

ANA AMÉLIA PAOLUCCI ALMEIDA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS E
DE COMPOSTOS FENÓLICOS E
NITROGENADOS DO CAFÉ: AVALIAÇÃO *IN*
VITRO E EM MODELO ALIMENTAR**

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2007

ANA AMÉLIA PAOLUCCI ALMEIDA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS E
DE COMPOSTOS FENÓLICOS E
NITROGENADOS DO CAFÉ: AVALIAÇÃO *IN*
VITRO E EM MODELO ALIMENTAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa Maria Beatriz Abreu Glória

Co-orientadora: Profa Elzília Aguiar Nunan

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2007

A447a Almeida, Ana Amélia Paolucci
Atividade antimicrobiana de extratos e de compostos fenólicos e nitrogenados do café : avaliação *in vitro* e em modelo alimentar / Ana Amélia Paolucci Almeida. – 2007.
135 f. : il.

Orientadora: Profa. Maria Beatriz Abreu Glória.
Co-Orientadora: Profa. Elzília de Aguiar Nunan
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia.

1. Agentes antibacterianos – Teses. 2. Café – Compostos fenólicos – Teses. 3. Café – Compostos nitrogenados – Teses. 4. Café – Pesquisa - Teses. 5. Enterobactérias – Teses. I. Título. II. Glória, Maria Beatriz Abreu. III. Nunan, Elzília de Aguiar. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia.

CDD: 663.93

Folha de aprovação

“Podemos realizar um sonho, se acreditarmos que ele existe.”

DEDICATÓRIA

Ao Henrique, amigo e companheiro, pelo incentivo constante, pelo carinho e confiança.
Obrigada pelo seu amor incondicional.

Às minhas queridas filhas, Juliana e Luiza, razão da minha vida, pela compreensão e carinho, nas horas ausentes.

Aos meus pais, Ângelo e Glorinha, modelos em que espelho minha vida.

Aos meus sogros, Antônio e Elin por acreditarem em mim e na minha profissão.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos que me trouxeram muitos instantes de alegria e paz em momentos de muito trabalho.

A todos vocês, dedico esta tese.

AGRADECIMENTOS

A Deus, obrigada por ter me dado saúde durante a minha trajetória e discernimento para ir de encontro às pessoas amigas.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelas bolsas concedidas durante o curso.

À professora Maria Beatriz Abreu Glória, minha orientadora, por seu apoio e profissionalismo em todas as fases deste doutorado. Obrigada pela sua dedicação e determinação, que foram sempre contribuições marcantes neste trabalho.

À professora Elzília de Aguiar Nunan, minha co-orientadora, por sua amizade e acolhimento. Obrigada pelo respeito e por sua maneira de acompanhar a busca e expansão do meu conhecimento. A sua persistência, disponibilidade e confiança foram os estímulos necessários para a construção do meu trabalho.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia, da Escola de Engenharia e do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, pela contribuição na minha formação científica.

A todos os funcionários da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Ao professor Vagner Rodrigues dos Santos da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, pela confiança e apoio.

Ao professor Leandro Soares de Oliveira que me despertou para o amplo mundo do café.

À professora Adriana Farah do Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela colaboração nas análises cromatográficas.

Aos professores Vicente Toledo e Tânia Mara P. Guimarães, pela disponibilização do laboratório.

Ao professor Lauro Mello Vieira, pelo apoio na realização das microfotografias.

Aos professores da minha banca de qualificação Maria Cristina Dantas Vanetti e Tasso Moraes e Santos, pelas críticas e sugestões.

Aos pesquisadores do CETEC Margareth Spangler e José Mario Carneiro Vilela, do Laboratório de Nanoscopia, pelo apoio para execução das imagens por microscopia de Força Atômica.

Aos Professores Dulce Regina Niffenegger e Souza e Edmar Chartone de Souza, pelo exemplo e incentivo.

Ao Professor Pier Carlo Braga da Faculdade de Medicina e Cirurgia de Milão, pelo envio dos artigos sobre Microscopia de Força Atômica.

À minha estagiária, amiga e colega Cristina da Cunha Naghetini pelo seu carinho, amizade e acolhimento desde os primeiros momentos.

À minha estagiária Daniela Álvares Machado Silva, pela sua amizade, dedicação e questionamentos durante a pesquisa.

