



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da
Saúde

NATALIA SERON BRIZZOTTI MAZUCHI

KOMBUCHA: um estudo exploratório do
perfil químico e das propriedades
antifúngicas.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de São José do Rio preto para obtenção do
Título de Doutor no Curso de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde.

Eixo Temático: Medicina e Ciências
correlatas

São José do Rio Preto

2023

NATALIA SERON BRIZZOTTI MAZUCHI

KOMBUCHA: um estudo exploratório do perfil químico e das propriedades antifúngicas.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio preto para obtenção do Título de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Eixo Temático: Medicina e Ciências correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Margarete Teresa
Gottardo de Almeida

São José do Rio Preto
2023

Mazuchi, Natalia Seron Brizzotti

Kombucha: um estudo exploratório do perfil químico e das propriedades antifúngicas / Natalia Seron Brizzotti Mazuchi
São José do Rio Preto, 2023
88 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do
Rio Preto – Famerp
Eixo temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida

1. Kombucha; 2. Atividade antifúngica; 3. Dermatófitos; 4. Toxicidade.

NATALIA SERON BRIZZOTTI MAZUCHI

KOMBUCHA: um estudo exploratório do perfil químico e das propriedades antifúngicas.

BANCA EXAMINADORA
TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Margarete
Teresa Gottardo de Almeida

2º Examinador: Prof. Dr. João Paulo Zen Siqueira

3º Examinador: Profa. Dra. Mariela Domiciano Ribeiro
Marques

4º Examinador: Profa. Dra. Marcia Costa Nunes
Soares

5º Examinador: Profa. Dra. Maria Lucia Scroferneker

Suplentes: Profa. Dra. Elza Maria Castilho e Profa.
Dra. Catia Rezende

São José do Rio Preto, 03/04/2023.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
EPIÍGRAFE.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS GERAIS	5
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	6
3 MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1 OBTENÇÃO DO SCOBY DA KOMBUCHA.....	7
3.2 PREPARAÇÃO DOS CHÁS E MÉTODO DE CULTIVO DA KOMBUCHA.	8
3.3 FILTRAÇÃO EM SISTEMA MILLIPORE®	9
3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DA KOMBUCHA	10
3.5 ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS DA KOMBUCHA.....	11
3.6 TOXICIDADE DOS EXTRATOS DA KOMBUCHA.....	12
3.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS EXTRATOS DA KOMBUCHA	12
3.8 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DOS EXTRATOS DA KOMBUCHA E FLUCONAZOL	13
4 RESULTADOS	15

4.1 MASSA DO SCOBY E PH	15
4.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC) DOS EXTRATOS DA KOMBUCHA	16
4.3 TOXICIDADE EM <i>GALLERIA MELLONELLA</i>	18
4.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS DA KOMBUCHA	19
4.4.1 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS DE CHÁ PRETO, CHÁ BRANCO E CHÁ VERDE CONTRA <i>TRICHOPHYTON RUBRUM</i> E <i>T. MENTAGROPHYTES</i>	20
4.4.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO DE CHÁ PRETO CONTRA DERMATÓFITOS.....	21
4.5 INTERAÇÃO DO EXTRATO DE KOMBUCHA EM CHÁ PRETO COM FLUCONAZOL (<i>CHECKERBOARD</i>)	24
5 DISCUSSÃO	25
6 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
Apêndice A: Manuscrito submetido no periódico Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences.....	37
Apêndice B: Short Communication submetido no periódico Mycologia	60
ANEXOS	70

DEDICATÓRIA

Dedico,

À minha mãe Marilúcia, meu marido
Marcos e meu filho Kauê.

A força e o incentivo de vocês me
ajudaram a chegar até aqui e concretizar
meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar em meus sonhos e me dar forças para sempre seguir em frente na busca de meus objetivos.

À minha família por todo o apoio, em especial a minha mãe Marilúcia, minha alma gêmea, pela sua força e determinação em conseguir e conquistar tudo aquilo que deseja, me mostrando que nada na vida é impossível, desde que feito com o coração. Espelhar-me nela, me fez ser a mulher que sou hoje, forte, objetiva e determinada a conseguir realizar todos meus sonhos.

Ao meu marido Marcos, por toda sensibilidade diante das realizações dos meus sonhos, por dar sentido a minha vida e me fazer conhecer a pureza do amor na construção de uma família.

Ao meu filho Kauê, que me mostrou o que é o amor incondicional entre mãe e filho, que me dá forças para levantar todos os dias e lutar por um mundo melhor.

Aos meus avós, em especial a vó Zaira, que sempre me colocou em suas orações, pedindo a Deus e aos Anjos que iluminasse meus caminhos e guiasse meus passos na busca do conhecimento.

À Profa. Margarete Teresa Gottardo de Almeida pela orientação, por todo o conhecimento científico e pessoal que carregarei nessa e em outras vidas e pela amizade tão verdadeira. Nos momentos de desânimo, seus conselhos de mulher e amiga em conjunto com sua orientação espiritual trouxe conforto e sabedoria, se tornando uma fonte de inspiração na minha caminhada, me iluminado com a sua luz interior.

Aos queridos amigos do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto- FAMERP: em especial à Luceli Ferreira de Souza, pela disposição e por ser sempre tão prestativa no desenvolvimento deste e de todos os trabalhos no laboratório.

À Profa. Elza Maria Castilho e a Profa. Cleuzenir por ter me acolhido em seu laboratório, pela amizade, companheirismo, disposição e atenção durante todos esses anos e que certamente se eternizarão.

Ao Laboratório de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus São José do Rio Preto, representado pelo Prof. Dr. Luis Octávio Regasini e Profa. Dra. Julyanna Andrade Silva Nascentes por me ajudarem no processo de purificação dos extratos da Kombucha.

À Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, representada pela Profa. Dra. Márcia Regina von Zeska Kress e Mario Henrique Paziani pela realização dos testes de toxicidade.

Aos membros da comissão examinadora, por terem aceito o convite, dedicando-se nas correções deste estudo, agregando experiência e conhecimento.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização desta tese de Doutorado.

Meus Sinceros Agradecimentos!

EPÍGRAFE

“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”

Albert Einstein

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Microrganismos presentes no SCOBY	2
FIGURA 2. Lavagem do disco da Kombucha	8
FIGURA 3. Preparação dos chás da Kombucha.....	9
FIGURA 4. Filtração em Sistema MILLIPORE®	10
FIGURA 5. Extração líquido-a-líquido com acetato de etila	11
FIGURA 6. Esquema de montagem da placa de <i>checkerboard</i>	14
FIGURA 7. Perfis cromatográficos da Kombucha.....	17
FIGURA 8. Toxicidade <i>in vivo</i> dos extratos da Kombucha.....	19

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Massa do SCOBY	16
TABELA 2. Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) dos extrato da Kombucha, em diferentes tempos de fermentação, contra <i>T. mentagrophytes</i> e <i>T. rubrum</i>	21
TABELA 3. Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos da Kombucha em chá preto, contra fungos dermatófitos.....	23
TABELA 4. Efeito integrado do extrato de Kombucha em chá preto e fluconazol contra dermatófitos	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATCC: American Type Culture Collection

CIM: concentração inibitória mínima

CP: chá preto

CPP: chá preto puro

CP10: chá preto 10 dias

CP20: chá preto 20 dias

CP30: chá preto 30 dias

CB: chá branco

CBP: chá branco puro

CB10: chá branco 10 dias

CB20: chá branco 20 dias

CB30: chá branco 30 dias

CV: chá verde

CVP: chá verde puro

CV10: chá verde 10 dias

CV20: chá verde 20 dias

CV30: chá verde 30 dias

CCD: cromatografia em camada delgada

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

C18: coluna de octadecilsilano

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

°C: graus Celcius

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

ICIF: índice de concentração inibitória fracionada

MG: média geométrica

µL: microlitro

µg/mL: micrograma por mL

nm: nanômetro

SCOBY: cultura simbiótica de bactérias e leveduras

TTC: cloreto de trifetil tetrazólico

RESUMO

Introdução: A Kombucha é uma bebida que teve sua origem na Manchúria obtida pela fermentação do chá (*Camellia sinensis*) e do açúcar por uma “cultura simbiótica de bactérias e leveduras” (SCOBY). Esta bebida tem vários efeitos benéficos, incluindo atividade antimicrobiana. Devido à importância e prevalência das infecções fúngicas, cuja etiologia é variável quanto às espécies e aos perfis de suscetibilidade aos antifúngicos, a descoberta de novas moléculas antifúngicas é crucial. **Objetivo:** Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica dos extratos de Kombucha, contra agentes comuns de dermatofitoses bem como avaliar o efeito combinado ao fluconazol.

Material e Métodos: O Chá preto, verde e branco de *Camellia sinensis* foi preparado como base de desenvolvimento de 20 g de SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast) seguindo-se a incubação por 10, 20 ou 30 dias, considerando-se os tempos de fermentação do chá. Após, os chás foram filtrados através de um sistema de membranas. Os extratos foram obtidos por extração líquido-líquido com acetato de etila e secos em rotaevaporador. Os perfis cromatográficos foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e os testes de toxicidade foram conduzidos no modelo *Galleria mellonella*. A concentração inibitória mínima por microdiluição em caldo (CIM) dos extratos, foi determinada contra isolados clínicos e cepas padrões (ATCC) de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum canis*. A resposta antimicrobiana combinada entre extratos de Kombucha e o fluconazol foi investigada através dos ensaios de

checkerboard. **Resultados:** Os perfis cromatográficos demonstraram a presença de diferentes componentes, mas nenhuma correlação pôde ser feita com os valores de CIMs encontrados. O CB para todos os tempos de fermentação, apresentou toxicidade matando mais de 50% das larvas em cinco dias de incubação. Os ensaios com *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* demonstraram valores de CIM entre 62,5 a 2.000 µg/mL. O chá verde e preto de Kombucha apresentaram os melhores resultados de CIMs após fermentação de 10 dias. O extrato de Kombucha com chá preto, testado contra isolados clínicos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *E. floccosum* e *M. canis*, demonstrou valores de CIM entre 31,25 e 500 µg/mL. Houve ação sinérgica entre extrato de Kombucha em chá preto com fluconazol para os fungos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *E. floccosum*. No entanto, frente à espécie *M. canis*, a ação foi aditiva. **Conclusão:** Os extratos de Kombucha podem constituir uma alternativa viável para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para dermatofitoses, uma vez que a resposta antimicrobiana foi efetiva.

Palavras-chave: Kombucha; Atividade antifúngica; Dermatófitos; Toxicidade, Sinergismo.

ABSTRACT

Introduction: Kombucha is a drink that originated in Manchuria, obtained by fermenting tea (*Camellia sinensis*) and sugar by a “symbiotic culture of bacteria and yeast” (SCOBY). This drink has several beneficial effects, including antimicrobial activity. Due to the importance and prevalence of fungal infections, whose etiology is variable in species and susceptibility profiles to antifungals, the discovery of new antifungal molecules is crucial. **Objective:** This study aimed to evaluate the antifungal activity of Kombucha extracts against common dermatophytosis agents and the combined effect of fluconazole. **Material and Methods:** *Camellia sinensis* black, green and white tea was prepared as a base for developing 20 g of SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast) followed by incubation for 10, 20 or 30 days, considering the tea fermentation times. Afterward, the teas were filtered through a membrane system. The extracts were obtained by liquid-liquid extraction with ethyl acetate and dried in a rotary evaporator. The chromatographic profiles were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) and toxicity tests were conducted on the *Galleria mellonella* model. The broth microdilution minimum inhibitory concentration (MIC) of the extracts was determined against clinical isolates and standard strains (ATCC) of *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* and *Microsporum canis*. The combined antimicrobial response between Kombucha extracts and fluconazole was investigated using checkerboard assays. **Results:** The chromatographic profiles demonstrated the presence of different components, but no correlation could be made with the MIC values

found. The CB for all fermentation times showed toxicity killing more than 50% of the larvae in five days of incubation. Assays with *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* showed MIC values between 62.5 and 2,000 µg/mL. Green tea and Kombucha showed the best MIC results after 10-day fermentation. Kombucha extract with black tea, tested against clinical isolates *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *E. floccosum* and *M. canis*, showed MIC values between 31.25 and 500 µg/mL. There was a synergistic action between Kombucha extract in black tea and fluconazole for *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* and *E. floccosum* fungi. However, against the *M. canis* species, the action was additive.

Conclusion: Kombucha extracts may be a viable alternative for developing new treatment strategies for dermatophytosis since the antimicrobial response was adequate.

Keywords: Kombucha; Antifungal activity; Dermatophytes; Toxicity, Synergism.

1 INTRODUÇÃO

A bebida de Kombucha é obtida, originalmente, pela fermentação da *Camellia sinensis* (chá preto) adicionada ao açúcar. Acredita-se que sua origem tenha sido na China, por volta de 220 a.C., ganhando popularidade por suas propriedades desintoxicantes e energizantes.⁽¹⁾ O nome Kombucha é de origem japonesa e surgiu em 414 d.C. quando o médico Kombu tratou problemas digestivos do imperador japonês Inkyo. Com sabor levemente ácido, adocicado e carbonatado, a Kombucha é consumida mundialmente, podendo ser produzida em larga escala para uso comercial, ou em condições domésticas.^(2,3)

Dentre os efeitos benéficos da Kombucha, já comprovados *in vitro* ou *in vivo*, em modelos animais, estão: ação antimicrobiana, antioxidante e anticarcinogênica;⁽⁴⁾ tratamento e prevenção da diabetes;⁽⁵⁾ tratamento de úlceras gástricas;⁽⁶⁾ redução do colesterol;⁽⁷⁾ e efeitos imunopotenciadores.⁽⁸⁾ Ressalta-se que suas propriedades benéficas são melhores, comparadas às infusões (no Brasil, popularmente chamadas de chás) não fermentadas convencionais.⁽⁹⁾

A fermentação da Kombucha se dá por uma cultura iniciadora composta por bactérias acéticas e leveduras osmofílicas chamadas SCOBY (*Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast*). Sua composição é variável, dependente de fatores como a localização geográfica, o clima, a composição local de espécies de bactérias e leveduras e a origem do inóculo (Figura 1).^(1,10) Os organismos presentes são capazes de fermentar o chá açucarado e produzir uma complexa gama de moléculas. Dentre elas incluem açúcares; polifenóis (como as

catequinas); aminoácidos (como a lisina); elementos essenciais (como sódio, potássio, cálcio, cobre, ferro e zinco); vitaminas hidrossolúveis (como a C, B e B₂); enzimas hidrolíticas, dentre outros.⁽¹¹⁾ JAYABALAN et al (2014)⁽¹⁾ sugerem que o tempo de fermentação e a quantidade inicial de chá são os principais fatores que alteram a concentração dos componentes da bebida depois de pronta.

