()																																																																																																				
Sabor de vinagre	()	()	()	()	()	()																																																																																																				
Sabor refrescante	()	()	()	()	()	()																																																																																																				
Sabor adstringente	()	()	()	()	()	()																																																																																																				
Sabor desagradável	()	()	()	()	()	()																																																																																																				

4. De MANEIRA GLOBAL, indique o quanto gostou ou desgostou da amostra sinalizando abaixo:

4.1) ACEITAÇÃO GLOBAL? 1 2 3 4 5 6 7 8 9 Desgostei muito Desgostei muito Desgostei Desgostei pouco Nem gostei nem desgostei Gostei pouco Gostei Gostei muito Gostei muito	Comentários: 										
4.2) Caso você encontrasse essa bebida no mercado, qual seria sua INTENÇÃO DE COMPRA?											
<table style="width: 100%;"> <tr><td>Certamente compraria</td><td>()</td></tr> <tr><td>Provavelmente compraria</td><td>()</td></tr> <tr><td>Talvez comprasse/talvez não comprasse</td><td>()</td></tr> <tr><td>Provavelmente não compraria</td><td>()</td></tr> <tr><td>Certamente não compraria</td><td>()</td></tr> </table>		Certamente compraria	()	Provavelmente compraria	()	Talvez comprasse/talvez não comprasse	()	Provavelmente não compraria	()	Certamente não compraria	()
Certamente compraria	()										
Provavelmente compraria	()										
Talvez comprasse/talvez não comprasse	()										
Provavelmente não compraria	()										
Certamente não compraria	()										

APÊNDICE E – Gráfico de radar para a intensidade dos atributos pelo teste RATA.

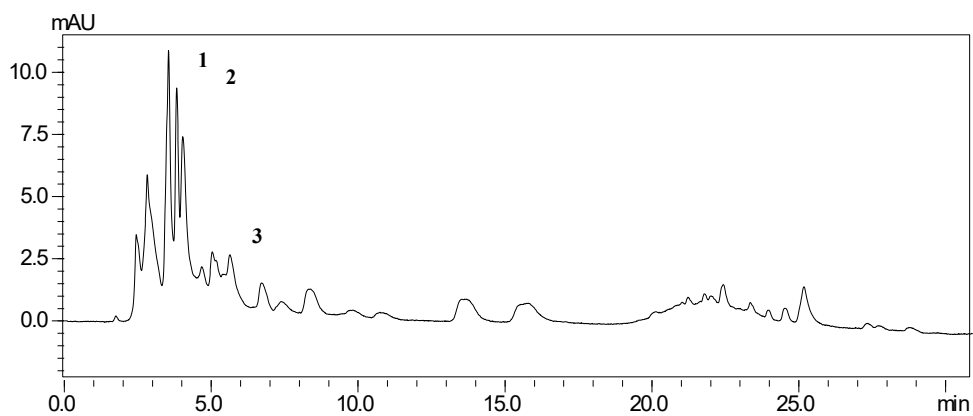


Legenda: KM – Kombucha melancia, KC – Kombucha controle, KA – Kombucha abacaxi, KP – Kombucha pitaya, TL – Translúcida (limpida), GDO – Gosto doce, ACIT – Aroma cítrico, PB - Presença de bolhas, SAB – Sabor de abacaxi, AABA – Aroma de abacaxi, ADOC – Aroma doce, SFR – Sabor frutado, AFRU – Aroma frutado, APIT – Aroma de pitaya, SPI – Sabor de pitaya, BR – Brilhante, SCH – Sabor de chá, SCHV – Sabor de chá verde, SME – Sabor de melancia, AAPO – Aroma apodrecido, AVIN – Aroma vinagre, TV – Turva (material em suspensão).

Fonte: Autor (2025).