À minha estagiária Michele Cristina Vilaça pela dedicação e apoio em todos os momentos.

À Tânia Maria Leite Silveira por seu apoio, amizade e boas palavras sempre nos momentos necessários.

Às colegas Lúcia Péret de Almeida, Sílvia Mendonça Vieira, Flávia Beatriz Custódio e Renata Adriana Labanca, pelas contribuições e pelo acolhimento desde os primeiros momentos.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica de Alimentos Paula Santiago, Giuliana Elisa de Oliveira, Flávia Vitorino Freitas, Ana Paula Souza Moreira, Cyntia Karine Barreto Batista, Tarliane Maria da Silva, Juliana Rigueira.

Aos professores da Universidade Federal de Minas Gerais Carlos Rosa, Geraldo Célio Brandão, Lígia Maria Moreira de Campos, Fernão Castro Braga.

À empresa Dialab pela doação de meios de cultura.

Aos alunos do laboratório de Controle de Qualidade Fernando Henrique, José Antônio, Isabela e Gisele.

Aos funcionários do laboratório de Controle de Qualidade Léo, Lúcia, Márcia, Mariinha e Luciano.

À Professora Maura Mary de Almeida Barreto pelas importantes sugestões.

À Andréa da Paz pelo apoio.

Agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para meu crescimento como pessoa e como profissional para a realização desta conquista

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	17
REVISÃO DA LITERATURA	19
1. CAFÉ	19
1.1 Produção.....	19
1.2 Composição química.....	21
1.3 Atividade biológica.....	25
1.3.1 Atividade antimicrobiana do café	26
2. COMPOSTOS QUÍMICOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMOS DE AÇÃO	28
2.1 Compostos fenólicos	28
2.1.1 Definição, formação e função.....	28
2.1.2 Atividade antimicrobiana.....	30
2.1.3 Mecanismo de ação antimicrobiana.....	32
2.2 Compostos nitrogenados.....	34
2.2.1 Definição, formação e função.....	34
2.2.2 Atividade antimicrobiana.....	35
2.2.3 Mecanismo de ação antimicrobiana.....	35
3. MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	36
3.1 Métodos para investigação da atividade antimicrobiana.....	36
3.1.1 Ensaio bioautográficos.....	37
3.1.2 Ensaio de difusão.....	37
3.1.3 Ensaio de diluição.....	38
4. ESTUDOS DE EFICIÊNCIA DE CONSERVANTES	38
4.1 Conservação de alimentos.....	38
4.2 Testes de aplicação e variáveis interferentes.....	40
4.3 Estudos de eficiência conservante em modelos alimentares.....	41
5. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	43
6. CONSIDERAÇÕES	43
OBJETIVOS	45

CAPÍTULO I TEORES DE ÁCIDOS FENÓLICOS, CAFEÍNA E TRIGONELINA, CARACTERÍSTICAS DE COR DE DIFERENTES AMOSTRAS DE CAFÉ E INFLUÊNCIA DO TIPO DE EXTRAÇÃO NO pH DO EXTRATO.....	47
RESUMO.....	47
I.1. INTRODUÇÃO.....	48
I.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
I.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
I.4. CONCLUSÕES.....	57
CAPÍTULO II ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> DE EXTRATO E DE COMPOSTOS FENÓLICOS E NITROGENADOS DO CAFÉ ISOLADOS E EM ASSOCIAÇÃO.....	58
RESUMO.....	58
II.1. INTRODUÇÃO.....	59
II.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	60
II.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
II.4. CONCLUSÕES.....	68
CAPÍTULO III ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> DE EXTRATOS DE CAFÉ E DA CAFEÍNA SOBRE <i>Streptococcus mutans</i>.....	69
RESUMO.....	69
III.1. INTRODUÇÃO.....	70
III.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	71
III.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
III.4. CONCLUSÕES.....	76
CAPÍTULO IV ATIVIDADE ANTIBACTERIANA <i>IN VITRO</i> DE EXTRATOS E DE COMPOSTOS FENÓLICOS E NITROGENADOS DO CAFÉ SOBRE ENTEROBACTÉRIAS... 	78
RESUMO.....	78
IV.1. INTRODUÇÃO.....	79
IV.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	80
IV.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
IV.4. CONCLUSÕES.....	93
CAPÍTULO V ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS QUÍMICOS DO CAFÉ EM DIFERENTES VALORES DE pH E EFICIÊNCIA CONSERVANTE EM UM	