Main microorganisms of SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast).		
Bacteria	Yeast	
<i>Acetobacter</i> sp.	<i>Arxula</i>	<i>Lachancea thermotolerans</i>
<i>Acetobacter aceti</i>	<i>adeninivorans</i>	<i>Lachancea fermentati</i>
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	<i>Brettanomyces lambicus</i>	<i>Lachancea kluyveri</i>
<i>Acetobacter nitrogenifigens</i>	<i>Brettanomyces clausenii</i>	<i>Merimblaingelheimense</i>
<i>Acetobacter peroxydans</i>	<i>Brettanomyces custersii</i>	<i>Meyerozyma caribbica</i>
<i>Bacterium gluconicum</i>	<i>Candida kefyr</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Mycoderma</i> sp.
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Candida stellata</i>	<i>Mycotorula</i> sp.
<i>Enterobacter ludwigii</i>	<i>Candida stellimalicola</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Gluconacetobacter kombuchae</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Saccharomyces ludwigii</i>
<i>Gluconacetobacter europaeus</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>
<i>Gluconobacter saccharivorans</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>
<i>Gluconobacter oxydans</i>	<i>Dekkera anomala</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>Komagataeibacter xylinus</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Starmeracarmichaelia</i>
<i>Komagataeibacter rhaeticuse</i>	<i>Eremothecium ashbyii</i>	<i>Starmeracaribae</i>
<i>Komagataeibacter hansenii</i>	<i>Eremothecium cymbalariae</i>	<i>Pichia fermentans</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Halomonas</i> sp.	<i>Pichia mexicana</i>
<i>Oenococcus oeni</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Sporopachydermialactivor</i>
	<i>Hanseniaspora meyeri</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
	<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	<i>Torulopsis</i> sp.
	<i>Hanseniaspora vineae</i>	<i>Zygowillipsis californica</i>
	<i>Herbaspirillum</i> sp.	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
	<i>Kazachstania telluris</i>	
	<i>Kazachstania exigua</i>	
	<i>Kloeckera apiculata</i>	
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	

Adapted from: Chakravorty et al., 2016; Sinir et al., 2019; Coton et al., 2017.

Figura 1. Microrganismos presentes no SCOBY.

Apesar da Kombucha ser tradicionalmente preparada pela fermentação do chá preto, outros tipos de ervas podem ser usados na sua fabricação, dentre elas, as infusões de alecrim, hibisco, erva-doce, erva-cidreira, hortelã e os chás verde e branco (também provenientes da *Camellia sinensis*). A diferença entre os três tipos de chás produzidos pela *Camellia sinensis* é no processo de colheita e secagem da planta: o chá verde é produzido com as folhas da planta madura

que são colocadas sob vapor e depois secas, não sendo necessário processo de fermentação, possuindo ação antioxidante e grande quantidade de cafeína. O chá preto é obtido das folhas velhas na qual é realizada uma drenagem interna sem rotação, após um processo de rotação, fermentação e por último uma secagem fina que produz uma grande quantidade de cafeína. Já o chá branco é produzido a partir das folhas novas e brotos que são colhidos antes das flores se abrirem sendo realizada uma vaporização parcial e secagem ao ar na luz natural, como não passa por processo de fermentação o chá branco não tem ação antioxidante. Cada tipo de chá possui diferentes componentes que podem alterar a composição química da Kombucha e, conseqüentemente, suas propriedades.⁽¹²⁾

Apesar de toxicidade relativa à ingestão da bebida de Kombucha já ter sido levantada, na maioria dos casos, ela foi atribuída à produção sob condições inadequadas de higiene e esterilidade.⁽³⁾ No entanto, mais dados são necessários para avaliar se há contraindicações.

No panorama atual de Saúde Pública, com números crescentes de indivíduos susceptíveis a infecções, a atividade antimicrobiana da Kombucha merece maior apreciação. Há atividade antibacteriana comprovada sobre muitas espécies causadoras de infecções, como: *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.⁽¹³⁻¹⁵⁾

No contexto das infecções fúngicas, o fardo global gerado, vem aumentando, dado ao crescente número de indivíduos em risco. Alguns dados da literatura demonstraram que as bebidas de Kombucha podem exercer atividade antifúngica contra *Candida* spp. envolvidas em vários tipos de infecção,

como *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*.^(12,15) Acentuada atividade inibitória contra *Microsporum* spp. e *Malassezia* spp., dois gêneros comuns de micoses superficiais em humanos e animais domésticos foram demonstradas.⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ YUNIARTO et al (2016)⁽¹⁸⁾ também relatam ação da Kombucha sobre *Aspergillus flavus*, um fungo comum no ambiente, causador de infecções oportunistas, especialmente, em indivíduos imunocomprometidos. Nenhum relato foi encontrado sobre a ação da Kombucha sobre biofilmes. Estas comunidades microbianas, que se aderem a superfícies como cateteres, dentes, ou até mesmo tecidos celulares, dificultam a ação dos antimicrobianos convencionais, usados na prática clínica.

A maioria dos trabalhos avaliaram a atividade antimicrobiana da Kombucha pelo método de difusão em ágar. O método *gold standard* para avaliação da atividade de um composto, com ação antifúngica, é a microdiluição em caldo, que fornece dados qualitativos e quantitativos mais precisos e confiáveis.

A atividade antimicrobiana da Kombucha é resultado de componentes biologicamente ativos formados na fermentação e os efeitos positivos de diferentes chás, ou infusões, podem ser otimizados pela associação com a Kombucha.⁽¹²⁾ Isto evidencia a importância de se estudar variações da bebida de Kombucha e não somente o tradicional chá preto.

Portanto, os efeitos relacionados a bebida de Kombucha estão diretamente associados à composição química do chá ou infusão e a concentração do complexo de biomoléculas produzidas pelos microrganismos. Dada a dificuldade de entender a complexidade da atividade do SCOBY, que

envolve uma multiplicidade de bactérias, leveduras e a composição química variável dos chás ou infusões, novas pesquisas são necessárias para entender o comportamento destas interações, ampliando a gama de benefícios atribuídos a esta bebida.⁽²⁾

1.1 OBJETIVOS GERAIS

Dada a importância de promover novas alternativas que sejam eficientes e menos tóxica que os medicamentos disponíveis, melhorando o gerenciamento e prevenção de doenças fúngicas, o objetivo do presente estudo foi estabelecer a avaliação da atividade antifúngica dos extratos da Kombucha em células planctônicas e verificar a toxicidade nos diferentes chás.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Preparar a Kombucha com o chá preto, chá branco e chá verde;
2. Determinar o perfil químico dos chás preto, verde e branco puro e com fermentação da Kombucha;
3. Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos obtidos em cada chá em células planctônicas de isolados clínicos e de referência (ATCC) de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum canis*;
4. Avaliar, *in vitro*, a atividade integrada se sinérgica, antagônica, indiferente e aditiva dos extratos de cada chá da Kombucha com fluconazol;
5. Avaliar a toxicidade dos extratos da Kombucha obtidos da fermentação de cada chá.

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Atualmente, há uma dificuldade muito grande em desenvolver novas drogas antifúngicas e são cada vez mais frequentes os relatos de cepas resistentes aos poucos fármacos disponíveis. Este projeto teve o potencial de promover novas alternativas que sejam eficientes e menos tóxicas às drogas disponíveis, melhorando o gerenciamento e prevenção de doenças fúngicas.

Apesar da Kombucha ser amplamente difundida e de haver relatos de seus benefícios, falta aplicabilidade destes compostos e como eles podem ser usados de forma sistemática. A maioria dos estudos relacionados à Kombucha preconizam seu uso como bebida e não exploram o uso de seu extrato em outras aplicações, como este projeto estudou.

Em um projeto piloto, observou-se que a Kombucha feita a partir do hibisco possui atividade antifúngica contra *Trichophyton rubrum*, um importante causador de micoses superficiais. Dois tempos de fermentação foram testados, fator este que mostrou ter grande influência na atividade do extrato. Com 10 dias de fermentação, a CIM do extrato de Kombucha de hibisco contra o fungo em questão foi de 500 µg/ml. Com o tempo aumentado para 20 dias, a CIM foi de apenas 62,5 µg/ml.

Ao comparar as atividades de diferentes extratos de Kombucha frente a essa e outras espécies fúngicas, que comumente causam infecções, determinou-se qual é o melhor chá a ser utilizado como substrato para que haja máxima atividade antifúngica e maior produção de compostos, que possam ser utilizados com fins terapêuticos ou industriais, com possibilidade futura de gerar

novos sistemas de tratamento menos tóxicos e eficientes para o tratamento de infecções fúngicas, especialmente, das cepas multirresistentes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi dividido em duas etapas: na primeira etapa foi preparado os três tipos de chás: chá preto (CP), chá branco (CB) e o chá verde (CV) nos diferentes tempos de fermentação (10, 20 e 30 dias), com análise do perfil químico, toxicidade no modelo *Galleria mellonella* e teste de suscetibilidade antifúngica, com concentração inibitória mínima (CIM) contra *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*. Após a análise dos resultados obtidos, a segunda etapa foi executada com o melhor chá, identificando o melhor tempo de fermentação, seguindo-se com os testes de CIM frente aos fungos dermatofitos: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum canis* (cinco cepas clínicas de micoses superficiais e subcutânea e uma ATCC) (ANEXO 1). A avaliação da interação entre os extratos do chá da Kombucha e fluconazol (*checkerboard*) constituiu o ensaio de interesse visando trazer alternativas terapêuticas mais efetivas.

3.1 OBTENÇÃO DO SCOBY DA KOMBUCHA

O SCOBY de Kombucha foi doado pela Casa Amarela Produtos Naturais (São José do Rio Preto, SP, BRASIL). Ele foi mergulhado em 1 litro de água destilada estéril com 20g de sacarose (Synth, Diadema, SP, BRASIL), e a cada 7 dias, por 1 mês, esse procedimento foi repetido, com a finalidade de retirar os

resquícios dos componentes primários do meio onde foi produzido. Este SCOBY foi fragmentado e 20g foram colocados nos respectivos chás: preto – *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Amaya Chás®, Registro, SP, BRASIL); branco – *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Kampo de Ervas®, Ribeirão Preto, SP, BRASIL) e verde – *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Kampo de Ervas®, Ribeirão Preto, SP, BRASIL). Todos os chás foram incubados a 25°C, por 20 dias, para fermentação inicial, e foram utilizados para inocular novas fermentações (arranque) (Figura 2).

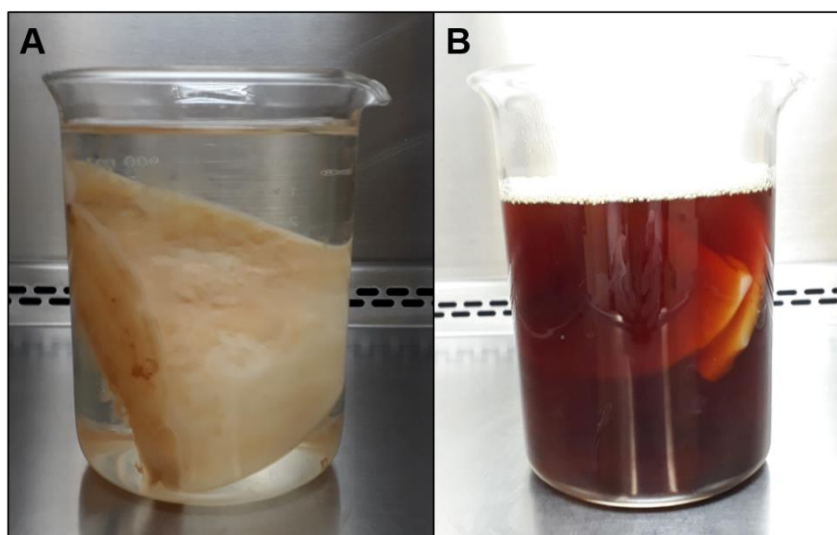


Figura 2. (a) Imagem da lavagem do disco de Kombucha. (b) Imagem do arranque que será utilizado para preparação dos chás do processo de fermentação da Kombucha.

Fonte: elaborada pela autora

3.2 PREPARAÇÃO DOS CHÁS E O MÉTODO DE CULTIVO DA KOMBUCHA

A preparação de cada chá e método de cultivo foi baseado no protocolo de Chen et al (2000) com modificações.⁽¹⁹⁾ Quatro gramas (4g) de chá preto (CP), chá branco (CB) e chá verde (CV) foram fervidos separadamente em 450mL de água mineral estéril, por 5 minutos, e coados em papel filtro estéril, em seguida,

o volume foi ajustado para 800mL, com água mineral estéril a temperatura ambiente. Este procedimento foi realizado em triplicata, para cada chá. Após a preparação do chá, foram adicionados em cada béquer: 80g de sacarose, 160mL de arranque e 20g do SCOBY do respectivo chá. A incubação foi realizada, em estufa, a 25°C. Para cada chá foram preparados 4 béqueres, três foram incubados nos seguintes tempos: 10 dias, 20 dias e 30 dias e o quarto béquer, chamado de chá puro, foi preparado nas mesmas condições, porém não foi colocado o SCOBY para fermentação (Figura 3). O chá puro após preparado já foi filtrado e, seguiu-se para as etapas de separação líquido-a-líquido e secagem em evaporador rotativo.



Figura 3. (a) Chá fervido com 80g de sacarose. (b) Arranque que foi adicionado 160mL à imagem A. (c) Chá preto com 160mL do arranque e 20g do SCOBY. (d) Incubação dos chás a 27°C pelo tempo de 10, 20 3 30 dias de fermentação.

Fonte: elaborada pela autora

3.3 FILTRAÇÃO EM SISTEMA MILLIPORE®

Após o término da incubação, o pH das fermentações foi medido com fita indicadora de pH (MColorpHast, Merck, DERMSTADT, ALEMANHA) e o SCOBY pesado para verificação da diferença da massa inicial e a massa final, seguindo-se para filtração no Sistema MILLIPORE®, com membrana Millipore de 0,2 μm (Figura 4).



Figura 4. Filtração do chá após o tempo de incubação (10, 20 e 30 dias) em Sistema MILLIPORE® com membrana Millipore de 0,2 μm .

Fonte: elaborada pela autora

3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DA KOMBUCHA

A obtenção dos extratos da Kombucha, seguiu a metodologia proposta por Mahmoudi et al (2016) com modificações.⁽¹⁷⁾ Os 800mL de cada chá de Kombucha filtrados foram submetidos à extração líquido-líquido, adicionando-se 96mL de acetato de etila (Synth, Diadema, SP, BRASIL), como contra-fase. O procedimento foi repetido duas vezes para cada chá, permitindo, assim, a

extração total dos metabólitos da Kombucha. A fase acetato de etila foi submetida a evaporador rotativo até secura total, para concentração do extrato purificado (Figura 5).

