



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**JORGE HENRIQUE DE ANDRADE VIEIRA**

**TOXICIDADE DE KOMBUCHAS SABORIZADAS COM RESÍDUOS DA  
AGROINDÚSTRIA REGIONAL EM MODELO *IN VIVO* DE *DANIO RERIO***

**FORTALEZA**

**2026**

JORGE HENRIQUE DE ANDRADE VIEIRA

TOXICIDADE DE KOMBUCHAS SABORIZADAS COM RESÍDUOS DA  
AGROINDÚSTRIA REGIONAL EM MODELOS *IN VIVO* DE *DANIO RERIO*

Trabalho de conclusão de curso apresentada em  
20 de janeiro de 2026 da Universidade Federal  
do Ceará, como requisito parcial à obtenção do  
título de bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Emílio de Castro Miguel  
Coorientador: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Thaiz Batista  
Azevedo Rangel Miguel.

FORTALEZA

2026

JORGE HENRIQUE DE ANDRADE VIEIRA

TOXICIDADE DE KOMBUCHAS SABORIZADAS COM RESÍDUOS DA  
AGROINDÚSTRIA REGINOAL EM MODELOS *IN VIVO* DE *DANIO RERIO*

Trabalho de conclusão de curso apresentada em  
27 de janeiro de 2026 da Universidade Federal  
do Ceará, como requisito parcial à obtenção do  
título de bacharel em Engenharia de Alimentos.

Aprovada em: 27/01/2026.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Emílio de Castro Miguel (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Ítalo Waldemiro Lima de França  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr.<sup>a</sup>. Ana Kamila Medeiros Lima

A Deus.

À minha mãe, irmão e amigos.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus que nunca me abandonou e me deu conforto em cada oração. À minha mãe, sempre amorosa e gentil, me apoiou nessa decisão difícil de iniciar uma nova faculdade, obrigado por sempre acreditar em mim.

À Prof. Dra. Thaiz Batista Azevedo Rangel Miguel e ao Prof. Dr. Emílio de Castro Miguel, pela oportunidade, orientação, carinho, respeito e por serem muito além de orientadores, serem meus amigos, protetores, conselheiros e companheiros de boas histórias.

Aos meus amigos do curso, embora o tempo e vida nos tenha distanciado, sempre me lembrarei de nossos momentos no ventão ou de quando estudávamos juntos para uma prova que parecia terrível. Obrigado Ana Beatriz, Gisela, Facundo, Lara, Pontes, Thallya e Vanessa.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biomateriais, obrigado por todo conhecimento, amizade, conversas e momentos únicos e enriquecedores. Foram vocês que me davam alegria e conforto em dias caóticos e estressantes. Obrigado Alexia, Ana, Cazé, Davi, Kamila, Leticia, Vini e Roberta.

## RESUMO

A kombucha é uma bebida fermentada, originária do leste asiático, no qual em sua fabricação se utiliza uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras, conhecida como SCOBY. Dentre os seus benefícios à saúde, destacam-se a ação antioxidante e a prevenção a doenças cardiovasculares, o que atraem pessoas que desejam um estilo de vida mais saudável. No entanto, há poucos estudos que apontam os possíveis riscos à saúde de sua ingestão crônica e se o uso de resíduos da agroindústria em sua saborização podem induzir alguma reação negativa no organismo. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial tóxico das kombuchas saborizadas com resíduos de caju, manga e uva oriundos da agroindústria e de uma kombucha tradicional em modelo *in vivo* de *Danio rerio*, em três concentrações: 10, 100 e 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os resultados mostraram que para a kombucha tradicional na concentração de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , houve mortalidades, no entanto análises dos outros parâmetros, como morfologia, desenvolvimento e deformação indicam a ausência de toxicidade. Todas as demais kombuchas em todas as demais concentrações apresentaram claros indícios de não toxicidade, em todos os parâmetros. Conclui-se que a saborização de kombuchas com resíduos da agroindústria de caju, manga e uva, não apresentou risco ou toxicidade para *D. rerio*.

**Palavras-chave:** Kombucha; Resíduos; Toxicidade; FET; *Danio rerio*.

## ABSTRACT

Kombucha is a fermented beverage originating in East Asia, whose production uses a symbiotic culture of bacteria and yeasts known as SCOBY. Among its health benefits, its antioxidant activity and the prevention of cardiovascular diseases stand out, which attract people seeking a healthier lifestyle. However, there are few studies that address the possible health risks of its chronic consumption and whether the use of agro-industrial residues in its flavoring may induce any negative reactions in the body. Therefore, the objective of this study was to evaluate the toxic potential of kombuchas flavored with cashew, mango, and grape residues from the agroindustry, as well as a traditional kombucha, using an in vivo *Danio rerio* model at three concentrations: 10, 100, and 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The results showed that for the traditional kombucha at the concentration of 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , there were mortalities; however, analyses of other parameters, such as morphology, development, and deformities, indicated the absence of toxicity. All other kombuchas, at all other concentrations, showed clear evidence of non-toxicity across all parameters. It can be concluded that the flavoring of kombucha using residues derived from the cashew, mango, and grape agroindustry did not pose any risk or exhibit toxicity to *Danio rerio*.

**Keywords:** Kombucha; Residues; Toxicity; FET; *Danio rerio*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Esquemas do aquário de reprodução de zebrafish .....	18
Figura 2	– Esquema de distribuição de poços e placas para FET .....	20
Figura 3	– Embrião de <i>D. rerio</i> coagulado.....	22
Figura 4	– Imagens da presença e ausência do somito em embriões e larvas de <i>D. rerio</i> .....	23
Figura 5	– Larva de 96 horas com edemas no miocárdio e no saco vitelino.....	24
Figura 6	– Morfologia dos embriões e larvas de <i>D. rerio</i> expostos à kombucha tradicional.....	29
Figura 7	– Morfologia dos embriões e larvas de <i>D. rerio</i> expostos à kombucha saborizada de caju.....	33
Figura 8	– Morfologia dos embriões e larvas de <i>D. rerio</i> expostos à kombucha saborizada de manga.....	37
Figura 9	– Morfologia dos embriões e larvas de <i>D. rerio</i> expostos à kombucha saborizada de uva.....	41
Figura 10	– Exemplos de diferentes curvas de dose-resposta.....	44
Figura 11	– Exemplos de tabelas de dados de não monotoxicidade.....	45

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Taxa de sobrevivência de embriões de zebrafish expostos à kombucha tradicional.....	25
Gráfico 2	– Média de eclosão de embriões de zebrafish expostos à kombucha tradicional.....	26
Gráfico 3	– Taxa de deformações de embriões de zebrafish expostos à kombucha tradicional.....	27
Gráfico 4	– Comprimentos (mm) do corpo e do saco vitelino das larvas de zebrafish após 96 h de exposição à kombucha tradicional.....	28
Gráfico 5	– Taxa de sobrevivência de embriões de zebrafish expostos à kombucha saborizada de caju.....	30
Gráfico 6	– Média de eclosão de embriões de zebrafish expostos à kombucha saborizada de caju.....	31
Gráfico 7	– Taxa de deformações de embriões de zebrafish expostos à kombucha saborizada de caju.....	32
Gráfico 8	– Comprimentos (mm) do corpo e do saco vitelino das larvas de zebrafish após 96 h de exposição à kombucha saborizada de caju.....	32
Gráfico 9	– Taxa de sobrevivência de embriões de zebrafish expostos à kombucha saborizada de manga.....	34
Gráfico 10	– Taxa de eclosão de embriões de zebrafish expostos à kombucha saborizada de manga.....	35
Gráfico 11	– Taxa de deformações de embriões de zebrafish expostos à kombucha saborizada de manga.....	35
Gráfico 12	– Comprimentos (mm) do corpo e do saco vitelino das larvas de zebrafish após 96 h de exposição à kombucha saborizada de manga.....	36
Gráfico 13	– Taxa de sobrevivência de embriões de zebrafish expostos à kombucha saborizada de uva.....	38
Gráfico 14	– Taxa de deformações de embriões de zebrafish expostos à kombucha saborizada de uva.....	38
Gráfico 15	– Taxa de deformações de embriões de zebrafish expostos à kombucha saborizada de uva.....	39

Gráfico 16 – Comprimentos (mm) do corpo e do saco vitelino das larvas de zebrafish 40  
após 96 h de exposição à kombucha saborizada de uva.....

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compilados de estudos acerca da reutilização de resíduos da agroindústria.	15
Tabela 2 – Teste de Variância Anova aplicada sobre valores de sobrevivência de larvas de zebrafish com 96 h de exposição, com significância de 5%.....	44
Tabela 3 – Agrupamento estatístico das larvas sobreviventes com 96 h dos 14 tratamentos pelo teste de Tukey após ANOVA de fator único ( $p < 0,05$ ) .....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
DCA	3,4 – dicloroanilina (4 mg.L <sup>-1</sup> )
DEMM	Departamento de Engenharia Metalúrgica e Materiais
DRNM	Dose-resposta não monotônica
EFSA	European Food Safety Authority
FET	Fish Embryo Test
bHpf	Horas pós-fertilização
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
ONU	Organização das Nações Unidas
SCOBY	<i>Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
2.1 OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES.....	18
2.2 ÁGUA RECONSTITUÍDA.....	19
2.3 PESTICIDA.....	19
2.4 PREPARO E DISSOLUÇÃO DAS KOMBUCHAS.....	19
2.5 PLAQUEAMENTO.....	20
2.6 PARÂMETROS OBSERVADOS.....	21
2.6.1 <i>Sobrevivência dos embriões de D. rerio</i> .....	21
2.6.2 <i>Coagulados dos embriões de D. rerio</i> .....	21
2.6.3 <i>Eclosão dos embriões de D. rerio</i> .....	22
2.6.4 <i>Ausência de formação de somito dos embriões de D. rerio</i> .....	22
2.6.5 <i>Deformações dos embriões de D. rerio</i> .....	23
2.6.7 <i>Morfologia e estatística</i> .....	24
3 RESULTADOS.....	25
3.1 KOMBUCHA TRADICIONAL.....	25
3.2 KOMBUCHA SABORIZADA COM RESÍDUOS DE CAJU.....	29
3.3 KOMBUCHA SABORIZADA COM RESÍDUOS DE MANGA.....	34
3.4 KOMBUCHA SABORIZADA COM RESÍDUOS DE UVA.....	37
3.5 ESTATÍSTICA.....	41
4 DISCUSSÃO.....	43
4.1 KOMBUCHA TRADICIONAL.....	43
4.2 KOMBUCHA SABORIZADA COM CAJU.....	46
4.3 KOMBUCHA SABORIZADA COM MANGA.....	47
4.4 KOMBUCHA SABORIZADA COM UVA.....	47
5 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 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 - *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) (Brasil, 2019).

Alguns estudos apontam para origem no nordeste da China, na região da Manchúria, 220 a.C., durante a dinastia Qin, onde era chamada de “chá da imortalidade” devido às suas propriedades atribuídas de desintoxicação e revitalização do organismo. (Jayabalan et al., 2014; Soares; De Lima; Reolon Schmidt, 2021)

Posteriormente, em 414 d.C., relatos indicam que o médico *Kombu* teria levado a bebida ao Japão, utilizando-a como tratamento para distúrbios digestivos do imperador Inkyo (Jayabalan et al., 2014; Soares; De Lima; Reolon Schmidt, 2021).

A difusão do consumo expandiu-se por rotas comerciais, chegando à Rússia, onde recebeu diferentes denominações locais como *Cainiigrib* e *Kambucha*, e mais tarde se espalhou para outras regiões do Leste Europeu e da Alemanha, onde passou a ser consumida com frequência no início do século XX (Jayabalan et al., 2014; Nyhan et al., 2022).

Na Rússia, registros hospitalares da década de 1940, em Omsk, sugerem que o consumo regular poderia contribuir para a melhora de condições inflamatórias, digestivas e cardiovasculares, bem como auxiliar em casos de disenteria infantil, embora tais relatos careçam de validação clínica rigorosa (Soares; De Lima; Reolon Schmidt, 2021)

No Ocidente, a popularização contemporânea da kombucha se intensificou a partir da década de 1990, em paralelo ao crescimento do mercado de alimentos funcionais e da valorização dos probióticos como promotores de saúde (Kapp; Sumner, 2019; Soares; De Lima; Reolon Schmidt, 2021).

Da mesma forma que a kombucha vem se popularizando, a preocupação com a melhor reuso de resíduos provenientes da agroindústria vêm ganhando contornos cada vez relevantes.

Globalmente, 1,3 bilhão de toneladas de alimentos são desperdiçadas a cada ano, representando um terço do total de alimentos produzidos para consumo humano (Gautam et al., 2022; Gonçalves de Moura et al., 2017).

A perda e o desperdício de alimentos representam enormes custos socioeconômicos, sendo que 8% da população mundial é afetada pela fome, conforme a ONU (2025). São

exemplos desses o caju que desperdiça cerca 80% de sua massa após a extração da castanha (Biasoto et al., 2015), a manga cujo os principais resíduos (casca e semente) representam cerca de que cerca de 35 a 60 % do seu peso total (Carnaval; Jaiswal; Jaiswal, 2024) ou a uva que gera 210 mil toneladas de resíduos por ano, sendo apenas 3% deles aproveitados, geralmente para adubo orgânico ou ração animal (Filho; Queiroz; Lima, 2024).

Esses resíduos contêm uma variedade de substâncias nutritivas, compostos bioativos e materiais com boas capacidades de formação de filmes, entre outros de grande relevância. A síntese de bioprodutos utilizando resíduos agroindustriais como matéria-prima está alinhada com a tão necessária economia circular (Carnaval; Jaiswal; Jaiswal, 2024).

Alguns estudos propõem a reutilização desses resíduos, seja como ingredientes alimentares, agregação ou potencialização de características nutricionais, biocomponentes ou geração energética, a tabela 1 resume algumas dessas pesquisas.

Tabela 1 – Compilados de estudos acerca da reutilização de resíduos da agroindústria

<b>Resíduos</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Referência</b>
Casca e semente de manga	Biscoito funcionais	Albaayit et al., (2024)
Bagaço do caju	Biomassa e biopolímeros	Barroso et al., (2025)
Bagaço da uva	Nanomateriais	Baroi et al., (2023)

Fonte: próprio autor

Dessa forma, a utilização de resíduos da agroindústria na produção de kombucha, agrega valor ao resíduo e à bebida, trazendo inovação e evitando desperdício. Sendo que, normalmente são utilizados sucos de frutas para a saborização, no entanto há resíduos como casca e semente que ainda trazem consigo alguns compostos bioativos (Fonteles et al., 2024).

Porém, apesar de apresentar vantagens à saúde, são poucos os estudos sobre a toxicidade da kombucha saborizadas com resíduos alimentícios ou se seu uso crônico pode inferir em algum efeito colateral. Há casos clínicos relatados como Sannapaneni et al., (2023), que reportou um caso de uma mulher, sem fatores de risco para doença hepática, que mostrou que mais de 95% de necrose das células do fígado retirada em uma biópsia hepática após ingestão excessiva de kombucha por 3 meses.

Considerando a crescente relevância econômica da kombucha, especialmente quando associada ao aproveitamento de resíduos da agroindústria, torna-se fundamental a realização de estudos que avaliem seus efeitos e implicações, de modo a garantir a segurança do produto e a sustentabilidade desse modelo produtivo.

Nesse contexto, o zebrafish (*Danio rerio*) surge como ferramenta inicial para avaliar potenciais efeitos associados ao consumo da bebida, pois uma de suas principais características é similaridade genômica entre o *Danio rerio* e o ser humano (Dubey; Ghosh; Singh, 2022) com cerca de 87%, sendo ainda 70% de genes ortólogos (que possuem origem de ancestral em comum).

Morfologicamente, o zebrafish apresenta sistemas cardiovasculares, neurológicos, digestivos e imunológicos comparáveis aos humanos, o que possibilita investigar potenciais benefícios ou riscos da bebida em múltiplos órgãos e sistemas (Bedell et al., 2025; Dubey; Ghosh; Singh, 2022; Lawrence, 2007).