MODELO ALIMENTAR	
RESUMO.....	95
V.1. INTRODUÇÃO.....	96
V.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	97
V.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	100
V.4. CONCLUSÕES.....	106
CAPÍTULO VI AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DE <i>Salmonella enterica</i> POR MICROSCOPIAS ÓTICA E DE FORÇA ATÔMICA, APÓS CONTATO COM ÁCIDO PROTOCATÉICO E CAFEÍNA	107
RESUMO.....	107
VI.1. INTRODUÇÃO.....	108
VI.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	109
VI.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	112
VI.4. CONCLUSÕES.....	120
CONCLUSÕES INTEGRADAS	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
ANEXOS	135

LISTA DE TABELAS

	[REVISÃO DA LITERATURA]	
1	Composição química de grãos de café (arábica e robusta) crus e torrados	22
	[CAPÍTULO I]	
I.1	Programa de gradiente para a determinação de ácidos fenólicos por CLAE.....	52
I.2	Características de cor (CIE L*a*b*) de amostras de café arábica moído.....	53
I.3	Teores de cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos em extrato aquoso de café de diferentes marcas obtido por ebulição por 3 min e filtração.....	54
	[CAPÍTULO II]	
II.1	Diâmetro dos halos de inibição obtidos pelo método de difusão em ágar para o extrato aquoso de café (4,0 mg/disco) e compostos químicos (40 µg/disco) frente a bactérias.....	63
II.2	Diâmetro dos halos de inibição obtidos pelo método de difusão em ágar para o extrato aquoso de café e associações desse extrato com compostos químicos do café frente a bactérias.....	65
II.3	Diâmetro dos halos de inibição obtidos pelo método de difusão em ágar para o extrato aquoso de café, a substância pura (ácidos cafêico, clorogênico, protocatéico, cafeína e trigonelina) e a associação do extrato com a substância frente a bactérias.....	67
	[CAPÍTULO III]	
III.1	Diâmetro dos halos de inibição de <i>S. mutans</i> obtidos pelo método de difusão em ágar de extratos aquosos, etanólicos e café expresso (4,0 mg/disco) de diferentes marcas de café	74
	[CAPÍTULO IV]	
IV.1	Diâmetro dos halos de inibição obtidos pelo método de difusão em ágar para extratos aquosos de café frente a espécies de enterobactérias.....	84
IV.2	Diâmetro dos halos de inibição obtidos pelo método de difusão em ágar para compostos químicos do café a 2 mg/mL frente a espécies de enterobactérias.....	86
IV.3	Absorbância a 595 nm em caldo BHI inoculado com <i>S. enterica</i> após 18 h de contato com diferentes concentrações de ácido cafêico, ácido clorogênico, ácido protocatéico, cafeína e trigonelina em placa de microtítulo.....	89
IV.4	Equações e coeficientes de determinação das regressões obtidas para algumas substâncias do café por modelo sigmoidal de relação dose	

	resposta e concentrações inibitórias de 50% e de 90% para <i>S. enterica</i>	90
IV.5	Percentagem de inibição para diferentes concentrações das substâncias do café sobre <i>S. enterica</i> pelo método turbidimétrico, após 24 h de contato.....	92
	[CAPÍTULO V]	
V.1	Influência do pH na inibição de <i>S. enterica</i> por alguns compostos químicos do café em caldo BHI, após 18 h de contato.....	100
V.2	Área sob a curva de crescimento de <i>S. enterica</i> em LDR (pH 4,5 e 5,5) na presença de cafeína (4,96 mg/mL) e de ácido protocatéico (4,14 mg/mL), durante 28 dias de contato a 25 °C.....	104
	[CAPÍTULO VI]	
VI.1	Transmitância e absorvância, percentagem de inibição e pH após 24 h de incubação de <i>S. enterica</i> em caldo BHI, na presença ou não de ácido protocatéico ou cafeína, e em pH ajustado ou não para 4,5.....	113