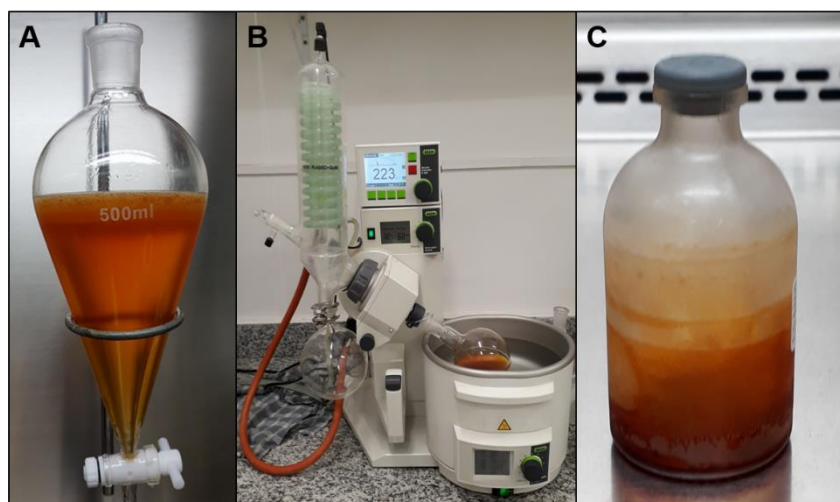


Figura 5. (a) Extração líquido-a-líquido com acetato de etila. (b) Fase acetato no evaporador rotativo para secura do extrato. (c) Extrato seco e pronto para uso.

Fonte: elaborada pela autora

3.5 ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS DA KOMBUCHA

A composição química qualitativa dos extratos da Kombucha foi analisada por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A CCD foi desenvolvida em cromatoplasmas de gel de sílica em diferentes fases móveis, compostas de misturas de hexano, acetato de etila e etanol. As cromatoplasmas foram reveladas por exposição a ultravioleta (256 e 365nm), bem como por anisaldeído sulfúrico. A CLAE utilizou como fase estacionária, coluna de octadecilsilano (C18) e fases móveis utilizando misturas de metanol/água ou acetonitrila/água. Para a detecção dos analitos, foi

empregado detector de arranjo de diodos, sendo as análises realizadas em comprimentos de onda (250 a 800nm).

3.6 TOXICIDADE DOS EXTRATOS DA KOMBUCHA

Para a avaliação da toxicidade dos extratos da Kombucha foram utilizados grupos de 10 larvas de *Galleria mellonella* (R.J. Mous Livebait, THE NETHERLANDS) de acordo com a metodologia descrita por Gottardo et al (2019),⁽²⁰⁾ As larvas foram separadas em placas de Petri, em estágio larvário, com peso entre 0,3 e 0,5g, incubadas a 37°C, isoladas de luz no dia anterior dos experimentos. Larvas com alterações de cor, com manchas escuras ou com melanização aparente, foram excluídas.

A partir da CIM obtida, as larvas foram colocadas em recipientes contendo os extratos isolados da Kombucha. Coloração marrom-escura e a falta de movimento, por toque, indicaram a morte larvária motivada pela toxicidade do extrato. O experimento foi conduzido em triplicata.

3.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS EXTRATOS DA KOMBUCHA

A atividade antifúngica dos extratos de cada chá da Kombucha foi investigada por método de microdiluição em caldo, segundo protocolo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008)⁽²¹⁾ para os fungos filamentosos.

A concentração inibitória mínima foi calculada através da fórmula abaixo, considerando a porcentagem de inibição de 80%. Na qual, **I** = porcentagem de

inibição; Abs.teste = absorbância do teste; Abs.EP = absorbância do extrato puro; Abs.C+ = absorbância do controle positivo.

$$I = 1 - \frac{(\text{Abs.teste} - \text{Abs.EP})}{(\text{Abs.C+})} \times 100$$

3.8 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DOS EXTRATOS DA KOMBUCHA E FLUCONAZOL

A avaliação da interação entre o extrato do chá da Kombucha e fluconazol (Sigma-Aldrich, DERMSTADT, ALEMANHA) foi através do ensaio de *checkerboard* baseado no protocolo (CLSI, 2012b),⁽²²⁾ com modificações, que forneceu as CIMs dos compostos isoladamente ou em associação, avaliando a evolução da CIM individual dos metabólitos, na presença do fluconazol, frente às cepas clínicas e ATCC de *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum canis*.

Para a preparação do inóculo dos dermatófitos, culturas em ágar Batata Dextrose (Sigma-Aldrich, DERMSTADT, ALEMANHA) com sete dias de crescimento, a 35°C, foram transferidas para uma solução salina a 0,85%, obtendo-se uma suspensão com transmitância em espectrofotômetro de 68% a 70%, em comprimento de onda de 490nm. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:50, em meio RPMI obtendo-se uma suspensão de $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/mL, que foi utilizada no ensaio.

Os poços das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 100µL de RPMI. Na última coluna (nº 12) foi adicionado 100µL do extrato da Kombucha a 1000µg/mL para realização da diluição seriada, transferindo-se sequencialmente

100µL do poço anterior para o próximo até a coluna 2. Da mesma maneira, na primeira linha (A) foram adicionados 100µL de fluconazol a 128µg/mL, para posterior realização da diluição seriada até a linha G. Portanto, a coluna 1 conterá apenas o fluconazol e a linha H apenas o extrato da Kombucha. No poço H1 foi feito o controle de crescimento fúngico. Adicionalmente, foram distribuídos 100µL da suspensão de dermatófitos em cada poço (Figura 6).

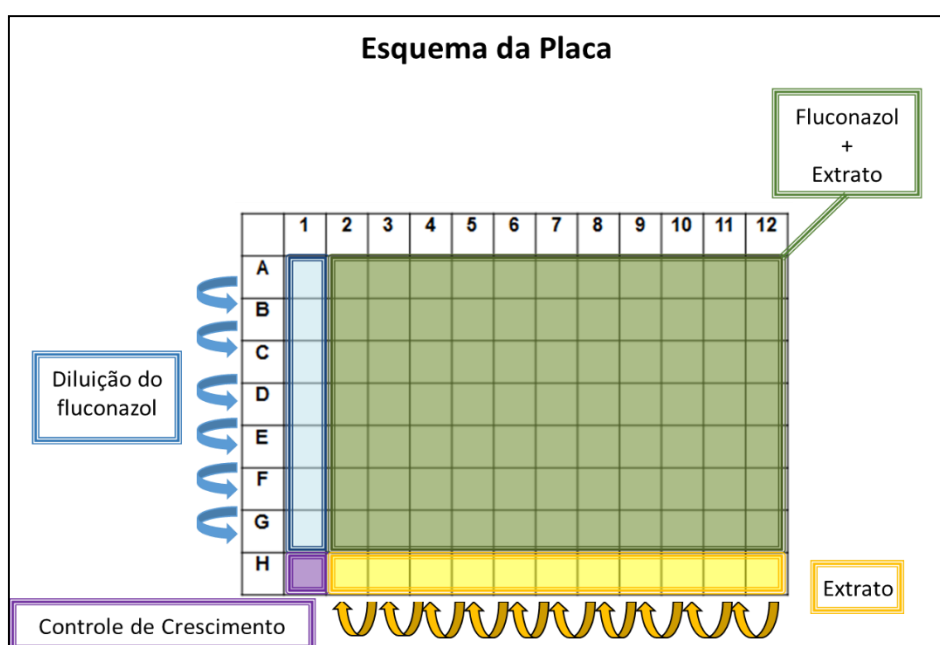


Figura 6. Esquema de montagem da placa do teste de *checkerboard* com a diluição do extrato e do fluconazol.

Fonte: elaborada pela autora

As microplacas foram incubadas, por sete dias a 37°C. Após esse período, a viabilidade das células foi medida por incorporação do revelador Cloreto de Trifenil Tetrazólico (TTC - 100µg/mL) (MP Biomedicals, UNITED STATES) para visualização do crescimento fúngico. Os experimentos foram realizados em triplicata.

O índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) dos extratos de cada chá da Kombucha com fluconazol foi obtido pela seguinte fórmula (Eq2):

$$\text{ICIF} = \frac{(\text{CIM fluconazol na combinação})}{(\text{CIM fluconazol isolado})} + \frac{(\text{CIM do extrato na combinação})}{(\text{CIM do extrato isolado})}$$

A partir do ICIF foi avaliada a interação seguindo a classificação descrita por Kumar et al (2012):⁽²³⁾ $\text{CIF} \leq 0,5$ para ação sinérgica; $0,5 < \text{CIF} \leq 1$ para ação aditiva; $1 < \text{CIF} \leq 2$ para indiferente; $\text{CIF} > 2$ para ação antagônica.

4 RESULTADOS

4.1 MASSA DO SCOBY E PH

No término do período de fermentação de cada chá (CP, CB e CV), pesou-se a massa do SCOBY e mediu-se o pH para verificar se houve diferença no início e fim do processo. Não houve alteração, do pH no início e término do período de fermentação (10, 20 e 30 dias) apresentando o valor de pH 3,0 para todos os chás.

O chá branco foi que o apresentou maior diferença entre a massa inicial e final do SCOBY (Tabela 1).

Tabela 1: Massa do SCOBY para diferentes chás

Tipos de chás		F10 (g)	F20 (g)	F30 (g)
Chá Preto	mi		20	
	mf	42,61	46,63	60,27
Chá Branco	mi		20	
	mf	69,67	52,13	71,85
Chá Verde	mi		20	
	mf	37,08	43,14	45,39

F10: fermentação 10 dias; F20: fermentação de 20 dias; F30: fermentação de 30 dias; mi: massa inicial; mf: massa final; (g): gramas

4.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC) DOS EXTRATOS DE KOMBUCHA

Os extratos de chá puro e de chá da Kombucha, foram submetidos à análise por HPLC em comprimentos entre 200 e 800nm. O comprimento de onda de 254nm foi selecionado, pois houve maior absorção nesta região espectral. A composição cromatográfica dos extratos pode ser vista na Figura 7.

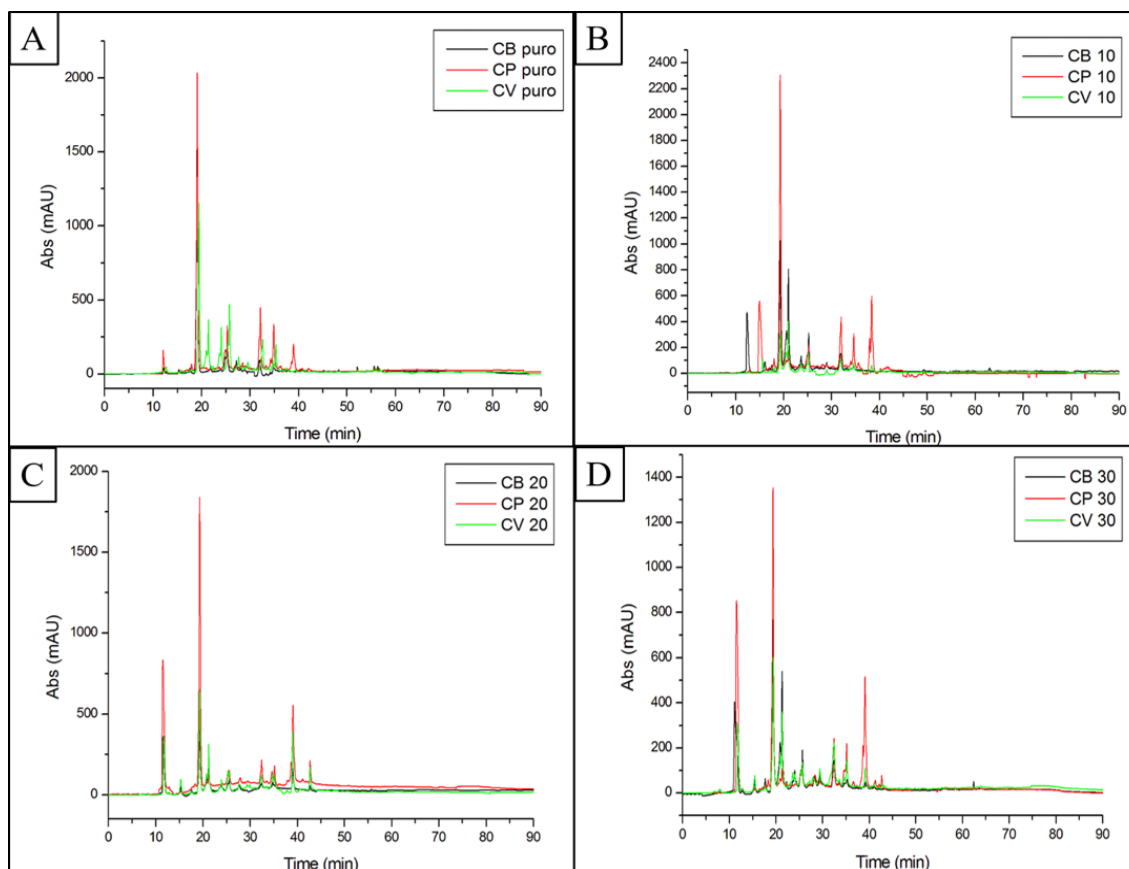


Figura 7. Perfis cromatográficos de extratos de chá puro (sem SCOBY, sem fermentação) e extratos de chá da Kombucha branco (CB), preto (CP) e verde (CV). (a) extratos de chá puro; (b) extratos de fermentação de 10 dias; (c) extratos de fermentação de 20 dias; (d) extratos de fermentação de 30 dias.

A análise de HPLC para o chá branco puro (CB puro) mostrou picos cromatográficos maiores em tempos de retenção entre 15 e 20 min, com absorções máximas entre 1750 e 2000 mAU; e entre 25 e 30 min com picos de absorção entre 250 e 500 mAU. Nos extratos de fermentação de 10 dias (CB 10), a análise cromatográfica mostrou picos cromatográficos em tempos de retenção de 10 a 15 min com absorção máxima de 400 a 500 mAU, indicando metabólitos mais polares, do que os observados no CB puro. Além disso, houve pico cromatográfico no intervalo de tempo de retenção entre 20 e 25 min, com

absorções máximas entre 700 e 800 mAU; e um pico no intervalo de 30 a 35 min com absorção máxima de aproximadamente 50 mAU. Picos cromatográficos observados no CB puro ocorreram no CB 10 (tempos de retenção entre 15 e 20 min e 25 e 30 min), porém, neste último, com picos de absorção menores (Figura 6B).

No chá branco Kombucha de 20 e 30 dias de fermentação (CB 20 e CB 30), os perfis cromatográficos foram semelhantes aos CB 10. No entanto, alguns picos cromatográficos apareceram em tempos de retenção mais longos (35 a 65 min), caracterizando a formação de mais metabólitos hidrofóbicos (Figuras 6C e 6D).