Os embriões de zebrafish são transparentes, o que permitindo observar em tempo real alterações morfológicas e fisiológicas após a exposição à kombucha, sendo que o seu ciclo de desenvolvimento é rápido (embriões formam sistemas básicos em 24h e atingem maturidade sexual em 10 semanas), o que facilita estudos dinâmicos e de alta produtividade (Lawrence, 2007).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

Avaliar toxicidade aguda da kombucha tradicional (não saborizada) e das kombuchas de caju (*Anacardium occidentale*), manga (*Mangifera indica*) e uva (*Vitis vinifera*) saborizadas com resíduos da agroindústria regional.

### 2.2 Objetivos Específicos

São objetivos específicos desse trabalho de conclusão de curso:

- Verificar a toxicidade da kombucha tradicional (não saborizada) em embriões e larvas de *Danio rerio*;
- Verificar a toxicidade da kombucha saborizada de manga em embrião e larva de *D. rerio*;
- Verificar a toxicidade da kombucha saborizada de caju em embrião e larva de *D. rerio*;
- Verificar a toxicidade da kombucha saborizada de uva em embrião e larva de *D. rerio*;
- Processar os dados obtidos através do *Fish Embryo Test* (FET);

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios de toxicidade foram feitos seguindo o protocolo nº 236 da OECD, que trata de toxicidade aguda em *Danio rerio* (OECD, 2025). Algumas adaptações foram feitas, quando necessário.

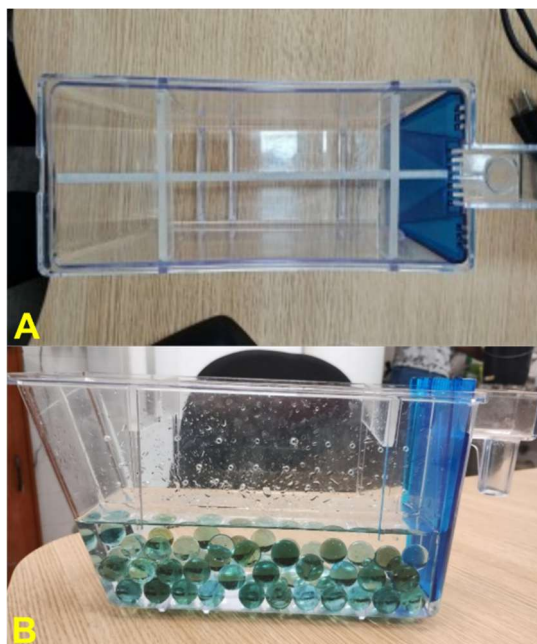
#### 2.1 Obtenção dos embriões

Os aquários de reprodução foram preparados no Laboratório de Biomateriais, do departamento de Engenharia Metalúrgica e de Matérias (DEMM) da UFC, no final do dia, uma hora após a última alimentação dos espécimes (17h).

Os aquários de reprodução possuíam uma divisória móvel, no qual impossibilitava o contato direto entre os adultos, machos e fêmeas, semelhante a figura 1A. Em seguida, são colocadas bolinhas de gude, até uma altura de aproximadamente 5 cm, a fim de evitar o canibalismo dos óvulos liberados pelas fêmeas – figura 1B (Lawrence, 2007).

São selecionados, para cada aquário de reprodução, três machos e seis fêmeas. O critério de escolha dos machos foi o tamanho corporal, destacando-se os maiores; das fêmeas, as que apresentavam uma maior dilatação na região pélvica, o que indica maior quantidade de óvulos acumulados.

Figura 1 – Esquemas do aquário de reprodução de *Danio rerio*.



Fonte: Próprio Autor

Após essa seleção, no dia seguinte, a divisória foi removida com machos e fêmeas ficando em contato direto e isolado até o encerramento. Os embriões coletados foram selecionados e filtrados pelo estágio de desenvolvimento para que o plaqueamento não fosse feito com embriões em estágio diversos.

## 2.2 Água reconstituída

A água reconstituída atua no FET como controle negativo e meio de dissolução das amostras testadas, consiste em uma solução de sais, próprias para o crescimento e desenvolvimento dos embriões de *D. rerio* até a fase de larva.

Sua constituição é de 96 mg de  $\text{NaHCO}_3$ , 60 mg de  $\text{MgSO}_4$ , 60 mg de  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e 04 mg de  $\text{KCl}$  para 1 litro de água destilada.

Em água destilada, colocou-se, inicialmente, o  $\text{NaHCO}_3$  sob agitação magnética, observando se todo o conteúdo de  $\text{NaHCO}_3$  foi completamente dissolvido, caso contrário ocorreria precipitação das demais substâncias que seriam inseridas, inviabilizando o meio de cultura.

Após a dissolução do  $\text{NaHCO}_3$ , colocou-se o  $\text{MgSO}_4$ , igualmente aguardando sua dissolução completa, em seguida o  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e por fim o  $\text{KCl}$ . Ao final do preparo da água reconstituída, o pH foi aferido e fixado em 7,3.

## 2.3 Pesticida

O controle positivo no FET foi o pesticida 3,4 dicloroanilina (DCA), na concentração  $4 \text{ mg.L}^{-1}$ , no qual possibilita que taxa de mortalidade entre 30 – 70%, além de possibilitar observar claras deformações do miocárdio e do saco vitelino.

O pesticida encontrava-se, originalmente, na forma de pastilhas, onde foram pesadas e dissolvidas e álcool etílico absoluto PA (99,5%), até obter uma concentração de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ , essa concentração é usada no Laboratório de Biomaterias do DEMM como solução estoque. Da solução estoque, foram preparados 50 mL do pesticida à  $4 \text{ mg.L}^{-1}$ .

## 2.4 Preparo e Dissolução das Kombuchas

As kombuchas foram preparadas e cedidas via colaboração para análise pelo Laboratório de Biotecnologia, vinculado ao Departamento de Engenharia de Alimentos (DEAL) da UFC, da Prof.<sup>a</sup> Dra. Sueli Rodrigues (Linhares, 2024).

Os resíduos de caju e manga foram oriundos da indústria de processamento de sucos e os resíduos de uva são oriundos da indústria de processamento de vinhos (Linhares, 2024).

As kombuchas encontravam-se originalmente na forma líquida, sendo que cada uma das kombuchas (tradicional, manga, caju e uva) foram preparadas, pesando-se uma alíquota e diluindo em água reconstituída, a fim de se obter uma concentração de 1000 µg.mL. Dessa solução, foram feitas diluições seriadas, para obter-se as concentrações de 100 e 10 µg.mL<sup>-1</sup>.

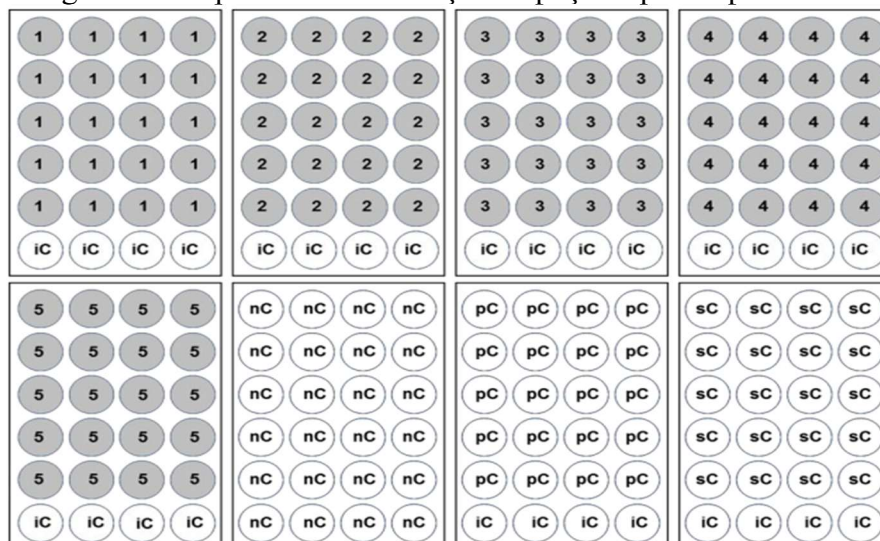
## 2.5 Plaqueamento

Foram usadas, para os experimentos, placas de cultivo de células de 24 poços, no qual foram atendidas a seguinte ordem:

- uma placa exclusiva dedicada ao controle negativo (nC);
- uma placa dedicada ao controle positivo (pC);
- uma placa para cada concentração de cada amostra testada.

As cinco primeiras colunas da placa são reservadas ao ensaio de toxicidade, expressas por números '1', '2', '3', '4' e '5' na figura 2, e a última coluna foi reservada ao controle interno de placa (iC), esse último é uma recomendação do protocolo nº 236 da OECD, para aferir a viabilidade da placa usada no experimento. Não foi feito controle de solvente (sC).

Figura 2 – Esquema de distribuição de poços e placas para FET



Fonte: Protocolo OECD nº 236 (OECD, 2025)

Foi inserido em cada poço 2 mL da substância testada na sua concentração específica e no controle interno de placa, iguais 2 mL, Em seguida, a fim de aclimatar as soluções com a temperatura ideal, elas foram colocadas na incubadora *Science Labor Zebrafish*, específica para embriões de *D. rerio*, com controle de temperatura (28° C) e fotoperíodo de 12h.

## **2.6 Parâmetros observados**

O FET tem uma duração de 96h, com análises feitas em intervalos de 24h. Os dados observados foram, rigorosamente, feitos na hora em que foi colocado os embriões nos poços das placas. Ex.: se os embriões foram colocados na placa por volta das 15h da tarde, os registros de 24h, 48h, 72h e 96h foram feitos às 15h dos dias subsequentes.

### ***2.6.1 Sobrevivência dos embriões de D. rerio***

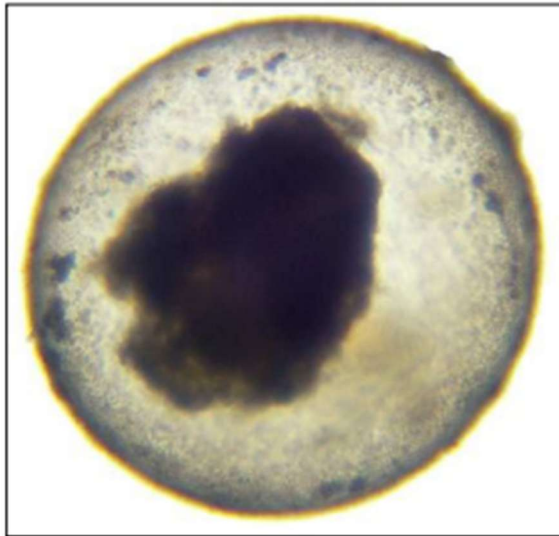
O primeiro parâmetro observado foi a sobrevivência dos indivíduos que pôde ser notada por movimento, coloração corpórea e por batimentos cardíacos, sempre observando o total de indivíduos que estavam sob teste, ou seja, não se contou para as análises o controle de placa e no controle negativo se considerou os 20 poços.

### ***2.6.2 Coagulados dos embriões de D. rerio***

O parâmetro de coagulação foi usado para a morte e mapeamento de uma possível toxicidade para à espécie naquele estágio de desenvolvimento.

A coagulação se caracteriza pelo embrião com uma coloração escura opaca, semelhante à figura 3.

Figura 3 – Embrião de *D. rerio* coagulado



Fonte: Protocolo OECD nº 236 (OECD, 2025)

Os embriões da *D. rerio*, de acordo com Braunbeck et al., (2005), geralmente tendem a coagular até as 48h de ensaio de toxicidade.

### ***2.6.3 Eclosão dos embriões de D. rerio***

Nas condições laboratoriais corretas, temperatura de 28 °C, a eclosão ocorre entre 2,5 – 3 dias, após a fertilização, é quando o embrião rompe as paredes do córion e fica livre no poço (Lawrence, 2007). A eclosão foi utilizada como parâmetro cronológico de observação.

### ***2.6.4 Ausência de formação de somito dos embriões de D. rerio***

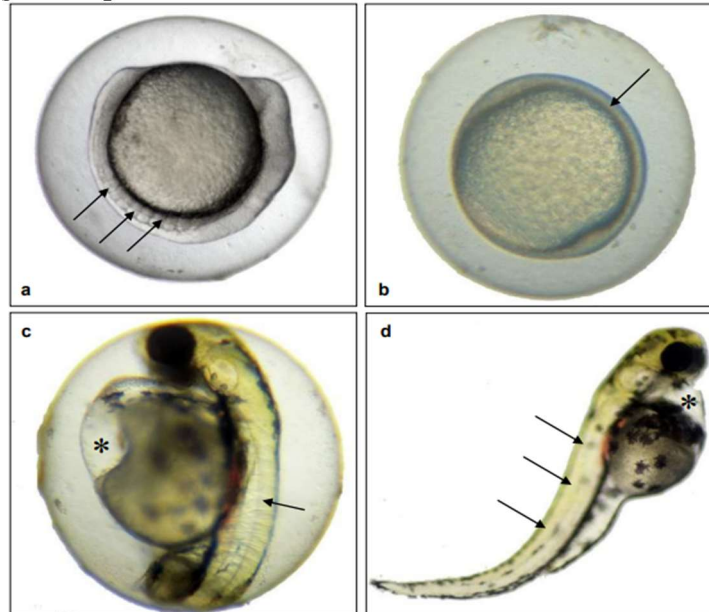
O somito se forma nas primeiras 18 horas de vida do embrião (Braunbeck et al., 2005), pode ser percebido por movimentos espontâneos no interior do córion.

A ausência de formação de somitos indica um comprometimento grave no desenvolvimento embrionário, podendo resultar em malformações da musculatura esquelética, coluna vertebral e órgãos associados, com sérias consequências para a viabilidade e morfologia do embrião.

Na figura 4, exemplifica quatro possíveis cenários sobre a ausência ou presença do somito, em (a), embora com desenvolvimento retardado, mostra somitos bem desenvolvidos; o embrião em (b) não mostra qualquer sinal de formação de somitos. No embrião (c), com 48 horas, apesar de apresentar pronunciado edema do saco vitelino (\*), mostra formação distinta

de somitos; na larva com 96 horas de idade representada em (d) não mostra nenhum sinal de formação de somitos. Observe também a curvatura da coluna vertebral (escoliose) e o edema pericárdico (\*) no embrião mostrado em (d).

Figura 4 – Imagens da presença e ausência do somito em embriões e larvas de *D. rerio*



Fonte: Protocolo OECD nº 236 (OECD, 2025).

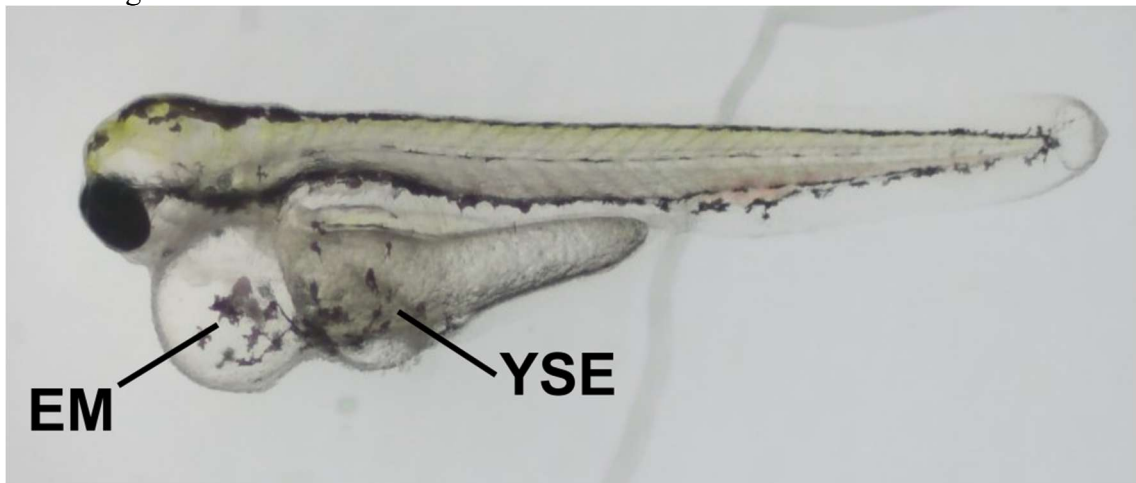
### 2.6.5 Deformações dos embriões de *D. rerio*

Foram catalogados dois tipos de deformações: cauda e edemas. A primeira caracterizada pela ausência de retidão, geralmente associada a não formação de somito.