LISTA DE FIGURAS

[REVISÃO DA LITERATURA]	
1	Distribuição da produção de café no Brasil em função dos estados produtores..... 19
2	Estruturas químicas dos ácidos clorogênico, caféico e protocatéico..... 30
3	Estruturas químicas da cafeína (a) e da trigonelina (b)..... 34
[CAPÍTULO I]	
I.1	Valores de pH dos extratos aquosos por ebulição/filtração, dos extratos etanólicos e dos extratos aquosos (expresso) para as marcas de café..... 57
[CAPÍTULO III]	
III.1	Influência da concentração e do tempo de contato da cafeína sobre o crescimento de <i>S. mutans</i> 76
[CAPÍTULO IV]	
IV.1	Fotografia de uma placa de microtítulo inoculada com <i>S. enterica</i> , após 18 h de incubação a 36,5 °C..... 88
IV.2	Percentual de inibição de <i>S. enterica</i> para diferentes concentrações de substâncias químicas do café obtido pelo método de diluição em placa de microtítulo após 18 h de incubação a 36,5 °C..... 88
IV.3	Influência da concentração e do tempo de contato do ácido protocatéico (a), cafeína (b) e trigonelina (c) sobre o crescimento de <i>S. enterica</i> 91
[CAPÍTULO V]	
V.1	Contagem de células viáveis de <i>S. enterica</i> em LDR (pH 4,5 e 5,5) na presença de ácido protocatéico (4,14 mg/mL) e de cafeína (4,96 mg/mL), durante 28 dias de contato, a 25 °C..... 103
[CAPÍTULO VI]	
VI.1	Microfotografia em microscópio ótico de uma cultura de <i>S. enterica</i> , após 24 h de crescimento em caldo BHI a 36,5 °C na ausência (a) controle, e na presença de (b) 4,14 mg/mL de ácido protocatéico e (c) 4,96 mg/mL de cafeína, corada pelo método Gram com aumento de 1000 x..... 115
VI.2	Imagens de microscopia de força atômica de <i>S. enterica</i> após 24 h de crescimento em caldo BHI a 36,5 °C na ausência (a) controle (15x15 µm), e na presença de (b) 4,14 mg/mL de ácido protocatéico (30x30 µm), e (c) 4,96 mg/mL de cafeína (15x15 µm)..... 116

VI.3	Imagens de microscopia de força atômica de <i>S. enterica</i> após 24 h de crescimento em caldo BHI a 36,5 °C na ausência (a) controle (15x15 µm), e na presença de (b) 4,14 mg/mL de ácido protocatéico (30x30 µm), e (c) 4,96 mg/mL de cafeína (15x15 µm).....	118
	[ANEXO]	
A.1	Perfil cromatográfico dos ácidos clorogênicos de uma amostra de café.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS

3-CQA	-	ácido 3-cafeoilquínico
4-CQA	-	ácido 4-cafeoilquínico
5-CQA	-	ácido 5-cafeoilquínico
ABIC	-	Associação brasileira das indústrias de café
BHI	-	caldo infuso de cérebro e coração
CCD	-	cromatografia de camada delgada
CGA	-	ácidos clorogênicos
CLAE	-	cromatografia líquida de alta eficiência
EA	-	extrato aquoso
IC50	-	concentração inibitória mínima de 50%
IC90	-	concentração inibitória mínima de 90%
LDR	-	leite desnatado reconstituído
MIC	-	concentração inibitória mínima
MO	-	microscopia ótica
MFA	-	microscopia de força atômica
MTT	-	sal de tetrazólio [brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazol
rpm	-	rotações por minuto
RMN	-	ressonância magnética nuclear