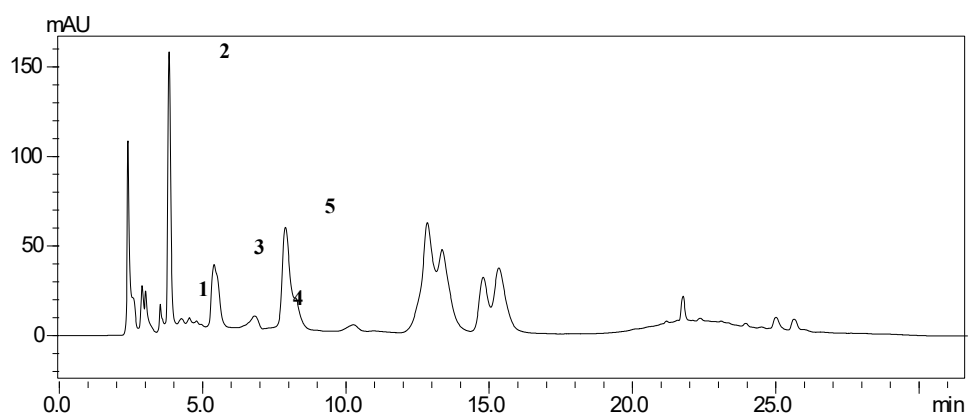
APÊNDICE F – Cromatogramas dos ensaios em HPLC.

CROMATOGRAMA OBTIDO PELA INJEÇÃO DA AMOSTRA – KP



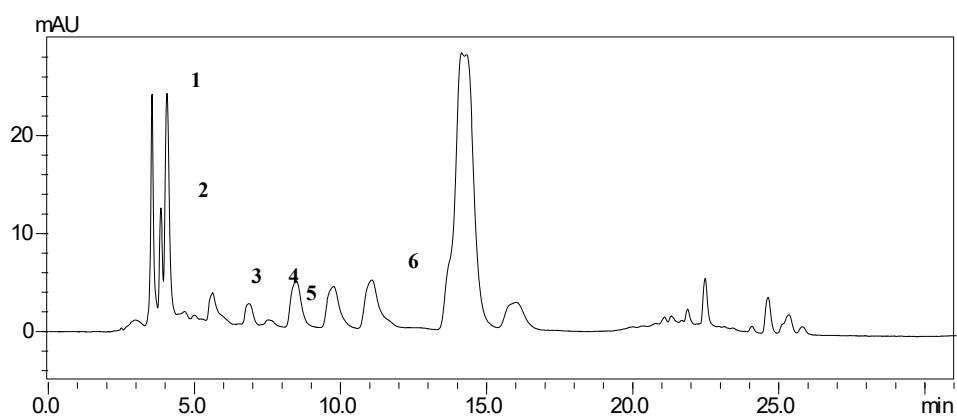
Nº	Tempo de Retenção	Descrição	Área	Comprimento de onda máximo
1	3.54 min	Ácido Gálico	133605	195 nm; 224 nm
2	3.81 min	Ácido Clorogênico	80679	215 nm; 330 nm
3	5.65 min	Ácido Cafeico	35324	218 nm; 324 nm