O segundo tipo de deformação, edemas, foram divididos em dois tipos: miocárdio e saco vitelino. Na figura 5, apresenta larva com 96 horas, no qual apresenta dois tipos de edemas: EM é o edema do miocárdio, cuja protuberância, pela imagem, apresenta dimensões próxima à cabeça da larva; e YSE, edema do saco vitelino.

No peixe-zebra, o estudo de seu saco vitelino também é um excelente modelo para identificar perturbações tóxicas na nutrição embrionária precoce e possui potencial para revelar explicações baseadas em mecanismos biológicos sobre as origens do desenvolvimento de doenças (Sant; Timme-Laragy, 2018).

Figura 5 – Larva de 96 horas com edemas no miocárdio e no saco vitelino



Fonte: Próprio autor

### ***2.6.7 Morfologia e estatística***

Para as análises morfológicas foram realizadas fotos de um único indivíduo, sendo esse o mais representativo do grupo, por placa, em 24h e 96h, sempre no mesmo horário em que os embriões foram postos nas placas.

Foram registradas, nas 96h, imagens de todos os espécimes vivos em todas as placas individualmente, para que com o auxílio do software ImageJ (versão 1,54g), fossem medidos os tamanhos corporais e de saco vitelino.

Para a estatística, foi aplicado teste de variância anova, com significância 5% aos dados de sobrevivência e medidas (corpóreas e de saco vitelino) e caso fosse identificada diferença significativa entre as amostragens, aplicou-se teste de Tukey.

### 3 RESULTADOS

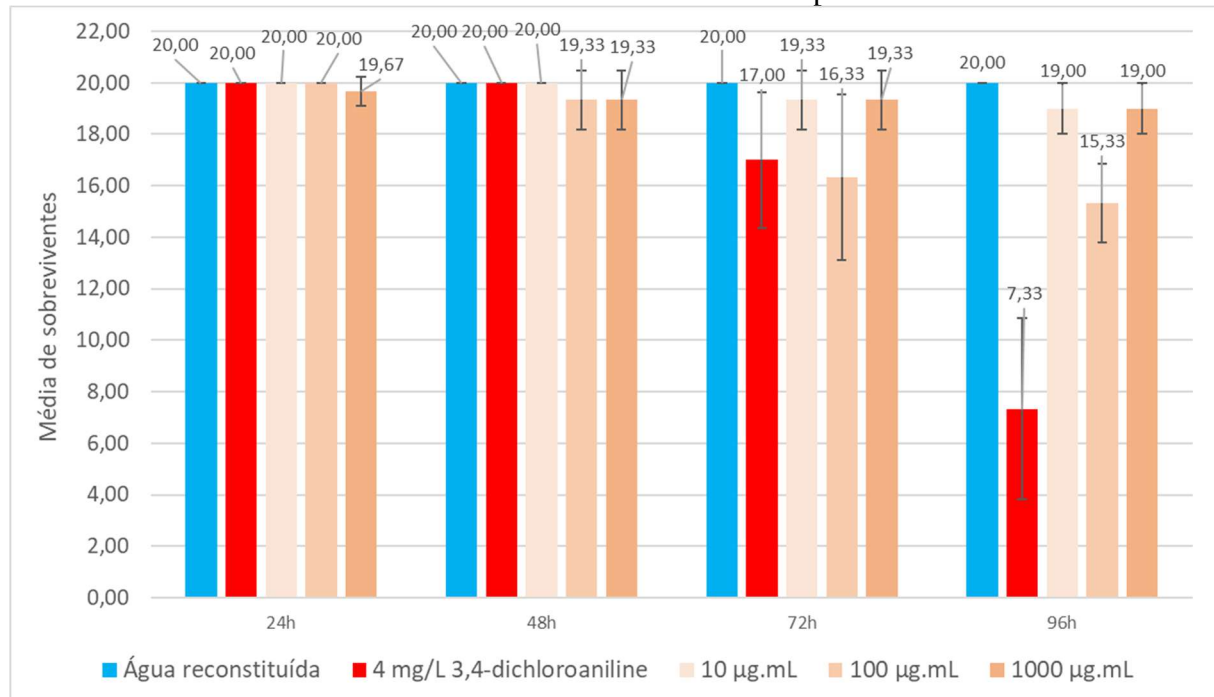
#### 3.1 Kombucha Tradicional

No Gráfico 1, mostra os valores da água reconstituída (controle negativo), pesticida DCA [4 mg.L<sup>-1</sup>] (controle positivo) e as três concentrações da kombucha tradicional.

É possível observar que os embriões em contato com a água reconstituída se mantiveram, ao longo das 96 h, sem mortalidade, preservando a média total de sobreviventes. Por esse motivo, não foi observado desvio padrão, indicando similaridade entre as triplicatas analisadas.

Já os embriões expostos ao pesticida apresentaram, após 48 h, uma redução nos valores de sobrevivência, atingindo ao final do experimento uma média de aproximadamente 7 (sete) indivíduos, o que corresponde a 35%.

Gráfico 1 – Taxa de sobrevivência de embriões de zebrafish expostos à kombucha tradicional

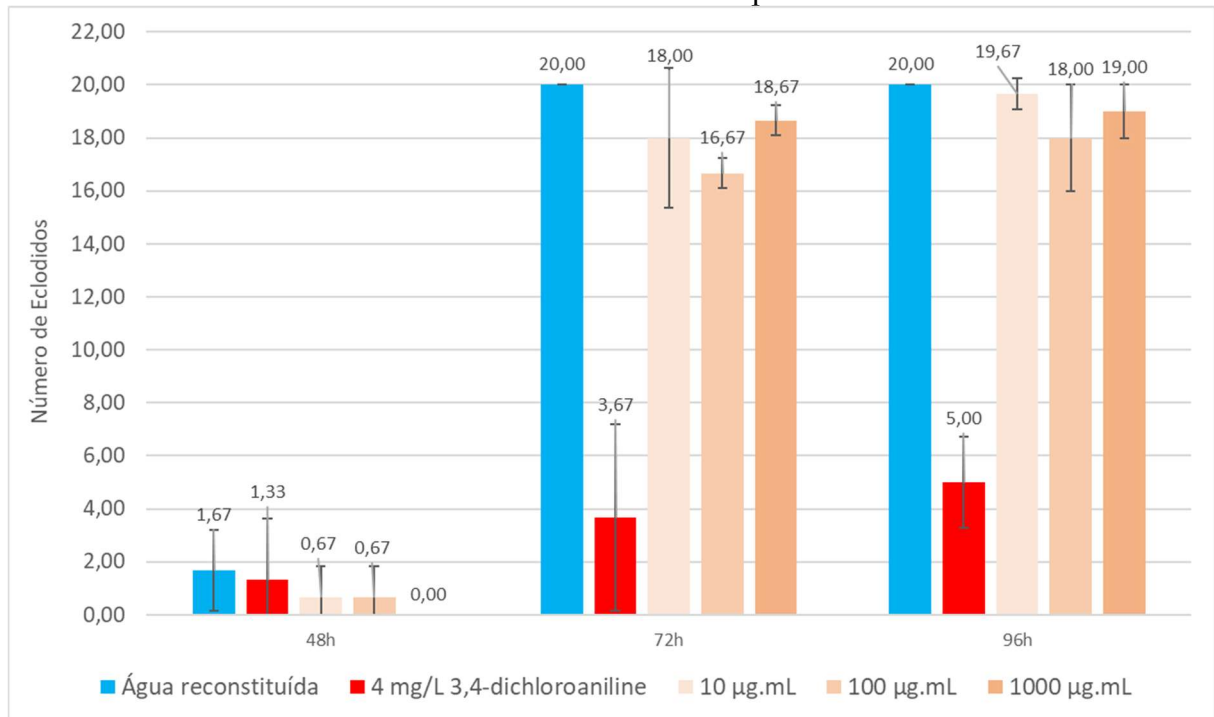


Fonte: Próprio autor

A kombucha tradicional, nas concentrações de 10 e 1000 µg.mL<sup>-1</sup>, apresentou resultados finais próximos ao que foi observado na água reconstituída, ambas com médias 19 indivíduos vivos, cerca de 95%. No entanto, a concentração intermediária (100 µg.mL<sup>-1</sup>) apresentou, após 48 h, uma redução nos valores de sobrevivência, com média aproximada de 16 larvas vivas (80%) em 72 h e 15 larvas (75%) ao final de 96 h.

O parâmetro seguinte é o de eclosão visto por meio do gráfico 2, no qual as observações foram realizadas após 24 h. Os embriões submetidos à água reconstituída, já nas 72 h de exposição, apresentaram 100% de eclosão, quanto ao pesticida, a média, ao final das 96 h, não superou 5 eclosões (25%).

Gráfico 2 – Média de eclosão de embriões de zebrafish expostos à kombucha tradicional

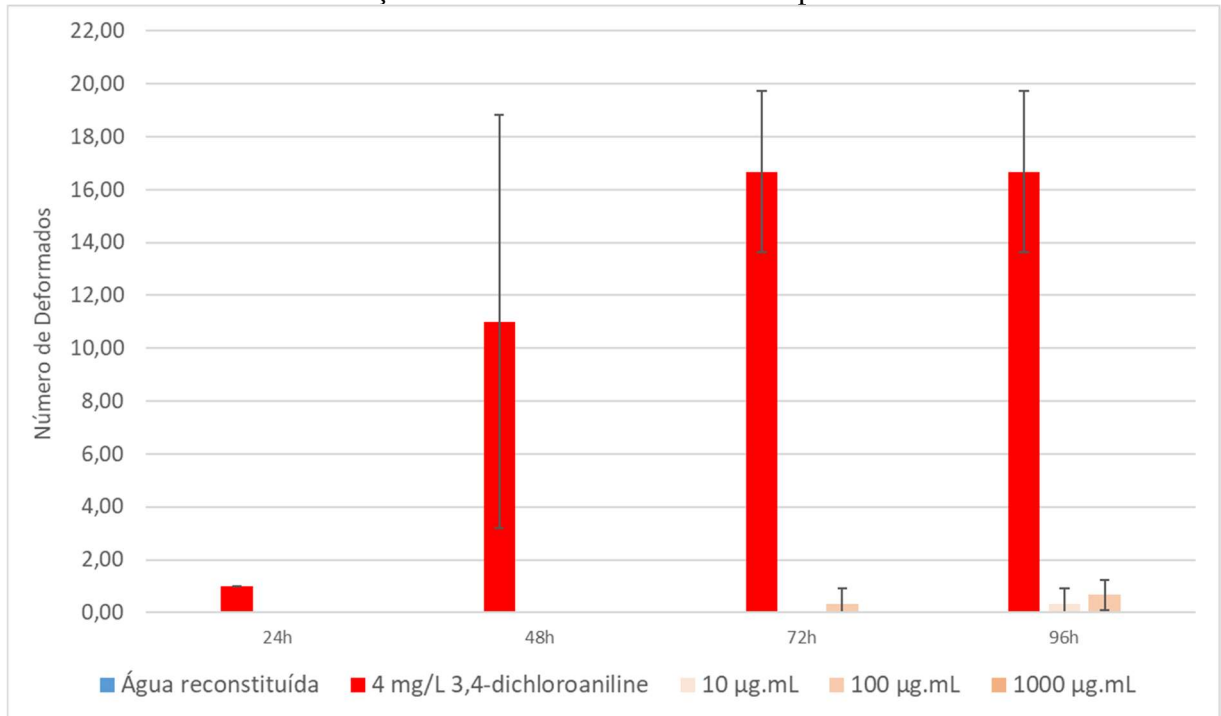


Fonte: Próprio autor

Sobre a taxa de eclosão nas concentrações de kombucha tradicional, em  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , observou-se a maior média, aproximadamente 19 eclodidos (95%); em  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , houve a menor média observada: 18 eclodidos (90%), provavelmente associada a mortalidade vista no gráfico 1; e em  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , resultado semelhante ao que foi observado na menor concentração.

Sobre as deformações, o gráfico 3 revela que o controle da água reconstituída não apresentou deformações e no controle do pesticida houve deformações crescentes ao longo do experimento, chegando nas 72 h ao valor de aproximadamente 16 larvas deformadas, um valor de referente à 80%.

Gráfico 3 – Taxa de deformações de embriões de zebrafish expostos à kombucha tradicional

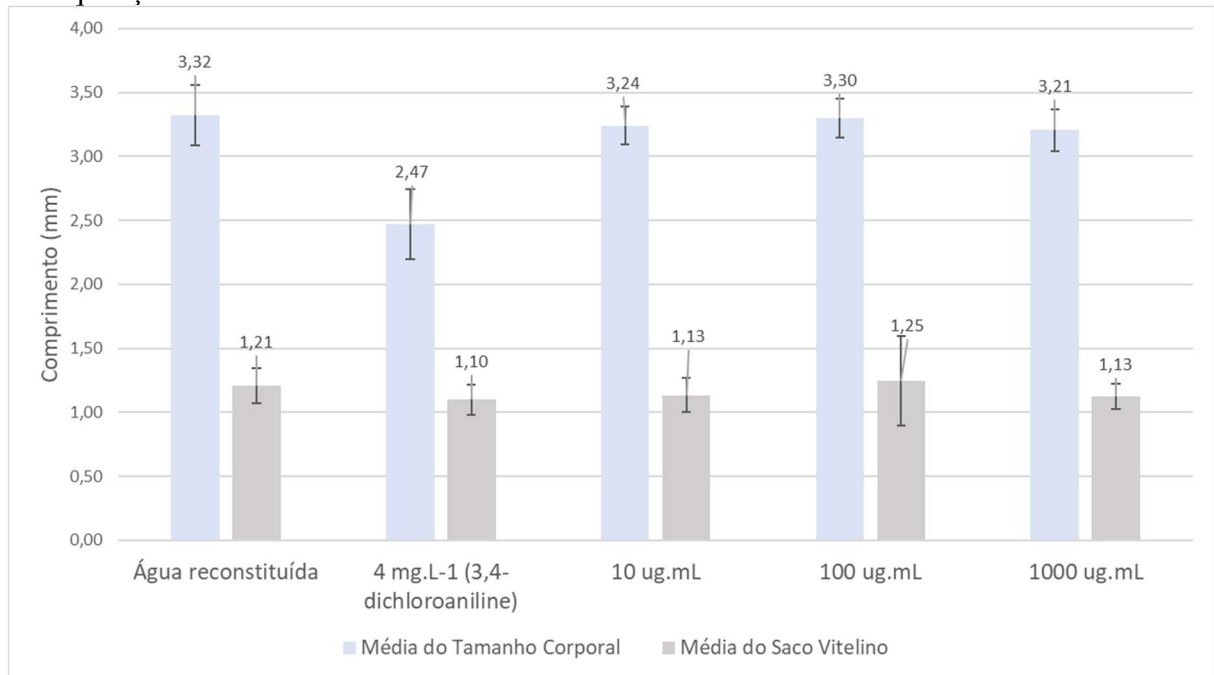


Fonte: Próprio autor

Sobre as concentrações da amostra, assemelharam-se ao que foi constatado no controle negativo, sendo que na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , a que apresentou maior número de deformações, não superou 5% dos embriões expostos.

As médias dos comprimentos de corpo e de saco vitelino revelaram outra similaridade entre as amostras de kombucha tradicional com o controle da água reconstituída, bem como evidenciaram uma diferença com o controle do pesticida.

