



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UNB
CURSO DE FARMÁCIA

MARIA FERNANDA VIANA DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DO
KOMBUCHA FRENTE A CEPAS *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus***

BRASÍLIA, 2023

MARIA FERNANDA VIANA DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DO
KOMBUCHA FRENTE A CEPAS *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus***

Monografia de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia, na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

ORIENTADORA: Farmacêutica Especialista Carla Azevedo Bilac

COORIENTADORA: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

BRASÍLIA, 2023

MARIA FERNANDA VIANA DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DO
KOMBUCHA FRENTE A CEPAS *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus***

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Farmacêutica Especialista Carla Azevedo Bilac
(FCE/ Universidade De Brasília)

Coorientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
(FCE/ Universidade De Brasília)

Avaliadora: Farmacêutica Mestre Letícia Fernandes Silva Rodrigues
(FCE/ Universidade De Brasília)

Avaliador: Prof. Mestre Daniel Oliveira Freire
(FCE/ Universidade De Brasília)

BRASÍLIA, 2023

A Jesus Cristo, a minha família, Paulo, Sônia e
Maria Eduarda, ao meu amor, Júnior.

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, por me amar incondicionalmente, me sustentar, proteger e iluminar durante esta caminhada, todo mérito é Dele. A Ele toda glória.

Aos meus pais, por me cobrirem de amor e carinho, serem essenciais em minha vida. Agradeço por todo incentivo, ajuda e suporte a estudar e correr atrás dos meus objetivos.

A minha irmã, por estar sempre por perto, me ajudar em muitos momentos e possuir uma alegria contagiante.

Ao amor da minha vida, Júnior, que com sua chegada repentina em minha vida, me encheu de amor e cuidado, me aproximou mais de Deus, esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis, inclusive nos melhores. Sua presença foi essencial para eu chegar até onde cheguei.

Aos meus amigos Carol, Luan e Lucas, pelos momentos de descontração, por me ajudarem a caminhar com Cristo, por suas orações e fazerem uma importante parte da minha vida.

À minha orientadora Carla, que além dos incentivos, orientações, ajuda e muita paciência, foi imprescindível para a realização deste trabalho. Agradeço por todo cuidado e carinho, criamos não apenas uma relação acadêmica, mas de uma amizade, que espero perdurar por muito tempo.

À minha coorientadora Daniela Orsi, por me aceitar neste estudo e dar todo o suporte necessário.

Agradeço aos meus avaliadores Daniel e Letícia, que me deram companhia, auxílio e sugestões durante o estudo.

“E, se algum de vós tem falta de sabedoria, peça a Deus, que a todos dá liberalmente, e o não lança em rosto, e ser-lhe-á dada.” – Tiago 1:5

RESUMO

Kombucha é uma bebida probiótica produzida pela fermentação do SCOBY, uma cultura simbiótica microbiológica, tendo como substrato o chá verde ou preto, acrescido de açúcar. A composição da microbiota do SCOBY é constituída por bactérias lácticas, bactérias acéticas e leveduras. Os componentes bioativos do kombucha resultantes da fermentação dos microrganismos exercem atividade antimicrobiana contra bactérias. O objetivo deste trabalho foi isolar os microrganismos presentes no kombucha para avaliação da atividade antagonista *in vitro* frente às cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. O kombucha foi preparado a partir de infusão de chá verde e açúcar mascavo, com fermentação de 7 dias. Foram utilizados 5 meios de cultura em ágar (APT, HS, MRS, M17e YM) afim de isolar diferentes microrganismos do kombucha. A partir dos resultados obtidos, 79 microrganismos foram isolados das amostras de kombucha e identificados morfolologicamente como bacilos, cocos, leveduras e simbioses. Destes 79, 56 (70,88%) inibiram o crescimento de *S. aureus* e/ou *E. coli*. Do total, 45 microrganismos (59,96%) apresentaram inibição do crescimento de *S. aureus* e 40 microrganismos (50,63%) do total apresentaram inibição do crescimento de *E. coli*. A atividade antimicrobiana teve melhores resultados contra *S. aureus*. Em relação a morfologia, os bacilos foram a maioria em inibir *S. aureus* e as leveduras foram predominantes em inibir *E. coli*. Sendo assim, os microrganismos constituintes do kombucha podem ser explorados como uma nova alternativa para o tratamento e prevenção de infecções bacterianas e gastrointestinais, além dos benefícios probióticos à saúde.

Palavras-chave: kombucha; microbiota; antibiose, agente infeccioso

ABSTRACT

Kombucha is a probiotic drink produced by the fermentation of SCOBY, a microbiological symbiotic culture, using green or black tea as a substrate, plus sugar. The composition of the SCOBY microbiota is made up of lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeasts. The bioactive components of kombucha resulting from the fermentation of microorganisms exert antimicrobial activity against bacteria. The objective of this work was to isolate the microorganisms present in kombucha to evaluate the in vitro antagonistic activity against the strains *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The kombucha was prepared from an infusion of green tea and brown sugar, with fermentation of 7 days. Five agar culture media (APT, HS, MRS, M17 and YM) were used to isolate different microorganisms from kombucha. From the results obtained, 79 microorganisms were isolated from kombucha samples and morphologically identified as bacilli, cocci, yeasts and symbioses. Of these 79, 56 (70.88%) inhibited the growth of *S. aureus* and/or *E. coli*. Of the total, 45 microorganisms (59.96%) showed inhibition of the growth of *S. aureus* and 40 microorganisms (50.63%) of the total showed inhibition of the growth of *E. coli*. Antimicrobial activity had better results against *S. aureus*. Regarding morphology, bacilli were the majority in inhibiting *S. aureus* and yeasts were predominant in inhibiting *E. coli*. Therefore, the microorganisms that make up kombucha can be explored as a new alternative for the treatment and prevention of bacterial and gastrointestinal infections, in addition to probiotic health benefits.

Key words: kombucha; microbiota; antibiosis, infectious agent

LISTAS DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Apresentação dos microrganismos isolados da kombucha em diferentes meios de cultura	30
--	----

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Microrganismos encontrados no kombucha	19
Tabela 2 - Análise da atividade antagonista dos microrganismos isolados do kombucha: uma relação entre morfologia e inibição de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	32
Tabela 3 - Avaliação da capacidade inibitória dos microrganismos isolados do kombucha contra as cepas de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Kombucha preparado com SCOBY, chá verde e xarope de açúcar mascavo.....	26
Figura 2 - Halos de inibição em triplicata dos microrganismos isolados do kombucha contra <i>S. aureus</i>	29

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus celsius
a.C.	Antes de Cristo
APT	All Purpose Tween
ATCC	American Type Culture Collection
BA	Bacilo
BAA	Bactérias do ácido acético
BAL	Bactérias do ácido láctico
CO	Coco
HS	Hestrin-Schamm
LE	Levedura
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MRS	Man, Rogosa and Sharpe
NA	Não Aplicável
nm	Nanômetro
pH	Potencial Hidrogeniônico
SB	Simbiose
SCOBY	Symbiotic Culture of Bacterias and Yeasts
spp.	Species
UFC	Unidades formadora de colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	PROBIÓTICOS.....	16
2.2	KOMBUCHA.....	16
2.3	MICROBIOTA DO KOMBUCHA.....	18
2.4	PROCESSO DE FERMENTAÇÃO E COMPOSTOS BIOATIVOS DO KOMBUCHA.....	20
2.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO KOMBUCHA.....	21
2.6	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E A BUSCA POR ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS	22
3	OBJETIVO.....	24
3.1	OBJETIVO GERAL.....	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4	JUSTIFICATIVA	25
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
5.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SCOBY E PREPARAÇÃO DO KOMBUCHA	26
5.2	ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS PRESENTES NO KOMBUCHA ..	26
5.2.1	Meios de cultivo para isolamento dos microrganismos presentes no kombucha.....	26
5.2.2	Preparação das amostras para o isolamento dos microrganismos.....	27
5.2.3	Isolamento e purificação das colônias	27
5.2.4	Ativação dos microrganismos isolados	28
5.2	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DO KOMBUCHA	28
5.2.5	Preparação das cepas patogênicas.....	28
5.2.6	Estudo da atividade antimicrobiana	28
5.3	ESTATÍSTICA.....	29
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6.1	ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS DAS AMOSTRAS DE KOMBUCHA	30
6.2	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DAS AMOSTRAS DA KOMBUCHA (TESTE DE ANTAGONISMO IN VITRO)	32
7	CONCLUSÃO.....	37
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
	ANEXO.....	45

1 INTRODUÇÃO

Com o crescente interesse por alimentos com potencial benéfico à saúde, os probióticos estão recebendo notoriedade por serem microrganismos produtores de substâncias naturais que são usadas no tratamento e prevenção para diversas patologias, principalmente às relacionadas aos distúrbios gastrointestinais (Oliveira; Almeida; Bomfim, 2017). A Organização Mundial de Saúde definiu o termo “probiótico” como “microrganismo vivo que, quando administrado em quantidades adequadas, confere benefício à saúde do hospedeiro” (Hill *et al.*, 2014). Dentre os alimentos probióticos, o kombucha é uma nova tendência de consumo nos países ocidentais, por ser uma bebida nutritiva, de sabor agradável e gaseificada.