Os perfis cromatográficos dos extratos dos outros chás foram comparáveis aos extratos da Kombucha do chá branco (Figura 6). Esses chás apresentaram composição semelhante, especialmente demonstrado pelos picos nos tempos de retenção entre 15 e 20 min. Além disso, esses picos foram consistentes em todos os extratos de chá preto e verde, após períodos de incubação de 10 a 30 dias. Nos extratos de chá preto e verde, assim como nos extratos de chá branco, períodos de incubação mais longos resultaram na formação de novos picos, o que é esperado devido ao processo de fermentação e aparecimento de metabólitos menores. Novos picos com tempos de retenção mais longos têm características mais hidrofóbicas, enquanto tempos de retenção mais curtos revelam características menos hidrofóbicas.

4.3 TOXICIDADE EM *GALLERIA MELLONELLA*

Não foi observada toxicidade superficial das larvas de *G. mellonella* banhadas com os extratos dos chás da Kombucha, ou seja, todas as larvas permaneceram vivas após cinco dias de incubação.

Para os testes de inoculação, os extratos de Kombucha em chá preto e verde não apresentaram toxicidade. Já os extratos do chá branco foram tóxicos, matando mais de 50% das larvas em cinco dias (Figura 8).

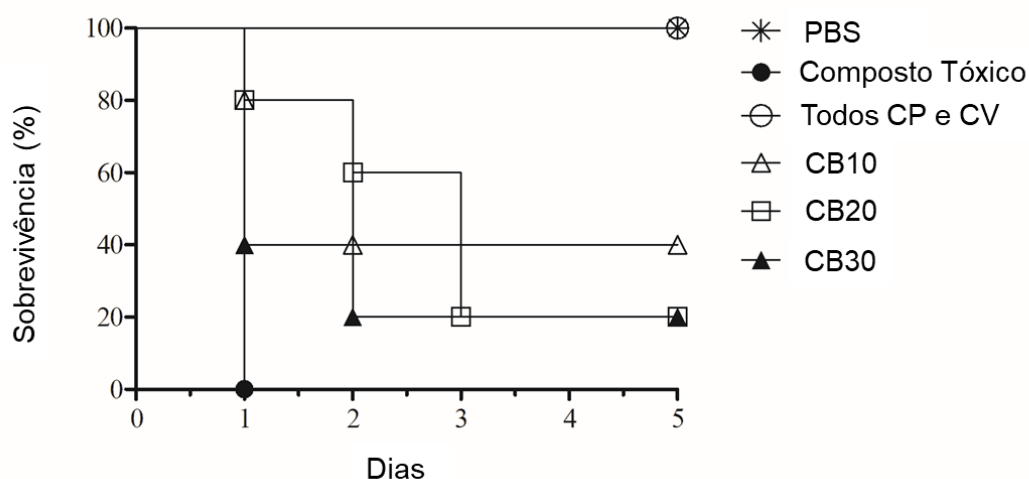


Figura 8. Avaliação da toxicidade *in vivo* dos extratos da Kombucha em diferentes chás. (%): Taxa de sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* após a inoculação dos extratos; Dias: os números correspondem aos dias de incubação das larvas; PBS: controle negativo (composto não tóxico); Composto tóxico: controle positivo; CP: extrato da Kombucha em chá preto; CV: extrato da Kombucha em chá verde; CB: extrato de Kombucha em chá branco.

4.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS DA KOMBUCHA

4.4.1 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS DE CHÁ PRETO, CHÁ BRANCO E CHÁ VERDE CONTRA *TRICHOPHYTON RUBRUM* E *TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES*.

Os extratos de chá puro exibiram atividade antifúngica, com valores de CIM iguais para *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, 250µg/mL para extrato de chá branco e 125µg/mL para extratos de chá preto e verde (Tabela 2). Neste estudo, os valores de CIM dos extratos de chá Kombucha variaram de 62,5 a 2.000µg/mL. Considerando o tipo de chá, o chá verde apresentou o menor valor médio de CIM, (média geométrica (MG) de 125µg/mL), enquanto o chá preto apresentou menor atividade (MG 222,7µg/mL).

Com relação ao tempo de fermentação, o período de 10 dias apresentou melhor atividade (MG 111,3µg/mL) apresentando as menores CIMs, em relação ao de 20 dias (MG 250µg/mL), 30 dias (MG 176,8µg/mL) ou extratos de chá puro (MG 157,5µg/mL).

Os extratos de fermentação de 10 dias mostraram produtos com os mesmos valores de CIM para *T. mentagrophytes* (250µg/mL para CB e 125µg/mL para CP e CV). Para *T. rubrum*, a atividade antifúngica foi maior, com valores de CIM de 125µg/mL para CB e 62,5µg/mL para CP e CV. Para extratos de fermentação de 20 dias, os resultados variaram de acordo com a origem do chá. A atividade antifúngica melhorou para os extratos da Kombucha em chá branco, e piorou para os chás, preto e verde (Tabela 2). Os valores de CIM para extratos de fermentação de 30 dias foram iguais ou superiores aos extratos de chá puro, exceto para o chá preto contra *T. rubrum*, com CIM de 125µg/mL, para chá puro, e 62,5µg/mL, para extrato de chá Kombucha.

Tabela 2: Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos da Kombucha, em diferentes tempos de fermentação, contra *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*.

Chá	Dias de Fermentação	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
		<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>
Branco	0 (puro)	250	250
	10	250	125
	20	125	62,5
	30	500	250
Preto	0 (puro)	125	125
	10	125	62,5
	20	2000	1000
	30	125	62,5
Verde	0 (puro)	125	125
	10	125	62,5
	20	250	62,5
	30	250	125

A atividade antifúngica dos extratos foi melhor contra *T. rubrum* do que em *T. mentagrophytes*. A média dos valores geométricos da CIM foi de 222,7 $\mu\text{g/mL}$ para *T. mentagrophytes* e 125 $\mu\text{g/mL}$ para *T. rubrum*. Além disso, o teste de sensibilidade ao fluconazol isolado mostrou diferentes valores de CIM para *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (1 $\mu\text{g/mL}$ e 32 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).

4.4.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO DE CHÁ PRETO CONTRA DERMATÓFITOS.

Ao analisar os resultados dos testes realizados com os extratos de CP, CB e CV nos diferentes tempos de fermentação (10, 20 e 30 dias), o chá preto

com fermentação de 10 dias apresentou os melhores resultados e foi selecionado para os testes de CIM contra os dermatófitos e a interação com o fluconazol para cada fungo.

O extrato de chá preto puro (CPP) exibiu atividade antifúngica, com valores de CIM que variaram entre 15,62 e 500µg/mL para *E. floccosum* e *M. canis*, respectivamente (Tabela 3). Neste estudo, os valores de CIM do extrato da Kombucha em chá preto, com fermentação de 10 dias (CP10), variaram de 31,25 a 250µg/mL. Adicionalmente, o chá preto, com 10 dias de fermentação, apresentou o menor valor de CIM, com média geométrica (MG) de 74,8µg/mL, enquanto o chá preto puro, MG de 89,7µg/mL.

Com relação à espécie fúngica, *T. rubrum* foi mais sensível com MG 62,5µg/mL. Em relação ao *E. floccosum*, a MG foi de 76,9µg/mL, *T. mentagrophytes*, MG 78,7µg/mL e *M. canis*, MG 117,9µg/mL.

Os extratos de chá preto (CP10 e CPP) frente aos isolados de *T. rubrum* apresentaram o mesmo valor de CIM, à exceção uma cepa (7636), em que o valor de CIM para CP10 (31,25µg/mL) foi menor que o CPP (62,5µg/mL). Para *T. mentagrophytes*, as cepas 7405, 6007 e ATCC 11480, foram sensíveis ao extrato de chá preto puro, com CIM menor do que o extrato de CP10 (Tabela 3). Este evento aconteceu também para a espécie de *E. floccosum*, porém, apenas para uma cepa (7331) com 10 dias de fermentação (31,25µg/mL e 15,62µg/mL). A espécie *M. canis* apresentou menor sensibilidade, e, com valores de CIM altos para ambos os extratos (CP10 e CPP).

Tabela 3: Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos da Kombucha em chá preto, contra fungos dermatófitos.

Fungo	Cepas	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	
		Chá Preto	
		10	0 (puro)
<i>T. rubrum</i>	6195	62,5	62,5
	7614	125	125
	7636	31,25	62,5
	7604	62,5	31,25
	7609	62,5	62,5
	CBS 118892	62,5	62,5
<i>T. mentagrophytes</i>	7606	125	125
	7405	250	31,25
	6007	62,5	31,25
	7389	62,5	125
	7362	62,5	62,5
	ATCC 11480	125	62,5
<i>E. floccosum</i>	6068	62,5	250
	6050	125	250
	6117	62,5	62,5
	7331	31,25	15,62
	6069	62,5	125
<i>M. canis</i>	7259	31,25	125
	7094	62,5	250
	7134	125	250
	7171	125	62,5
	7507	250	500
	ATCC 9865	31,25	125

A atividade antifúngica do extrato da Kombucha em chá preto foi melhor para *T. rubrum*, com MG de 62,5 $\mu\text{g/mL}$. O teste de sensibilidade ao fluconazol isolado, mostrou valores de CIM diferentes para cada espécie estudada, variando entre 1 e 64 $\mu\text{g/mL}$.

4.5 INTERAÇÃO DO EXTRATO DE KOMBUCHA EM CHÁ PRETO COM FLUCONAZOL (*CHECKERBOARD*).

As atividades combinadas dos extratos de chá preto da Kombucha com fluconazol, no ensaio *in vitro* de checkerboard contra os fungos dermatófitos, são apresentados na tabela 4. O índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) contra os fungos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *E. floccosum* e *M. canis* demonstrou ação sinérgica. Para o fungo *M. canis*, a interação do extrato da Kombucha em chá preto puro e 10 dias, com fluconazol foi aditiva em 3 isolados e sinérgico apenas para a cepa ATCC. O resultado indiferente não foi registrado em nenhum dos fungos testados.

A combinação dos extratos da Kombucha em chá preto puro e 10 dias com fluconazol foi melhor para *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *E. floccosum* (MG 0,35) do que para *M. canis* (MG 0,77).

Tabela 4: Efeito integrado do extrato de Kombucha em chá preto e fluconazol contra dermatófitos

	TRCBS				TR6195				TR7604				TR7609				TR7614				TR7636			
	MIC µg/mL				MIC µg/mL				MIC µg/mL				MIC µg/mL				MIC µg/mL				MIC µg/mL			
	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF
CP Puro	62,5	8	2/0,244	0,3	125	16	2/0,244	0,1	125	4	2/0,244	0,5	125	4	1/7,81	0,25	125	4	2/0,244	0,5	62,5	4	2/0,244	0,5
CP 10	125	4	2/0,244	0,5	125	16	2/1,95	0,1	125	4	2/0,244	0,5	250	4	1/1,95	0,25	125	4	2/0,244	0,5	125	4	2/0,244	0,5

	TMATCC				TM6007				TM7362				TM7389				TM7405				TM7606			
	MIC µg/mL				MIC µg/mL				MIC µg/mL				MIC µg/mL				MIC µg/mL				MIC µg/mL			
	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF
CP Puro	125	4	2/0,244	0,5	250	4	2/0,244	0,5	62,5	64	16/1,95	0,3	125	64	32/1,95	0,5	125	16	4/0,97	0,3	125	32	8/0,244	0,3
CP 10	250	2	1/0,244	0,5	125	2	1/0,244	0,5	62,5	64	16/1,95	0,3	125	64	32/0,488	0,5	125	16	2/1,95	0,1	125	32	8/0,244	0,3

	EF6068				EF6050				EF6117				EF7331				EF6069							
	MIC µg/mL				MIC µg/mL				MIC µg/mL				MIC µg/mL				MIC µg/mL							
	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF				
CP Puro	31,3	32	1/1,95	0,1	15,62	16	8/1,95	0,6	250	16	8/0,244	0,5	62,5	16	4/0,97	0,25	15,62	64	1/0,97	0,1				
CP 10	1,95	16	1/1,95	1	3,9	16	8/0,244	0,5	125	16	16/0,244	1	250	16	8/0,244	0,5	62,5	32	1/0,97	0,04				

	MCATCC				MC7507				MC7171				MC7134				MC7094				MC7259			
	MIC µg/mL				MIC µg/mL				MIC µg/mL				MIC µg/mL				MIC µg/mL				MIC µg/mL			
	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF	EXT	FLC	FLC+ EXT	ICIF
CP Puro	125	32	16/1,95	0,5	62,5	64	64/0,488	1	125	64	16/62,5	0,75	125	64	32/62,5	1	62,5	32	32/1,95	1	125	32	16/62,5	1
CP 10	125	32	16/0,244	0,5	250	64	64/0,244	1	125	64	64/0,244	1	125	64	64/0,488	1	125	16	8/0,244	0,5	125	64	32/0,488	0,5

ICIF ≤ 0,5: ação sinérgica

0,5 < ICIF ≤ 1: ação aditiva

1 < ICIF ≤ 2: indiferente

5. DISCUSSÃO

Composta por uma cultura simbiótica de bactérias ácidas, *Lactobacillus* e leveduras, a bebida Kombucha, no seu processo de fermentação, produz ácidos como ácido acético, glucônico, tartárico, málico e cítrico que são responsáveis por caracterizar o sabor azedo da Kombucha, deixando-a ácida. O consumo do açúcar pelas bactérias e leveduras no processo de fermentação, forma um filme flutuante em cima do SCOBY, evidenciando o crescimento dos microrganismos.⁽²⁴⁾

Existe vários tipos de fermentação e, dependendo da via metabólica seguida, os produtos obtidos diferem quanto à quantidade e qualidade. Na Kombucha, o processo de fermentação utilizado é a alcóolica, láctica e acética.⁽²⁴⁾ O chá preto é o mais utilizado no processo de fermentação da Kombucha, devido aos seus valores terapêuticos como compostos lipídicos, enzimas, aminoácidos e polifenóis, presentes em suas folhas que absorvem o oxigênio e atuam com propriedades antioxidantes.⁽²⁵⁾ No presente estudo, nenhuma correlação pôde ser feita entre picos específicos nos cromatógrafos e a qualidade de atividade inibitória dos extratos. Estudos adicionais sobre metabolômica poderão permitir o reconhecimento de moléculas e sua identidade funcional. Evidenciou-se neste estudo que o extrato da Kombucha em chá preto com 10 dias de fermentação, apresentou um pico entre 30 e 40 min que não apareceu nos outros tempos de fermentação e nos outros extratos (CB e CV). Tem-se a produção de um metabólito exclusivo durante o processo de fermentação que pode ou não ter correlação com a atividade inibitória encontrada neste estudo, para podermos

correlacionar este pico específico do chá preto à atividade inibitória é necessária a identificação do composto.