Gráfico 4 – Comprimentos (mm) do corpo e do saco vitelino das larvas de zebrafish após 96 h de exposição à kombucha tradicional



Fonte: Próprio autor

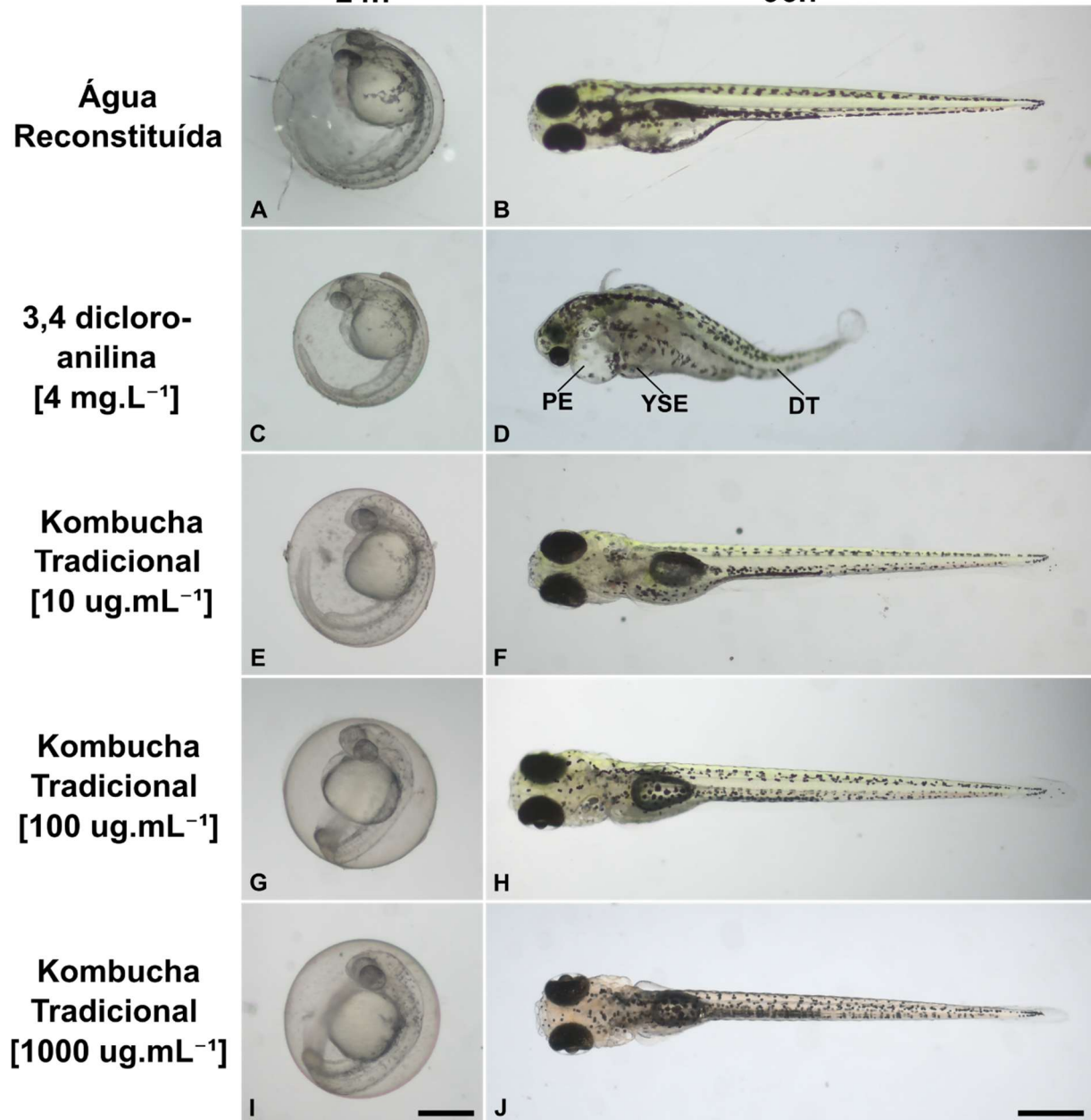
Entre as concentrações, os valores corporais ultrapassaram o 3,20 mm de comprimento, no entanto não foram maiores do que a média observada no controle negativo da água reconstituída (3,32 mm), porém foram 0,74 mm maior, em comparação à menor média levantada ( $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  – 3,21 mm) e o controle positivo do pesticida.

Sobre o saco vitelino, nenhuma concentração ficou abaixo do valor médio do pesticida, porém na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  a média foi superior ao observado no controle negativo.

A figura 6 mostra a análise morfológica feita entre os espécimes testados em ambos os controles e os submetidos à kombucha tradicional. Nas Figuras 6A e 6B, observa-se o embrião (24h) e a larva (96h) expostos à água reconstituída, não há presença de deformações ou edemas; há pigmentação característica da espécie; olhos presentes; e cauda reta.

Na figura 6C, nota-se um tamanho reduzido do embrião submetido ao DCA, embora haja pigmentação. Já na figura 6D, a larva mostra um comprimento menor do que o visto figura 6B, há também a presença de edemas do pericárdio (PE), edemas do saco vitelino (YSE) e deformação de cauda torta (DT).

Figura 6 – Morfologia dos embriões e larvas de *D. rerio* expostos à kombucha tradicional



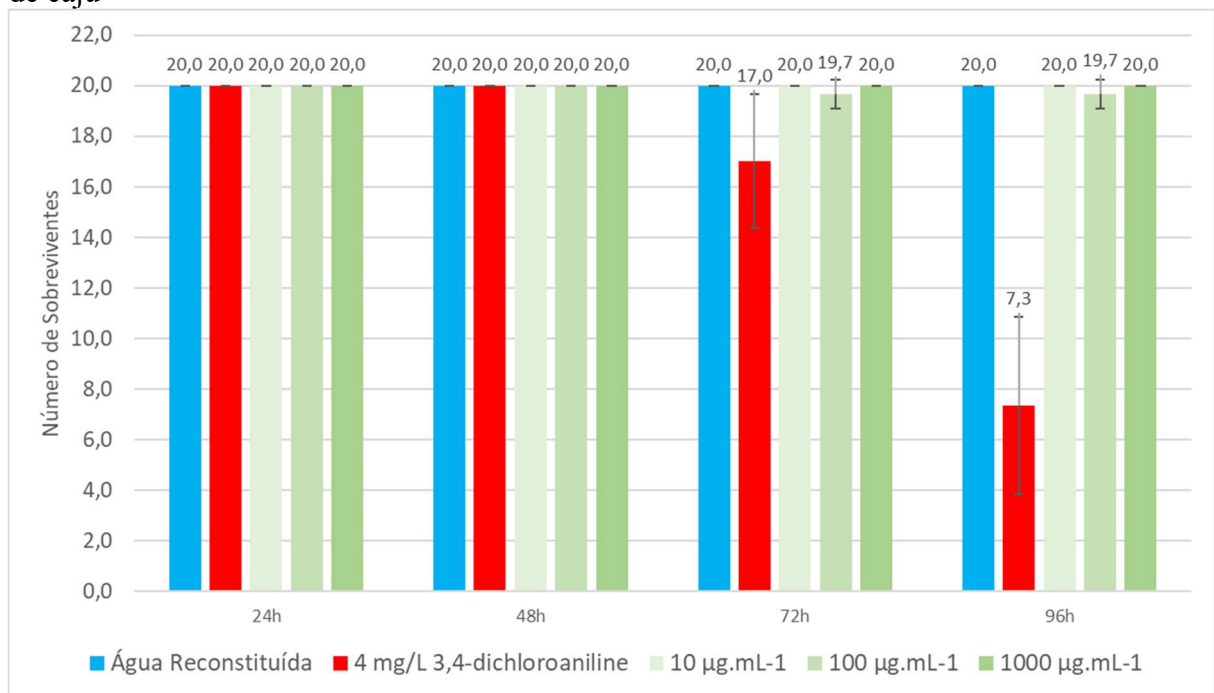
Fonte: Próprio autor. Barra: A, B, C, D, E, F, G, H, I e J: 500  $\mu$ m

Nas figuras 6E, 6G e 6I, não há diferenças visíveis entre eles, ou seja, não há diferença entre os embriões expostos às diferentes concentrações da kombucha, bem como há similaridade entre esses com a figura 6A. Tal padrão se repete também para as larvas com 96h, nas figuras 6F, 6H e 6J, há semelhanças de tamanho, pigmentação, formação dos olhos e retidão da cauda, tal qual como visto na figura 6B.

### 3.2 Kombucha Saborizada com resíduos de caju

Os resultados do FET com a kombucha saborizada de caju mostraram, através do gráfico 5, que as taxas de sobrevivência dos embriões de *D. rerio*, tiveram uma maior proximidade de valores entre as três concentrações e entre essas e o controle da água reconstituída.

Gráfico 5 – Taxa de sobrevivência de embriões de zebrafish expostos à kombucha saborizada de caju

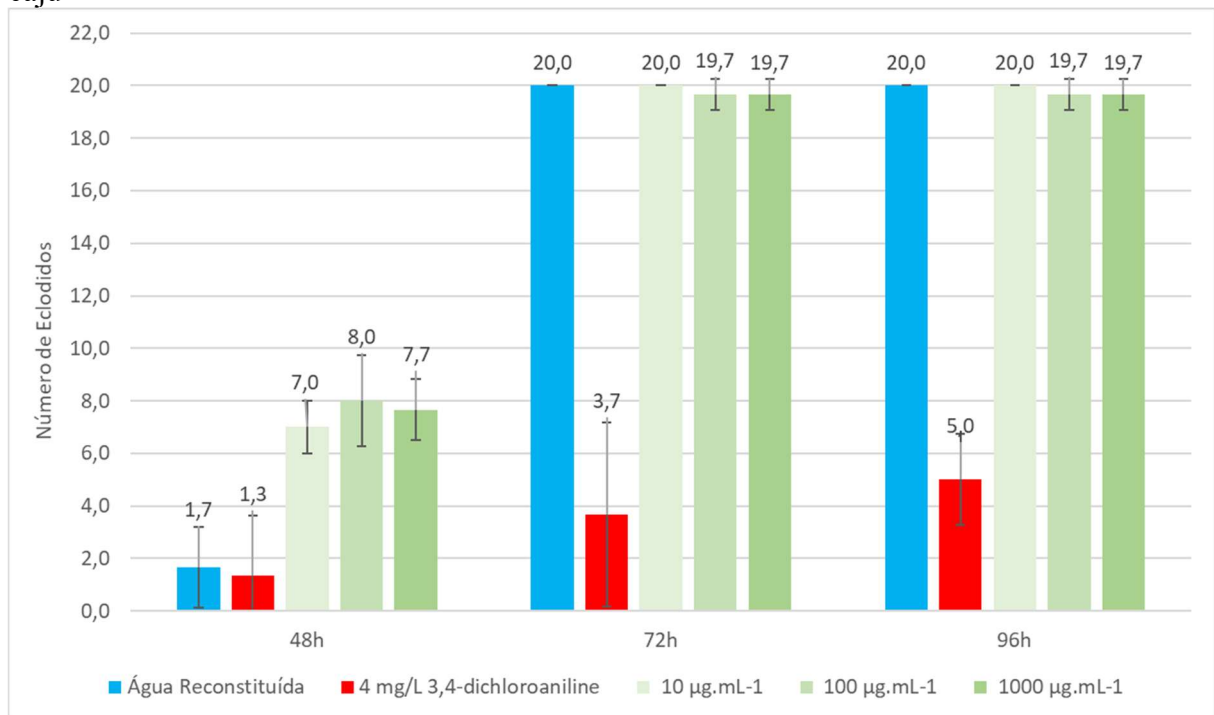


Fonte: Próprio autor

A menor média observada foi na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , com uma porcentagem de 98,5% de sobreviventes, sendo que nas concentrações de 10 e  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , houve 100% de sobrevivência.

Essa alta taxa de sobrevivência também impulsionou os valores de eclosão, conforme o gráfico 6, abaixo.

Gráfico 6 – Média de eclosão de embriões de zebrafish expostos à kombucha saborizada de caju

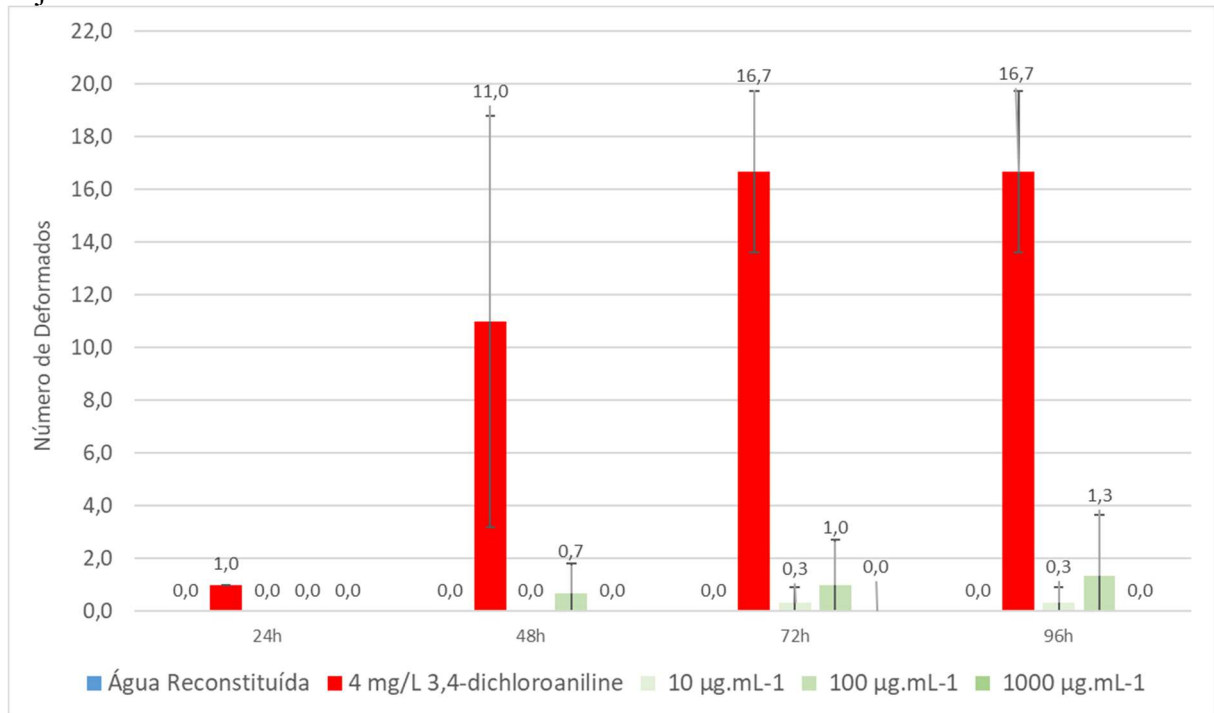


Fonte: Próprio autor

É possível observar que já nas 48 h de ensaio, todas concentrações da kombucha saborizada de caju apresentaram valores médios de eclosão superiores ao controle da água reconstituída. Em 72 h, os valores do controle negativo e das concentrações eram estatisticamente iguais (Anova,  $p > 0,05$ ), com um desvio padrão de 0,3.

Já as deformações para essa kombucha, conforme o gráfico 7, não ultrapassaram, nas concentrações testadas, 02 indivíduos (10%), tendo o maior valor registrado na concentração de 100 µg.mL<sup>-1</sup>.

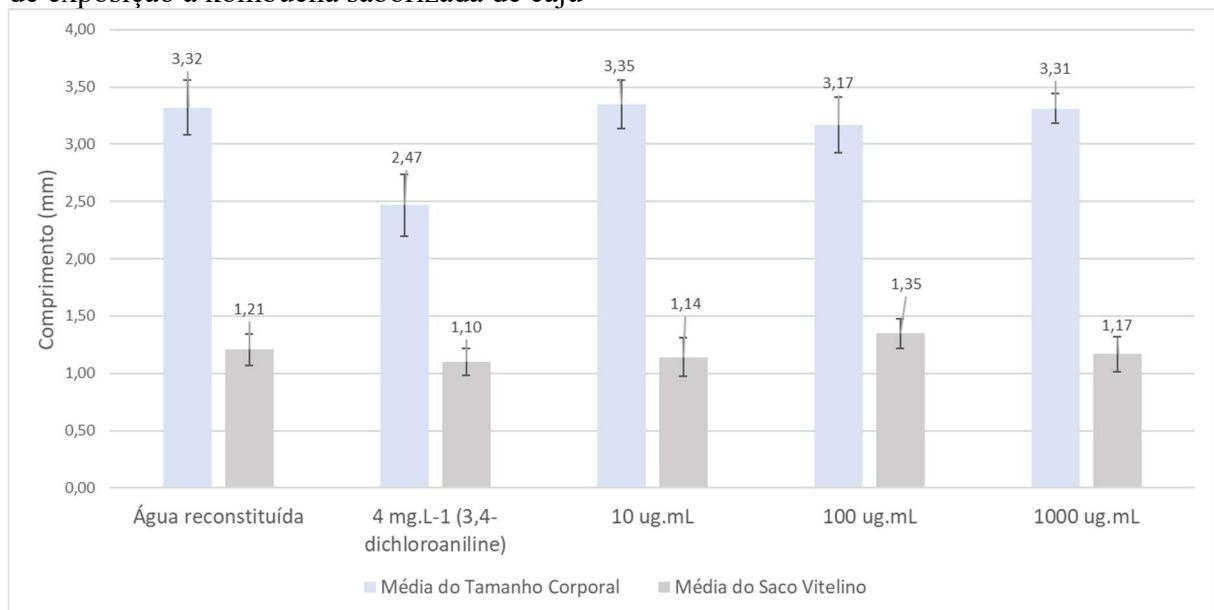
Gráfico 7 – Taxa de deformações de embriões de zebrafish expostos à kombucha saborizada de caju



Fonte: Próprio autor

Os tamanhos corporais e de saco vitelino tiveram resultados próximos ao observado no controle negativo, com destaque à concentração de 10 µg.mL<sup>-1</sup>, no qual teve um valor médio corpóreo superior, no entanto o tamanho do saco vitelino foi inferior.