O kombucha apesar de ser consideravelmente uma novidade no Ocidente, tem sua origem datada por volta de 221 a.C. na China, e significa “chá do Kombu”, surgindo após o médico “Kombu” levar a bebida da Coreia para o Japão, a fim de curar problemas digestivos do imperador Inkuo (Bruschi; Sousa; Modesto, 2018). O kombucha é feito à base de chá (*Camellia sinensis* - chá preto ou verde) acrescido de açúcar, o qual sofre fermentação pela presença de bactérias e leveduras presentes no SCOBY (Jayabalan *et al.*, 2014). O SCOBY, abreviação de “Symbiotic Culture of Bacterias and Yeasts”, que em português significa “Cultura Simbiótica de Bactérias e Leveduras”, é um biofilme de celulose flutuante no chá, de consistência gelatinosa e utilizado como iniciador da fermentação (Maia *et al.*, 2020).

Por ser uma bebida probiótica, um dos principais efeitos do kombucha é no trato gastrointestinal, auxiliando no equilíbrio e regulação da microbiota do intestino, além de conferir proteção contra patógenos neste local. Também possui ação extra intestinal, detendo propriedades antimicrobianas, anticancerígenas, antioxidantes, antitumoral, hipoglicemiante e com efeito antienvelhecimento (Jayabalan *et al.*, 2014). O kombucha é considerado fonte de diversos componentes bioativos, que ao serem absorvidos pelo organismo, exercem seus benefícios em nível celular (Jayabalan *et al.*, 2014).

Portanto, produzir a bebida de forma correta é de suma importância pois a fermentação do chá é quando ocorre o consumo de macronutrientes e o aumento gradativo de compostos bioativos (Mendonça *et al.*, 2020). Ácidos orgânicos produzidos durante este processo diminuem o valor de pH do chá, e conseqüentemente, devido a essa acidez fermentativa, ocorre a redução de possíveis

patógenos que podem estar no meio, o que torna a bebida segura para o consumo, apesar de ter origem microbiana (Leal *et al.*, 2018; Watawana *et al.*, 2015).

As bactérias mais abundantes na cultura simbiótica (SCOBY) são as do ácido acético. As principais pertencem aos gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter*, ambas da família *Acetobacteraceae* (Jayabalan *et al.*, 2014). O gênero *Acetobacter* é capaz de formar o ácido acético, gerando o gosto avinagrado do chá, que aumenta com o tempo prolongado de fermentação (Teyssier; Hamdouche, 2016).

Análises científicas comprovaram o kombucha exerce atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos patogênicos, devido a formação de metabólitos pela microbiota presente no SCOBY, e pelo pH baixo decorrente da formação de ácidos orgânicos durante a fermentação (Silva *et al.*, 2021). Assim, através de testes *in vitro*, constatou-se a atividade antibacteriana dos microrganismos do kombucha contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas (Velićanski *et al.*, 2014).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROBIÓTICOS

Os alimentos funcionais são aqueles que produzem efeitos benéficos à saúde, além de suas funções nutricionais básicas (Leal *et al.*, 2018), e entre eles, estão os alimentos probióticos que contêm microrganismos vivos (Pereira *et al.*, 2018). Os probióticos representam uma parcela significativa da indústria alimentícia (Tripathi; Giri, 2014), estando entre os alimentos funcionais mais consumidos em todo o mundo (Suez *et al.*, 2019). Os probióticos são frequentemente utilizados para tratar doenças gastrointestinais, incluindo a modulação da imunidade da mucosa intestinal, bem como a prevenção e tratamento de infecções intestinais (Jayabalan *et al.*, 2014).

Os probióticos consistem em microrganismos com funcionalidades distintas, sendo diferenciados por suas designações de gênero, espécie e linhagem (Sanders *et al.*, 2018). E os mais utilizados até o momento, consistem em gêneros de bactérias do ácido láctico, ácido acético e leveduras (Al-Mohammadi *et al.*, 2021). Os microrganismos probióticos mais comumente encontrados em alimentos são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces boulardii* (Fijan, 2014; Islam, 2016).

Os consumidores têm uma preferência marcante pelo consumo de probióticos para tratar condições de saúde, além disso, eles são procurados como auxílio na perda de peso e fortalecimento do sistema imunológico (Islam, 2016). Os probióticos têm sido extensivamente estudados e seus benefícios estão principalmente associados ao trato gastrointestinal, incluindo a regulação e proteção da microbiota intestinal, bem como a melhoria do trânsito intestinal (Kechagia *et al.*, 2013). É importante ressaltar que há uma ampla variedade de cepas probióticas disponíveis que atuam como aliados na manutenção e equilíbrio da microbiota intestinal, contribuindo para a defesa do organismo contra agentes prejudiciais (Vandenplas *et al.*, 2015).

2.2 KOMBUCHA

Kombucha é uma bebida probiótica produzida pela fermentação da planta *Camellia sinensis* (chá preto ou verde), adoçado e fermentado com o uso de uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (Leal *et al.*, 2018). Possui um sabor agradável, frutado, ácido e gaseificado, resultado da presença de ácidos orgânicos e

do dióxido de carbono liberado durante a fermentação. A bebida pode ser preparada de forma caseira ou adquirida pronta, sendo comum encontrar versões comerciais com adição de frutas (Laavanya, Shirkole e Balasubramanian, 2021).

Embora não existam dados concretos sobre a origem exata da kombucha, alguns registros encontrados na China, datados de 221 a.C., descrevem uma bebida com características semelhantes ao kombucha, conhecida como o "chá da imortalidade" (Bruschi *et al.*, 2018). Mesmo numa época da história onde estudos científicos eram inexistentes, a bebida tornou-se conhecida por seus benefícios perceptíveis à saúde (Bruschi *et al.*, 2018).

O SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast), também conhecido como "cultura mãe", é utilizado como iniciador para a fermentação do kombucha. As bactérias iniciam a síntese de celulose, e as leveduras contribuem para conferir uma consistência gelatinosa ao biofilme (Gomes *et al.*, 2018; Leal *et al.*, 2018). Esse biofilme é composto por uma matriz que se assemelha a uma tampa de cogumelo (Kapp; Sumner, 2018).

A microbiota do SCOBY é amplamente diversificada, compreendendo principalmente as Bactérias do Ácido Acético (BAA), tais como as dos gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter*, e as Bactérias do Ácido Lático (BAL) como os gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus*, e leveduras do gênero *Saccharomyces* (Kapp; Sumner, 2018). A diversidade da microbiota do SCOBY depende de fatores externos, como substratos utilizados, clima, temperatura, tempo de fermentação e os metabólitos produzidos durante a fermentação (Laavanya, Shirkole and Balasubramanian, 2021).

A interação entre o SCOBY e o chá adoçado durante o processo de fermentação resulta em uma bebida rica em substâncias químicas, incluindo metabólitos de ácidos orgânicos, aminoácidos, dióxido de carbono, vitaminas e polifenóis. Isso confere ao kombucha um perfil funcional e nutritivo (Kapp; Sumner, 2018). A matriz presente no SCOBY, composta por fibrilas de celulose sintetizadas pelas bactérias, possui propriedades inibitórias contra bactérias indesejáveis (Silva *et al.*, 2021). As leveduras convertem a sacarose em glicose e frutose pela invertase e produzem etanol através de vias metabólicas (Al-Mohammadi *et al.*, 2021), que servem como fonte de energia para as bactérias acéticas na produção da matriz gelatinosa do SCOBY (Jayabalan *et al.*, 2014; Laavanya; Shirkole; Balasubramanian, 2021).

No Brasil, a regulamentação do kombucha foi estabelecida em 2019, a Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019 (Brasil, 2019). Essa instrução delinea padrões específicos de identidade e qualidade para a produção industrializada do kombucha destinado à comercialização. A legislação determina que os ingredientes obrigatórios para a fabricação do kombucha incluem água potável, infusão ou extrato aquoso de *Camellia sinensis* (chá verde ou preto), açúcares, e o SCOBY (Brasil, 2019). Nos Estados Unidos, não existe uma legislação específica para o kombucha. No entanto, com o aumento da comercialização da bebida, o Departamento de Agricultura da Pensilvânia publicou diretrizes para regulamentar tanto a produção quanto a embalagem (Oliveira *et al.*, 2023). É importante destacar que, durante a produção artesanal do kombucha destinado à venda informal, podem ocorrer práticas inseguras que comprometem a qualidade da bebida. Portanto, é crucial regular a produção do kombucha quando se trata de fins comerciais (Kim; Adhikari, 2020; Oliveira *et al.*, 2023).