CROMATOGRAMA OBTIDO PELA INJEÇÃO DA AMOSTRA – EXTRATO DE
MALVARISCO



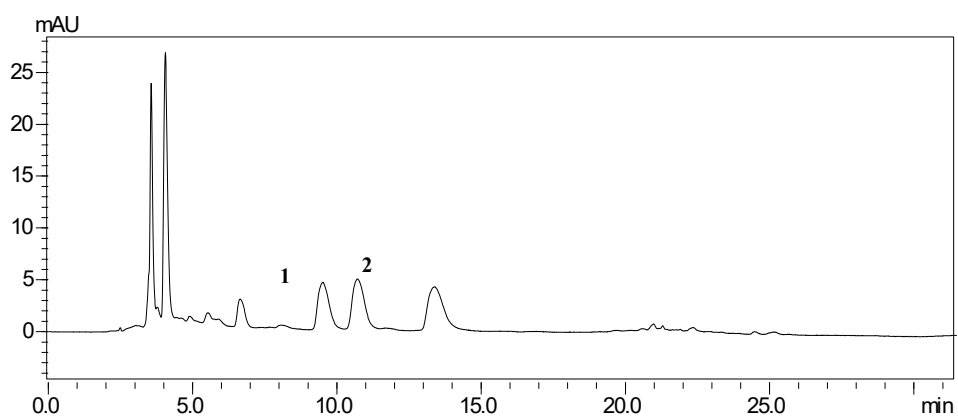
Nº	Tempo de Retenção	Descrição	Área	Comprimento de onda máximo
1	3.51 min	Ácido Gálico	127092	212 nm; 273 nm
2	3.81 min	Ácido Clorogênico	1217412	219 nm; 330 nm
3	5.42 min	Ácido Cafeico	868725	217 nm; 324 nm
4	6.81 min	Ácido Vinílico	340857	207 nm; 259 nm
5	7.88 min	Isoquecitrina	1879213	199 nm; 254 nm; 342 nm

CROMATOGRAMA OBTIDO PELA INJEÇÃO DA AMOSTRA – KA



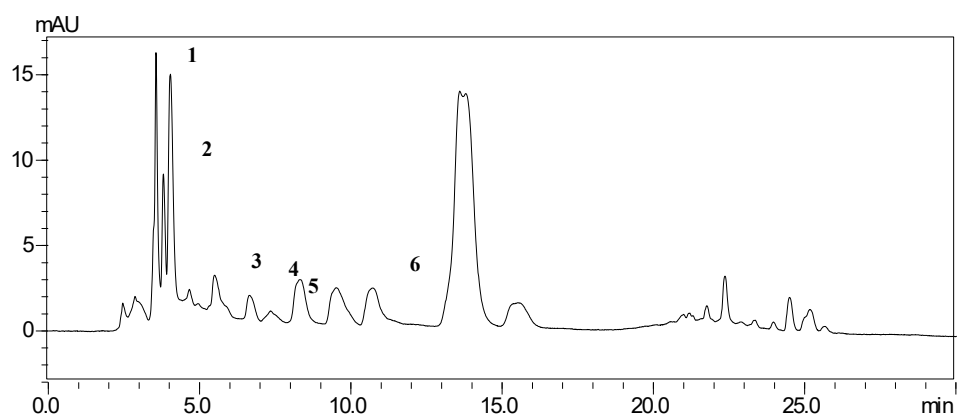
Nº	Tempo de Retenção	Descrição	Área	Comprimento de onda máximo
1	3.55 min	Ácido Gálico	186698	212 nm; 273 nm
2	3.80 min	Ácido Clorogênico	82253	198 nm; 326 nm
3	5.52 min	Ácido Cafeico	101671	217 nm; 324 nm
4	6.64 min	Ácido Vinílico	28197	207 nm; 259 nm
5	8.32 min	Ácido p-Cumárico	7266	216 nm; 326 nm
6	11.07 min	Ácido Ferúlico	26514	219 nm; 322 nm