Gráfico 8 – Comprimentos (mm) do corpo e do saco vitelino das larvas de zebrafish após 96 h de exposição à kombucha saborizada de caju

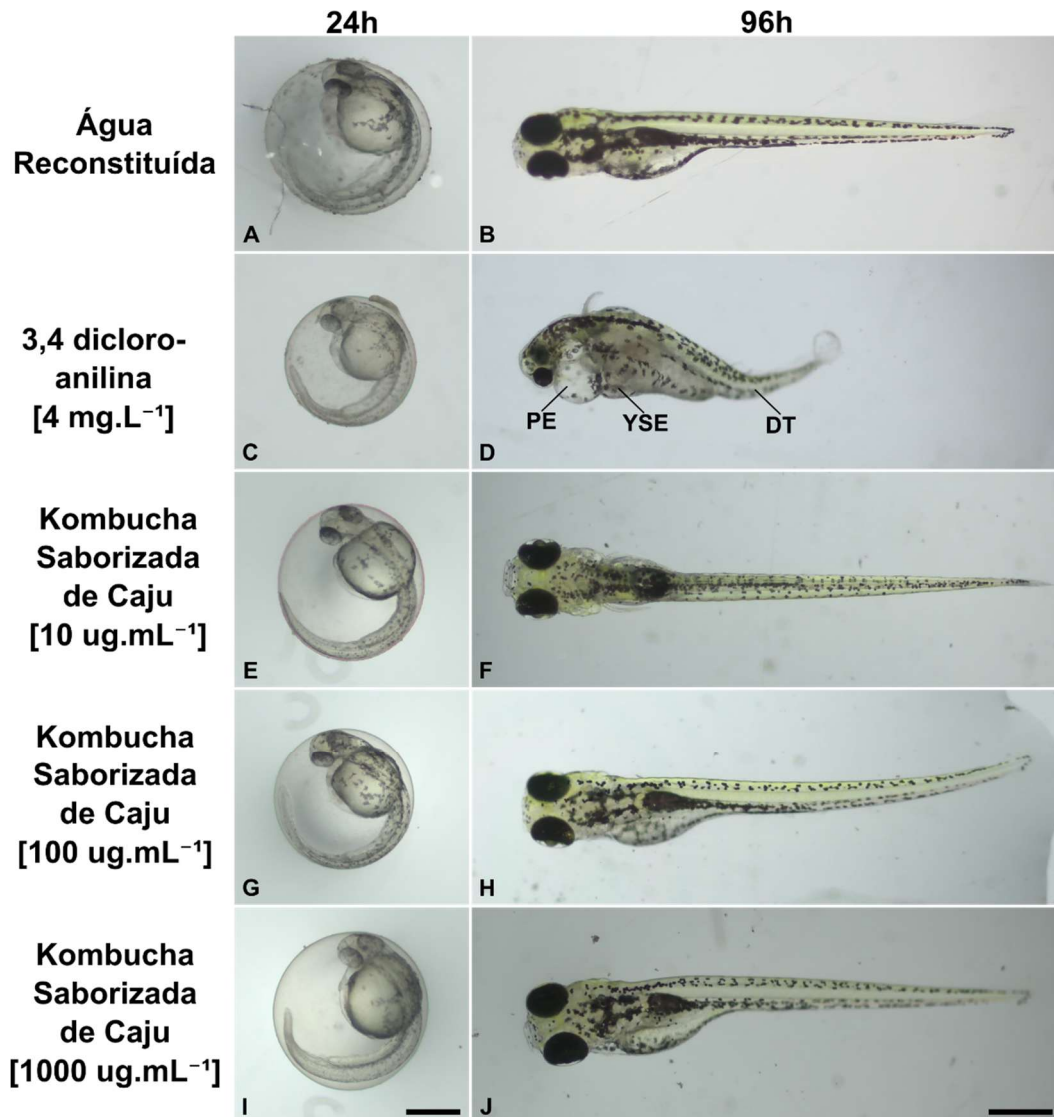


Fonte: Próprio autor.

As análises morfológicas (figura 7) demonstraram que, em todas as concentrações avaliadas, as estruturas típicas da larva de *D. rerio* estavam presentes e bem organizadas. Os resultados obtidos se aproximaram do que foi observado no controle negativo e se distanciaram do controle positivo, evidenciando condições normais de desenvolvimento.

Observou-se ausência de edemas, tanto no miocárdio quanto no saco vitelino, além de um tamanho corpóreo compatível com a espécie e com o estágio de desenvolvimento esperado. A estrutura ocular manteve-se íntegra e sem deformações aparentes, a pigmentação apresentou-se adequada e a cauda permaneceu retilínea, reforçando a ausência de alterações morfológicas relevantes.

Figura 7 – Morfologia dos embriões e larvas de *D. rerio* expostos à kombucha saborizada de caju

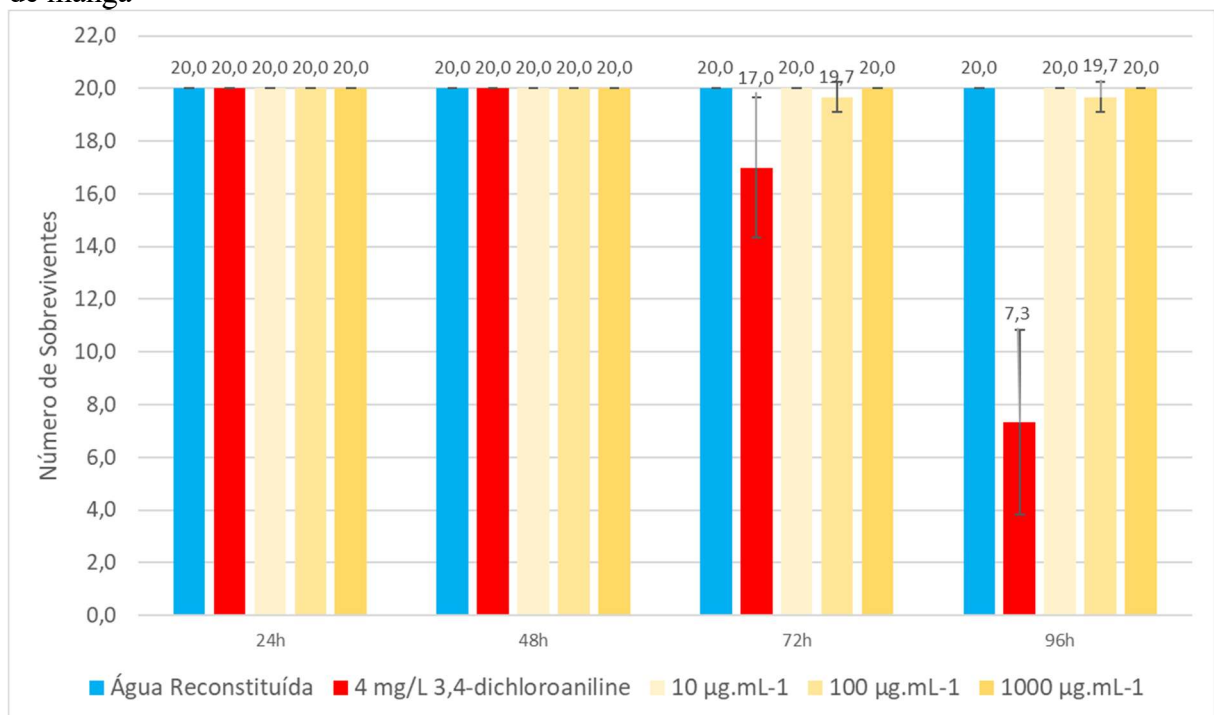


Fonte: Próprio autor. Barra: A, B, C, D, E, F, G, H, I e J: 500 µm

### 3.3 Kombucha saborizada com resíduos de manga

A kombucha saborizada de manga obteve resultados próximos ao que foi observado também na kombucha saborizada de caju. É possível observar semelhanças numéricas entre o gráfico 9 e o gráfico 5 – Taxa de sobrevivência de embriões de zebrafish expostos à kombucha saborizada de caju, ou seja, similaridade entre as concentrações e o controle negativo, tanto que os valores são iguais, para as três concentrações.

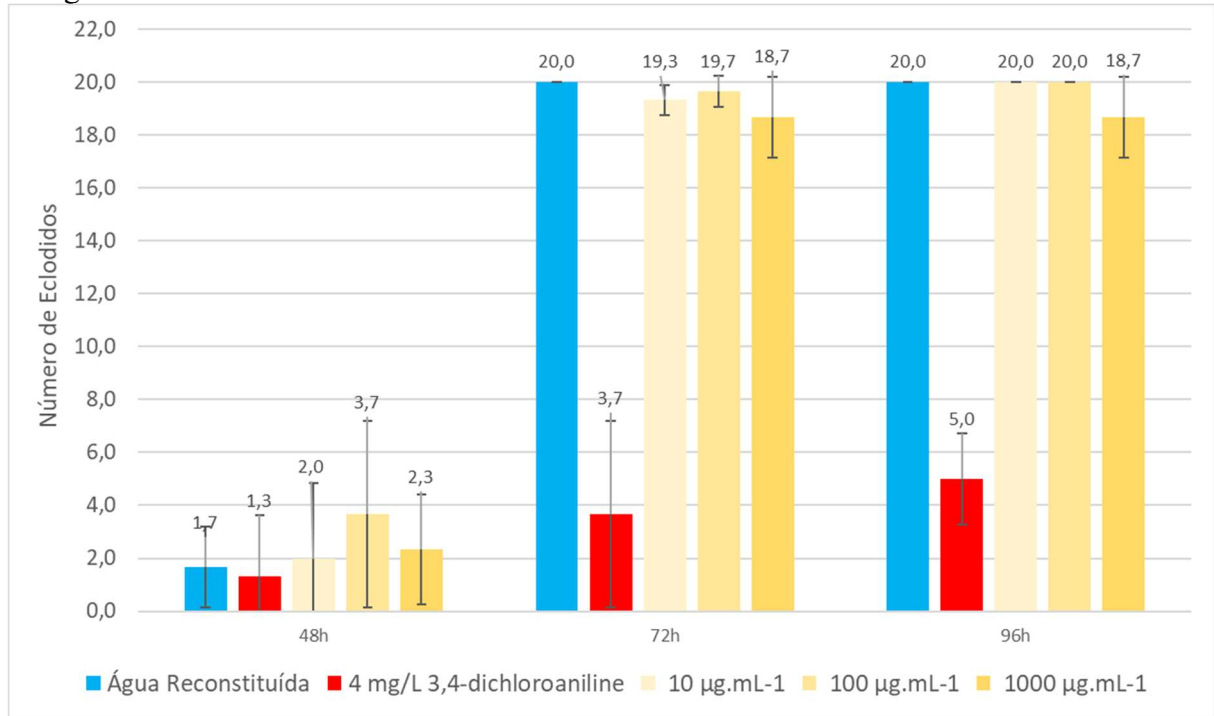
Gráfico 9 – Taxa de sobrevivência de embriões de zebrafish expostos à kombucha saborizada de manga



Fonte: Próprio autor

No entanto esse paralelo entre as duas kombuchas não se estende à eclosão, pois na concentração de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  da kombucha saborizada de manga, as médias das triplicatas vistas no gráfico 10, mostram que não houve a totalidade de eclosão, diferentemente das concentrações inferiores.

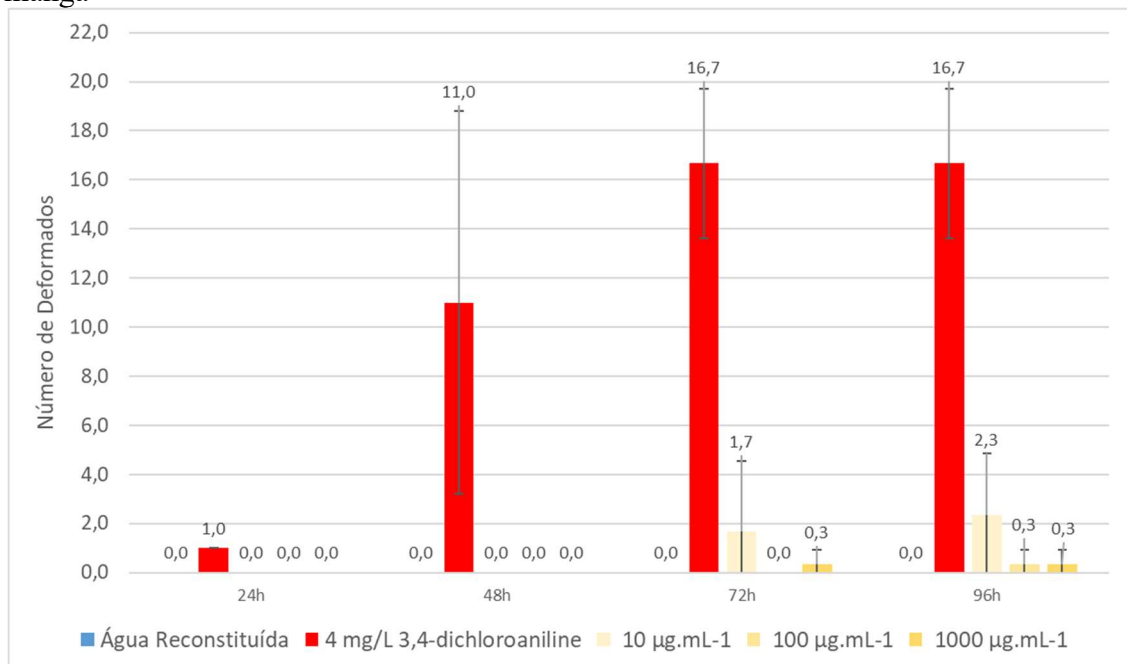
Gráfico 10 – Taxa de eclosão de embriões de zebrafish expostos à kombucha saborizada de manga



Fonte: Próprio autor

As taxas de deformação nessa amostra mostraram, por meio do gráfico 11, que na concentração de 10 µg.mL<sup>-1</sup>, houve a maior média de deformação entre todas as kombuchas testadas, um valor médio acima de 10%.