2.3 MICROBIOTA DO KOMBUCHA

O kombucha é uma bebida fermentada, cuja fermentação é realizada por microrganismos que toleram a acidez (Kim; Adhikari, 2020). O processo de fermentação é uma técnica amplamente utilizada na conservação de alimentos, e pode produzir diferentes substâncias dependendo da via metabólica utilizada pelos microrganismos envolvidos (Maia *et al.*, 2020).

No kombucha, a fermentação ocorre por meio de três vias metabólicas principais: alcóolica, láctica e acética, devido à presença das bactérias e leveduras no SCOBY. O equilíbrio desses microrganismos no meio de fermentação influencia o teor de álcool e ácido acético da bebida. Além disso, durante o processo fermentativo, os microrganismos produzem ácidos orgânicos que diminuem o pH do chá, criando um ambiente ácido que inibe ou reduz o crescimento de microrganismos indesejáveis (Leal *et al.*, 2018; Watawana *et al.*, 2015).

A composição microbiológica do kombucha é uma simbiose de microrganismos probióticos. Majoritariamente, é composto por bactérias acéticas, bactérias lácticas e leveduras. A microbiota varia a depender da origem do SCOBY e do substrato (tipo de chá, tipo de açúcar) usado para a produção (Kim; Adhikari, 2020; Leal *et al.*, 2018; Teyssier; Hamdouche, 2016; Villarreal-Soto *et al.*, 2018). A Tabela 1 apresenta as

espécies de microrganismos do kombucha identificados em diversos estudos, conforme a sua morfologia.

Tabela 1 - Microrganismos encontrados no kombucha

Bacilos	Cocos	Leveduras
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Komagataeibacter rhaeticus</i>
<i>Lactobacillus bulagricus</i>	<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Leuconostoc</i> spp.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>		

Fonte: (Al-Mohammadi *et al.*, 2021; Bogdan *et al.*, 2018; Dinev *et al.*, 2018; Marsh *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2015; Pei *et al.*, 2020)

As acetobactérias, bacilos Gram-negativos aeróbios, possuem a capacidade de converter glicose em ácido glucônico e oxidar o ânion acetato em dióxido de carbono, além de usar etanol para produzir ácido acético. Este último processo confere à bebida seu sabor avinagrado, que pode variar de acordo com o tempo de fermentação (Kim; Adhikari, 2020; Leal *et al.*, 2018; Teyssier; Hamdouche, 2016; Villarreal-Soto *et al.*, 2018).

Além das bactérias acéticas, o SCOBY também contém uma grande quantidade de leveduras que superam as bactérias acéticas em número. Estas leveduras são responsáveis pela produção da enzima invertase, que converte sacarose em glicose e frutose, resultando na produção de álcool durante a fermentação (Leal *et al.*, 2018).

Adicionalmente, o SCOBY abriga as BAL, bactérias Gram-positivas, que utilizam o carboidrato (glicose) como substrato para produzir ácido lático, agregando sabor ao chá fermentado e sintetizando metabólitos que enriquecem a bebida com compostos nutricionais. Os metabólitos produzidos pelas BAL, participam da composição da kombucha após a fermentação, e além de propriedades probióticas, também participam na atividade antimicrobiana (Gao *et al.*, 2019).

Pesquisas indicam que a variedade microbiológica presente no kombucha contribui para a atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos patogênicos (Miranda *et al.*, 2022). Notoriamente, o kombucha pode inibir o crescimento de vários patógenos, como *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e

Staphylococcus spp. (Watawana *et al.*, 2015). Acredita-se que essa capacidade antimicrobiana se deve aos metabólitos produzidos pela diversidade de bactérias e leveduras presentes no SCOBY (Silva *et al.*, 2021).

2.4 PROCESSO DE FERMENTAÇÃO E COMPOSTOS BIOATIVOS DO KOMBUCHA

A fermentação é um método antigo de preservação de alimentos que promove alterações bioquímicas, e assim, prolongam a durabilidade dos alimentos (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). No preparo tradicional do kombucha, adiciona-se geralmente de 5 a 8% de açúcar ao chá preto ou verde (*Camellia sinensis*). O período de fermentação pode variar de no mínimo 3 dias a no máximo 60 dias, dependendo das preferências pessoais, práticas culturais e objetivos de consumo (Watawana *et al.*, 2015). Essas variáveis, como a quantidade de açúcar e o tempo de fermentação, desempenham um papel crucial no processo, pois influenciam diretamente o pH final e a concentração de substâncias orgânicas no kombucha. É importante ressaltar que a fermentação em si é um fator determinante para a ação antimicrobiana do kombucha (Leal *et al.*, 2018; Vina *et al.*, 2014).

Ao longo da fermentação do kombucha, a concentração de ácido acético tende a aumentar (Jayabalan *et al.*, 2014; Villarreal-Soto *et al.*, 2018). A fermentação também leva à oxidação da glicose em ácido glucônico e posteriormente à síntese da celulose microbiana para a formação do SCOBY que flutua na superfície do chá. Além disso, o ácido glucônico possui alta capacidade de ligar-se a substâncias tóxicas e auxiliar na desintoxicação do organismo (Leal *et al.*, 2018). Outro ácido produzido durante a fermentação é o ácido lático (Jayabalan *et al.*, 2014; Neffe-Skocińska *et al.*, 2017).

O kombucha apresenta uma composição rica em compostos bioativos e antioxidantes, incluindo polifenóis. Essas substâncias contribuem para o potencial terapêutico do kombucha. O tipo de chá utilizado no preparo, seja preto ou verde, influencia na presença dos polifenóis. A oxidação do chá preto resulta em teaflavinas e tearubiginas, enquanto o chá verde apresenta maior concentração de catequinas (Fu *et al.*, 2014; Villarreal-Soto *et al.*, 2018).

O kombucha é rico em ácido glucurônico, um poderoso desintoxicante hepático e precursor da vitamina C. Este ácido tem a habilidade de ligar-se a substâncias tóxicas

hepáticas, facilitando a secreção renal (Neffe-Skocińska *et al.*, 2017). A quantidade de ácido glucurônico e vitamina C no kombucha é influenciada pelas BAA e leveduras presentes, bem como pelo tempo de fermentação (Leal *et al.*, 2018; Malbaša *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2015).

O sabor do kombucha varia durante o processo de fermentação, podendo ser doce e frutado, ácido e levemente espumante, ou apresentar um sabor suave de vinagre. Isso ocorre porque os microrganismos do SCOBY usam o açúcar como substrato para a biossíntese de ácidos orgânicos. Assim, o tempo de fermentação e a seleção da microbiota influenciam diretamente o sabor, a qualidade e quantidade dos ingredientes benéficos produzidos no kombucha (Jayabalan *et al.*, 2014; Kim; Adhikari, 2020).

O kombucha possui propriedades antioxidantes devido à presença de ácido ascórbico, polifenóis e outras moléculas bioativas, auxiliando no aumento da imunidade, prevenção do câncer, alívio de inflamações e artrites (Jayabalan *et al.*, 2014). O ácido acético, também produzido durante a fermentação, possui atividade antioxidante e atua em conjunto com os outros compostos presentes no kombucha (Gomes *et al.*, 2018).

2.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO KOMBUCHA

Durante a fermentação do chá, as bactérias produzem ácidos orgânicos, o que torna possível combater microrganismos patogênicos por meio da acidificação do meio. Essa acidificação causa danos nas enzimas, paredes e membranas celulares, interrompendo a absorção de nutrientes e inibindo a síntese de proteínas. Além disso, os microrganismos do kombucha também produzem bacteriocinas, que são peptídeos com atividade antimicrobiana (Gao *et al.*, 2019; Hou *et al.*, 2021).

As bacteriocinas, liberadas por diferentes espécies bacterianas, causam danos nas membranas celulares dos patógenos. O estudo realizado por Simons *et al.* (2020) avaliou uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus plantarum*, isolado do kombucha, que demonstrou uma atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, causando morte celular por aumentar a permeabilidade da membrana celular.

Estudos demonstraram que a atividade antimicrobiana do kombucha está relacionada não apenas aos ácidos produzidos, mas também a outros componentes

biossintetizados durante a fermentação (Battikh *et al.*, 2012). Pesquisadores identificaram a presença de ésteres, compostos hidrofóbicos que interagem com bactérias patogênicas, bem como compostos heterocíclicos, que inibem a síntese de funções bacteriológicas essenciais e resultam em morte celular (Al-Mohammadi *et al.*, 2021). Além disso, os alcaloides encontrados no kombucha causaram danos às bactérias patogênicas, resultando em lise celular (Zhao *et al.*, 2015).

