

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO KOMBUCHA TEA FRENTE A *Sporothrix* spp.

TÁBATA PEREIRA DIAS¹; ANNA LUIZA SILVA²; STEFANIE BRESSAN WALLER³; MÁRCIA KUTSCHER RIPOLL⁴; ANGELITA DOS REIS GOMES⁵; MÁRIO CARLOS ARAÚJO MEIRELES⁶

¹Universidade Federal de Pelotas - tabata_pd@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas - annavet@live.com

³Universidade Federal de Pelotas - waller.stefanie@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas - marciaripoll@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas - angelitagomes@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas - meireles@ufpel.tche.br

1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose de implantação de caráter zoonótico causada por fungos do Complexo *Sporothrix schenckii*, (MARIMON et al., 2008) que compreende as espécies *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. luriei*, *S. pallida*, *S. chilensis* e *S. albicans*. A doença é endêmica na região sul do Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro, com maior prevalência da espécie *S. brasiliensis* (SCHUBACH et al., 2008; MADRID et al., 2012).

O itraconazol é o tratamento de eleição contra esporotricose humana e animal (MADRID et al., 2010; PEREIRA et al., 2010), no entanto, são crescentes os relatos de isolados resistentes e falhas terapêuticas devido ao uso indiscriminado de antifúngicos (MARIMON et al., 2008; STOPIGLIA et al., 2013). Além disso, o tratamento contra esporotricose representa um desafio pelo limitado número de antifúngicos disponíveis, além dos efeitos adversos, tempo prolongado de tratamento e alto custo da medicação.

Diante deste contexto, têm-se direcionado esforços para encontrar substâncias antifúngicas com alternativas naturais, que apresentem menores efeitos colaterais e menor custo. O Kombucha Tea surge como uma opção, apresentando ação antibacteriana e antifúngica descrita por diversos autores (SANTOS et al., 2009; CETOJEVIC-SIMIN et al., 2008). É uma bebida fermentada com os chás verde ou preto, composta por uma simbiose entre leveduras e bactérias ácido lácticas (DUFRESNE et al., 2000). O substrato inicial e o tempo de fermentação estão relacionados diretamente na composição metabólica final do Kombucha Tea (CHEN et al., 2000). E dentre os principais componentes da bebida estão polifenóis (flavanóides), ácido glicurônico, ácido láctico, ácido glucônico e antibióticos (CETOJEVI-SIMIN et al., 2008), sendo o ácido acético o maior constituinte químico (GREENWALT et al., 1998).

A ação antifúngica do Kombucha Tea já foi reportada contra *Malassezia* spp. (MAHMOUDI et al., 2016), *Trichophyton mentagrophytes* (RAHAYU, et al., 2009), *Microsporum gypseum*, *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. (YUNIARTO et al., 2016), não sendo encontrada na literatura nenhuma referência frente *Sporothrix* spp. Diante disto, o objetivo do presente trabalho foi verificar a ação anti-*Sporothrix* spp. do Kombucha Tea fermentado com chá preto.

2. METODOLOGIA

A infusão de chá preto foi preparada com adição de sete gramas de chá e 120 gramas de açúcar em dois litros de água fervente durante 15 min, após resfriamento, o scoby do Kombucha Tea foi adicionado ao chá, permanecendo a temperatura ambiente (25°C) durante 90 dias para fermentação. No dia do

experimento, parte do produto foi centrifugado a 4.000 rpm por 15 min e filtrado em membrana millipore 0,22µm (KCPF) e parte foi autoclavada (KCPA).