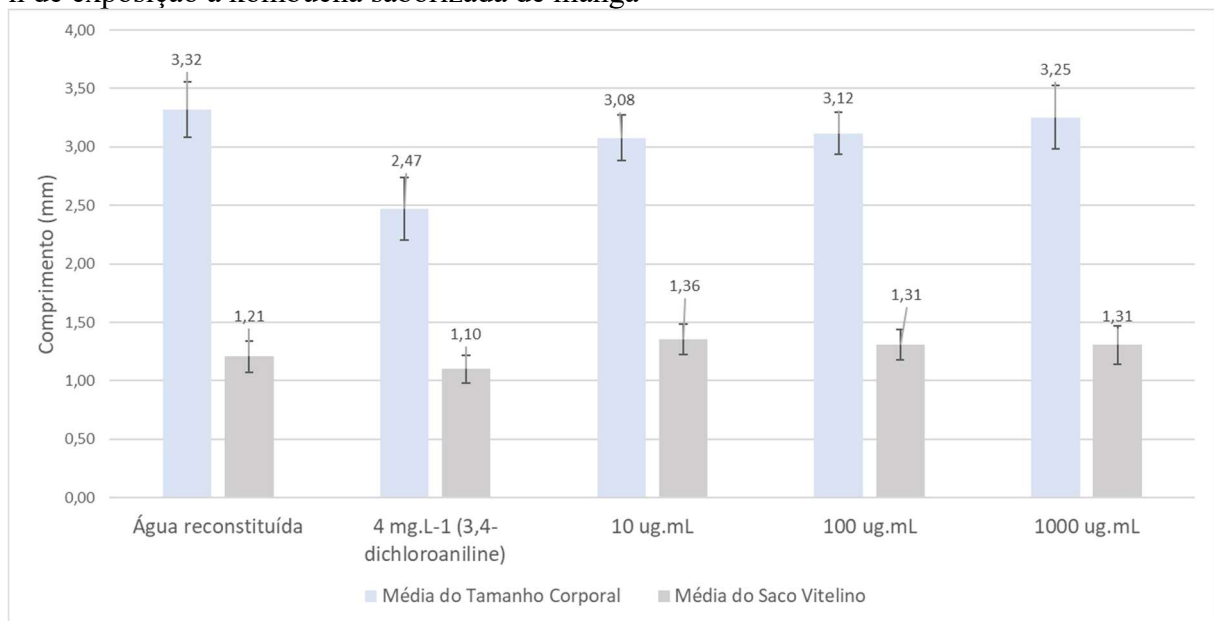
Gráfico 11 – Taxa de deformações de embriões de zebrafish expostos à kombucha saborizada de manga



Fonte: Próprio autor

E sobre gráfico 12, os comprimentos corporais e de saco, o destaque vai para a crescente média de tamanho corporal observado com o aumento da concentração: 3,08, 3,12 e 3,25 mm para 10, 100 e 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e o inverso disso para tamanho do saco vitelino, que obteve em todas as concentrações valores maiores que o observado no controle negativo.

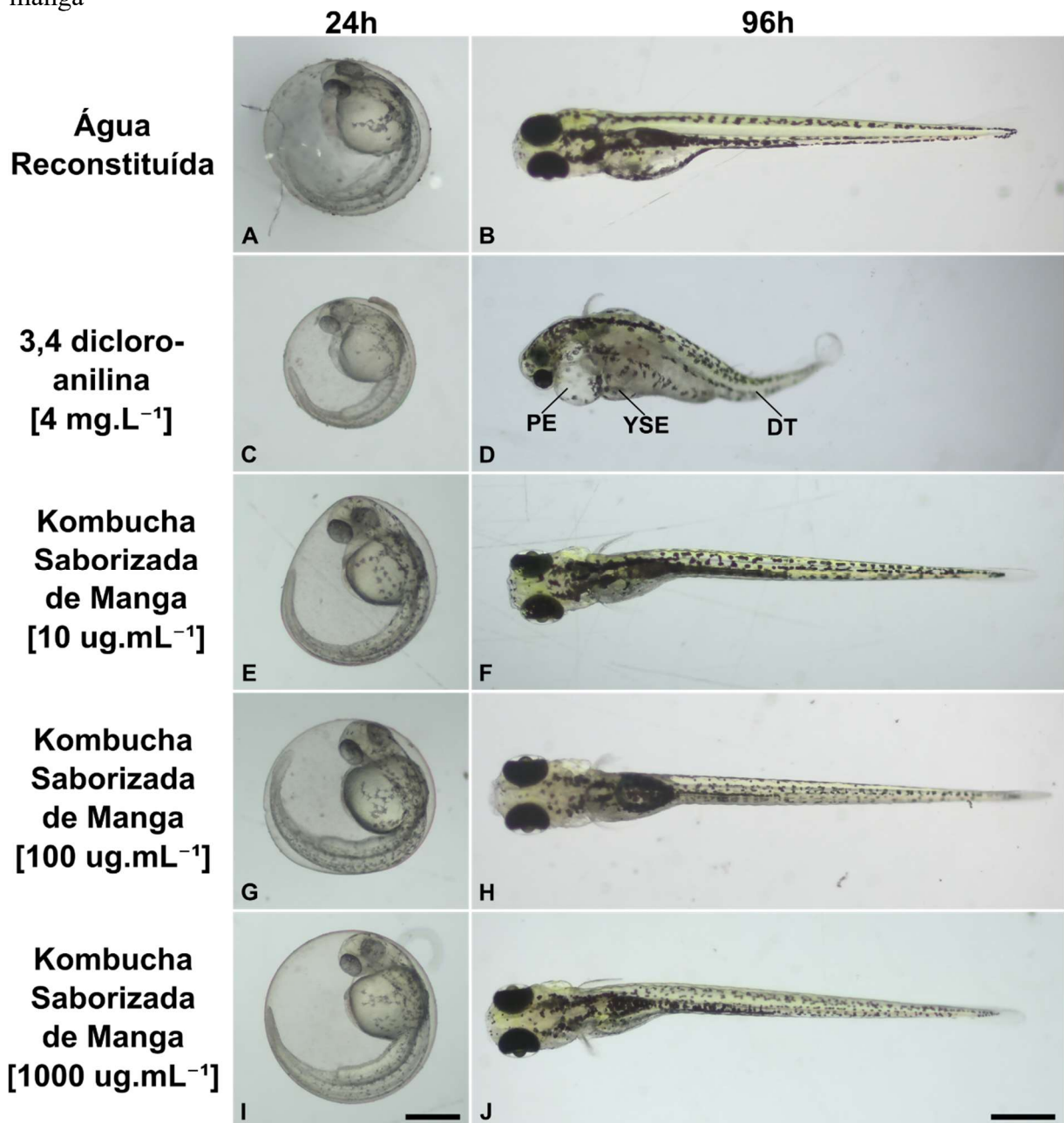
Gráfico 12 – Comprimentos (mm) do corpo e do saco vitelino das larvas de zebrafish após 96 h de exposição à kombucha saborizada de manga



Fonte: Próprio autor.

As análises morfológicas dos espécimes submetidos a essa kombucha indicaram novamente, similaridade entre o controle negativo e as concentrações testadas, com características do estado larval presentes em todas as concentrações.

Figura 8 – Morfologia dos embriões e larvas de *D. rerio* expostos à kombucha saborizada de manga

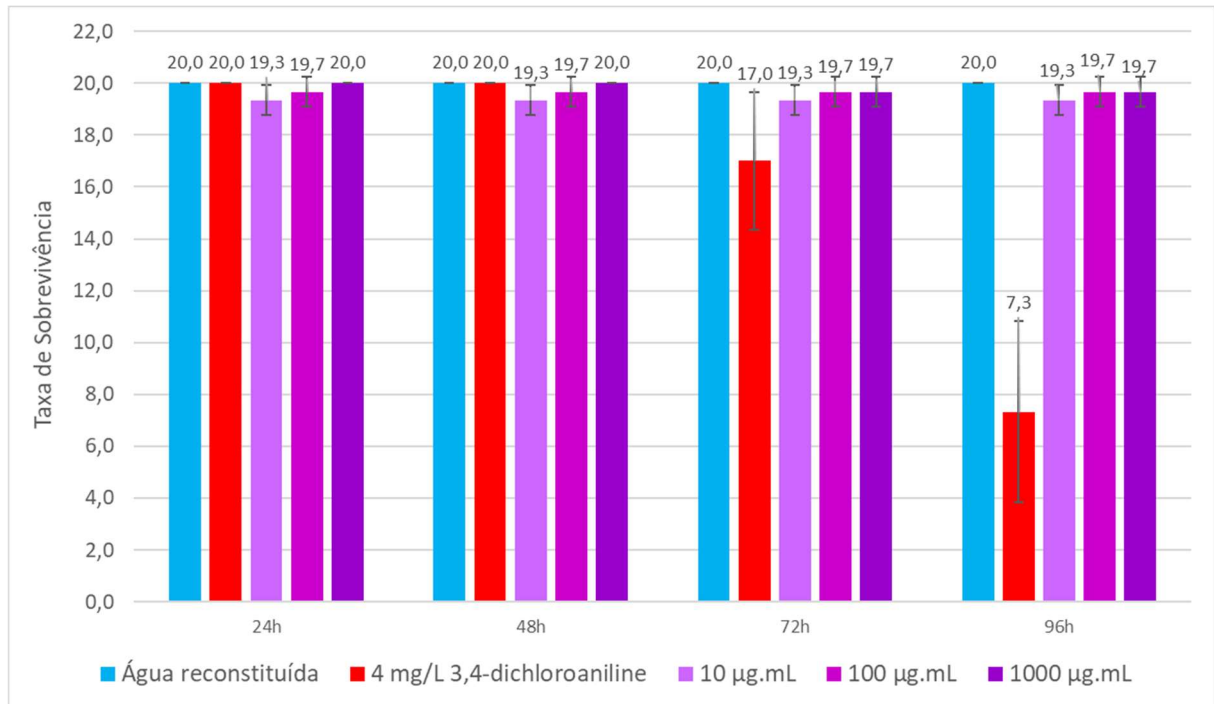


Fonte: Próprio autor. Barra: A, B, C, D, E, F, G, H, I e J: 500 µm

### 3.4 Kombucha saborizada com resíduos de uva

A kombucha saborizada de uva, foi a única testada cujo os valores de sobrevivência média não alcançaram 100% em nenhuma das concentrações. No entanto, os valores ainda estão acima dos 19 sobreviventes (95%), conforme o gráfico 13.

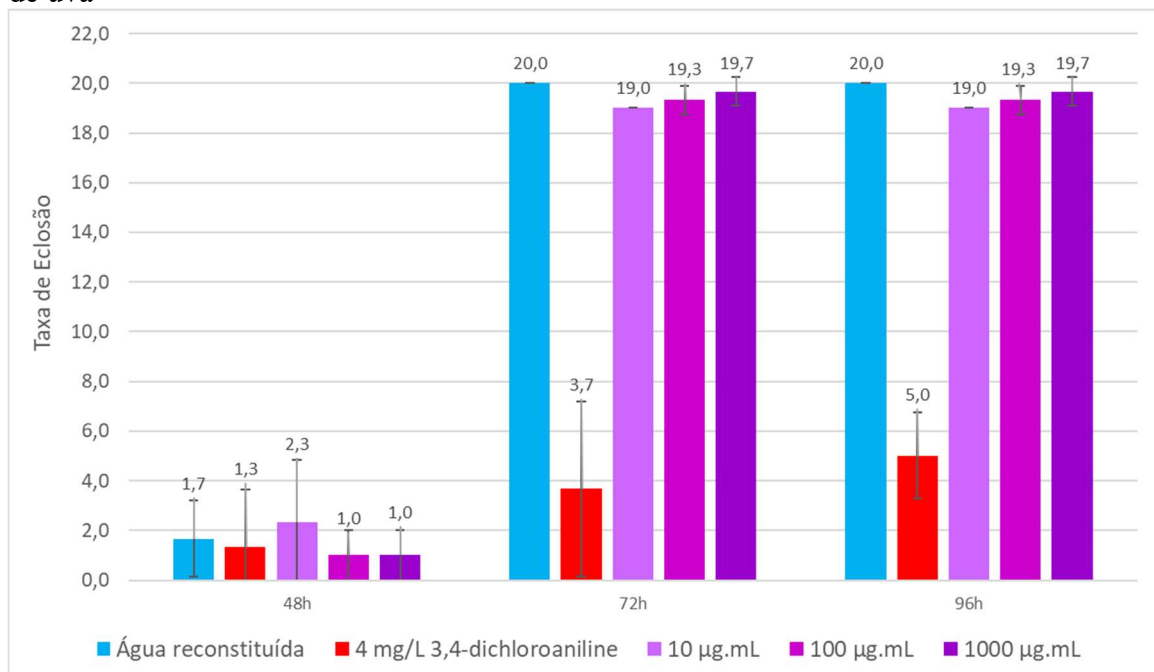
Gráfico 13 – Taxa de sobrevivência de embriões de zebrafish expostos à kombucha saborizada de uva



Fonte: Próprio autor

Tal qual foi a taxa de sobrevivência, as taxas de eclosão para essa amostra em nenhuma concentração tiveram valores totais. O gráfico 14 mostra que a eclosão foi acima dos 95% em todas as concentrações.

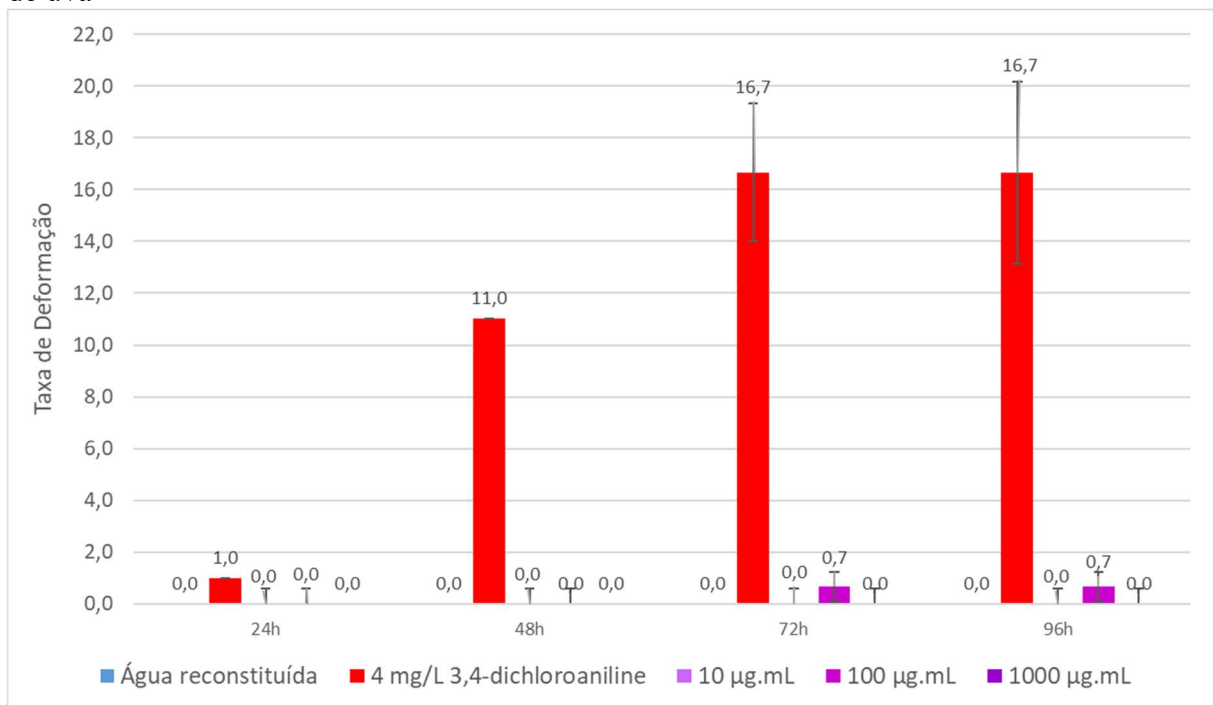
Gráfico 14 – Taxa de deformações de embriões de zebrafish expostos à kombucha saborizada de uva



Fonte: Próprio autor

Quanto as deformações, gráfico 15, apenas a concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  obteve resultados, esse não totalizando uma unidade inteira.