Essas atividades antimicrobianas têm sido observadas contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e alguns tipos de fungos, como *Candida* spp. (Pei *et al.*, 2020). Os autores Al-Mohammadi *et al.*, (2021) também destacaram a importância dos metabólitos provenientes do processo fermentativo, que atuam em sinergia com fármacos convencionais para fornecer uma atividade antimicrobiana mais forte. A compreensão desses mecanismos de ação e a relação entre os componentes microbiológicos e químicos do kombucha ainda requerem estudos mais aprofundados (Silva *et al.*, 2021).

2.6 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E A BUSCA POR ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência antimicrobiana ocorre quando um microrganismo é exposto a um antimicrobiano, e adquire resistência à ação antimicrobiana (Silva *et al.*, 2020). Essa resistência pode surgir naturalmente durante a interação dos microrganismos no ambiente ou devido a fatores intrínsecos multifatoriais. No entanto, o aumento expressivo da resistência está diretamente relacionado ao uso irracional de antimicrobianos em humanos, bem como à utilização excessiva desses medicamentos na criação animal (Munita; Arias, 2016). Além disso, a falta de busca por novos antimicrobianos pela indústria farmacêutica tem contribuído para agravar a situação. Esse cenário representa um desafio alarmante para a saúde pública global, pois dificulta o tratamento e limita as opções de combate às infecções (Marston *et al.*, 2016).

A resistência aos antimicrobianos tem evoluído de forma exponencial e resultou em um aumento no número de infecções intratáveis. Para reduzir a disseminação de microrganismos resistentes, como bactérias, fungos, vírus e parasitas, são necessárias ações como a conscientização sobre a prescrição racional de antimicrobianos e a adoção de medidas para prevenir e controlar infecções causadas

por patógenos resistentes em seres humanos e animais (Pérez, 2017; Silva *et al.*, 2020). É de suma importância compreender os mecanismos pelos quais os microrganismos desenvolvem resistência para desenvolver estratégias eficazes de combate (Munita; Arias, 2016).

Nesse contexto, os estudos promissores sobre os alimentos com potencial antimicrobiano, como o kombucha, podem ser úteis para o desenvolvimento de alternativas inovadoras (Battikh *et al.*, 2012). O estudo de Al-Mohammadi *et al.*, \92021) reporta que alguns probióticos que produzem bacteriocinas e metabólitos são capazes de inibir bactérias multirresistentes. No entanto, é necessário investir em mais pesquisas tanto para encontrar maneiras de lidar com o avanço da resistência quanto para aprofundar o conhecimento sobre o potencial do kombucha no combate a doenças e na melhoria da saúde.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi isolar os microrganismos presentes no kombucha para avaliação da atividade antagonista *in vitro* frente às cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar os microrganismos presentes no kombucha;
- Comparar a eficácia de isolamento dos meios de cultura utilizados;
- Determinar a atividade inibitória dos microrganismos isolados do kombucha contra o crescimento de *S. aureus* e *E. coli*;
- Realizar a coloração de Gram e comparar morfológicamente os microrganismos isolados do kombucha de acordo com sua capacidade de antimicrobiana.

4 JUSTIFICATIVA

Majoritariamente, a produção de kombucha no Brasil é realizada artesanalmente, muitas vezes pelos próprios consumidores em casa, mas notoriamente essa bebida está sendo inserida no mercado por meio da produção industrial. Devido a progressiva inserção de alimentos saudáveis na indústria alimentícia brasileira, facilitando o acesso ao consumidor, o uso de probióticos aumentou consideravelmente. Com um sabor adocicado levemente gaseificado e possuindo propriedades benéficas à saúde, como atividade antioxidante, o kombucha é um dos probióticos mais promissores neste nicho alimentício. Há estudos e pesquisas sobre o kombucha, mas alguns são controversos e não aprofundam o efeito antimicrobiano dos microrganismos isolados do kombucha contra microrganismos patogênicos. Em função disto, a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos microrganismos isolados da kombucha deve adicionar mais informações a essa lacuna na literatura.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SCOBY E PREPARAÇÃO DO KOMBUCHA

Os SCOBYs foram doados por pessoas que cultivam essas culturas artesanais em casa. Para a produção do kombucha, os SCOBYs foram inoculados em chá verde (4 g/L) adoçado com açúcar mascavo até a leitura de 10º Brix, e fermentado por 7 dias, em temperatura ambiente (Figura 1).

Figura 1 - Kombucha preparado com SCOBY, chá verde e açúcar mascavo



Fonte: Elaboração própria.

5.2 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS PRESENTES NO KOMBUCHA

5.2.1 Meios de cultivo para isolamento dos microrganismos presentes no kombucha

As bactérias ácido-láticas foram isoladas em três diferentes meios de cultura: Ágar All Purpose Tween (APT) usado para o isolamento de culturas heterofermentadoras, Ágar M17 utilizado para o isolamento de *Lactococcus* spp., conforme descrito por Terzaghi e Sandine (1995) e Ágar Man Rogosa Sharpe (MRS) utilizado para isolar *Lactobacillus* spp., de acordo com a metodologia descrita por Rogosa, Mitchell e Wiseman (1951). Para isolar bactérias do ácido acético foi utilizado o meio de cultivo Ágar Hestrin-Schramm (HS) conforme descrito por Hestrin e

Schramm (1954), com adaptações. As leveduras foram isoladas utilizando o meio Ágar Yeast Malt (YM).

5.2.2 Preparação das amostras para o isolamento dos microrganismos

O preparo das amostras foi realizado no sétimo dia de fermentação. Para aumentar a superfície de contato, pequenas porções do SCOBY foram retiradas, tanto da superfície superior quanto inferior, além da camada interna da membrana. Para as diluições seriadas, 10 g de SCOBY foram transferidos para um recipiente estéril, adicionando a bebida fermentada até alcançar 25 mL. A amostra foi então diluída em 225 mL de água destilada com peptona 0,1% (p/v) estéril, obtendo-se a diluição 10^{-1} . Após homogeneização em vórtex por 2 minutos, 1 mL da amostra (diluição 10^{-1}) foi transferida para um tubo Falcon contendo 9 mL de água com peptona 0,1% (p/v), resultando na diluição 10^{-2} . As amostras foram diluídas sucessivamente até 10^{-5} . Alíquotas de 100 µL das amostras foram pipetadas em placas de Petri contendo os meios de cultivo (APT, MRS, M17, HS e YM), e com o auxílio de alças de Drigalski estéreis, as alíquotas foram espalhadas sobre a superfície do ágar. Após a secagem, as placas foram incubadas a 28°C, em condições de aerobiose e anaerobiose, por um período de 24 a 72 horas.

5.2.3 Isolamento e purificação das colônias

O isolamento dos microrganismos foi realizado com o auxílio do estereoscópio Leica modelo M-125C, que facilita a observação das estruturas das colônias e permite distinguir diferenças morfológicas. As placas que exibiram crescimento de colônias simbióticas foram submetidas a sucessivas diluições até que fosse possível isolar colônias puras. Após a purificação, os microrganismos foram novamente semeados, em tubo inclinados previamente preparados contendo os mesmos meios de cultura de origem. Para a preservação dos microrganismos isolados, foi adicionada aos tubos glicerina líquida esterilizada, para inibir possíveis contaminantes, proporcionando condições adequadas para a preservação dos microrganismos.

5.2.4 Ativação dos microrganismos isolados

Para a ativação dos microrganismos isolados, com o auxílio de uma alça de calibrada de 10 μ L, os isolados foram repicados em tubos contendo 10 mL de caldo APT, caldo MRS, caldo M17, caldo HS e caldo YM, correspondentes ao meio de cultivo do isolamento. As amostras foram incubadas na estufa por 24 horas ou até que se observasse turbidez nos tubos. Após a ativação, e com o auxílio de um swab estéril, os isolados foram semeados em placas de ágar (APT, MRS, M17, HS e YM). As placas foram incubadas a 28°C por 24 a 72 horas. Após o crescimento, os microrganismos estavam preparados para o teste de antagonismo.