A identificação dos metabólitos produzidos pela fermentação da Kombucha em diversos chás é de suma importância, uma vez que pode haver algum composto tóxico prejudicial à saúde humana. Os testes de toxicidade realizados no presente estudo, demonstraram resultados semelhantes ao estudo de Silva, que não encontrou toxicidade no modelo *G. mellonella* nos extratos da Kombucha em chá verde.⁽²⁶⁾ As larvas de *G. mellonella* têm sido utilizadas para avaliar a virulência de microrganismos, bem como a toxicidade de novos compostos, como uma alternativa aos modelos experimentais de mamíferos.⁽²⁷⁾ A inexistência de toxicidade dos extratos de Kombucha em chás preto e verde, sobre *G. mellonella* é interessante, pois podem ser indicados como forma terapêutica para o controle de onicomicose e dermatofitose. Em relação aos extratos de Kombucha em chá branco, a toxicidade para os seres humanos deverá constituir objetivo de estudos futuros.

As dermatofitoses, são infecções cutâneas superficiais, muito comuns em todo o mundo, apresentam impacto psicossocial negativo devido à inflamação e desconforto físico tão evidente, exigindo tratamento prolongado.⁽²⁸⁾ O fluconazol é um antifúngico triazólico que apresenta atividade fungistática dose-dependente que requer uma concentração sérica acima da CIM no organismo na maior parte do intervalo de dosagem. Os azóis são fármacos de primeira escolha na terapia antifúngica, porque se ligam ao ergosterol presente na membrana celular dos fungos formando poros ou canais que vão aumentar a permeabilidade da membrana e, permitir o extravasamento de moléculas,

levando à morte celular.⁽²⁹⁾ As classes de antifúngicos são limitadas e as drogas orais apresentam efeitos colaterais expressivos, como hepatotoxicidade.⁽³⁰⁾ O mecanismo de ação dos fármacos convencionais baseia-se na inibição do esterol-14- α -desmetilase, que prejudica a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática e leva ao acúmulo de 14- α -desmetilase acarretando no mal desempenho das funções básicas necessárias para o desenvolvimento do fungo.⁽²⁹⁾ Acredita-se que a Kombucha tenha o mesmo mecanismo de ação que o fármaco convencional, reduzindo a síntese de ergosterol na membrana celular do fungo. Este estudo mostra uma alternativa factível para controle de infecções fúngicas. O encontro de novas moléculas e, alternativas naturais, pode resultar em opções de tratamento, com baixa toxicidade ao paciente.

A atividade antifúngica do chá de camélia foi relatada anteriormente, específico ao extrato de chá verde, contra *T. mentagrophytes*.⁽³¹⁾ No entanto, grande variação da CIM foi observada devido, provavelmente, às diferenças na metodologia, incluindo quantidade de chá, tipo de folhas, preparo do extrato, etc.

Estudos anteriores investigaram as propriedades antifúngicas do chá de Kombucha contra outros fungos de importância clínica, tais como: *Candida*, *Malassezia* e dermatófitos e, demonstrou que a Kombucha foi capaz de inibir o crescimento destes fungos.^(17,18)

O tempo de fermentação da Kombucha é variável, de 8 a 14 dias.^(17,19,32,33) Conforme apresentado na literatura científica, o extrato de Kombucha fermentado apresenta diferentes propriedades quando comparada com a bebida não fermentada.⁽³⁴⁾ Se considerada a atividade antifúngica, o presente estudo

confirma esta afirmativa, e, nos tempos intermediários de fermentação, os resultados foram melhores. De fato, os tempos menores ou maiores de fermentação, comprometem a ação antifúngica dos extratos, evento identificado também por Yuniarto et al (2016).⁽¹⁸⁾ No presente estudo, os extratos de 10 dias mostraram as melhores atividades inibitórias, e corrobora com os dados de Chen et al (2000),⁽¹⁹⁾ demonstrando o papel importante que a fermentação da Kombucha exerce.

A alta atividade proteolítica de *T. mentagrophytes* é um fator de virulência que auxilia no rápido crescimento micelial deste fungo.⁽³⁵⁾ Este fato pode justificar a diferença observada, no atual estudo, sobre os valores de CIM para *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*. Se os metabólitos forem de origem proteica, pode haver alteração química, alterando as funções. Além disso, o comportamento biológico entre espécies podem diferir segundo origem dos isolados, condição do paciente de onde as amostras foram obtidas, exposição prévia aos antifúngicos ou esteróides, resultando em diferenças de suscetibilidade dos isolados aos extratos de Kombucha.

Considerando a importância das dermatofitoses em saúde pública e o problema crescente da resistência antifúngica, novos estudos para o desenvolvimento de fármacos naturais são imprescindíveis.

Junior et al (2022)⁽³⁶⁾ testou a ação inibitória de extratos foliares de espécies de *Justicia* L. (Acanthaceae) contra dermatófitos obtendo alta sensibilidade. O menor valor de CIM dos extratos de Kombucha, encontrados no presente estudo, caracterizou melhores resultados do que o estudo citado.

A ação antifúngica dos extratos da Kombucha em chá preto foi reportada contra *Malassezia sp.*,⁽¹⁷⁾ *Microsporum gypseum*, *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*⁽¹⁸⁾ e *T. mentagrophytes*,⁽³⁰⁾ utilizando a metodologia por difusão em disco. Alguns autores,^(37,38) testaram ervas Siddha Kodagasalai Chooranam (*Justiça procumbens*) e extratos do tronco de *Justicia gendarussa* contra fungos dermatófitos. Até o presente, não há na literatura estudos que demonstrem a ação antifúngica da Kombucha contra esses fungos, especialmente identificando a concentração inibitória pelo método de microdiluição em caldo, como realizado pelo nosso estudo.

O tratamento das dermatofitoses é lento e, envolve o uso tópico e oral de antifúngicos por ação prolongada. Na maioria das vezes, o tratamento é empírico, e com o uso incorreto da dose e duração, tem-se a expressão da resistência antifúngica de *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum* aos fármacos convencionais.⁽³⁹⁾ Vários estudos mostraram uma eficácia maior contra bactérias e fungos dos fármacos convencionais quando combinados à óleo da semente de *Jatropha curcas*, extratos de *Illicium verum* e extratos de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae),⁽⁴⁰⁻⁴²⁾ essa combinação melhora o espectro da atividade da droga eliminando os microrganismos.

O teste de checkerboard determina a atividade antimicrobiana utilizando a combinação de um composto convencional como o fluconazol e uma substância teste, no caso o extrato da Kombucha. Nessa combinação a resposta é apresentada como sinérgica, aditiva, antagônica e indiferente. O efeito sinérgico é quando a atividade de ambos os compostos é melhor do que a dos compostos isolados. O efeito aditivo aumenta a atividade de um dos compostos

na combinação, sendo melhor que a do composto isolado, no efeito indiferente a atividade dos compostos cobinados é a mesma que deles isolados e no efeito antagônico, os compostos quando cobinados anulam o efeito de um deles, sendo melhor a atividade deles isolados.⁽²³⁾ A interação desta ação sinérgica pode ser complexa, por exemplo o fluconazol mata os fungos atuando na 14- α -desmetilase do lanosterol do citocromo P450, que é codificada pelo gene ERG11 para Erg11p.⁽²⁹⁾ Com relação aos extratos da Kombucha, não se sabe o mecanismo de ação dos seus compostos, no entanto, a combinação do fluconazol com os extratos da Kombucha pode inibir o crescimento fúngico pelo mecanismo de ação do antifúngico ou por um novo mecanismo, ainda desconhecido, que aumenta a taxa de morte.

Dada a escassez do arsenal terapêutico contra micoses, novos estudos devem ser elaborados investigando a ação integrada dos fármacos convencionais junto aos novos compostos, procurando aprimorar os efeitos inibitórios. Efeitos sinérgicos podem impedir o crescimento microbiano sob baixas doses, o que diminui a toxicidade, e previne o surgimento da resistência aos compostos.⁽²³⁾ A combinação do extrato da Kombucha em chá preto com o fluconazol, melhorou as respostas individualizadas, isto é, apresentou um efeito sinérgico contra os fungos dermatófitos.

Este estudo é inédito e apresenta resultados promissores para o controle de infecções fúngicas.

6 CONCLUSÃO

Todos os extratos de Kombucha, preparados com rigor técnico quanto à base, chás diversos, apresentam atividade antifúngica contra *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum*.

As melhores atividades observadas para o chá verde e Kombucha, em 10 dias de fermentação, demonstram especificidades técnicas e a necessidade de se obter recursos adicionais para os conhecimentos das diversas áreas de interface, microbiologia, química e indústria, melhorando o produto final.

Os extratos de Kombucha de chá verde e preto sem toxicidade, caracterizam novos potenciais terapêuticos. A combinação do extrato da Kombucha com derivado azólico, identifica a alternativa para controle de infecção por cepas resistentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jayabalan R, Malbasa RV, Loncar ES, Vitas JS, Sathishkumar M. A review on Kombucha tea - microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. Compr Rev Food Sci Food Saf 2014;13(4):538-550.
2. Marsh AJ, O'Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. Food Microbiol 2014;38:171-178.
3. Leal JM, Suárez LV, Jayabalan R, Oros JH, Escalante-Aburto A. A review on health benefits of Kombucha nutritional compounds and metabolites. CyTA - J Food 2018;16(1):390-399.

4. Jayabalan R, Chen PN, Hsieh YS, Prabhakaran K, Pitchai P, Marimuthu S, et al. Effect of solvent fractions of kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells - characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidene) malonate and vitexin. *Indian J Biotechnol* 2011;10:75-82.
5. Aloulou A, Hamden K, Elloumi D, Ali MB, Hargafi K, Jaouadi B, et al. Hypoglycemic and antilipidemic properties of Kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. *BMC Complement Altern Med* 2012;16:12-63.
6. Banerjee D, Hassarajani AS, Maity B, Narayan G, Bandyopadhyay SK, Chattopadhyay S. Comparative healing property of Kombucha tea and black tea against indomethacin-induced gastric ulceration in mice: possible mechanism of action. *Food Funct* 2010;1(3):284-293.
7. Yang ZW, Ji BP, Zhou F, Li B, Luo Y, Yang L, et al. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of Kombucha tea in high-cholesterol fed mice. *J Sci Food Agric* 2009;89:150-156.
8. Ram MS, Anju B, Pauline T, Dipti P, Kain AK, Mongia SS, et al. Effect of Kombucha tea on chromate(VI)-induced oxidative stress in albino rats. *J Ethnopharmacol* 2000;71(1-2):235-40.
9. Chakravorty S, Bhattacharya S, Chatzinotas A, Chakraborty W, Bhattacharya D, Gachhui R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *Int. J. Food Microbiol* 2016;220:63-72.
10. Watawana MI, Jayawardena N, Waisundara V Y. Enhancement of the functional properties of coffee through fermentation by “tea fungus” (Kombucha). *J. Food Process. Preserv* 2015;39(6):2596–2603.

11. Kozyrovska NO, Reva OM, Goginyan VB, Vera JP. Kombucha microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology. *Biopolym. Cell.* 2012;28(2):103–113.
12. Battikh H, Bakhrouf A, Ammar E. Antimicrobial effect of Kombucha analogues. *LWT. Food Sci. Technol* 2012;47:71-77.
13. Cetojevic-Simin DD, Bogdanovic GM, Cvetkovic DD, Velicanski AS. Antiproliferative and antimicrobial activity of traditional Kombucha and *Satureja montana* L. Kombucha. *J BUON* 2008;13:395–401.
14. Sreeramulu G, Zhu Y, Knol W. Characterization of antimicrobial activity in Kombucha fermentation. *Acta Biotechnol* 2001;21:49–56.
15. Battikh H, Chaieb K, Bakhrouf A, Ammar E. Antibacterial and antifungal activities of black and green Kombucha teas. *J Food Biochem* 2013;37:231–236.
16. Santos-Júnior RJS, Batista RA, Rodrigues AS, Filho LX, Lima AS. Antimicrobial activity of broth fermented with Kombucha colonies. *J Microb Biochem Technol* 2009;1(1):072-078.
17. Mahmoudi E, Saeidi M, Marashi MA, Moafi A, Mahmoodi V, Zeinolabedini ZM. In vitro activity of Kombucha tea ethyl acetate fraction against *Malassezia* species isolated from seborrhoeic dermatites. *Curr Med Mycol* 2016;2(4):30-36.
18. Yuniarto A, Anggadiredja K, Aqidah RAN. Antifungal activity of Kombucha tea against human pathogenic fungi. *Asian J Pharm Clin Res* 2016;9(5):253-255.
19. Chen C, Liu BY. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *J Appl Microbiol* 2000;89(5):834-9.
20. Gottardo B, Lemes TH, Byzyski G, Paziani MH, von-Zeska-Kress MR, Almeida MTG, Volanti DP. One-Pot synthesis and antifungal activity of nontoxic

silver-loaded hydroxyapatite nanocomposites against *Candida* species. *ACS Appl Nano Mater* 2019;2:2112–2120.

21. (CLSI) Clinical Laboratory and Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard—Second Edition document M38-A2 *Clin Lab Stand Inst* 2008;28:29.

22. (CLSI) Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts—approved standard. Document M27-A4. Wayne, PA. 2012b.

23. Kumar SN, Siji JV, Nambisam B, Mohandas C. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria in vitro. *World J Microbiol Biotechnol* 2012;28(3):143-3150.

24. Villarreal-Soto SA, Beaufort S, Bouajila J, Souchard JP, Taillandier P. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *J. Food Sci* 2018;83(3):580-588.

25. Kumar V, Joshi VK. *Kombucha*: Technology, Microbiology, Production, Composition and Therapeutic Value. *Intl. J. Food. Ferment. Technol.* 2016;6(1):13-24.

26. Silva KA, Uekane TM, Miranda JF, Ruiz LF, Motta JCB, Silva CB, et al. Kombucha beverage from non-conventional edible plant infusion and green tea: Characterization, toxicity, antioxidant activities and antimicrobial properties. *Biocatal Agric Biotechnol* 2021;34:102032.

27. Binder U, Maurer E, Lass-Florl. *Galleria mellonella*: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species. *Fungal Biol* 2016;120(2):288-295.

