

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE KOMBUCHA ELABORADO A PARTIR DE CHÁ VERDE (*CAMELLIA SINENSIS*)

JÚLIA SOMMER CANABARRO¹; AMANDA RADMANN BERGMANN²;
FRANCIELE NUNES VITÓRIA³; SIMONE PIENIZ⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – juliasommerc@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – amandarbergmann@outlook.com

³Universidade Federal de Pelotas – fraannv2012@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – nutrisimone@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Durante séculos o chá vem sendo consumido no mundo todo por ser uma bebida saudável. Ao falar de alimentos funcionais, a planta *Camellia sinensis* tem sido muito investigada devido aos seus efeitos terapêuticos, sobretudo por seu conteúdo específico de flavonoides (PIETTA, 2010). Por esta razão, suas folhas são utilizadas para a produção de dois principais tipos de chá, o chá preto e o chá verde.

O chá verde é produzido das folhas frescas da planta, após uma rápida inativação da enzima polifenol oxidase, o que mantém preservado seu teor de polifenóis, o que o torna mais rico em catequinas do que o chá preto (CABRERA et al., 2006).

Kombucha é uma bebida de origem oriental feita a partir da fermentação de chá preto açucarado com uma cultura simbiótica de leveduras e bactérias. O produto final resulta em um líquido levemente adocicado, carbonatado e ácido (GREENWALT et al., 2000). A fermentação do chá ocorre por ação do *scooby*, uma colônia flutuante de bactérias e leveduras, as quais produzem um tapete de celulose flutuante durante o crescimento microbiano, o que facilita a aeração das bactérias aeróbias (ASAI, 1968). De acordo com a literatura de kombucha, o ácido acético é considerado responsável pelo efeito inibitório para uma série de micro-organismos testados (SREERAMULU; ZHU e KNOL, 2000). Segundo Arakawa et al. (2004) as catequinas apresentam ação bactericida devido à sua geração de peróxido de hidrogênio, sendo que a maior atividade antimicrobiana do chá é devido à presença de catequinas e polifenóis que danificam a membrana celular bacteriana. Devido à associação das bactérias patogênicas com diversas comorbidades e mortalidades nos dias atuais, torna-se essencial buscar métodos alternativos ao combate destas infecções, tais como o chá kombucha. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo analisar a atividade antimicrobiana do chá kombucha, em diferentes tempos de fermentação frente a bactérias patogênicas de importância alimentar.

2. METODOLOGIA

Para realizar as análises foram elaborados três extratos: chá verde (*Camellia sinensis*) *in natura*, chá artesanal (KA) e outro chá denominado industrial (KI).

Preparação dos extratos

O extrato de chá verde (*in natura*) foi preparado a partir da infusão de dois sachês – aproximadamente 10g – de chá verde, obtido comercialmente, em 400ml de água fervente; as amostras permaneceram em infusão por 20 minutos.

Após o resfriamento a temperatura ambiente, o extrato foi filtrado em membrana Millipore com 0,22µm de diâmetro de poro e armazenado em eppendorf estéril. O chá KA foi preparado em triplicata a partir da infusão de 2 sachês – aproximadamente 10g – de chá verde, obtido comercialmente, em 500ml de água fervente e 25g de açúcar refinado, homogeneizado em seguida. Após, estas foram deixadas em infusão, à temperatura ambiente, até que retornassem a temperatura ambiente (25°C±2). Após o resfriamento, foi adicionado o *scooby* – uma colônia flutuante de bactérias e leveduras (~5x5cm) em cada uma das três amostras. Por fim, foi acrescentado 1 colher de sobremesa de vinagre branco de maçã às triplicatas igualmente. Todas as amostras foram recobertas com papel filtro a fim de permitir a aeração e fermentação das mesmas durante os tempos de fermentação propostos (7, 14 e 21 dias). O chá KI foi preparado em triplicata a partir da infusão de dois sachês – aproximadamente 10g – de chá verde, obtido comercialmente, em 400ml de água fervente; as amostras permaneceram em infusão por 20 minutos e, então, adoçadas com 20g de sacarose cada. As infusões foram então filtradas usando papel filtro e, posteriormente, 200ml de chá açucarado filtrado foram vertidos em um balão Erlenmeyer de 500ml, seguido de esterilização a 115°C, durante 15 minutos. Após a obtenção da infusão a temperatura ambiente, foi adicionado às amostras o *scooby* formado a partir de fermentações anteriores (~5x5cm). O frasco contendo o chá e o *scooby* foi cuidadosamente coberto com papel filtro, e transferido para um equipamento de banho maria com agitação interna (100 rpm) a 30°C, durante 96 horas.