RESUMO

A atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos e de compostos fenólicos e nitrogenados do café (ácido caféico, ácido clorogênico, ácido protocatéico, cafeína e trigonelina) isolados ou em associação sobre 15 espécies de bactérias, duas de leveduras e uma de fungo filamentosos foi investigada pelo método de difusão em ágar. Observou-se atividade antibacteriana, com destaque para *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. Não foi verificada atividade antifúngica dos extratos e compostos estudados. Foi observado efeito positivo da associação do extrato de café com a cafeína sobre *Bacillus subtilis*. Não houve influência significativa de diferentes marcas de café, do tipo de solvente extrator e do modo de preparo na inibição de *S. mutans*. Estudo cinético utilizando o método turbidimétrico indicou significativa atividade sobre *S. mutans* em níveis de cafeína $\geq 4,0$ mg/mL. As concentrações inibitórias de 50% e 90% das substâncias sobre *S. enterica*, calculadas pelo método de diluição em placa de microtítulo, indicaram maiores atividades antimicrobianas do ácido protocatéico, cafeína e trigonelina. Estudo cinético empregando o método turbidimétrico indicou que o ácido protocatéico e a cafeína apresentaram os maiores efeitos antimicrobianos sobre *S. enterica* em 24 h. O pH interferiu na atividade antimicrobiana das substâncias sobre *S. enterica*. Elevada atividade antimicrobiana foi obtida em pH 4,5 para cafeína e ácido protocatéico (96%), seguida da trigonelina e ácido clorogênico (80%). Estudos em modelo alimentar constituído de leite desnatado, pH 4,5 e 5,5, 25 °C/28 dias, inoculado com 10^6 UFC/mL de *S. enterica* indicaram maior eficiência conservante do ácido protocatéico, pH 4,5, comparado à cafeína, com inibição de até três ciclos logarítmicos, em relação ao controle. Alterações morfológicas de *S. enterica* após 24 h de contato com ácido protocatéico e com cafeína foram observadas em microscopias óptica e de força atômica. Pode-se inferir que a cafeína tenha a sua ação antimicrobiana relacionada à divisão celular, com uma possível interferência na formação do septo.

Palavras-chave: café; atividade antimicrobiana; compostos fenólicos e nitrogenados; enterobactérias.

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF COFFE EXTRACTS, PHENOLICS AND NITROGENOUS COMPOUNDS: *IN VITRO* EVALUATION IN A FOOD MODEL. The *in vitro* antimicrobial activity of coffee extracts and coffee chemical compounds (caffeic acid, chlorogenic acid, protocatechuic acid, caffeine and trigonelline) isolated or in association against 15 bacteria, 2 yeasts and 1 filamentous fungus were investigated by the agar diffusion method. There was antibacterial activity, mainly against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. There was no antifungal activity of the extracts and chemical compounds. The association of caffeine with the coffee extract provided enhanced antimicrobial effect against *Bacillus subtilis*. The inhibition of *S. mutans* was not affected by coffee brand, type of solvent and way of preparation. Kinetic studies using the turbidimetric method indicated that significant effect against *S. mutans* was observed only at ≥ 4.0 mg of caffeine/mL. The 50 and 90% inhibitory concentrations using the microtiter plate dilution method and *S. enterica* indicated that protocatechuic acid, caffeine and trigonelline promoted the highest inhibitory effects. Kinetic studies using the turbidimetric method indicated that protocatechuic acid and caffeine had the higher antimicrobial effects against *S. enterica* for 24 h. pH affected the antimicrobial activity of the compounds against *S. enterica*. High inhibition was observed at pH 4.5 for caffeine and protocatechuic acid (96%), followed by trigonelline and chlorogenic acid (80%). The preservative effect of protocatechuic acid and caffeine in a non-fat dry milk food model, pH 4.5 and 5.5, with 10^6 UFC/mL of *S. enterica* was investigated for 28 days at 25 °C. Protocatechuic acid, pH 4.5, showed a higher preservative effect with a three log cycle inhibition compared to the control. However, the antimicrobial activity was reduced by the presence of milk components. Morphological alterations of *S. enterica* after 24 h contact with protocatechuic acid and caffeine were observed by optic and atomic force microscopy. It can be inferred that the inhibitory effect of caffeine is related to cell division, with a possible interference in the formation of septum.

Key words: coffee; antimicrobial activity; phenolic acids; caffeine; trigonelline; enterobacteria.

INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais populares em todo o mundo, amplamente consumido é apreciado tanto pelo sabor e aroma, como também por seu efeito estimulante. Atualmente, um grande número de propriedades benéficas à saúde tem sido atribuído ao café (ALMEIDA et al., 2003; YEN et al., 2005; FARAH et al., 2006a), entre elas a atividade antimicrobiana (DAGLIA et al., 2002; DOGAZAKI et al., 2002; FURUHATA et al., 2002).

Os microrganismos são as formas de vida mais abundantes do planeta e muitos são potencialmente patogênicos para os seres vivos. Tanto vegetais como animais têm evoluído, combatendo o ataque constante de microrganismos, desenvolvendo sistemas de defesa que variam de acordo com o organismo. Nos vegetais superiores, tem sido observada a presença de compostos com amplo espectro de ação, e com potencial aplicação como agentes terapêuticos e como conservantes de alimentos (MONTANO & VARGAS, 2002).