28. Urban K, Chu S, Scheufele C, Giese RL, Mehrmal S, Uppal P, et al. The global, regional, and national burden of fungal skin diseases in 195 countries and territories: A cross-sectional analysis from the Global Burden of Disease Study. *JAAD* 2020;2:22-27.
29. Nogueira LG. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Pouteria* spp. e de triterpenos quinonametídeos com enfoque no *Helicobacter pylori* [Dissertação]. Araraquara (SP): Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP; 2012.
30. Hay R. Therapy of skin, hair and nail fungal infections. *J Fungi* 2018;4(3):99.
31. Cheruiyot SE, Muturi M, Bii C. Antifungal activities of *Camellia sinensis* crude extract on selected pathogenic and mycotoxic fungi. *J Bacteriol Mycol* 2015;2(2):1015.
32. Coton M, Pawtowski A, Taminiau B, Burgaud G, Deniel F, Coulloume-Labarthe L, et al. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiol Ecol* 2017;93(5):fix048.
33. Filippis FD, Troise AD, Vitaglione P, Ercolini D. Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. *Food Microbiol* 2018;73:11-16.
34. Al-Mohammadi AR, Ismaiel AA, Ibrahim RA, Moustafa AH, Zeid AA, Enan G. Chemical constitution and antimicrobial activity of Kombucha fermented beverage. *Mol* 2021;26(16):5026.
35. Pakshir K, Mohamadi T, Khodadadi H, Motamedifar M, Zomorodian K, Alipour S, et al. Proteolytic activity and cooperative hemolytic effect of dermatophytes with different species of bacteria. *Curr Med Mycol* 2016;2(4):9-14.

36. Junior PRLA, Oliveira RAM, Mendes MB, Bonci MM, Paula CR, Baroni FA, et al. Potencial antifúngico "in vitro" de extratos foliares de espécies de *Justicia* L. (Acanthaceae) diante de isolados clínicos veterinários de dermatófitos. Res. Soc. Dev. 2022;11(10):e62111032346.
37. Vinothkumar P, Devaki R, Giftillda SET, Nalina SK, Velpandian V. Screening of antibacterial and antifungal activities of siddha herbal drug Kodagasalai chooranam (*Justicia procubens*). World J. Pharm. Res. 2017;6(4):1247-1255.
38. Venkatachalam D, Rahman A, Sunny B, Jacob J, Kuriyan N, Raman R, et al. Screening of Antimicrobial Activity of Various Extracts of the Stem *Justicia gendarussa*. Asian J. Pharm. Sci. 2019;6(4):1-7.
39. Silvestre ECA, Queiroz-Fernandes GM. Fungos dermatófitos e resistência a antifúngicos. InterAm J Med Health 2021;4:e202101021.
40. Haq A, Siddiqi M, Batool SZ, Islam A, Khan A, Khan D, et al. Comprehensive investigation on the synergistic antibacterial activities of *Jatropha curcas* pressed cake and seed oil in combination with antibiotics. AMB Expr 2019;9:67.
41. Alhajj MS, Qasem MAA, Jar El Nabi AR, Al-Mufarrej SL. In-Vitro Antibacterial and Antifungal Effects of High Levels of Chinese Star Anise. Braz. J. Poult. Sci. 2019;21(1):001-008.
42. Silva RM, Dourado MR, Penha MQ, Campos LG, Carvalho MFF, Júnior DRP. Microbial susceptibility of bacteria and fungi against extracts of *Psidium guajava* L.: *in vitro* evaluation. Arq Odontol 2013;49(2):60-65.

Apêndice A: Manuscrito submetido no periódico Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences.

Comparison of the antifungal activity of black, white, and green tea Kombucha extracts against dermatophytes

Natalia Seron Brizzotti-Mazuchi^a, Thiago Henrique Lemes^b, João Paulo Zen Siqueira^a, Mariela Domiciano Ribeiro^a, Taiza Maschio-Lima^b, Bianca Gottardo de Almeida^b, Carlos Roberto Polaquini^b, Julyanna Andrade Silva Nascentes^b, Leticia Ribeiro de Assis^b, Reinaldo dos Santos Theodoro^b, Luis Octavio Regasini^b, Mario Henrique Paziani^c, Márcia Regina von Zeska Kress^c, Elza Maria Castilho^a, Margarete Teresa Gottardo de Almeida^{a*}.

^a Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), 5416 Brigadeiro Faria Lima Ave., 15090-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

^b Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2265 Cristóvão Colombo St., 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

^c Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Café Ave., 14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

***Corresponding author:**

Margarete Teresa Gottardo de Almeida (Ph.D.)

Department of Dermatological, Infectious, and Parasitic Diseases, São José do Rio Preto School of Medicine (FAMERP).

5416 Brigadeiro Faria Lima Ave., 15090-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

Telephone: +55 17 3201 5920

E-mail: margarete@famerp.br

DECLARATIONS

Funding. No funding was received for conducting this study.

Conflicts of interest. The authors declare there are no conflicts of interest.

Ethics approval. Not applicable.

Consent to participate. The authors consented to participate in this study.

Consent for publication. The authors consent to the publication of this study.

Availability of data and material. All data generated or analysed during this study are

included in the article.

Code availability. Not applicable.

Author contributions

Conceptualization: MTGA

Supervision: MTGA, EMC

Investigation: NSBM, THL, JASN, CRP MDR, MHC, TML, BGA, LMB

Methodology: NSBM, THL, LOR, MRZK

Formal analysis: JASN, LPA, RST, MHP

Resources: MTGA, MRZK, LOR,

Writing - original draft preparation: NSBM

Writing – review & editing: JPZS

All authors read and approved the final manuscript.

ABSTRACT

Kombucha is obtained by fermentation of tea (*Camellia sinensis*) and sugar by a “symbiotic culture of bacteria and yeast” (SCOBY). This beverage has several beneficial effects, including antimicrobial activity. Due to the importance and prevalence of fungal infections, discovery of new antifungal molecules is crucial. Therefore, the objective of this study was to evaluate the antifungal activity of Kombucha extracts against common agents of dermatophytosis. Depending on how the leaves are processed, *Camellia sinensis* can produce black, white, or green tea, which have distinct characteristics. SCOBY (20 g) was added to each type of tea and incubated for 10, 20, or 30 days, which reflect the time of *fermentation* of the tea. After incubation, teas were filtered through a membrane system. The extracts were obtained by liquid-liquid extraction with ethyl acetate and dried in rotary evaporator. The minimum inhibitory concentration (MIC) of extracts were determined against clinical isolates of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* by broth microdilution. Toxicity tests were conducted in *Galleria mellonella* model, and chromatographic profiles were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Values of MIC ranged from 62.5–2000 µg/mL. Green tea Kombucha showed the best results and lower MICs were obtained for 10-days fermentation extracts. Toxicity was observed only for white

tea Kombucha extract. The chromatographic profiles showed the presence of different components, but no correlation could be made. Further studies are needed to characterize the active molecules. However, Kombucha extracts may constitute a viable alternative for development of new treatment strategies for dermatophytosis.

Keywords: Kombucha; Antifungal activity; *Trichophyton mentagrophytes*; *Trichophyton rubrum*; Dermatophytosis.

INTRODUCTION

Kombucha is a beverage originally obtained by the fermentation of *Camellia sinensis* leaves and sugar. It is believed that its origin is in China, around 220 B.C. Recently, it has gained popularity for its detoxifying and energizing properties [1]. With a slightly acidic, sweetened, and carbonated taste, Kombucha is consumed worldwide as a homemade beverage, or it can be found on stores and supermarkets as ready to drink beverage [2,3].

The fermentation process is carried out by a starter culture composed of acetic acid bacteria (for example, *Komagataeibacter*, *Gluconobacter*, and *Acetobacter* species) and yeast (*Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*, among others) named SCOBY (symbiotic culture of bacteria and yeast) [4-6]. Its composition is variable, depending on factors such as geographic location, climate, local composition of bacterial and yeast species, and the origin of the

inoculum [1, 7]. The organisms on the SCOBY can ferment the sugary tea, producing a variety of metabolites, for example, carbohydrates; polyphenols, such as catechins; amino acids, such as lysine; essential elements, such as sodium, potassium, calcium, copper, iron, and zinc; water-soluble vitamins, such as C, B, and B2; hydrolytic enzymes, among others [1].

Although Kombucha is traditionally prepared by fermenting black tea for 7 to 10 days, other types of plants can be used to make it, including *Camellia sinensis* in different stages of processing (green and white teas), rosemary and hibiscus infusions, fennel, lemon balm, mint, among many others. Each type of infusion has different components that can change Kombucha's chemical composition and, consequently, its properties [8,9].

Kombucha have many beneficial effects reported in the literature: antimicrobial, antioxidant and anticarcinogenic activities [10]; diabetes treatment and prevention [11]; treatment of gastric ulcers [12]; lowering cholesterol [13]; and immunopotentiating effects [14]. Although toxicity related to the ingestion of Kombucha has already been reported, it was mainly attributed to inadequate conditions of hygiene and sterility [15].

Kombucha's antimicrobial activity is a result of biologically active components formed in fermentation. Consequently, the positive effects of different teas and infusions can be optimized by association with Kombucha [8]. In the current scenario, with increasing numbers of individuals susceptible to infections, to study variations of Kombucha can lead to the discovery of new molecules and beneficial effects.

Antifungal activity of Kombucha beverages has already been demonstrated against *Candida* spp. involved in several types of infection, such as *C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. tropicalis* [8]. Strong inhibitory activity was also observed against *Microsporum* spp. and *Malassezia* spp., two agents of superficial mycoses in humans and domestic animals [16-18]. Kombucha's activity has also been reported against *Aspergillus flavus*, a fungus that can cause opportunistic infections, especially in immunocompromised patients [18].

Fungal infections are often defined by the causing agent or affected area. Among the most prevalent, dermatophytosis are superficial infections caused by dermatophyte fungi (i.e., genera *Trichophyton*, *Microsporum*, and *Epidermophyton*). When they affect the nail, the infection is named onychomycosis, which is characterized by thickening, roughness, and fragmentation of the nail, and affects 10 to 30% of the world population. Its pathology evolves from discomfort and pain to physical and occupational limitations, reducing the patient's quality of life. Although onychomycoses can be caused by many genera, *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* are the most frequent agents in most of the countries. In many cases, oral treatment is necessary, and terbinafine is the gold standard, followed by itraconazole, fluconazole, ketoconazole and griseofulvin. However, prolonged time of treatment may cause systemic side effects, including liver and cardiac damage [19].

Within the purpose of finding new antifungal strategies and improving the quality of life of patients with onychomycosis and dermatophytosis, the main objective of this study was to evaluate the antifungal activity of extracts obtained

from Kombucha made from different types of tea against *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. In addition, to assess the toxicity of these extracts in an in vivo model.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of SCOBY, teas, and Kombucha

The SCOBY used to prepare the Kombucha was donated by Casa Amarela Produtos Naturais (São José do Rio Preto, Brazil). It was added to one litre of sterile distilled water and 20g of sucrose (Synth®, Diadema, Brazil) and incubated at 25°C, for 7 days. This procedure was performed twice to remove traces of the original medium where it was produced. The SCOBY was then fragmented into parts of 20g each and added to the different teas: black – *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Amaya Chás®, Registro, Brazil); white – *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Kampo de Ervas®, Ribeirão Preto, Brazil); and green – *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Kampo de Ervas®, Ribeirão Preto, Brazil). These mixtures (teas and SCOBY) are called *starters*. They were incubated at 25°C for 20 days for initial fermentation.

Teas and Kombucha were prepared as previously described [9], with modifications. Four grams (4g) of black tea (BT), white tea (WT), and green tea (GT) were boiled separately in 450 mL of sterile mineral water for 5 minutes and filtered through sterile filter paper. In a beaker, the volume was adjusted to 800 mL with sterile mineral water at room temperature. Then, 80g of sucrose, 20g of SCOBY, and 160 ml of starter from the respective tea were added to each beaker.

These solutions were incubated at 25°C. To verify the influence of incubation time, they were incubated at 10, 20, and 30 days.

Preparation of the extracts

After each incubation period, the SCOBY was weighed to calculate the difference between the initial and final mass, followed by filtration by a Millipore® system, with a 0.45µm filter membrane.

The pH of the fermentations was measured with a pH indicator tape (MColorpHast®, Merck, Darmstadt, Germany) and the obtainment of extracts followed the methodology previously proposed [17], with modifications. The filtrates of each tea were subjected to liquid-liquid extraction by adding 96 mL of ethyl acetate (Synth®, Diadema, Brazil) as a counter-phase. The procedure was repeated twice for each Kombucha, allowing the total extraction of chemical compounds from Kombucha. The ethyl acetate phase was subjected to a rotary evaporator, for concentration of the purified extract. Dried extracts were diluted in 10% DMSO.

Pure white, black, and green teas extracts were also prepared to determine the influence of the SCOBY fermentation on the antifungal activity.

Kombucha extracts antifungal susceptibility testing

Two clinical isolates from onychomycosis were included in this study, one *Trichophyton rubrum* and one *Trichophyton mentagrophytes*. They were from the Microbiology Laboratory of the São José do Rio Preto Medical School (FAMERP).

The antifungal activity of WT, BT, and GT extracts were determined by the microdilution method, according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), document M38-A2, with modifications [20]. The inoculums were adjusted in a concentration of 0.4 to 5×10^4 cells/ml. Each extract was prepared in sterile distilled water at a concentration of $2000 \mu\text{g/mL}$ and serially diluted in a 96-well plate until the concentration of $15.62 \mu\text{g/mL}$. Controls included the extract solvent (10% DMSO) and RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) medium.

One hundred microlitres of inoculum was added to each well and the plate was incubated at 35°C , for 7 days. After incubation, readings were performed visually. The minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of the extract that resulted in 100% of inhibition of visible growth. Tests were performed in duplicate. The fungal isolates were also submitted to susceptibility testing against fluconazole, according to the document M38-A2 of CLSI [20], for comparison.

Toxicity Test on *Galleria mellonella* model

The toxicities of the Kombucha extract were analysed in an in vivo model of sixth-instar *G. mellonella* larvae (weighing 250 to 350 mg each), according to a methodology previously described [21]. The analysis included larvae bathed in aliquots of Kombucha and artificial inoculation into the larvae's haemolymph. For the first method, to assess surface toxicity, the larvae were bathed for 2s in each extract (BT, WT, and GT) at a concentration of (8 mg/mL). In the inoculation method, 5 μL of each Kombucha extract (8 mg/mL) was injected with a Hamilton 10 μL 7000.5 KH syringe into the larval hemocoel through the last right proleg.

Quaternary ammonium and PBS solutions were used as positive and negative controls, respectively. The larvae were incubated at 28°C, deprived of food and direct light. Every 12 hours, larvae were removed from the prepupae stage to delay their metamorphosis. Survival rate was analysed every 24 hours, and statistical analyses and graphs were generated by the log-rank method (Mantel-Cox) in Prism 5 software (GraphPad®).