5.2. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DO KOMBUCHA

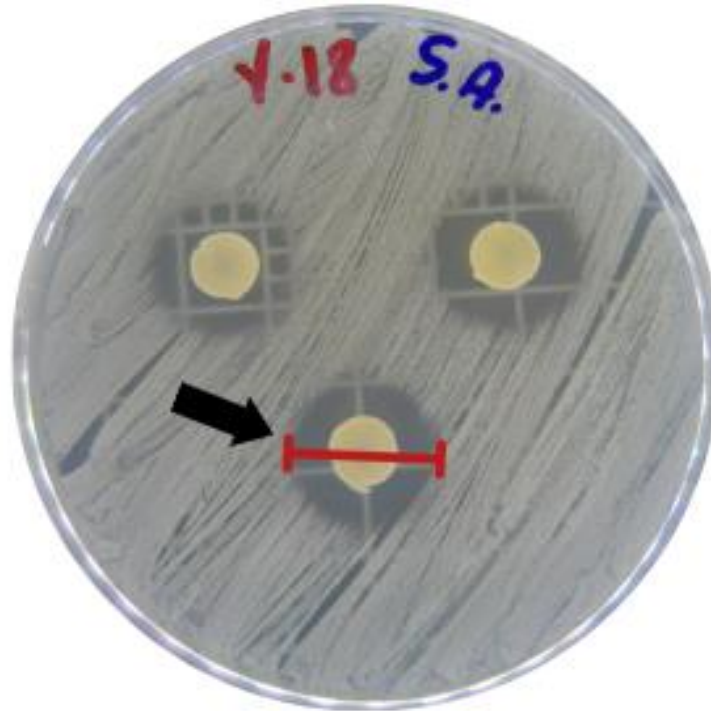
5.2.5 Preparação das cepas patogênicas

As cepas utilizadas no estudo incluíram *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Os inóculos foram preparados por meio de suspensão direta do crescimento microbiano em caldo Luria Bertani, ajustando a turvação para ser equivalente 0,5 na escala de McFarland, o que corresponde a uma concentração de $1,0 \times 10^6$ - $1,0 \times 10^8$ UFC/mL. A densidade óptica das suspensões foi ajustada para um intervalo entre 0,08 e 0,10 a 625 nm no espectrofotômetro.

5.2.6 Estudo da atividade antimicrobiana

Seguindo as metodologias propostas por Valgas (2007) e Magaldi *et al.* (2004) com adaptações, os inóculos das cepas patogênicas foram semeados em Ágar YM usando swabs estéreis. Posteriormente, discos de ágar de 5 mm, contendo os microrganismos isolados do kombucha, foram colocados sobre as placas de Ágar YM já semeadas com as cepas patogênicas (*S. aureus* e *E. coli*) promovendo o contato entre os microrganismos isolados e as cepas patogênicas. Os ensaios foram realizados em triplicata. Após 24 horas de incubação a 37°C, foram realizadas as medições dos halos de inibição (Figura 2) das cepas patogênicas. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (Média \pm DP) em milímetros de diâmetro.

Figura 2 - Halos de inibição em triplicata dos microrganismos isolados do kombucha contra *S. aureus*



Fonte: Elaboração própria.

5.3 ESTATÍSTICA

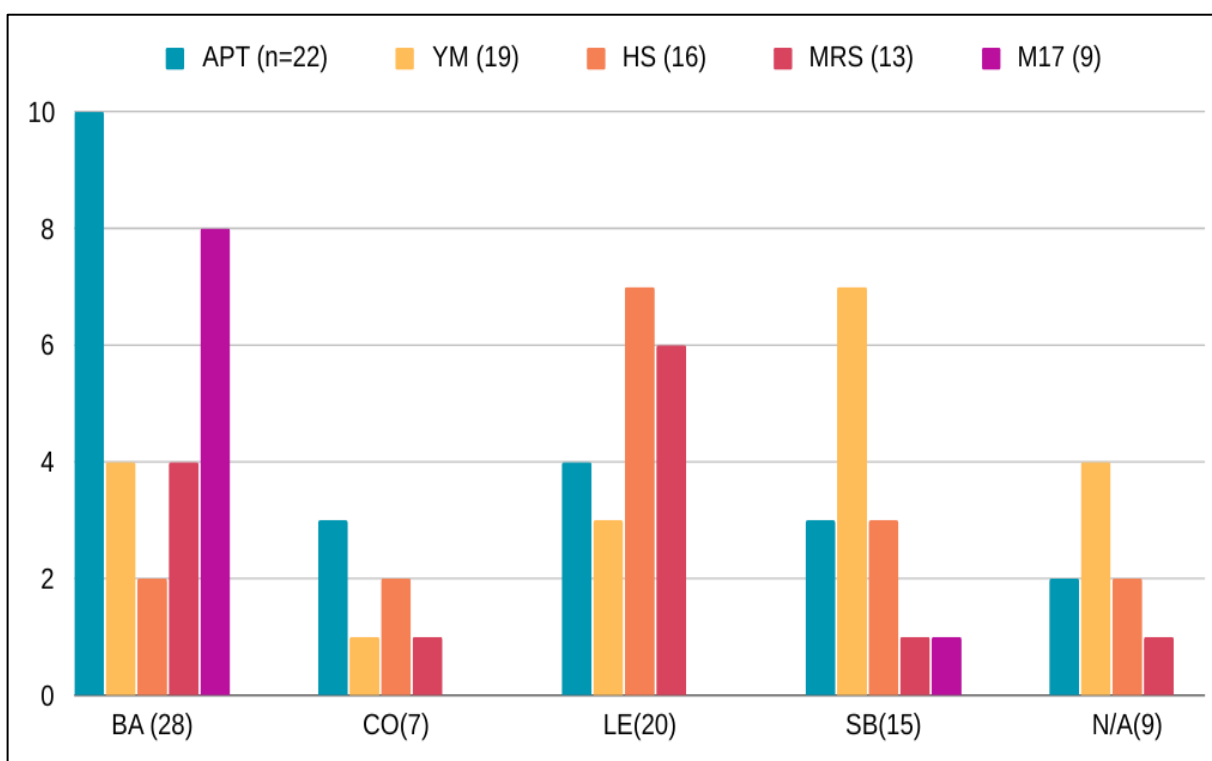
As análises experimentais foram realizadas em triplicata, e os resultados obtidos foram expressos como valores de média e desvio padrão.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS DAS AMOSTRAS DE KOMBUCHA

O Gráfico 1 apresenta os resultados das análises quantitativas dos microrganismos isolados de amostras de kombucha em diferentes meios de cultura e as suas características morfológicas. No total foram isolados 79 microrganismos do kombucha. Destaca-se o meio de cultura ágar APT que apresentou o maior número de microrganismos isolados com 22 isolados (27,84%), seguido dos meios ágar YM com 19 isolados (24,05%), ágar HS com 16 isolados (20,25%), ágar MRS com 13 isolados (16,45%) e ágar M17 com 9 isolados (11,39%).

Gráfico 1 - Distribuição dos microrganismos isolados do kombucha por meios de cultura e morfologia



Fonte: Elaboração própria. (n=79) = quantidade de microrganismos isolados; APT = ágar All Purpose Tween; MRS = ágar Man, Rogosa and Sharpe; M17 = ágar M17, HS = ágar Hestrin-Schamm, YM = ágar Yeast Malt. BA = bacilo; CO = coco; LE = levedura; SB = simbiose; NA = morfologia não identificada.

O estudo revelou que o meio de cultivo ágar APT foi muito eficaz no isolamento de microrganismos, apesar de sua aplicabilidade ser direcionada para bactérias lácticas mais exigentes, como os *Lactobacillus* heterofermentadores, amplamente

reconhecidos como componentes chave da microbiota da kombucha (Fijan, 2014). De fato, a análise mostrou que o APT não só isolou o maior número de microrganismos, mas também demonstrou ser particularmente propício para o cultivo de bacilos, confirmando que essa foi morfologia mais prevalente, representando 35,4% dos isolados ($n = 28$).

O meio ágar YM foi o segundo mais produtivo, favorecendo não apenas o crescimento de leveduras, mas também de bactérias, em especial o grupo simbiótico, como evidenciado pelo Gráfico 1, com 19 isolados (24,05%). As leveduras representaram o segundo tipo morfológico mais isolado ($n = 20$, 25,31%). Tal resultado está em consonância com a literatura que destaca o papel das leveduras na formação do biofilme do kombucha (Gomes *et al.*, 2018; Leal *et al.*, 2018), e reforça a importância das simbioses entre bactérias e leveduras, componentes fundamentais do SCOBY e essenciais no processo de fermentação do kombucha (Kapp; Sumner, 2018; Leal *et al.*, 2018). As técnicas empregadas para isolamento e separação dessas culturas simbióticas não foram eficientes, assim, os métodos analíticos precisam ser refinados para uma caracterização mais precisa dessas interações complexas.