Oito isolados de *Sporothrix* spp. (três *S. brasiliensis*, dois *S. chilensis*, dois *S. globosa* e um *S. pallida*) foram utilizados. O teste de suscetibilidade antifúngica foi realizado com microdiluição em caldo, adaptado do protocolo M38-A (CLSI, 2002). Foram testadas seis concentrações para ambos produtos a partir da concentração inicial apresentada por eles, sendo de 902 mg/ml para KCPF e 894,2 mg/ml para KCPA. Como controle negativo foi utilizado itraconazol nas concentrações de 16 a 0,03 µg/ml. Todos os testes foram realizados em triplicata, e as microplacas foram incubadas a 35°C por 48 horas para leitura da concentração inibitória mínima (CIM).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que 87,5% (7/8) dos isolados foram sensíveis ao produto KCPF e 87,5% (7/8) foram sensíveis ao produto que foi autoclavado (KCPA) (Tabela 1). As amostras do produto passaram por tratamento térmico com intuito de testar a termoestabilidade dos componentes ativos e assim verificar a natureza proteica dos metabólitos. Demonstrando com os resultados encontrados que a substância com ação antifúngica provavelmente não seja de origem proteica, uma vez que as CIMs requeridas foram menores no produto autoclavado comparado ao produto filtrado. Podendo indicar também que com a desnaturação de alguns compostos houve o aumento da concentração de substâncias com potencial antifúngico contra *Sporothrix* spp., facilitando o contato com o agente.

Tabela 1: Concentrações Inibitória Mínima

Isolado	KCPA	KCPF	Itraconazol
S. brasiliensis (ATCC 201681)	223,55 mg/ml	225,5 mg/ml	0,5 µg/ml
S. brasiliensis (S72 MV 1173)	27,94 mg/ml	112,7 mg/ml	*
S. brasiliensis (S73 MV 1192)	27,94 mg/ml	225,5 mg/ml	16 µg/ml
S. chilensis (SS469)	223,55 mg/ml	>902,2 mg/ml	*
S. chilensis (SS470)	223,55 mg/ml	225,5 mg/ml	0,25 µg/ml
S. globosa (SS180)	27,94 mg/ml	112,7 mg/ml	≥16 µg/ml
S. globosa (4900941 HCPA)	>894,2 mg/ml	28,19 mg/ml	1 µg/ml
S. pallida (SS184)	447,1 mg/ml	451,1 mg/ml	2 µg/ml

*Não realizado

Yuniarto et al. (2016) testaram a atividade antifúngica do Kombucha Tea com 6, 12 e 18 dias de fermentação frente a *M. gypseum*, *C. albicans* e *A. flavus* utilizando a técnica de disco difusão, e encontraram halos de inibição promissores. Segundo o estudo, destes autores, o aumento do tempo de fermentação diminuiu a ação antifúngica, uma vez que os halos tiveram maior diâmetro quando testado o produto com 6 dias de fermentação. Resultado que vai de encontro ao presente estudo, onde foi utilizado o produto com 90 dias de fermentação e ainda assim verificou-se ação anti-*Sporothrix*, demonstrando que mesmo havendo um possível decréscimo de concentração de moléculas com potencial antifúngico essas são suficientes para inibir esse agente, ou que se trata de diferentes moléculas com espectro de ação específicos.

Quanto ao teste realizado com o itraconazol pode-se verificar que dois isolados de duas espécies diferentes (*S. globosa* e *S. brasiliensis*) mostraram-se resistentes ao itraconazol, requerindo concentrações que variaram de 16 a ≥16µg/ml, mas foram os isolados inibidos com as menores concentrações do



Kombucha Tea, principalmente tratando-se do produto autoclavado. Apenas um isolado de *S. chilensis* (SS469) não foi sensível as concentrações testadas do produto filtrado (>902,2 mg/mL) porém, mostrou-se sensível ao produto autoclavado na concentração de 223,55 mg/mL. A cepa de *S. globosa* (4900941 HCPA) foi sensível ao KCPF, mas não apresentou sensibilidade ao KCPA (>894,2 mg/ml) nas concentrações testadas, para esta espécie a ação antifúngica pode estar relacionada a uma substância que quando submetida ao tratamento térmico perdeu eficácia, diferente do observado nos outros isolados.

4. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram que após 90 dias de fermentação, o Kombucha Tea apresenta potencial anti-*Sporothrix* spp. frente a 87,5% (7/8) dos isolados testados utilizando o KCPF e o KCPA, inibindo o crescimento de espécies que se mostraram resistentes ao fármaco de eleição para tratamento da esporotricose.