Estudos têm sido realizados para investigar as propriedades antimicrobianas do café e de alguns compostos químicos nele presentes. Extratos aquosos de café e substâncias como os ácidos clorogênico, caféico e protocatéico apresentaram efeito inibidor sobre *Legionella pneumophila*, bactéria causadora de infecções respiratórias (FURUHATA et al., 2000; 2002; DOGAZAKI et al., 2002). Embora esses estudos apontassem diferença na atividade antimicrobiana dos compostos investigados, apenas uma bactéria foi investigada.

BUCHANAN & FLETCHER (1978) observaram a inibição da produção de aflatoxina por *Aspergillus parasiticus* pela cafeína. Resultados similares foram relatados por NARTOWICZ et al. (1979), após avaliarem grãos de café com cafeína e descafeinados e por CHALFOUN et al. (2000), ao investigarem o efeito da cafeína no crescimento de algumas espécies dos fungos *Fusarium*, *Cladosporium* e *Aspergillus*. Entretanto, DAGLIA et al. (2002) inferiram que a cafeína não possuía atividade antibacteriana sobre *S. mutans*, após observarem que a atividade antimicrobiana não variava no café com e sem cafeína.

Os ácidos *p*-cumárico e ferúlico, inibiram totalmente o crescimento de bactérias do rumem de bovinos (CHENSON et al., 1982), enquanto pequena atividade antimicrobiana dos ácidos caféico, *p*-cumárico e ferúlico foi observada sobre a bactéria

Pseudomonas fluorescens (BARANOWSKI & NAGEL, 1982). HERALD & DAVIDSON (1983) também observaram atividade antimicrobiana desses ácidos contra *E. coli*, *S. aureus* e *B. cereus*. WEN et al. (2003) descreveram efeito bactericida causado pelos ácidos hidrocínâmicos sobre *Listeria monocytogenes*. PENNA et al. (2001) observaram atividade antifúngica do ácido protocatéico, extraído de plantas originadas da Argentina, entretanto, não consideraram o efeito significativo para estudos posteriores. VAQUERO et al. (2007) observaram atividade antimicrobiana dos ácidos protocatéico e caféico, presentes em vinho, sobre *E. coli*.

Os estudos da atividade antimicrobiana do café e de alguns de seus componentes, relatados na literatura até o momento, revelaram alguns resultados conflitantes, como é o caso da cafeína sobre os microrganismos. Além disso, os estudos sobre bactérias incluíram um reduzido espectro (quatro bactérias Gram positivas e cinco Gram negativas, entre elas *E. coli*). Nenhum estudo foi relatado na literatura, até o momento, sobre a atividade antimicrobiana de componentes do café em leveduras.

A pesquisa da atividade antimicrobiana de extratos de café e a seleção de substâncias com propriedades antimicrobianas apresentam-se como alternativa aos compostos químicos usados na conservação de alimentos. Assim, a realização de um estudo investigativo mais abrangente e mais profundo da atividade antimicrobiana do café sobre diversos microrganismos impactantes para a saúde humana e a sua utilização em modelo alimentar é de grande relevância.

No presente trabalho, foi pesquisada a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos de café, de compostos fenólicos e nitrogenados presentes no café e de associações de extrato de café e compostos químicos, contra 15 espécies de bactérias, duas de leveduras e uma de fungo filamentoso. Foram determinadas, pela primeira vez, as concentrações inibitórias para as substâncias estudadas, empregando-se a *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium como microrganismo teste. Considerando-se que a aplicação prática de compostos naturais na conservação de alimentos pode ser limitada pela interação desses compostos com ingredientes do alimento, foi feito um estudo para determinar a eficácia do ácido protocatéico e da cafeína como conservante em um modelo alimentar constituído de leite desnatado. Para inferir sobre o modo de ação dessas substâncias sobre as células de *S. enterica*, foram investigadas alterações morfológicas ocasionadas, após um tempo de contato de 24 h, por microscopia ótica e microscopia de força atômica.