Chromatographic analysis

The qualitative chemical composition of the Kombucha extracts were analysed by high performance liquid chromatography (HPLC). The chromatoplates were inspected using sulfuric anisaldehyde reagent, under ultraviolet light (wavelengths of 256 nm and 365 nm). The analyses were performed in a system equipped with a binary pump, autosampler column (Agilent® Technologies, Santa Clara, USA, model 1220 Infinity) and Zorbax Eclipse Plus C-18 column (4.6×250 mm, 5µm, Agilent® Technologies, Santa Clara, USA), using isocratic flow in methanol:water (3:1) at 1.0 mL/min. An aliquot of 20 µL of each sample was injected and analysed by a diode array detector at wavelengths from 250 nm to 800 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

Dermatophytosis, such as onychomycosis and superficial skin infections, are immensely common worldwide. These infections have a negative psychosocial impact and may cause inflammation and physical discomfort [22]. Treatment is often prolonged and ineffective. The number of classes of

antifungals is limited, and oral drugs may present side effects, including hepatotoxicity [23]. This study shows preliminary results demonstrating the antifungal activity of Kombucha tea extracts against dermatophytes commonly found in clinic. The search for new natural molecules and alternatives could result in better treatment options, with low toxicity, which could improve patient's quality of life.

Antifungal activity of Kombucha extracts

The pure tea extracts exhibited antifungal activity, with equal MIC values for *T. rubrum* and *T. mentagrophytes*, 250 µg/mL for white tea extract and 125 µg/mL for black and green teas extracts (Table 1). Antifungal activity of *Camellia* tea has been reported previously, including green tea extract against *T. mentagrophytes* [24]. However, great MIC range can be observed due to differences in methodology, including amount of tea used, type of leaves, extract preparation, etc.

Kombucha tea is also known to have antifungal activity against a variety of fungi, including *Candida*, *Malassezia*, and dermatophytes [17,18]. In this study, MIC values of Kombucha tea extracts ranged from 62.5 to 2000 µg/mL. Considering the type of tea, green tea exhibited the lowest mean MIC value, (geometric mean – GM – of 125 µg/mL), while black tea had lower activity (GM 222.7 µg/mL). Concerning time of fermentation, a 10-days period exhibited better activity (GM 111.3 µg/mL), in relation to 20-days (GM 250 µg/mL), 30-days (GM 176.8 µg/mL), or pure tea extracts (GM 157.5 µg/mL).

The 10-days fermentation extracts showed the same MIC values for *T. mentagrophytes* (250 µg/mL for WT and 125 µg/mL for BT and GT). For *T. rubrum*, antifungal activity was higher, with MIC values of 125 µg/mL for WT and 62.5 µg/mL for BT and GT. For 20-days fermentation extracts, results varied according to the tea of origin. The activity improved when the extracts were from white tea Kombucha, but less activity was observed for black and green teas (Table 1). MIC values for 30-days fermentation extracts were equal or higher than the pure tea extracts, except for the black tea against *T. rubrum*, which was 125 µg/mL, for pure tea, and 62.5 µg/mL, for Kombucha tea extract.

[Table 1]

Kombucha fermentation time is often reported to be between 8 and 14 days [5, 7, 9, 17]. The literature reports, and it is corroborated here, the fermented Kombucha extract has the potential to show a higher activity than the unfermented beverage [25]. However, it has also been postulated that the antifungal activity of Kombucha tea decreases with longer periods of fermentation [18]. We could also observe this, where 10-days extracts showed the best activities. Metabolites and cell concentration vary during fermentation [9]. Consequently, time of fermentation plays an important role in Kombucha antimicrobial activity.

The antifungal activity of the extracts was better on *T. rubrum* than on *T. mentagrophytes*. Geometric mean MIC values were 222.7 µg/mL for *T. mentagrophytes*, and 125 µg/mL for *T. rubrum*. The high proteolytic activity of *T.*

mentagrophytes is a virulence factor that helps in the fast mycelial growth of this fungus [26]. This fact may help justify the difference in MIC values for *T. mentagrophytes* and *T. rubrum*.

Moreover, fluconazole susceptibility testing showed different MIC values for *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* (1 µg/mL and 32 µg/mL, respectively). This characteristic, and the origin of the isolates (patient status, anatomical site of the infection, prior exposure of antifungal drugs or steroids), can also influence the difference of susceptibility of the isolates against the Kombucha tea extracts.

***Galleria mellonella* Toxicity Test**

None of the superficial toxicity tests (bathed *G. mellonella* larvae) showed toxicity, i.e., all larvae remained alive after five days. For the inoculation tests, extracts from black and green tea Kombucha also did not show toxicity. These results corroborate the findings by [27]. However, extracts from white tea Kombucha presented toxicity, killing more than 50% of the larvae within five days (Figure 1).

[Figure 1]

Due to its similarity to the innate immune system of insects and mammals, *G. mellonella* larvae have been used to assess virulence of microorganisms, as well as the toxicity of new antimicrobial compounds, as an alternative to mammalian models [28]. The non-toxicity of black and green tea Kombucha extracts on *G. mellonella* is promising for their use in the control of

onychomycosis and dermatophytosis. Regarding white tea Kombucha extracts, further testing is necessary to verify its toxicity to humans.

Analysis of the chromatographic profile by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) of Kombucha extracts

The extracts, including pure tea and Kombucha tea extracts, were submitted to HPLC analysis in lengths between 200 and 800 nm. The wavelength at 254 nm was selected to evaluate the chromatographic profile of the extracts as there was greater absorption in this spectral region. The chromatographic composition of the extracts can be seen on Figure 2.

[Figure 2]

HPLC analysis for pure white tea (pure WT) showed major chromatographic peaks in retention times between 15 and 20 min, with maximum absorptions between 1750 and 2000 mAU; and between 25 and 30 min with absorptions peaks between 250 and 500 mAU. In 10-days fermentation extracts (WT 10), chromatographic analysis showed chromatographic peaks at retention times of 10 to 15 min with maximum absorption of 400 to 500 mAU, indicating more polar metabolites than those observed in pure WT. In addition, there was a chromatographic peak in the retention time interval between 20 and 25 min, with maximum absorptions between 700 and 800 mAU; and a peak in the interval of 30 to 35 min with maximum absorption of approximately 50 mAU. Chromatographic peaks seen on pure WT were also seen on WT 10 (retention

times between 15 and 20 min, and 25 and 30 min), however, on the latter, with lower absorption peaks (Figure 2B).

In 20-days and 30-days fermentation white tea Kombucha (WT 20 and WT 30), chromatographic profiles were similar to WT 10. However, some chromatographic peaks appeared at longer retention times (35 to 65 min), characterizing the formation of more hydrophobic metabolites (Figures 2C and 2D).

Chromatographic profiles from the extracts from the other teas were comparable to the ones from white tea Kombucha (Figure 2). These teas showed a similar composition, especially demonstrated by the peaks in retention times between 15 and 20 min. Moreover, these peaks were consistent in all black and green tea extracts after incubation periods of 10 to 30 days. In black and green teas extracts, similarly to white tea extracts, longer incubation periods resulted in the formation of new peaks, which is expected due to the fermentation process and the appearance of minor metabolites. New peaks with longer retention times have more hydrophobic characteristics, while shorter retention times reveal less hydrophobic characteristics. Unfortunately, no correlation could be made between the peaks in chromatographs and the inhibitory activity of the extracts.

The future perspective to this study is to select the best extracts, considering antimicrobial activity and toxicity. In addition, to isolate and identify the active compounds, test a larger set of species and isolates, assess the activity of the extracts against fungal biofilms, and to perform drug interaction assays to determine if there are synergistic effects with the available antifungal drugs.

CONCLUSIONS

All Kombucha extracts tested showed antifungal activity against the *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* included in this study. The best activities were observed for green tea Kombucha and 10-days fermentation extracts. Green and black tea Kombucha extracts did not present toxicity, according to the methodology used. Further testing is necessary to reveal the active compounds of the extracts and the best way to include them in a treatment regime. However, this preliminary study shows promising results for the obtention of natural molecules with antifungal activity.

ACKNOWLEDGEMENTS

MTGA would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development – CNPq Brazil (grant 307297/2019-5).

DECLARATIONS

Funding. No funding was received for conducting this study.

Conflicts of interest. The authors declare there are no conflicts of interest.

Ethics approval. Not applicable.

Consent to participate. The authors consented to participate in this study.

Consent for publication. The authors consent to the publication of this study.

Availability of data and material. All data generated or analysed during this study are included in this published article.

Code availability. Not applicable.

Author contributions

REFERENCES

1. Jayabalan R, Malbasa RV, Loncar ES, Vitas JS, Sathishkumar M (2014) A review on Kombucha tea - microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 13(4):538-550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
2. Marsh AJ, O'Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD (2014) Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiol* 38:171-178. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003>
3. Baschali A, Tsakalidou E, Kyriacou A, Karavasiloglou N, Matalas AL (2017) Traditional low-alcoholic and non-alcoholic fermented beverages consumed in European countries: a neglected food group. *Nutr Res Rev* 30(1):1-24. <https://doi.org/10.1017/S0954422416000202>.
4. Roos JD, Vuyst LD (2018) Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Curr Opin Biotechnol* 49:115-119. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.007>
5. Coton M, Pawtowski A, Taminiau B, Burgaud G, Deniel F, Coulloume-Labarthe L, Fall A, Daube G, Coton E (2017) Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiol Ecol* 93(5):fix048. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix048>

6. Primiani CN, Pujiati, Mumtahanah M, Ardhi W (2018) Kombucha fermentation test used for various types of herbal teas. J Phys Conf Ser **1025**:012073. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1025/1/012073>
7. Filippis FD, Troise AD, Vitaglione P, Ercolini D (2018) Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. Food Microbiol 73:11-16. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.008>
8. Battikh H, Bakhrouf A, Ammar E (2012) Antimicrobial effect of Kombucha analogues. LWT - Food Science and Technology 47:71-77. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.12.033>
9. Chen C, Liu BY (2000) Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. J Appl Microbiol 89(5):834-9. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01188.x>
10. Jayabalan R, Chen PN, Hsieh YS, Prabhakaran K, Pitchai P, Marimuthu S, Thangaraj P, Swaminathan K, Yun SE (2011) Effect of solvent fractions of kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells - characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidene) malonate and vitexin. Indian J Biotechnol 10:75-82.
11. Aloulou A, Hamden K, Elloumi D, Ali MB, Hargafi K, Jaouadi B, Ayadi F, Elfeki A, Ammar E (2012) Hypoglycemic and antilipidemic properties of Kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. BMC Complement Altern Med 16:12-63. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-63>
12. Banerjee D, Hassarajani AS, Maity B, Narayan G, Bandyopadhyay SK, Chattopadhyay S (2010) Comparative healing property of Kombucha tea

and black tea against indomethacin-induced gastric ulceration in mice: possible mechanism of action. *Food Funct* 1(3):284-293. <http://dx.doi.org/10.1039/C0FO00025F>

13. Yang ZW, Ji BP, Zhou F, Li B, Luo Y, Yang L, Li T (2009) Hypcholesterolaemic and antioxidant effects of Kombucha tea in high-cholesterol fed mice. *J Sci Food Agric* 89:150-156. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3422>
14. Ram MS, Anju B, Pauline T, Dipti P, Kain AK, Mongia SS, Sharma SK, Singh B, Singh R, Ilavazhagan G, Kumar D, Selvamurthy W (2000) Effect of Kombucha tea on chromate(VI)-induced oxidative stress in albino rats. *J Ethnopharmacol* 71(1-2):235-40.
15. Leal JM, Suárez LV, Jayabalan R, Oros JH, Escalante-Aburto A (2018) A review on health benefits of Kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA - J Food* 16(1):390-399. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>
16. Santos-Júnior RJS, Batista RA, Rodrigues AS, Filho LX, Lima AS (2009) Antimicrobial activity of broth fermented with Kombucha colonies. *J Microb Biochem Technol* 1:072-078. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000014>
17. Mahmoudi E, Saeidi M, Marashi MA, Moafi A, Mahmoodi V, Zeinolabedini Zamani M (2016) In vitro activity of Kombucha tea ethyl acetate fraction against *Malassezia* species isolated from seborrhoeic dermatites. *Curr Med Mycol* 2(4):30-36. <https://doi.org/10.18869/acadpub.cmm.2.4.30>

18. Yuniarto A, Anggadiredja K, Aqidah RAN (2016) Antifungal activity of Kombucha tea against human pathogenic fungi. *Asian J Pharm Clin Res* 9(5):253-255.
19. Angelo T, Borgheti-Cardoso LN, Gelfuso GM, Taveira SF, Gratieri T (2017) Chemical and physical strategies in onychomycosis topical treatment: a review. *Med Mycol J* 55:461–475. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw084>
20. Clinical Laboratory and Standards Institute (2008) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard—Second Edition document M38-A2 *Clin Lab Stand Inst* 28:29.
21. Gottardo B, Lemes TH, Byzynski G, Paziani MH, von-Zeska-Kress MR, Almeida MTG, Volanti DP (2019) One-Pot synthesis and antifungal activity of nontoxic silver-loaded hydroxyapatite nanocomposites against *Candida* species. *ACS Appl Nano Mater* 2:2112–2120. <https://doi.org/10.1021/acsanm.9b00091>
22. Urban K, Chu S, Scheufele C, Giese RL, Mehrmal S, Uppal P, Delost GR (2020) The global, regional, and national burden of fungal skin diseases in 195 countries and territories: A cross-sectional analysis from the Global Burden of Disease Study. *JAAD* 2:22-27. <https://doi.org/10.1016/J.JDIN.2020.10.003>
23. Hay R (2018) Therapy of skin, hair and nail fungal infections. *J Fungi* 4(3):99. <https://doi.org/10.3390/JOF4030099>

24. Cheruiyot SE, Muturi M, Bii C (2015) Antifungal activities of *Camellia sinensis* crude extract on selected pathogenic and mycotoxic fungi. J Bacteriol Mycol 2(2):1015.
25. Al-Mohammadi AR, Ismaiel AA, Ibrahim RA, Moustafa AH, Zeid AA, Enan G (2021) Chemical constitution and antimicrobial activity of Kombucha fermented beverage. Mol 26(16):5026.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES26165026>
26. Pakshir K, Mohamadi T, Khodadadi H, Motamedifar M, Zomorodian K, Alipour S, Motamedi M (2016) Proteolytic activity and cooperative hemolytic effect of dermatophytes with different species of bacteria. Curr Med Mycol 2(4):9-14. <https://doi.org/10.18869/acadpub.cmm.2.4.9>
27. Silva KA, Uekane TM, Miranda JF, Ruiz LF, Motta JCB, Silva CB, Pitangui NS, Gonzalez AGM, Fernandes FF, Lima AR (2021) Kombucha beverage from non-conventional edible plant infusion and green tea: Characterization, toxicity, antioxidant activities and antimicrobial properties. Biocatal Agric Biotechnol 34:102032.
<https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2021.102032>
28. Binder U, Maurer E, Lass-Florl (2016) *Galleria mellonella*: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species. Fungal Biol 120(2):288-295.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2015.06.002>

Table 1: MIC values ($\mu\text{g/mL}$) of each Kombucha tea extract, with different times of fermentation, against *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum*

Tea	Fermentation Days	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	
		<i>T.</i> <i>mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>
White	0 (pure)	250	250
	10	250	125
	20	125	62,5
	30	500	250
Black	0 (pure)	125	125
	10	125	62,5
	20	2000	1000
	30	125	62,5
Green	0 (pure)	125	125
	10	125	62,5
	20	250	62,5
	30	250	125

Fig. 1 In vivo toxicity evaluation of Kombucha tea extracts. *Galleria mellonella* larvae survival rate after inoculation of the extracts. PBS: negative control (non-toxic compound), Toxic compound: positive control, BT: black tea Kombucha extract, GT: green tea Kombucha extract, WT: white tea Kombucha extract. Numbers correspond to days of fermentation

Fig. 2 Chromatographic profiles obtained at 254 nm by high performance liquid chromatography of pure tea extracts (no fermentation), and white (WT), black (BT), and green (GT) tea Kombucha extracts. (a) pure tea extracts, (b) 10-days fermentation extracts, (c) 20-days fermentation extracts, and (d) 30-days fermentation extracts.