Não há relatos na literatura referente à sensibilidade do *Sporothrix* spp. frente ao Kombucha Tea, sendo assim, os resultados encontrados são promissores para novos estudos que visem caracterizar o componente ativo com ação frente a esse agente, bem como estabelecer o tempo de fermentação suficiente para produzir o composto em concentrações adequadas para apresentar ação antifúngica visando facilitar sua obtenção.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATTIKH, H., CHAIEB, K., BAKHROUF, A., & AMMAR, E. Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 231-236, 2013.

CETOJEVIC-SIMIN, D. D. BOGDANOVIC, G. M., CVETKOVIC, D. D., & VELICANSKI, A. S. . Antiproliferative and antimicrobial activity of traditional Kombucha and Satureja montana L. Kombucha. **Journal of BU ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 13, n. 3, p. 395-401, 2008.

CHEN, C., LIU, B. Y. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 5, p.834–839, 2000.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing for Filamentous Fungi. M38-A Guideline. Wayne, Pennsylvania, USA, 2002.

DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. Tea, Kombucha, and health: a review. **Food research international**, v. 33, n. 6, p. 409-421, 2000.

GREENWALT, C. J.; LEDFORD, R. A.; STEINKRAUS, K. H. Determination and Characterization of the Antimicrobial Activity of the Fermented Tea Kombucha. **LWT-Food Science and Technology**, v. 31, n. 3, p. 291-296, 1998.

MADRID, I. M. MATTEI, A., MARTINS, A., NOBRE, M., & MEIRELES, M. Feline sporotrichosis in the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil: clinical,



zoonotic and therapeutic aspects. **Zoonoses and public health**, v. 57, n. 2, p. 151-154, 2010.

MADRID, I.M., MATTEI, A.S., FERNANDES, C.G., NOBRE, M.O. & MEIRELES, M.C.A. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in southern Brazil. **Mycopathologia**, v.173, n.4, p. 265–273, 2012.

MARIMON, R., SERENA, C., GENE, J., CANO, J. & GUARRO, J. In vitro antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix schenckii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 732–734, 2008.

MAHMOUDI, E. SAEIDI, M., MARASHI, M. A., MOAFI, A., MAHMOUDI, V., & ZEINOLABEDINI. Z. M. In vitro activity of kombucha tea ethyl acetate fraction against *Malassezia* species isolated from seborrhoeic dermatitis. **Current Medical Mycology**, v. 2, n. 4, p. 30-36, 2016.

PEREIRA, A.S., PASSOS, S.R.L., SILVA, J.N., GREMIÃO, I.D., FIGUEIREDO, F.B., TEIXEIRA, J.L., MONTEIRO, P.C. & SCHUBACH, T.M. Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. **The Veterinary Record**, v. 166, n. 10, p. 290-294, 2010.

RAHAYU, T. RAHAYU, T. Uji antijamur kombucha coffee terhadap *Candida albicans* dan *Tricophyton mentagrophytes*. **Journal Penelition Sains e Teknologi**, v. 10, n. 1, 10-17, 2009.

SCHUBACH, A., BARROS, M.B. & WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. **Current opinion in infectious diseases**, LOCAL DA EDIÇÃO, v. 21, n. 2, p. 129-133, 2008.

SANTOS, Jr. R. J. BATISTA, R. A. RODRIGUES, F. S. A. Antimicrobial activity of broth fermented with kombucha colonies. **Microbial Biochem Technol**, v. 1, p. 072-078, 2009.

STOPIGLIA, C.D.O., MAGAGNIN, C.M., CASTRILLÓN, M.R., MENDES, S.D.C., HEIDRICH, D., VALENTE, P. & SCROFERNEKER, M.L. Antifungal susceptibility and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. **Medical mycology**, v. 52, n. 1, p. 56-64, 2013.

YUNIARTO, A. ANGGADIREDDA, K. AQIDAH, R. A. N. Antifungal activity of kombucha tea against human pathogenic fungi. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 9, n. 5, p. 253-255, 2016.

AGRADECIMENTOS: CNPq, CAPES, FAPERGS, MICVET, Maria Lucia Scroferneker.