Embora os meios HS e MRS tenham isolado menos microrganismos em comparação com o APT e o YM, eles tiveram uma contribuição significativa com 16 (20,25%) e 13 isolados (16,45%), respectivamente. O meio HS é conhecido por favorecer o crescimento das Bactérias do Ácido Lático (BAL) (Hestrin e Schramm, 1954), enquanto o MRS é mais adequado para o isolamento de *Lactobacillus* spp. (Rogosa, Mitchell e Wiseman, 1951). No entanto, observou-se que ambos os meios, HS e MRS, apresentaram as maiores taxas de isolamento de leveduras, com 7 e 6 isolados respectivamente, o que contrasta com o meio YM, que é especificamente destinado ao isolamento de leveduras.

O ágar M17, que isolou apenas 9 microrganismos (11,39%) é utilizado principalmente para isolar *Lactococcus* spp. (Terzaghi; Sandine, 1995), e mostrou uma capacidade limitada de isolar microrganismos. A baixa quantidade de isolados pode ser atribuída à especificidade deste meio, que é mais utilizado em produtos lácteos e nos produtos fermentados que favorecem o crescimento bactérias do ácido lático (BAL) (Gao *et al.*, 2019; Kivanç; Yapici, 2015).

No Gráfico 1, observa-se que os cocos representaram a menor porcentagem de isolamento, constituindo apenas 9% ($n = 7$) dos isolados. Fica evidente neste estudo que os cocos compuseram a menor fração bacteriológica do kombucha. Marsh

et al. (2014) também identificaram menores proporções de *Lactococcus* na análise da microbiota do kombucha. Bogdan *et al.* (2018) identificaram na microbiota do kombucha a predominância de espécies de *Lactobacillus* spp., sendo os *Lactococcus* spp. menos predominantes.

Os dados também revelaram que um pequeno percentual de microrganismos não teve a morfologia identificada, ressaltando os desafios associados à preservação dos microrganismos e análise morfológica subsequente, particularmente em face da ocorrência de contaminações durante o cultivo.

6.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DAS AMOSTRAS DA KOMBUCHA (TESTE DE ANTAGONISMO *IN VITRO*)

A Tabela 2 apresenta a relação entre a morfologia dos microrganismos isolados da kombucha e o resultado do antagonismo contra as cepas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Tabela 2 - Análise da atividade antagonista dos microrganismos isolados do kombucha: uma relação entre morfologia e inibição de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Morfologia	Isolados (n=79)	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
		AA (n=40)	Halos de inibição (mm)	AA (n=45)	Halos de inibição (mm)
BA	29 (36,7%)	6 (15%)	18,0±2,0 a 31,3±1,2	15 (33,3%)	9,7±0,5 a 50,4±1,8
CO	7 (8,9%)	3 (7,5%)	19,8±0,2 a 36,6±1,5	1 (2,2%)	29,2±0,4
LE	20 (25,3%)	15 (37,5%)	10,1±1,2 a 41,4±1,9	13 (28,9%)	12,4±2,9 a 23,1±1,2
SB	14 (17,7%)	11 (27,5%)	9,1±0,0 a 33,2±2,1	9 (20%)	11,6±10 a 26,7±1,6
NA	9 (11,4%)	5 (12,5%)	13,1±0,3 a 23,1±0,2	7 (15,6%)	10,1±0,8 a 26,6±6,6

Fonte: elaboração própria. AA= atividade antagonista; n= número de microrganismo isolados; BA = bacilo; CO = coco; LE = levedura; SB = simbiose; NA = morfologia não identificada; (mm) = milímetro.

Dentro do espectro de microrganismos isolados do kombucha, os bacilos destacaram-se significativamente, formando 36,7% do total. Eles demonstraram uma capacidade antagonista contra *E. coli* em 15% dos casos, produzindo halos de inibição que variaram de 18,0 a 31,3 mm. Este resultado foi ainda mais expressivo no combate ao *S. aureus* apresentando porcentagem de inibição de 33,3% dos isolados, com halos variando de 9,7 a 50,4 mm, sugerindo uma produção diversificada de substâncias antimicrobianas.

Conforme ilustrado, é notável que mais da metade dos bacilos isolados exibiram atividade antagonista contra *S. aureus*. Vários estudos na literatura comprovaram o potencial antimicrobiano dos lactobacilos. Dinev *et al.* (2018) destacaram que a espécie *Lactobacillus plantarum* é particularmente probiótica e possui um amplo espectro de atividade antibacteriana, um bacilo eficaz contra patógenos Gram-positivos, incluindo *S. aureus*, assim como contra Gram-negativos.

Lactobacillus plantarum produz bacteriocinas e ácidos orgânicos que funcionam como compostos antibacterianos, além de hidroxiácidos graxos e dipeptídeos orgânicos que têm ação antifúngica e atuam como bioconservantes eficazes contra microrganismos que deterioram alimentos (Dinev *et al.*, 2018). Pei *et al.* (2020) relataram que *Lactobacillus plantarum* isolado de kombucha produziu uma bacteriocina específica que inibiu a formação de biofilme de *S. aureus* e aumentou a permeabilidade da membrana celular, conduzindo eventualmente à morte das células bacterianas.

Os cocos, contribuíram com 7,5% de inibição contra *E. coli* e 2,2% de inibição contra *S. aureus*, e assim, constituíram a menor fração dos isolados e apresentaram um potencial antibacteriano menos expressivo. No entanto, essa observação não invalida a sua contribuição significativa para as propriedades antimicrobianas do kombucha, especialmente quando em simbiose com outros microrganismos. Nesse sentido, os resultados mostraram que mais da metade dos microrganismos simbióticos foram eficazes em inibir patógenos, destacando um ótimo perfil antagonista contra *E. coli* (27,5%) e uma ação considerável contra *S. aureus* (20,0%). O SCOBY é um consórcio simbiótico composto principalmente por bactérias e leveduras. Devido à rica diversidade da microbiota do kombucha, a composição e a interação simbiótica entre bactérias e leveduras variam consideravelmente (Al-Mohammadi *et al.*, 2021).

As leveduras isoladas do kombucha também se mostraram eficazes, representando 25,3% dos isolados e liderando a atividade antagonista contra *E. coli* em 37,5% dos casos com halos de inibição de 10,1 a 41,4 mm, além de inibir 28,9% das amostras de *S. aureus* com halos de inibição de 12,4 a 23,1 mm. Estudos focados em leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* ressaltaram os benefícios à saúde proporcionados por esses microrganismos e suas propriedades antimicrobianas (Al-Mohammadi *et al.*, 2021).

A Tabela 3 apresenta os resultados da atividade antagonista dos microrganismos isolados da kombucha contra as cepas patogênicas de *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva). Dos 79 microrganismos isolados, 56 (70,88%) apresentaram formação halos de inibição. Observou-se que 41 isolados (51,90%) produziram halos acima de 20 mm, contra pelo menos uma das cepas patogênicas testadas, indicando uma forte atividade antimicrobiana.

Tabela 3 - Avaliação da capacidade inibitória dos microrganismos isolados do kombucha contra as cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Isolados (N=56)	Morfologia	Halos de inibição (mm)		Isolados (N=56)	Morfologia	Halos de inibição (mm)	
		<i>E. coli</i> (n=40)	<i>S. aureus</i> (n=45)			<i>E. coli</i> (n=40)	<i>S. aureus</i> (n=45)
1	LE	41,4±1,9	22,2±1,5	29	NA	22±0,6	10,1±0,8
2	LE	40,9±0,6	23±0,7	30	BA	20,9±1	19,5±0,6
3	LE	38,6±1,5	22,1±1	31	CO	20±0,2	0±0
4	LE	38,4±0,4	22,3±1,5	32	BA	18±2	14,5±1,1
5	LE	37,5±0,5	0±0	33	NA	16,9±0,8	13,5±3,7
6	CO	36,6±1,5	29,2±0,4	34	SB	15,4±1,3	0±0
7	LE	34,3±1,1	22,3±2,3	35	LE	15,2±0,3	0±0
8	SB	33,2±2,1	26,7±1,6	36	NA	13,1±0,3	10,8±0,9
9	BA	31,3±1,2	20,9±1,2	37	LE	10,5±0,4	0±0
10	SB	31±1,6	17,8±0,5	38	SB	10,3±0,5	0±0
11	BA	29,5±0,8	9,7±0,5	39	LE	10,1±1,2	0±0
12	SB	29,3±0,5	20,9±1,9	40	SB	9,1±0	24,4±0,9
13	CO	29±0,3	0±0	41	BA	0±0	50,4±1,8
14	BA	27,4±0,2	0±0	42	BA	0±0	36,9±2,1
15	SB	26,5±2,2	18±1,4	43	BA	0±0	35,2±1,1
16	LE	25,9±1	16,1±1,2	44	BA	0±0	29,1±1,1
17	SB	25,8±0,9	16,9±1,1	45	NA	0±0	26,6±6,6
18	BA	25,1±1	45,1±0,3	46	BA	0±0	25±0,5
19	SB	24,5±1	0±0	47	BA	0±0	23,9±0,6
20	LE	24,4±2,9	19,2±1	48	LE	0±0	23,1±1,2
21	LE	24,3±1,7	20,1±0,9	49	LE	0±0	22,5±0,3
22	SB	23,9±0,9	22,1±0,8	50	SB	0±0	17,5±0,5
23	LE	23,8±0,8	0±0	51	BA	0±0	17,1±0,9
24	SB	23,7±0,1	18,1±0,2	52	BA	0±0	16±0,2
25	LE	23,3±2	12,4±2,9	53	SB	0±0	14,9±1
26	NA	23,1±0,2	15,6±1,1	54	LE	0±0	14,6±0,1
27	NA	22,9±1,4	19,6±1,3	55	NA	0±0	14,1±0,6
28	LE	22,3±1,3	14,9±1,3	56	BA	0±0	12,6±0,5

Fonte: Elaboração própria. N = Não houve halo de inibição. Análise realizada em triplicata e valores expressos em Média milímetro (mm), seguido do (Desvio Padrão) em milímetro (mm). BA = bacilo. CO = coco. LE = levedura. SB = simbiose. NA = morfologia não identificada. N= total de microrganismos isolados. n= total de microrganismos com atividade inibitória.