REVISÃO DA LITERATURA

1. CAFÉ

1.1 Produção

O Brasil ocupa o primeiro lugar na produção mundial de café, com uma produção prevista para a safra 2006/2007 de 41,6 milhões de sacas. Esse número representa um crescimento de 26,2%, ou 8,6 milhões de sacas a mais em relação à safra anterior (ABIC, 2006; SINDICAFÉ, 2006).

A cultura do café é praticada em todos os continentes. Os principais países produtores encontram-se na América do Sul (Brasil e Colômbia), América Central e Ásia (Vietnã) (SINDICAFÉ, 2006). Cerca de 86% do café do Brasil é produzido nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná e São Paulo (Figura 1). Minas Gerais é o maior produtor, detendo 47% da produção. Em segundo lugar está o Espírito Santo, com 19% (maior produtor de *Coffea canephora*) e na terceira colocação está São Paulo, com 13%. O Paraná detém a quarta colocação, com 7% da produção do café nacional (DEMARCHI, 2003).

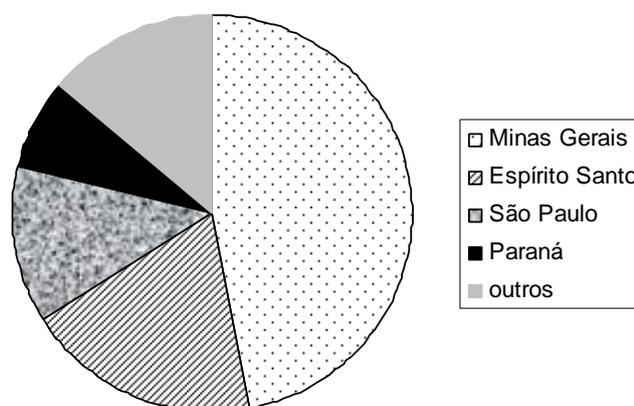


Figura 1. Distribuição da produção de café no Brasil em função dos estados produtores.

Duas espécies de café são comercialmente exploradas em nível mundial: *Coffea arabica* (arábica), considerada mais nobre, e *Coffea canephora* (robusta), considerada mais ácida, porém mais resistente a pragas (SMITH, 1989; PETTIGREW, 1999). Essas duas espécies de café são adaptadas a diferentes ambientes ecológicos, regiões montanhosas tropicais (> 600 m), principalmente na América Latina, leste da África e Índia e planícies do oeste da África, Indonésia, Vietnã e Brasil (KY et al., 2001). *C. arabica* totaliza 80% da produção mundial, sendo suas variedades as mais apreciadas pelos consumidores de café (SMITH, 1989).

Na maioria das áreas de cultivo, há uma colheita por ano. A seleção da época para a colheita é fundamental. Se os frutos não estiverem maduros, os grãos não estarão plenamente desenvolvidos ou amadurecidos no seu interior e não amadurecerão após serem colhidos. Por outro lado, se os frutos estiverem maduros demais, os grãos estragarão. Como os frutos amadurecem em tempos diferentes, o método mais recomendado é a colheita de apenas alguns frutos por vez e o retorno aos mesmos arbustos a cada dez dias, até que toda a colheita seja feita (LUNA-FILHO, 2004). Mesmo em regiões apropriadas ao plantio do café, as alterações nas condições climáticas podem provocar maturações desuniformes. Isso ocasiona a presença de frutos verdes ou a ocorrência de fermentações indesejáveis. Assim, é importante o estabelecimento de um estágio ideal de maturação fisiológica para a colheita (MALTA et al., 2003).

A aceitabilidade da bebida café está relacionada a uma série de fatores que são afetados durante as fases pré e pós-colheita dos grãos. Os atributos de classificação estão vinculados não só às condições naturais (solo, clima, chuvas, altitude), como também aos cuidados adotados no cultivo (adubação, poda, seleção dos pés, colheita e manipulação dos frutos) (LUNA-FILHO, 2004).

O beneficiamento é realizado após a colheita e pode ser realizado por via úmida ou por via seca. No beneficiamento por via úmida, as cerejas, cuidadosamente colhidas, passam por uma lavagem preliminar, durante a qual frutos com qualidade inferior são separados por flotação e os resíduos, como pedras, são removidos. As cerejas passam pela despulpadora, e as sementes são levadas para o separador rotatório para remover a polpa remanescente. No estágio de fermentação, que se passa em grandes tanques de concreto, a mucilagem aderida é quebrada pela ação de enzimas e as sementes são lavadas. Em seguida, as sementes são secas ao sol ou em secadores mecânicos (SMITH, 1989).