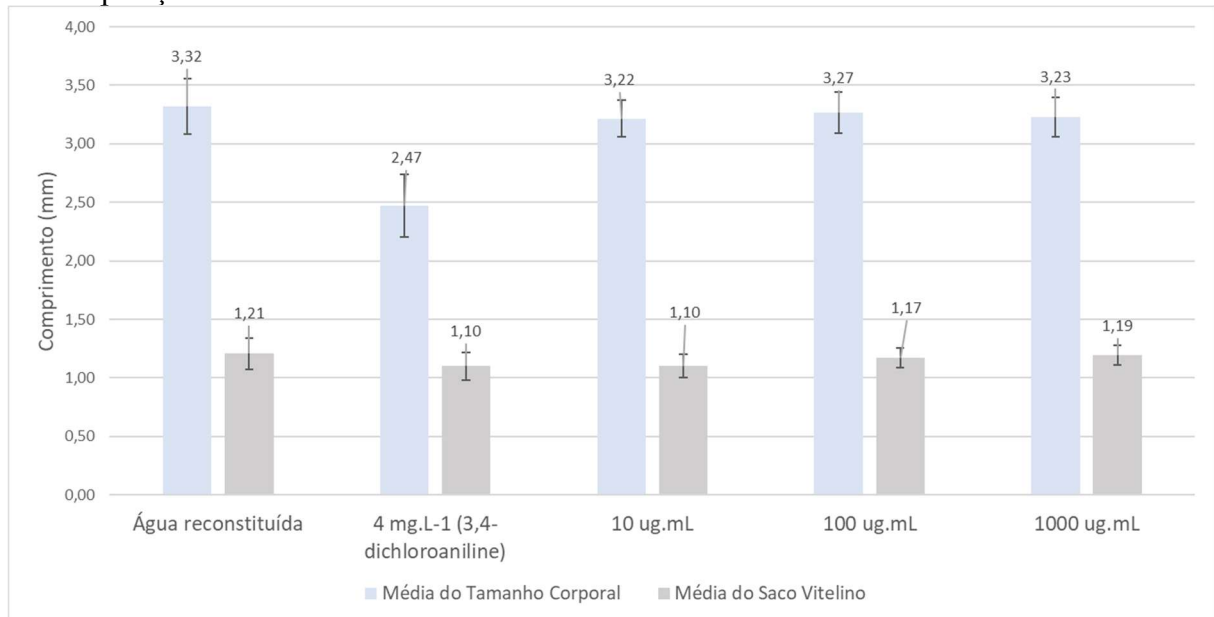
Gráfico 15 – Taxa de deformações de embriões de zebrafish expostos à kombucha saborizada de uva



Fonte: Próprio autor

Os tamanhos corporais das larvas expostas a essa kombucha não tiveram resultados destoantes ao que foi observado nas demais amostras, o ponto de destaque é o tamanho de saco vitelino da concentração de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  que ficou numericamente igual ao do controle positivo e as demais concentrações ficaram abaixo do controle negativo.

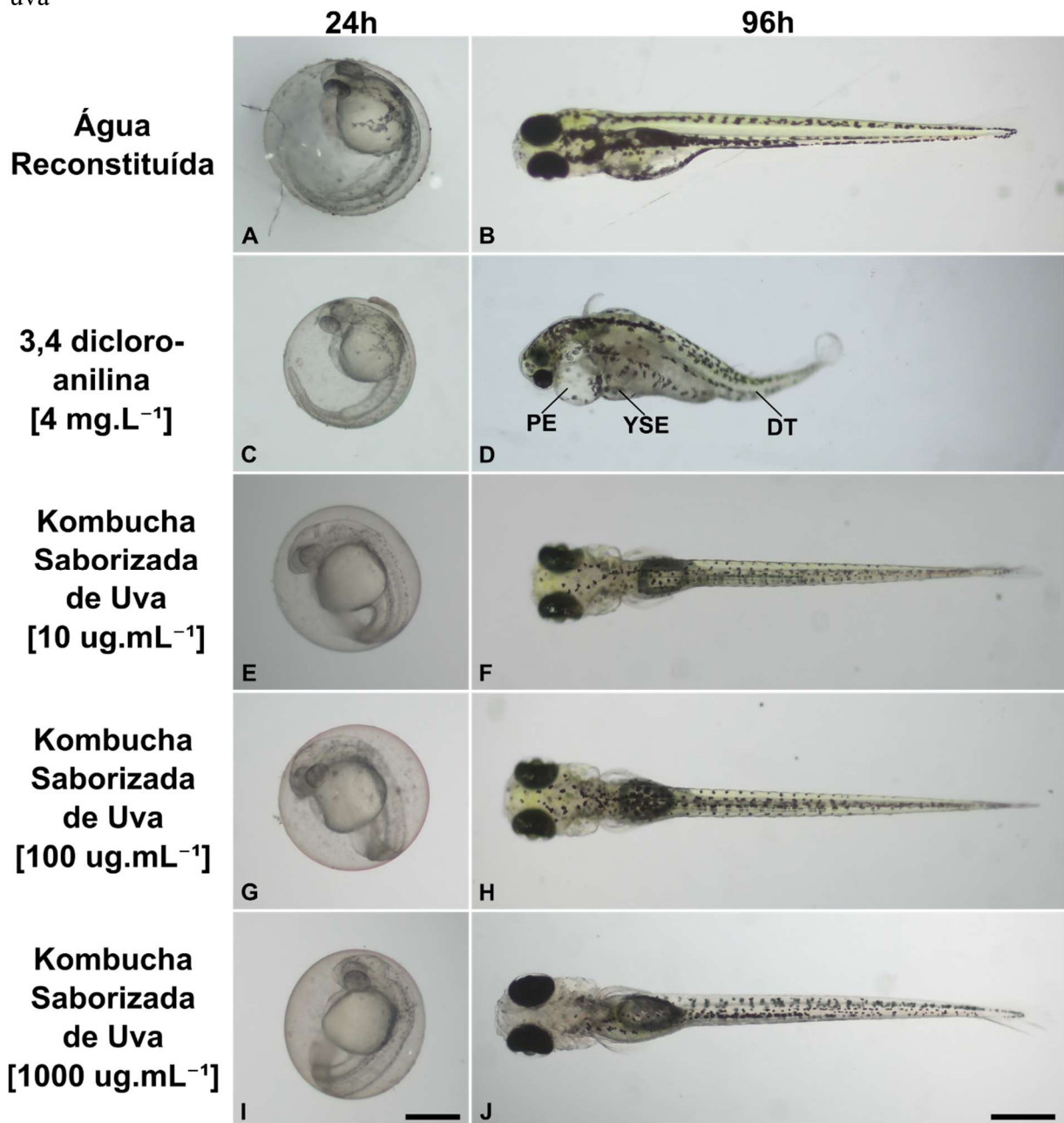
Gráfico 16 – Comprimentos (mm) do corpo e do saco vitelino das larvas de zebrafish após 96 h de exposição à kombucha saborizada de uva



Fonte: Próprio autor.

E o comparativo morfológico dessa kombucha com os controles mostra que, assim como todas as demais kombuchas houve uma semelhança entre o controle negativo, suas características e estruturas, com as concentrações testadas, sem a presença de deformações como é visto no controle positivo.

Figura 9 – Morfologia dos embriões e larvas de *D. rerio* expostos à kombucha saborizada de uva



Fonte: Próprio autor. Barra: A, B, C, D, E, F, G, H, I e J: 500  $\mu$ m

### 3.5 Estatística

A análise de variância – Anova identificou haver entre os 14 grupos testados, uma diferença significativa da sobrevivência das larvas de zebrafish, após 96 h de ensaio de toxicidade, conforme a Tabela 2. É possível notar que a razão da Média Quadrática (MQ) ‘Entre Grupos’ por ‘Dentro dos Grupos’, resultou no valor  $F$  de 26,89, maior do que o  $F$  crítico, valor limite obtido na tabela de distribuição  $F$  para o nível de significância de 5%, considerando os mesmos graus de liberdade da análise.

Tabela 2 – Teste de Variância Anova aplicada sobre valores de sobrevivência de larvas de zebrafish com 96 h de exposição, com significância de 5%

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	457,8095	13	35,21612	26,89231	2,20726E-12	2,088929
Dentro dos grupos	36,66667	28	1,309524			
Total	494,4762	41				

Fonte: Próprio autor

O teste Tukey, aplicado em sequência sobre os mesmos dados, revelou quais grupos apresentaram diferença significativa. A tabela 3 mostra os 14 grupos testados, as médias das triplicatas de sobrevivência após 96 h de ensaio e quais os grupos estatísticos foram agrupados.

Tabela 3 - Agrupamento estatístico das larvas sobreviventes com 96 h dos 14 tratamentos pelo teste de Tukey após ANOVA de fator único ( $p < 0,05$ )

Amostra	Média	Grupo Estatístico *
Água reconstituída	20,0	c
3,4 - dicloroanilina 4 mg.L <sup>-1</sup>	7,3	a
Komb. Tradicional 10 µg.mL <sup>-1</sup>	19,0	c
Komb. Tradicional 100 µg.mL <sup>-1</sup>	15,3	b
Komb. Tradicional 1000 µg.mL <sup>-1</sup>	19,0	c
Komb. Caju 10 µg.mL <sup>-1</sup>	20,0	c
Komb. Caju 100 µg.mL <sup>-1</sup>	19,7	c
Komb. Caju 1000 µg.mL <sup>-1</sup>	20,0	c
Komb. Manga 10 µg.mL <sup>-1</sup>	20,0	c
Komb. Manga 100 µg.mL <sup>-1</sup>	19,7	c
Komb. Manga 1000 µg.mL <sup>-1</sup>	20,0	c
Komb. Uva 10 µg.mL <sup>-1</sup>	19,3	c
Komb. Uva 100 µg.mL <sup>-1</sup>	19,7	c
Komb. Uva 1000 µg.mL <sup>-1</sup>	19,7	c

Fonte: Próprio Autor. (\*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os tratamentos foram agrupados em três categorias estatisticamente distintas, em razão do teste de Tukey ( $DMS = 3,422$ ;  $p < 0,05$ ). O controle positivo (3,4-dicloroanilina) apresentou valores significativamente menores de sobrevivência quando comparado a todos os demais tratamentos (grupo a). A kombucha tradicional na concentração de 100 µg/mL formou um grupo intermediário (b), apresentando redução significativa em relação ao controle negativo e às demais concentrações testadas. Todos os demais tratamentos permaneceram no mesmo grupo estatístico (c), indicando ausência de diferença significativa entre si e comportamento semelhante ao controle negativo.

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Kombucha tradicional

Os resultados de todas as concentrações revelam um primeiro indício de ausência de toxicidade aguda para *D. rerio*, no entanto, cabe ponderação na concentração da kombucha tradicional de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

O controle positivo apresentou o comportamento já esperado, pois as consequências do DCA em embriões de peixe-zebra, como efeitos teratogênicos, atrasos de desenvolvimento, alterações proteômicas e mortalidade (Vieira et al., 2020) já são conhecidos, sendo a mortalidade mínima de 30% um dos parâmetros de validade do FET (OECD, 2025).

Existem semelhanças entre os resultados e outros estudos sobre toxicidade da kombucha em modelos animais, Nogueira et al. (2025) mostrou que em ratos, com uma administração diária de kombucha por 28 dias não foi observada mortalidades ou deformações.

Em outra pesquisa, com o mesmo modelo animal citado, mostrou-se que, além de não causar mortalidades, a kombucha não provocou danos teciduais irreversíveis ao fígado e aos rins, corroborando com os resultados apresentados nesse trabalho de conclusão (Leitão; Silva; Gondim, 2023), esse resultado diverge do caso clínico visto por Sannapaneni et al., (2023), reforçando o fato de que o provável efeito tóxico observado não seja atribuído a bebida, mas ao seu uso equivocado ou erros que não levam em conta os parâmetros de identidade e qualidade (Cavicchia; Almeida, 2024).

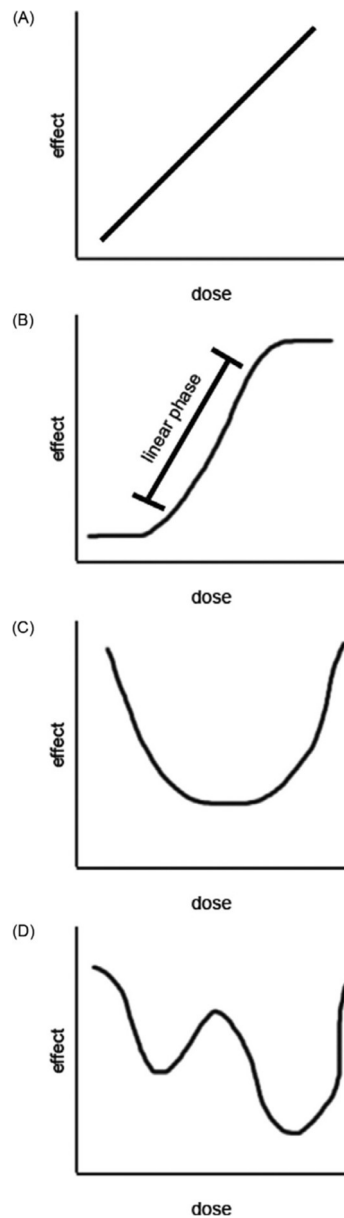
Revisões sobre kombucha também apontam sempre para os benefícios e ausências de efeitos tóxicos ou danosos (Medeiros; Cechinel-Zanchetti, 2019), o que reforça os dados visto nesse trabalho.

Sobre a concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Uma hipótese que pode explicar algumas dessas mortalidades na dose intermediária pode ser uma resposta não monotônica à dose. Em toxicologia, a lógica clássica é que com o aumento da dose ocorra o aumento da letalidade, ou seja as respostas de dose lineares são observadas quando a resposta biológica aumenta (ou diminui) a uma taxa constante ao longo da faixa de doses testadas (Fig. 10A) (Vandenberg; Blumberg, 2018).

No entanto, respostas biológicas estritamente lineares são raras na natureza, o mais comum, como aponta Vandenberg; Blumberg, (2018) são curvas logarítmicas (sigmóides) e dentro das curvas, há um trecho linear (Fig. 10B).

Todavia, a hipótese levantada na kombucha tradicional em sua concentração de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  é o que se vê na figura 10C, um formato de U, onde uma faixa de concentração apresentará resultados divergentes as outras duas concentrações de extremidade, nas quais apresentam valores iguais ou próximos ao controle.

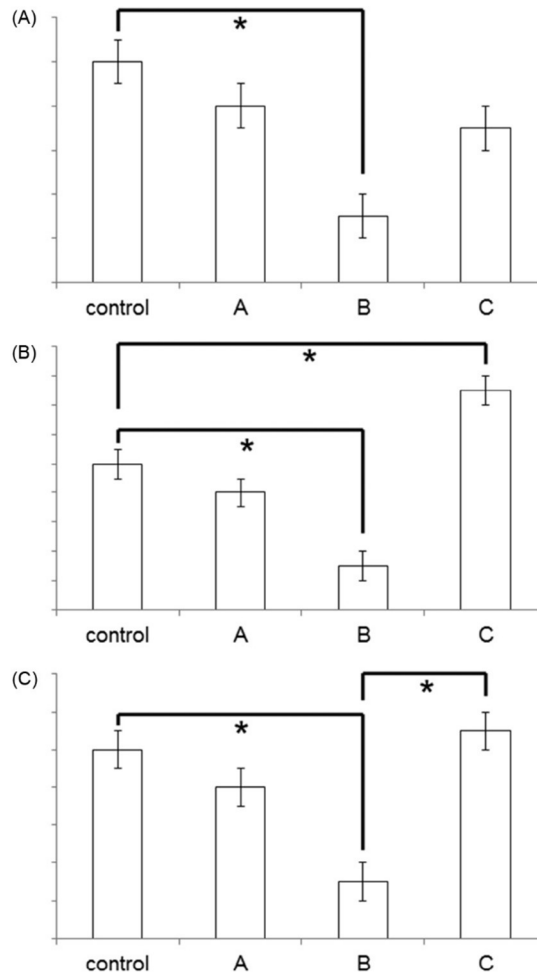
Figura 10 – Exemplos de diferentes curvas de dose-resposta.



Fonte: Vandenberg; Blumberg, (2018). (A) Uma relação linear entre dose e efeito. (B) Uma curva dose–resposta sigmoide. Observe a presença da fase linear indicada. (C) Uma resposta à dose não monotônica. Este exemplo também poderia ser descrito como “bifásico” ou em forma de U. (D) Uma curva dose–resposta multifásica. [Traduzido pelo autor]

Se observamos também alguns exemplos de tabelas, nos quais os dados apresentaram toxicidade com um comportamento não monotônico, vemos que na figura 11A, há uma estrita semelhança com o Gráfico 1 de taxa de sobrevivência da kombucha tradicional

Figura 11 – Exemplos de tabelas de dados de não monotonicidade.



Fonte: Vandenberg; Blumberg, (2018). (A) uma dose baixa ou moderada é significativamente diferente do controle, mas uma dose alta não é. (B) Uma dose baixa ou moderada é significativamente diferente do controle, e doses mais altas também são significativamente diferentes do controle, mas devido a uma resposta na direção oposta. (C) Uma dose baixa ou moderada é significativamente diferente do controle e uma dose mais alta também é significativamente diferente da dose baixa, com uma resposta na direção oposta. [Traduzido pelo autor]

O presente padrão observado pode ser interpretado à luz do arcabouço proposto pela *European Food Safety Authority* (EFSA) (Beausoleil et al., 2016), que estabelece seis pontos para a caracterização de respostas dose–resposta não monotônicas: a) evidência estatística de efeito dependente da dose; b) consistência interna entre réplicas; c) plausibilidade biológica do fenômeno; d) exclusão razoável de artefatos experimentais; e) coerência com outros desfechos ou com a literatura disponível; e f) relevância toxicológica do efeito observado.