A partir dos resultados obtidos é perceptível notar que 29 isolados (36,70%) foram capazes de inibir ambos os patógenos testados, *S. aureus* e *E. coli*, sugerindo um amplo espectro de ação antimicrobiana. Por outro lado, 23 isolados (29,11%) não apresentaram atividade inibitória (Anexo 2).

Valiyan *et al.* (2021) avaliaram a atividade antimicrobiana do kombucha de chá verde fermentado por um período de 7 a 14 dias e observaram que *E. coli* apresentou halos de inibição variando de 10 a 20 mm, enquanto *S. aureus* mostrou halos de 11 a 17 mm. Bhattacharya *et al.* (2016) estudaram a atividade antimicrobiana da fração fenólica do kombucha e observaram halos de inibição para *E. coli* de 20,7 mm e para *S. aureus* de 18,0 mm.

Battikh *et al.* (2013) realizaram um estudo sobre o kombucha fermentado a partir de infusões de chá verde e chá preto por 21 dias, com o objetivo de investigar seu efeito antimicrobiano contra patógenos. O estudo mostrou que o kombucha de chá verde apresentou um potencial antimicrobiano mais pronunciado em comparação com o chá preto. Foram registrados halos de inibição que variaram de 10,5 a 14,5 mm para *E. coli* e de 9,5 a 26,5 mm para *S. aureus*, evidenciando uma maior inibição de *S. aureus* em comparação com *E. coli*.

Noormandi e Dabaghzadeh (2015) e Valiyan *et al.* (2021) sugeriram que o chá verde pode aumentar o potencial antibacteriano dos microrganismos do kombucha. Os polifenóis presentes no chá verde são conhecidos por suas propriedades de inibição do crescimento de *E. coli*.

Dos isolados que apresentaram inibição contra *E. coli* (40) apenas 9 não inibiram também *S. aureus*, por outro lado, dos 45 isolados que formaram halos contra *S. aureus*, 16 não apresentaram halos contra *E. coli*. Curiosamente, 50% dos halos acima de 20 mm contra *S. aureus*, estão dentro dos que não apresentaram inibições contra *E. coli*. Esses resultados sugerem diferenças na suscetibilidade dos patógenos aos compostos antimicrobianos produzidos pelos isolados. Pelo menos 10 isolados contra *E. coli* se destacaram com a formação de halos acima de 30 mm (8) e 40 mm (2), sendo morfologicamente identificados como LE (6), SB (2), CO (1) e BA (1). Para *S. aureus*, 2 isolados apresentaram halos acima de 30 mm e 2 isolados acima de 40 mm, todos classificados com BA.

A capacidade inibitória das Bactérias do Ácido Lático (BAL) está diretamente relacionada com a sua habilidade de acidificar o ambiente através do metabolismo de carboidratos. Esta acidificação contribui para a supressão do crescimento de microorganismos patogênicos e deteriorantes (Dias *et al.*, 2018). Além disso, Barbosa *et al.* (2015) reportaram que certas espécies de BAL podem sintetizar peptídeos antimicrobianos chamados bacteriocinas e produzir peróxido de hidrogênio. Ambos os compostos são eficazes na inibição de patógenos e microrganismos que causam deterioração, destacando o papel importante das BAL na promoção da segurança e estabilidade alimentar, assim como no potencial terapêutico para tratamentos relacionados à microbiota intestinal.

Nguyen *et al.* (2015) isolaram microrganismos de kombucha fermentado por 5 dias e avaliaram quanto à sua capacidade de inibição bacteriana. Foi observado que esses microrganismos apresentaram zonas de inibição contra várias cepas patogênicas: *E. coli* (8,50 mm), *Bacillus cereus* (6,75 mm), *Salmonella Typhimurium* (9,15 mm) e *Listeria monocytogenes* (9,00 mm). Os autores concluíram que as atividades antimicrobianas observadas estão relacionadas com os ácidos orgânicos secretados pelas leveduras e bactérias acéticas presentes no kombucha.

Czerucka e Rampal (2019) avaliaram as características das leveduras, especialmente *S. boulardii*, no controle de problemas intestinais. Os autores observaram que as cepas possuem uma habilidade de fixar toxinas e bactérias em sua parede celular, facilitando assim a eliminação desses agentes durante o trânsito intestinal. Além disso, foi constatado que estas leveduras são capazes de sintetizar proteínas de alto peso molecular, algumas das quais têm a capacidade de inibir a expressão de fatores de virulência de patógenos como *E. coli*. Esses achados destacam o potencial terapêutico de *S. boulardii* no manejo de distúrbios gastrointestinais.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, através de testes *in vitro*, constatou-se a atividade antibacteriana dos microrganismos isolados do kombucha contra as bactérias patogênicas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O substrato para a fermentação da kombucha foi preparado a partir do chá verde acrescido de xarope de açúcar mascavo e a adição de amostras doadas de SCOBYs. O chá foi fermentado de 7 dias para a obtenção de amostras e realização dos testes antagonistas contra as cepas patogênicas.

Foram isolados 79 microrganismos do kombucha identificados morfológicamente entre bacilos, cocos e leveduras. Dos 79 microrganismos isolados, 56 (70,88%) obtiveram resultados positivos em inibir o crescimento dos patógenos, seja de somente um ou de ambos. Observou-se que 41 isolados (51,90%) produziram halos acima de 20 mm, contra pelo menos uma das cepas patogênicas testadas, indicando uma forte atividade antimicrobiana.

O estudo em questão demonstrou a atividade antagonista dos microrganismos isolados do kombucha com um grande potencial antibacteriano contra os patógenos testados (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*). Mais estudos aprofundados são necessários para explicar o papel dos microrganismos constituintes do kombucha no combate de bactérias patogênicas à saúde humana. Ambas as bactérias possuem importância clínica em infecções humanas. Sendo assim, os microrganismos constituintes do kombucha podem ser explorados como uma nova alternativa para o tratamento de infecções bacterianas e a prevenção de infecções gastrointestinais, podendo ser usados como agentes probióticos que conferem benefícios a saúde humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-MOHAMMADI, A.R. et al. Chemical constitution and antimicrobial activity of kombucha fermented beverage. **Molecules**, v. 26, n. 16, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26165026>.

BARBOSA, S., M. et al. Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. **Food Microbiology**, v. 46, p. 254-262, 2015.

BATTIKH, H.; BARHROUF, A.; AMMAR, E. Antimicrobial effect of Kombucha analogues. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 71–77, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.12.033>.

BATTIKH, H. et al. Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 231–236, 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2011.00629.x>.

BHATTACHARYA, D. et al. Antibacterial activity of polyphenolic fraction of kombucha against enteric bacterial pathogens. **Current Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 885–896, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1136-3>.

BOGDAN, M. et al. Lactic acid bacteria strains isolated from Kombucha with potential probiotic effect. **Romanian Biotechnological Letters**, 2018.

BRASIL. Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019. Seção. In: Brasília, D.F. Resolve: **Estabelecer o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha em todo o território nacional, na forma desta Instrução Normativa e do seu anexo**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019.

BRUSCHI, J.S.; SOUSA, R.C.S.; MODESTO, K.R. O ressurgimento do chá de kombucha. **Revista de Iniciação Científica e Extensão**, 2018.

CZERUCKA, Dorota; RAMPAL, Patrick. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. **Microbes and infection**, v. 4, n. 7, p. 733-739, 2002

DIAS, P. A.; SILVA, D. T.; TIMM, C. D. Atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de grãos de kefir. **Ciência Animal Brasileira**, v.1 9, p. 1-8, e-40548, 2018.