Apêndice B: Short Communication submetido no periódico Mycologia

***S Kombucha* extract against *Candida auris*.**

In vitro* antifungal activity of black tea *Kombucha* extract against the emerging pathogen *Candida auris

Natalia Seron Brizzotti-Mazuchi^a, Thiago Henrique Lemes^b, João Paulo Zen Siqueira^a, Mariela Domiciano Ribeiro-Marques^a, Taiza Maschio-Lima^b, Julyanna Andrade Silva Nascentes^b, Luís Octávio Regasini^b, Elza Maria Castilho^a, and Margarete Teresa Gottardo de Almeida^a

^a*Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, Brazil;* ^b*Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, Brazil*

Corresponding author:

Natalia Seron Brizzotti-Mazuchi

Department of Dermatological, Infectious, and Parasitic Diseases

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP).

5416 Brigadeiro Faria Lima Ave., 15090-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

Telephone: +55 17 3201 5920

E-mail: bionath@hotmail.com

Abstract: The multidrug-resistant *Candida auris* is an outbreak risk in health facilities. Treatment failure and low efficacy of disinfection methods present a challenge to controlling the dissemination of this pathogen. This study aimed to evaluate the antifungal activity of black tea *Kombucha* extracts against two isolates of *C. auris*. *Kombucha* is a fermented beverage with several beneficial effects, including antimicrobial properties. The minimum inhibitory concentrations of *Kombucha* extracts were 0.2 µg/ml against *C. auris* CBS 10913 and 0.4 µg/ml for a clinical isolate. Susceptibility testing against common antifungals showed that these isolates were resistant to fluconazole, terbinafine, and ketoconazole. Further investigation is needed, particularly to determine the composition of the extracts. However, these results show the potential use of black tea extract *Kombucha* against the emerging pathogen *C. auris*.

Keywords: *Candida auris*; *Kombucha*; drug resistance; antifungal activity.

Introduction: *Candida* species are the most critical fungal agents of nosocomial infections, with a mortality rate exceeding 40%. In the last years, *Candida auris* has gained the attention of great concern to public health services, being responsible for opportunistic invasive infections and outbreaks. In addition to being easily dispersed in healthcare environments, this organism usually presents resistance profiles to multiple antifungal classes (Forsberg et al. 2019; Lone and Ahmad 2019). Since its description in 2009 in Japan, *C. auris* infections have been reported in over 40 countries. The multidrug resistance associated with high virulence and prolonged surface survival makes this microorganism hard to manage and control (Du et al. 2020).

Kombucha is traditionally produced by fermentation of black tea leaves (*Camellia sinensis*) and sugar by a starter culture called Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast (SCOBY). The microbial composition of the SCOBY varies depending on the location, climate, and origin of the inoculum example (Jayabalan et al. 2014).

Among the many beneficial effects, the antimicrobial potential of black tea *Kombucha* and its metabolites have been investigated against several microorganisms, including *Staphylococcus aureus*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Helicobacter pylori*, and *Candida albicans*. These results evidence possible prophylactic and therapeutic applications (Al-Mohammadi et al. 2021).

Due to the lack of effective decontamination methods and environmental disinfectants, the challenge of controlling the spread of *C. auris* remains. Consequently, the search for new strategies to manage this pathogen is necessary. This study aimed to evaluate the antifungal activity of black tea *Kombucha* extract against *Candida auris*.

Materials and methods

Preparation of black tea *Kombucha*: The black tea *Kombucha* was prepared according to Chen and Liu (2000), with modifications. Four grams of black tea were boiled in 450 ml of mineral water for five minutes and then filtered through a sterile paper filter. For the *Kombucha* preparation, 80 g of sucrose, 160 ml of black tea, and 20 g of SCOBY (Casa Amarela®, São José do Rio Preto, Brazil) were added to a glass beaker, with the volume adjusted to 800 ml with mineral

water. This mixture was incubated at 25 °C for ten days. As a control, pure black tea was prepared in the same conditions but without the SCOBY.

Obtention of black tea *Kombucha* extracts: After incubation (fermentation period), the black tea *Kombucha* was filtered through a Millipore® system with a 0.45 µm membrane. The filtrate was submitted to liquid-liquid extraction, with 96 ml of ethyl acetate (Synth®, Diadema, Brazil) as a counter phase. This procedure was performed twice, allowing total extraction of the chemical compounds of the black tea *Kombucha*. The ethyl acetate phase was then subjected to a rotary evaporator to obtain the concentrated extract. The dried extracts were diluted in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO).

Antifungal susceptibility testing of the extracts: This study tested two isolates of *Candida auris*: a reference strain (CBS 10913) and a clinical isolate. The antifungal activity of the extracts was assessed by a microdilution method, considering the protocol M27-A3 of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2008). Microplates were prepared with RPMI medium and the extracts, with final concentrations on the wells ranging from 125 to 0.1 µg/ml. Inoculums prepared at a concentration of 5×10^2 to 2.5×10^3 cells/mL were added to the microplates and incubated at 35 °C for 24 h. The MIC was defined as the lowest concentration of the extracts that inhibited visible growth.

For minimum fungicidal concentration (MFC) determination, an aliquot of each well that showed antifungal activity was inoculated in a Sabouraud-dextrose agar plate (Difco®, Detroit, USA) and incubated at 35 °C. The MFC was defined

as the lowest concentration of the extract that did not allow visible growth on the solid medium. All tests were performed in duplicate.

Antifungal susceptibility testing of conventional drugs: The *C. auris* isolates were tested against fluconazole, itraconazole, ketoconazole, amphotericin B, and terbinafine (Sigma-Aldrich®) by microdilution method, following the M27-A3 protocol of the CLSI (CLSI 2008).

Results: The black tea *Kombucha* extract was obtained by liquid-liquid extraction with ethyl acetate. Serial dilutions were tested against two isolates of *Candida auris*. The minimum inhibitory concentrations (MIC) were 0.2 µg/ml for the *C. auris* CBS 10913 (a reference strain) and 0.4 µg/ml for a clinical *C. auris* isolate. As a control, pure black tea extracts (not fermented) were tested against the isolates, presenting MIC of 0.4 µg/ml for the *C. auris* CBS 10913 and 0.9 µg/ml for the clinical isolate.

The minimum fungicidal concentrations (MFC) evaluated showed values of 125 µg/mL for the CBS strain and >125 µg/mL for the clinical isolate. The same values were observed for the pure black tea extract. These results indicate a fungistatic activity of the extracts over *C. auris*.

For the susceptibility testing against commonly used antifungal drugs, the clinical isolate of *C. auris* showed high MIC values for fluconazole (128 µg/ml), terbinafine (4 µg/ml), and ketoconazole (2 µg/ml). Lower MIC values were obtained for amphotericin B (0.5 µg/ml) and itraconazole (0.25 µg/ml). In general, the CBS reference strain showed lower MIC values in comparison to the clinical strain,

except for fluconazole (128 µg/ml) and amphotericin B (0.5 µg/ml): terbinafine, 0.125 µg/ml; ketoconazole, 0.06 µg/ml; itraconazole, 0.03 µg/ml.

Discussion: Currently, there are no established susceptibility breakpoints for *C. auris*. However, the CDC (Center for Disease Control and Prevention, USA) provides tentative susceptibility breakpoints for fluconazole and amphotericin B (CDC 2020). Based on that, both isolates of *C. auris* tested here were resistant to fluconazole. Fluconazole resistance in *C. auris* is attributed to point mutations on the ERG11 gene, responsible for ergosterol synthesis, and can be present in up to 90 % of the isolates (Lockhart et al., 2017; Du et al. 2020; Rybak et al. 2020). In addition, in agreement with other studies (Chowdhary et al. 2018; Igunza et al. 2019), terbinafine and ketoconazole also showed low activity against the clinical isolate.

Multidrug resistance in *Candida auris* is a known event. High MICs have been observed for the main classes of antifungal drugs (azoles, echinocandins, polyenes, and nucleoside analogs) (Chaabane et al. 2019). Consequently, it leads to high rates of therapeutic failure. These characteristics highlight the need for new strategies against this pathogen.

Kombucha tea has gained popularity in the last few years because of its beneficial properties. The metabolites produced during fermentation are responsible for antimicrobial activity against several pathogens, including bacteria and fungi (Al-Mohammadi et al. 2021).

The antifungal activity observed in this study may be attributed to polyphenols present in the black tea *Kombucha*. Sitheeque et al. (2009) showed

the activity of catechin and theaflavin polyphenols against several *Candida* species. The MIC obtained against *C. albicans* was 6.25 mg/ml, much greater than the values for *C. auris*. These results suggest that other molecules may act synergically, improving the extract activity.

Another possible component responsible for the *C. auris* activity is acetic acid, one of the leading products of fermentation, and the phenolic compounds in black tea. Acetic acid can interact with electrophiles and nucleophiles in the cells, leading to the inhibition of cell wall, protein, and DNA synthesis, as well as suppression of metabolic pathways and interference with cell membrane integrity (Al-Mohammadi et al. 2021).

Differences in the starter culture composition, time of fermentation, and the tea substrate may cause essential changes in the *Kombucha* activity. Consequently, further investigation is needed to identify the essential compounds present in the tested extracts. Additional testing required also includes different *Candida* isolates, which can help establish the different activity among species, toxicity testing, and drug combination testing with existing drugs. Nevertheless, the results showed in this study certify the antimicrobial activity of black tea *Kombucha*. In the future, new therapeutic approaches could include using these extracts alone or in combination with other drugs.

This study shows the antifungal activity of black tea *Kombucha* extract against the emerging pathogen *Candida auris*. Although pure black tea extract also showed activity, the *Kombucha* exhibited higher activity against the two isolates tested. These results encourage the investigation of the active components of the extracts, as well as their mode of action, toxicity, and

combination with existing drugs, which could help with the battle against the dissemination of this multidrug-resistant pathogen, *Candida auris*.

Declaration of Interest Statement

Funding. Any funding agency did not explicitly support this work.

Disclosure statement. The authors report that there are no competing interests to declare.

References

Al-Mohammadi AR, Ismaiel, AA, Ibrahim RA, Moustafa AH, Abou Zeid A, Enan G. 2021. Chemical constitution and antimicrobial activity of *Kombucha* fermented beverage. *Molecules* 26:5026.

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2020. *Candida auris* – Antifungal Susceptibility Testing and Interpretation. USA, [accessed 2021 Dec 14].

Chaabane F, Graf A, Jequier L, Coste AT. 2019. Review on antifungal resistance mechanisms in the emerging pathogen *Candida auris*. *Frontiers in Microbiology* 10:2788.

Chen C, Liu BY. 2000. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal Applied of Microbiology* 89(5):834–839.

Chowdhary A, Prakash A, Sharma C, Kordalewska M, Kumar A, Sarma S, Tarai B, Singh A, Upadhyaya G, Upadhyay S, et al. 2018. A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009–17) in India: role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 78:891–899.

[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard—third edition. CLSI document M27-A3. Wayne (PA).

Du H, Bing J, Hu T, Ennis CL, Nobile CJ, Huang G. 2020. *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. PLoS Pathogens 16(10):e1008921.

Forsberg K, Woodworth K, Walters M, Berkow¹ EL, Jackson B, Chiller T, Vallabhaneni¹ S. 2019. *Candida auris*: The recent emergence of a multidrug-resistant fungal pathogen. Medical Mycology 57(1):1-12

Igunza OF, Ngeranwa J, Orinda G, Peter M. 2019. In vitro modulation of clotrimazole, ketoconazole, nystatin, amphotericin B and griseofulvin by *Acmella caulirhiza* and *Senna didymobotrya* extract against *Candida* spp. Journal of Applied Biosciences 142:14478–14508.

Jayabalan R, Malbasa RV, Loncar ES, Vitas JS. 2014. A review on *Kombucha* tea—Microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 13:538–550.

Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP, Colombo AL, Calvo B, Cuomo CA, Desjardins CA, et al. 2017. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. Clinical Infectious Diseases 64(2):134–140.

Lone SA, Ahmad A. 2019. *Candida auris*—the growing menace to global health. Mycoses 62(8):620–637.

Rybak JM, Muñoz JF, Barker KS, Parker JE, Esquivel BD, Berkow EL, Lockhart SR, Gade L, Palmer GE, White TC, et al. 2020. Mutations in *TAC1B*: A novel genetic determinant of clinical fluconazole resistance in *Candida auris*. *mBio* 11(3):e00365-20.

Sitheequ MAM, Panagoda GJ, Yau J, Amarakoon AMT, Udagama URN, Samaranayake LP 2009. Antifungal activity of black tea polyphenols (catechins and theaflavins) against *Candida* species. *Chemotherapy* 55(3):189–196.

ANEXOS

Anexo 1: Tabela com número e origem das cepas clínicas e ATCCs

Fungo	Cepas	Origem	Fluconazol CIM (µg/mL)
<i>T. rubrum</i>	6195	Unha	2
	7614	Unha	2
	7636	Unha	4
	7604	Unha	2
	7609	Unha	2
	CBS 118892	Pele	2
<i>T. mentagrophytes</i>	7606	Pele	8
	7405	Unha	16
	6007	Pele	64
	7389	Unha	32
	7362	Unha	32
	ATCC 11480	Unha	1
<i>E. floccosum</i>	6068	Pele	8
	6050	Unha	4
	6117	Unha	2
	7331	Unha	1
	6069	Pele	2
<i>M. canis</i>	7259	Couro Cabeludo	4
	7094	Couro Cabeludo	2
	7134	Couro Cabeludo	4
	7171	Couro Cabeludo	4
	7507	Biópsia	2
	ATCC 9865	Gato	4