Isolamento dos micro-organismos dos chás kombucha artesanal e industrial

O isolamento das bactérias e leveduras presentes nos chás KA e KI foi realizado a partir da produção dos seus extratos, nos quais posteriormente, foram realizadas diluições seriadas da amostra homogeneizada até a diluição 10⁻⁵. Para isolamento das bactérias ácido lácticas, foi realizada a inoculação em superfície de 0,1mL de cada diluição em placas de petri estéreis com o ágar Man Rogosa Sharpe (MRS), e para o isolamento de leveduras utilizou-se o ágar Batata Dextrose (BDA). O pré-inóculo foi realizado em tubos de ensaio contendo 10mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e uma alçada das bactérias e/ou leveduras isoladas obtidas de ambas os isolamentos provenientes de placas contendo MRS e/ou BDA. O sobrenadante livre de células foi utilizado para a realização dos testes da atividade antimicrobiana.

Micro-organismos indicadores

Os micro-organismos indicadores utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana foram: *Escherichia coli* ATCC 8739; *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076; *Listeria monocytogenes* ATCC 19114; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar por disco

Uma alíquota de 20µL do sobrenadante das culturas isoladas de ambos os chás foi aplicada sobre discos de celulose esterilizados alocados em placas de BHA previamente inoculados com uma cultura de cada bactéria indicadora. Da mesma forma, 20µL do extrato de chá verde foi aplicado sobre os discos de papel filtro. As zonas de inibição foram medidas após 24 horas. Foram considerados inibitórios os halos que apresentaram diâmetro ≥ a 7mm (BROMBERG et al., 2006).

Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar

Cinco microlitros (5µL) do sobrenadante livre de células de cada micro-organismo isolado de ambos os chás (KA e KI) foram adicionados sobre placas contendo ágar MRS e/ou BDA e, após a secagem do extrato do sobrenadante,

adicionado ágar BHA contendo 10^5 UFC.mL⁻¹ dos micro-organismos indicadores. Da mesma forma, 5µL do extrato de chá verde foi aplicado sobre as placas de cultivo. A atividade antimicrobiana foi considerada pela produção de halos de inibição ≥ 2 mm de diâmetro (IVANOVA et al., 1998).

Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar por poços

Poços de aproximadamente 5mm foram perfurados em placas de petri contendo BHA, inoculadas com 1% da suspensão das cepas patogênicas. Posteriormente, foram inoculados nos poços 35µL do sobrenadante de cada micro-organismo isolado em ambos os chás kombuch. Da mesma forma, 35µL do extrato de chá verde foi aplicado sobre os poços. O antagonismo foi detectado pela formação de um halo de inibição em torno dos poços (HARRIS et al., 1989).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da atividade antimicrobiana dos chás foi realizada sob diferentes perspectivas: primeiro, para avaliar a atividade antimicrobiana do chá verde *in natura*; segundo: do chá KA e KI; e terceiro: das bactérias ácido lácticas e leveduras presentes em ambos os chás (KA e KI). Ao avaliar a atividade antimicrobiana pelo teste de difusão por ágar em disco, observou-se atividade antimicrobiana tanto pelo extrato de chá KA quanto KI frente ao micro-organismo indicador *S. aureus*, e inibição contra o micro-organismo *L. monocytogenes* somente quando analisado o chá KA. O chá verde *in natura* não desempenhou nenhuma atividade antimicrobiana.