CROMATOGRAMA OBTIDO PELA INJEÇÃO DA AMOSTRA – KC



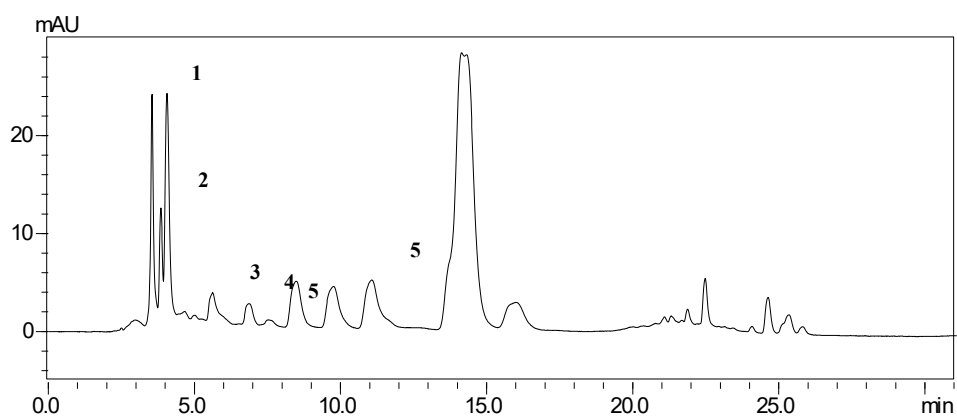
Nº	Tempo de Retenção	Descrição	Área	Comprimento de onda máximo
1	6.62 min	Rutina	186698	202 nm; 256 nm; 348 nm
2	9.50 min	Ácido p-Cumárico	122028	216 nm; 326 nm

CROMATOGRAMA OBTIDO PELA INJEÇÃO DA AMOSTRA – KM



Nº	Tempo de Retenção	Descrição	Área	Comprimento de onda máximo
1	3.51 min	Ácido Gálico	130213	212 nm; 273 nm
2	3.80 min	Ácido Clorogênico	70058	198 nm; 326 nm
3	5.49 min	Ácido Cafeico	63635	217 nm; 324 nm
4	6.81 min	Ácido Vinílico	23753	207 nm; 259 nm
5	8.32 min	Ácido p-Cumárico	14418	216 nm; 326 nm
6	11.07 min	Ácido Ferúlico	61944	219 nm; 322 nm

CROMATOGRAMA OBTIDO PELA INJEÇÃO DA AMOSTRA – KB



Nº	Tempo de Retenção	Descrição	Área	Comprimento de onda máximo
1	3.51 min	Ácido Gálico	173682	212 nm; 273 nm
2	3.80 min	Ácido Clorogênico	95802	198 nm; 326 nm
3	5.49 min	Ácido Cafeico	73111	217 nm; 324 nm
4	6.81 min	Ácido Vinílico	37346	207 nm; 259 nm
5	8.32 min	Ácido p-Cumárico	13030	216 nm; 326 nm
6	11.07 min	Ácido Ferúlico	163579	219 nm; 322 nm

**APÊNDICE G – Acompanhamento fermentativo da kombucha nas concentrações de 15,
10 e 5% de malvarisco durante 10 dias.**

	Análises	Fermentação (dias)										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MALVARISCO 15% (m/v)	pH	3,96	3,93	3,89	3,82	3,35	3,24	3,17	3,12	3,00	2,97	2,95
	Acidez total (% ácido acético)	0,58	0,58	0,61	0,68	0,74	0,79	0,82	0,85	0,88	9,40	1,04
	Sólidos solúveis (° Brix)	8,63	8,63	8,63	8,56	8,23	7,92	7,37	7,31	7,03	6,51	6,30
	Análises	Fermentação (dias)										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MALVARISCO 10% (m/v)	pH	3,78	3,67	3,35	3,35	3,34	3,36	3,54	3,52	3,51	3,48	3,48
	Acidez total (% ácido acético)	0,21	0,24	0,24	0,26	0,28	0,28	0,34	0,38	0,42	0,42	0,45
	Sólidos solúveis (° Brix)	9,43	9,43	9,40	9,40	9,39	8,97	8,63	8,55	8,46	8,21	7,90
	Análises	Fermentação (dias)										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MALVARISCO 5% (m/v)	pH	4,20	4,20	4,26	4,27	4,33	4,35	4,48	4,50	4,50	4,51	4,57
	Acidez total (% ácido acético)	0,07	0,07	0,08	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	0,09	0,09	0,09
	Sólidos solúveis (° Brix)	10,01	10,00	10,00	10,02	9,87	9,77	9,60	9,63	9,56	9,42	9,40