DINEV, T. et al. Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* against pathogenic and food spoilage microorganisms: A review. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, p. 253–268, 2018. <https://doi.org/10.15547/bjvm.1084>.

FIJAN, S. Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, p. 4745–4767, 2014. <https://doi.org/10.3390/ijerph110504745>.

FU, C. et al. Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage. **Food Science and Technology**, 2014.

GAO, Z. et al. Inhibitory effect of lactic acid bacteria on foodborne pathogens: A review. **Journal of Food Protection**, p. 441–453, 2019. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-303>.

GOMES, R.J. et al. Acetic acid bacteria in the food industry: Systematics, characteristics and applications. **Food Technology and Biotechnology**, p. 139–151, 2018. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5593>.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. J. B. J. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochemical Journal**, v. 58, n. 2, p. 345, 1954.

HILL, C. et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>.

HOU, J. et al. Antimicrobial potential of kombucha against foodborne pathogens: A review. **Quality Assurance and Safety of Crops and Foods**, p. 53–61, 2021. <https://doi.org/10.15586/QAS.V13I3.920>.

ISLAM, S.U. Clinical Uses of Probiotics. **Medicine**, v. 95, n. 5, p. e2658, 2016. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002658>.

JAYABALAN, R. et al. A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, p. 538–550, 2014. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>.

KAPP, J.M.; SUMNER, W. Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. **Annals of Epidemiology**, v. 30, p. 66–70, 2018. <https://doi.org/10.1016/J.ANNEPIDEM.2018.11.001>.

KECHAGIA, M. et al. Health Benefits of Probiotics: A Review. **ISRN Nutrition**, p. 1–7, 2013. <https://doi.org/10.5402/2013/481651>.

KIM, J.; ADHIKARI, K. Current trends in kombucha: Marketing perspectives and the need for improved sensory research. **Beverages**, p. 1–19, 2020. <https://doi.org/10.3390/beverages6010015>.

KIVANÇ, M.; YAPICI, E. Kefir as a Probiotic Dairy Beverage: Determination Lactic Acid Bacteria and Yeast. **ETP International Journal of Food Engineering** [Preprint], 2015. <https://doi.org/10.18178/ijfe.1.1.55-60>.

LADEVANYA, D.; SHIRKOLE, S.; BALASUBRAMANIAN, P. Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. **Journal of Cleaner Production**, 295, p. 126454, 2021. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2021.126454>.

LEAL, J.M. et al. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **CYTA - Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 390–399, 2018. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>.

MAGALDI, S. et al. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 39-45, 2004.

MAIA, Y.L.M. et al. Kombucha: características e aspectos biológicos. **Revista Referências em Saúde da Faculdade Estácio de Sá de Goiás**, v. 3, n. 1, p. 114–123, 2020.

MALBAŠA, R. V. et al. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1727—1731, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.048>.

MARSH, A.J. et al. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, v. 38, p. 171–178, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003>.

MARSTON, H.D. et al. Antimicrobial resistance. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 316, n. 11, p. 1193–1204, 2016. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.11764>.

MENDONÇA, G.R. et al. Propriedades antioxidantes e efeitos antimicrobianos da kombucha: revisão da evidência científica. **Revista Contexto & Saúde**, v. 20, n. 40, p. 244–251, 2020. <https://doi.org/10.21527/2176-7114.2020.40.244-251>.

MIRANDA, J.F. et al. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. **Journal of Food Science**, p. 503–527, 2022. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>.

MUNITA, J.M.; ARIAS, C.A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, 2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.

NEFFE-SKOCIŃSKA, K. et al. Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. **CYTA - Journal of Food**, v. 15, n. 4, p. 601–607, 2017. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1321588>.

NGUYEN, N.K. et al. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1149–1155, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.018>.

NOORMANDI, A.; DABAGHZADEH, F. Effects of green tea on *Escherichia coli* as a uropathogen. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, p. 15–20, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2014.10.005>.

OLIVEIRA, J.L.; ALMEIDA, C.; BOMFIM, N.S. A importância do uso de probióticos na saúde humana. **Unoesc & Ciência**, p. 7–12, 2017.

OLIVEIRA, P. V. et al. Kombucha benefits, risks and regulatory frameworks: A review. **Food Chemistry Advances**, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100288>.

PEI, J. et al. Isolation, purification, and structural identification of a new bacteriocin made by *Lactobacillus plantarum* found in conventional kombucha. **Food Control**, v. 110, p. 106923, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106923>.

PEREIRA, G.V.M. et al. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. **Biotechnology Advances**, p. 2060–2076, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>.

PÉREZ, D.Q. Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque ‘Una salud’ Antimicrobial resistance: evolution and current perspectives in the context of the ‘One health’ approach. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, 2017.

ROGOSA, M.; MITCHELL, J. A.; WISEMAN, R. F. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. **J Bacteriol**, v. 62, n. 1, p. 132-133, Jul. 1951. DOI: 10.1128/jb.62.1.132-133.1951.

SANDERS, M.E. et al. Probiotics for human use. **Nutrition Bulletin**, p. 212–225, 2018. <https://doi.org/10.1111/nbu.12334>.

SILVA, K.A. et al. Kombucha beverage from non-conventional edible plant infusion and green tea: Characterization, toxicity, antioxidant activities and antimicrobial properties. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 34, p. 102032, 2021. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2021.102032>.

SILVA, R.A. et al. Resistência a Antimicrobianos: a formulação da resposta no âmbito da saúde global. **Saúde em Debate**, v. 44, n. 126, p. 607–623, 2020. <https://doi.org/10.1590/0103-1104202012602>.

SIMONS, A.; ALHANOUT, K.; DUVAL, R.E. Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: Overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. **Microorganisms**, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050639>.

SUEZ, J. et al. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. **Nature Medicine**, **Nature Research**, p. 716–729, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0439-x>.

TERZAGHI, B. E.; SANDINE, W. E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. **Applied Microbiology**, v. 29, n. 6, p. 807-813, 1975.

TRIPATHI, M.K.; GIRI, S.K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, p. 225–241, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>.

VALGAS, C. et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 369-380, 2007

VALIYAN, F.; KOOHSARI, H.; FADAVI, A. Use of Response surface methodology to investigate the effect of several fermentation conditions on the antibacterial activity of several kombucha beverages. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 5, p. 1877–1891, 2021. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04699-6>.

VANDENPLAS, Y.; HUYS G.; DAUBE, G. Probiotics: An update. **Jornal de Pediatria**, p. 6–21, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jped.2014.08.005>.

VELIĆANSKI, A.S. et al. Antioxidant and antibacterial activity of the beverage. **Food Technology and Biotechnology**, v. 52, n. 4, p. 420–429, 2014.

VILLARREAL-SOTO, S.A. et al. Understanding kombucha tea fermentation: a review. **Journal of Food Science**, p. 580–588, 2018. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>.

VINA, I. et al. Current evidence on physiological activity and expected health effects of kombucha fermented beverage. **Journal of Medicinal Food**, p. 179–188, 2014. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0031>.

WATAWANA, M.I. et al. Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. **Journal of Chemistry**, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/591869>.

ZHAO, L. et al. *In vitro* antibacterial activities and mechanism of sugar fatty acid esters against five food-related bacteria. **Food Chemistry**, v. 187, p. 370–377, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.108>.

ANEXO

Anexo 1 – Isolados do kombucha versus meio de cultivo de isolamento

MORFOLOGIA	MEIOS DE CULTIVO					TOTAL
	APT	YM	HS	MRS	M17	
BACILO	10	4	2	4	8	28
COCO	3	1	2	1		7
LEVEDURA	4	3	7	6		20
SIMBIÓTICOS	3	7	3	1	1	15
NÃO IDENTIFICADO	2	4	2	1		9
TOTAL	22	19	16	13	9	79

Fonte: Elaboração própria

Anexo 2 – Microrganismos isolados do kombucha que não apresentaram inibição (N) contra *S. aureus* e *E. coli*

Morfologia	Isolado	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
BA	KOA003BA	N	N
BA	KOA024BA	N	N
BA	KOA066BA	N	N
BA	KOY013BA	N	N
BA	KOY015BA	N	N
BA	KOR029BA	N	N
BA	KOR031BA	N	N
BA	KOM070BA	N	N
BA	KOM072BA	N	N
BA	KOM073BA	N	N
BA	KOM076BA	N	N
BA	KOM077BA	N	N
BA	KOM078BA	N	N
CO	KOA006CO	N	N
CO	KOA008CO	N	N
CO	KOR020CO	N	N
CO	KOH067CO	N	N
LE	KOA010LE	N	N
LE	KOH042LE	N	N
NA	KOA079NA	N	N
NA	KOY014NA	N	N
SB	KOM074SB	N	N
SB	KOY019SB	N	N

Fonte: Elaboração própria