No teste de difusão por ágar, observou-se atividade antimicrobiana exercida pelo chá verde frente a três dos quatro micro-organismos testados, com exceção de *S. Enteritidis*. Já os chás KA e KI, desempenharam atividade antimicrobiana apenas contra *S. aureus*. No teste de difusão em ágar por poços, observou-se que o extrato de chá verde *in natura* e o chá KI desempenharam atividade antagonista frente aos quatro micro-organismos indicadores analisados, porém o chá KA demonstrou atividade antimicrobiana somente frente a *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *S. Enteritidis*. Em estudos desenvolvidos por Sreeramulu et al. (2000) ressalta-se que a eficácia antimicrobiana do chá kombucha ocorre tanto para micro-organismos Gram-positivos quanto Gram-negativos, e que esta atividade é atribuível à presença de ácidos orgânicos produzidos durante sua fermentação.

Quando analisada a atividade antimicrobiana utilizando-se os extratos de micro-organismos isolados dos chás (*in natura*, KA e KI), obteve-se os seguintes resultados: no teste de difusão em ágar em disco, todos os extratos de bactérias e leveduras apresentaram atividade antimicrobiana frente a três dos quatro micro-organismos testados, com exceção de *S. Enteritidis*. Pelo método de difusão por ágar, todos os extratos de micro-organismos isolados exerceram atividade antimicrobiana frente à todos os micro-organismos testados, bem como no método de difusão por ágar em poços. Estes resultados podem estar atrelados ao fato de que tais bactérias e leveduras são consideradas probióticas e, por isso, naturalmente exercem efeito antimicrobiano, no qual engloba-se a produção de substâncias como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e bacteriocinas, além da competição por nutrientes e sítios de adesão (CHICAIZA, 2014). Cheng et al. (2003) demonstraram como os ácidos orgânicos – ácido acético, ácido propiônico e ácido láctico – influenciam no crescimento e desenvolvimento de *E. coli* O157:H7. Destacam ainda que, o ácido láctico exerce maior efeito inibitório do que o ácido acético e propiônico contra patógenos, mas que a combinação dos mesmos exerce um efeito sinérgico relevante na inibição

deste patógeno, o que pode justificar o resultado encontrado neste estudo, visto que a composição da colônia (*scooby*) utilizada na fermentação dos chás kombucha contém possivelmente, predominância de bactérias produtoras de ácido acético e ácido glucônico.

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a fermentação do chá acentuou o efeito antimicrobiano provavelmente devido à redução do pH e aumento da produção de ácidos orgânicos. Além disso, observou-se maior atividade antimicrobiana proveniente das bactérias ácido lácticas e leveduras isoladas de ambos os chás quando comparados aos extratos de chá verde *in natura*, KA e KI. Embora tenha havido inibição de todos os gêneros, os mais suscetíveis foram os Gram-positivos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASAI, T. Acetic acid bacteria: classification and biochemical activities. **University of Tokyo Press**, Tokyo, v. 4, 1968.
- ARAKAWA, H.; MAEDA, M.; OKUBO, S.; SHIMAMURA, T. Role of hydrogen peroxide in bactericidal action of catechins. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 277-281, 2004.
- BROMBERG, R., MORENO, I., DELBONI, R.R., CINTRA, H. C. Characteristics of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 and its effect on *Listeria monocytogenes* in bovine meat. **Food Science and Technology**, v.26, p. 135144, 2006.
- CHICAIZA, L. E. M. (2014). **Desarrollo, elaboración y optimización bromatológica de una bebida de té negro fermentada a base de Manchurian fungus (kombucha) y evaluación de su actividad como potencial alimento funcional**. (Dissertação de mestrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- CHENG H.Y., YU, R.C. & CHOU, C.C. (2003). Increased acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by acid adaptation time and conditions of acid challenge. **Food Research International**, 36, 49-56.
- Greenwalt, C. J, Steinkraus K.H. & Ledford, R.A. (2000). Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. **Journal of food protection**, 63(7), 976-981.
- HARRIS, L.J., DAESCHEL, M.A., STILES, M.E. & KLAENHAMMER, T.R. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, 53, 384-387.
- IVANOVA, I., MITEVA, V., STEFANOVA, T., PANTEV, A., BUDAKOV, I., DANOVA, S., MONCHEVA, P., NIKOLOVA, I., DOUSSET, X. & BOYAVAL, P. (1998). Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. **International Journal of Food Microbiology**, 42(3), 147-158.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.
- SREERAMULU G.; ZHU Y.; KNOL W. Kombucha Fermentation and Its Antimicrobial Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2586-2594, 2000.