Apoiando-se estritamente nesses critérios expostos, os resultados obtidos neste

estudo são compatíveis com uma dose-resposta não monotônica (DRNM). Porém, para a EFSA, uma resposta não monotônica recomenda um maior número de doses da amostra (>5) esse piso de doses por amostra filtrou muitos casos, ora apontados como DRMN, como foi possível observar em Van der Most; Rietjens; Van den Brink, (2024) em sua revisão sobre não monototoxicidade da dose resposta e Varret et al., (2018), que chegou a reduzir para 10, um total de 179 conjuntos de dados sobre DRNM.

Ainda que os resultados sobre a kombucha tradicional em  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  tenham sido diferentes de todas as demais concentrações e amostras, os demais parâmetros verificados (eclosão, deformação, comprimento e morfologia) sustentam a não toxicidade dessa concentração.

#### 4.2 Kombucha saborizada com caju

Sobre a kombucha saborizada de caju, os resultados obtidos no ensaio FET indicam que essa não induziu efeitos tóxicos em embriões de *D. rerio*, considerando pontos apresentados nos gráficos 5, 6, 7 e 8 e na figura 7, sobrevivência, desenvolvimento e morfologia, respectivamente.

Esses achados sugerem que a incorporação de resíduos agroindustriais, aliada ao processo fermentativo, não comprometeu a segurança biológica do produto nas condições avaliadas. Os resultados são similares ao que foi visto por Asmawati et al., (2021) que comprovou que a ingestão subaguda (28 dias) do suco do caju não provocou efeitos tóxicos e reduziu teores de colesterol em ratos.

Também em ratos, Da Silva et al., (2020) estudou a segurança do consumo oral de um extrato enriquecido com carotenoides e ácidos anacárdicos a partir de resíduos de caju, nos quais não houve em 30 dias a indução de efeitos tóxicos ou mutagênicos.

Miguel et al., (2025) também mostrou, por meio do FET, que é seguro o consumo o suco de caju processado por plasma-frio, bem como observou que essa matriz alimentar se mantém segura para o consumo quando submetida a outros processamentos (ultrassom) e testada em outros modelos *in vivo*, como da *Artemia salina* (Miguel et al., 2023). Ambos os trabalhos reforçam o uso dessa matriz alimentar em diferentes campos de aplicação tecnológica.

Sousa et al., (2021) analisou a atividade antimicrobiana e a toxicidade de um extrato de caju feito de fibras residuais por meio do FET e, como esse trabalho de conclusão de curso, comprovou não haver toxicidade dessa matriz alimentar em *D. rerio*. Esses resultados são reforçados por Aslam et al., (2024) afirmando que aplicações de resíduos traz benefícios

antioxidantes, antimicrobianos e anticolesterol.

### 4.3 Kombucha saborizada com manga

Quanto à kombucha saborizada de manga, assim como a kombucha saborizada de caju, os resultados de todos os parâmetros abordados apontam para a ausência de toxicidade dessa kombucha em embriões de *D. rerio*, o que reforça a possibilidade de consumo.

Esses resultados complementam a pesquisa de Azara et al., (2025) cujo utilização de farinha de casca de manga resultou em aumento significativo de compostos fenólicos e atividade antioxidante, sem indícios de toxicidade microbiológica. Láscaris et al., (2020) também utilizou farinha para mostrar que houve atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Enteritidis* demonstrando que essas farinhas podem ser utilizadas como fonte de enriquecimento e os seus extratos podem ser utilizados como conservante de modo a aumentar a vida útil dos alimentos.

Já Aziz et al., (2023), mostrou também que a infusão de polpa de manga em diferentes matrizes de chá mantém padrões físico-químicos adequados, reforçando a viabilidade tecnológica e nutricional do produto. Esses resultados sustentam a caracterização da bebida como funcional e apta para consumo humano, sem riscos associados à toxicidade.

Pesquisas demonstram a viabilidade do uso de resíduos de manga na produção de novos alimentos funcionais. O aumento de compostos bioativos aliado à ausência de toxicidade confirma a aplicabilidade industrial e nutricional da kombucha de manga. Esses resultados corroboram a análise FET, validando sua segurança e benefícios à saúde.

### 4.4 Kombucha saborizada com uva

A última kombucha analisada foi a saborizada de uva, no qual não houve divergência de resultados das outras kombuchas saborizadas, indicando a não toxicidade para embriões de *D. rerio*.

Em paralelo ao que já foi visto nas demais matrizes alimentares abordadas nesse trabalho, há também um paralelo entre os resultados obtidos com pesquisas envolvendo kombucha de uva, como Barakat et al., (2024) que elaborou uma kombucha a partir do bagaço da uva, oriunda da indústria de vinhos, cujo o potencial antioxidante aumento em 100%, bem como aumentos de 50 a 75% nas atividades anti-inflamatórias e antidiabéticas.

Em Ayed; Ben Abid; Hamdi, (2017), produziu-se uma kombucha de uva vermelha

demonstrou atividade antibacteriana contra todas as bactérias testadas, muito provavelmente ao aumento da produção de ácido acético, mas também à biossíntese de outros metabólitos durante o processo de fermentação, tendo ainda a bebida fermentada de 6 dias uma alta aceitação do consumidor.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados sobre a kombucha tradicional mostraram que em suas concentrações não apresentaram claros indícios de toxicidade para *D. rerio*, seja pela mortalidade apresentada, seja pelos demais fatores como eclosão, ou seja, desenvolvimento, deformações, medições corpóreas e análise morfológica que em todos esses parâmetros, o que confirme sua viabilidade de uso e comercialização.

Sobre kombucha tradicional em  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , medições e análises morfológicas (deformações, comprimento de corpo e saco vitelino) indicam uma semelhança entre o controle negativo e essa amostra, que faz deduzir uma provável ausência de toxicidade. Sendo válida também uma investigação acerca efeito dose resposta.

As demais kombuchas saborizadas, caju, manga e uva, tiveram em todos os seus parâmetros semelhança com o controle negativo, fortalecendo a tese de que não há toxicidade dessas amostras, nas concentrações testada, para *D. rerio*. Tais resultados mostram a segurança alimentar dessa bebida e viabilidade para uma futura comercialização desse produto, o que ressignificaria a destinação dos resíduos dessas matrizes.

## REFERÊNCIAS

ALBAAYIT, Shaymaa Fadhel Abbas *et al.* Mango Waste (Peel and Kernel) Enhances Food Dietary Fiber and Antint. **J. Glob. Innov. Agric. Sci.**, v. 12, n. 4, p. 1043– 049, 17 nov. 2024.

ASLAM, Nabila *et al.* Exploring the potential of cashew waste for food and health applications- A review. **Future Foods**. Elsevier B.V., 1 jun. 2024.

ASMAWATI, Asmawati *et al.* The potential of Cashew Apple Juice as anti hypercholesterol agent on whistar rats (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769). *In: EDP Sciences*, 5 jan. 2021.

AYED, Lamia; BEN ABID, Salwa; HAMDI, Moktar. Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 111–121, 2017.

AZARA, Cíntia Ramos Pereira *et al.* Physicochemical, microbiology, and sensory characteristics of kombucha prepared with Tommy mango peel flour. **Food Science and Technology International**, p. 10820132251319930, 18 fev. 2025.

AZIZ, Nurus S. A. *et al.* Development of Kombucha Tea with Gac and Mango Fruits: Sensory, Nutritional, Phytochemical, Physicochemical and Antioxidant Evaluation. **Tropical Journal of Natural Product Research**, v. 7, n. 5, 2023.

BARAKAT, Nathalie *et al.* Development of a New Kombucha from Grape Pomace: The Impact of Fermentation Conditions on Composition and Biological Activities. **Beverages**, v. 10, n. 2, 2024.

BAROI, Anda Maria *et al.* Grape Waste Materials—An Attractive Source for Developing Nanomaterials with Versatile Applications. **Nanomaterials**, v. 13, n. 5, 2023.

BARROSO, Tiago Linhares Cruz Tabosa *et al.* Bioenergy and bioproducts from cashew apple bagasse: a scientometric overview and strategies for sustainable utilization. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 19, n. 2, p. 540–569, 1 mar. 2025.

BEAUSOLEIL, C. *et al.* Review of non-monotonic dose-responses of substances for human risk assessment. **EFSA Supporting Publications**, v. 13, n. 5, 7 mar. 2016.

BEDELL, Victoria M. *et al.* Zebrafishology, study design guidelines for rigorous and reproducible data using zebrafish. **Communications Biology** Nature Research, , 1 dez. 2025.

BIASOTO, Aline Camarão Telles *et al.* Dynamics of the loss and emergence of volatile compounds during the concentration of cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) and the impact on juice sensory quality. **Food Research International**, v. 69, p. 224–234, 2015.

BRASIL. Instrução Normativa n. 41, de 17 de setembro de 2019. **Diário Oficial da**

União Brasília, DF, 17 set. 2019. Disponível em:

<<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=18/09/2019&jornal=515&pa>>. Acesso em: 31 dez. 2025

BRAUNBECK, Thomas *et al.* Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species - An update. **ALTEX**, v. 22, p. 87–102, 1 fev. 2005.

CARNAVAL, Luana de S. C.; JAISWAL, Amit K.; JAISWAL, Swarna. Agro-Food Waste Valorization for Sustainable Bio-Based Packaging. *Journal of Composites Science Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*, 1 fev. 2024. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2504-477X/8/2/41>>. Acesso em: 29 dez. 2025

CAVICCHIA, Luis Otávio Aguiar; ALMEIDA, Martha Elisa Ferreira de. Riscos, toxicidade e contaminação da bebida Kombucha: uma perspectiva sobre sua produção, armazenamento e consumo. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 31, n. 00, p. e024005, 2024.

DA SILVA, Gisele Goulart *et al.* Yellow-colored extract from cashew byproduct – Nonclinical safety assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 115, p. 104699, 2020.

DUBEY, Anubhav; GHOSH, Niladry S.; SINGH, Ranjit. Zebrafish as An Emerging Model: An Important Testing Platform for Biomedical Science. **Journal of Pharmaceutical Negative Results**, v. 13, n. 3, p. 1–7, 2022.

FILHO, Rodolfo José Vieira; QUEIROZ, Stefânia Aparecida Belute; LIMA, Lucas Mateus. A utilização de resíduos da uva no desenvolvimento de novos produtos, no contexto da economia circular. **Revista da Iniciação Científica da Libertas**, v. 12, 25 jul. 2024.

FONTELES, Thatyane Vidal *et al.* Metabolic responses of kombucha consortium fermentation upon ultrasound-processing. **Food Chemistry Advances**, v. 4, p. 100646, 2024.

GAUTAM, Krishna *et al.* Production of biopolymers from food waste: Constrains and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 361, p. 127650, 2022.

GONÇALVES DE MOURA, Isabel *et al.* 7 - Bioplastics from agro-wastes for food packaging applications. *In: GRUMEZESCU, Alexandru Mihai (Org.). Food Packaging. [S.l.]: Academic Press, 2017. p. 223–263.*

JAYABALAN, Rasu *et al.* A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33412713/>>. Acesso em: 20 set. 2025

KAPP, Julie M.; SUMNER, Walton. Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. **Annals of Epidemiology**, v. 30, p. 66–70, 1 fev. 2019.

- LÁSCARIS, Matheus Pércles Silva *et al.* Extração, caracterização, atividade antioxidante e antimicrobiana de resíduos de manga (Tommy Atkins). **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e3519108696, 29 set. 2020.
- LAWRENCE, Christian. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, 14 set. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848607004012>>. Acesso em: 7 out. 2025
- LEITÃO, Marco Gabriel Silva; SILVA, Everton Cavalcante da; GONDIM, Delane Viana. Efeitos da administração sistêmica do kombucha fermentado em chá verde na periodontite experimental em ratos. **Brazilian Journal of Case Reports**, 14 jul. 2023. Disponível em: <[https://bjcasereports.com.br/index.php/bjcr/article/view/odontopet\\_10](https://bjcasereports.com.br/index.php/bjcr/article/view/odontopet_10)>. Acesso em: 26 dez. 2025
- LINHARES, Maria de Fátima Dantas. **Kombucha saborizada com extratos de resíduos agroindustriais**: influência do açúcar na fermentação e na microbiota intestinal. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará: Fortaleza, 3 dez. 2024.
- MEDEIROS, Stéphaney Christine Guimarães; CECHINEL-ZANCHETTI, Camile Cecconi. Kombucha: In vitro and in vivo effects. **Infarma - Pharmaceutical Sciences**, v. 31, n. 2, p. 73–79, 2019.
- MIGUEL, Thaiz Batista Azevedo Rangel *et al.* Toxic effect of plasma and ultrasound activated cashew apple juice in *Artemia salina* nauplii. **Food Bioscience**, v. 53, p. 102590, 2023.
- MIGUEL, Thaiz Batista Azevedo Rangel *et al.* Evaluating the Toxicity of Cold Plasma-Treated Cashew Apple Juice. **ACS Food Science and Technology**, v. 5, n. 10, p. 3716–3725, 17 out. 2025.
- NOGUEIRA, Jean Carlos Costa *et al.* Toxicity and Antioxidant Activity of Black Tea Kombucha in Wistar Rats: A 28-Day Repeated Dose Oral Study. **Chemistry & Biodiversity**, v. 22, n. 9, p. e202500046, 1 set. 2025.
- NYHAN, Laura M. *et al.* Advances in Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Applied Microbiology Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)**, 1 mar. 2022.
- OECD. Teste No 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. *In*: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris: **OECD Publishing**, 2025.
- ONU. **ONU**: Fome diminui, mas ainda atinge 673 milhões de pessoas em todo o mundo. Disponível em: <<https://brasil.un.org/pt-br/298770-onu-fome-diminui-mas-ainda-atinge-673-milh%C3%B5es-de-pessoas-em-todo-o-mundo>>. Acesso em: 30 dez. 2025.
- SANNAPANENI, Shilpa *et al.* Kombucha-Induced Massive Hepatic Necrosis: A Case

Report and a Review of Literature. **Gastro Hep Advances American Gastroenterological Association**, 1 jan. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39132615/>>. Acesso em: 26 dez. 2025

SANT, Karilyn E.; TIMME-LARAGY, Alicia R. Zebrafish as a Model for Toxicological Perturbation of Yolk and Nutrition in the Early Embryo. **Current Environmental Health Reports**, v. 5, n. 1, p. 125–133, 2018.

SOARES, Marcelo Gomes; DE LIMA, Marieli; REOLON SCHMIDT, Vivian Consuelo. Technological aspects of kombucha, its applications and the symbiotic culture (SCOBY), and extraction of compounds of interest: A literature review. **Trends in Food Science and Technology** Elsevier Ltd, 1 abr. 2021.

SOUSA, Jessica Maria Silva *et al.* Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from a by-product of juice processing: assessment of its toxicity, antiproliferative and antimicrobial activities. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 2, p. 764–776, 2021.

VAN DER MOST, Merel A.; RIETJENS, Ivonne M. C. M.; VAN DEN BRINK, Nico W. Evaluating non-monotonic dose-response relationships in ecotoxicological risk assessment: A case study based on a systematic review of data on fluoxetine. **Chemosphere**, v. 363, p. 142819, 2024.

VANDENBERG, L. N.; BLUMBERG, B. Alternative Approaches to Dose–Response Modeling of Toxicological Endpoints for Risk Assessment: Nonmonotonic Dose Responses for Endocrine Disruptors. *In*: MCQUEEN, C. A. (Org.). **Comprehensive Toxicology**. 3o ed. Oxford: Elsevier Ltd., 2018. v. 1 p. 39.

VARRET, C. *et al.* Evaluating the evidence for non-monotonic dose-response relationships: A systematic literature review and (re-)analysis of in vivo toxicity data in the area of food safety. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 339, p. 10–23, 2018.

VIEIRA, Leonardo R. *et al.* Proteomics analysis of zebrafish larvae exposed to 3,4-dichloroaniline using the fish embryo acute toxicity test. **Environmental Toxicology**, v. 35, n. 8, p. 849–860, 1 ago. 2020.