No beneficiamento por via seca, após a colheita, o café é colocado em local apropriado, com uma camada de aproximadamente 5 cm de espessura, e é constantemente misturado até que esteja completamente seco. Durante a noite, o café é coberto, sendo todo o processo realizado em, aproximadamente, três semanas. Em ambos os processos a umidade final não deve ser superior a 12% (SMITH, 1989).

Após a secagem, o café está pronto para os estágios finais de limpeza, descascamento e classificação. O café (verde) é enviado para a indústria, onde passa pelo processo de torração que consiste na aplicação de considerável calor ao grão, até que sua cor atinja um tom marrom característico. Em seguida, o café é rapidamente resfriado por corrente de ar ou por spray com água. Durante essa etapa, o grão de café passa por duas transformações. No estágio inicial, que dura cerca de 80% do tempo de torração, a cor é gradualmente modificada até atingir o marrom. O segundo estágio envolve pirólise com dilatação do grão e um escurecimento seguido da emissão de uma fumaça oleosa e som crepitante. Dessa forma, ocorre uma rápida mudança química, que só é interrompida após o resfriamento rápido. O grão de café torrado mantém as características de “flavour” por aproximadamente uma semana, em condições normais de atmosfera (SMITH, 1989). O grau dessas transformações depende, principalmente, da estabilidade dos diversos componentes do café verde ao calor aplicado durante o processo de torração. O grau de torração pode ser medido por meio da cor ou pela perda de peso que ocorre durante o processo, sendo essa perda consequência da perda de umidade e de uma fração de material orgânico volatilizado durante o processo (SABBAGH & YOKOMISO, 1976).

1.2 Composição química

O café é uma mistura complexa de compostos químicos de ocorrência natural e compostos formados durante o processo de torração (DAGLIA et al., 1998). Do ponto de vista químico, o café é uma das bebidas mais complexas. Essa complexidade se deve tanto pela presença de uma grande quantidade de compostos químicos, como pela possível reação e interação desses compostos durante o processamento (CLARKE & MACRAE, 1989). Durante o processo de torração ocorrem consideráveis alterações na composição química do café, substâncias lábeis são degradadas, enquanto outras interagem para formar produtos complexos. Por essa razão, o café é um dos alimentos que mais é alterado durante o seu processamento (SMITH, 1989).

A água é um componente importante e seu teor varia de acordo com o tipo do café. No grão de café verde, o conteúdo é de 10% a 13% (p/p), no café torrado é de 5% (p/p) e no café instantâneo varia entre 4% e 5% (p/p). O café é capaz de reter água em camadas monomoleculares e polimoleculares, nas superfícies internas e externas, ou por capilaridade através dos microporos e macroporos presentes na matriz (CLARKE, 1989).

Na Tabela 1 é apresentada a composição química em grãos crus e torrados de cafés arábica e robusta. Os carboidratos constituem 50% a 60% do peso do café verde em grão (SABBAGH et al., 1977). O café verde contém uma variedade de carboidratos, convencionalmente subdivididos em grupos de polissacarídeos, e açúcares de baixo peso molecular incluindo tri-, di- e monossacarídeos (TRUGO, 1989). Entre seus componentes, encontram-se a sacarose, a celulose, as substâncias pécicas e os polissacarídeos de alto peso molecular (SABBAGH et al., 1977). BERNAL et al. (1996) identificaram e quantificaram em amostras de café, os seguintes carboidratos: manitol, arabinose, raminose, galactose, glicose, sacarose, manose e frutose e detectaram diferenças nos seus conteúdos.

Tabela 1. Composição química de grãos de café (arábica e robusta) crus e torrados

Componentes	Composição química/ grão de café cru e torrado (g/100 g bs)			
	arábica		robusta	
	cru	torrado	cru	torrado
Minerais	3,0-4,2	3,5-4,5	4,0-4,5	4,6-5,0
Cafeína	0,9-1,2	Aprox. 1,0	1,6-2,4	Aprox. 2,0
Trigonelina	1,0-1,2	0,5-1,0	0,6-0,75	0,3-0,6
Lipídios	12,0-18,0	14,5-20,0	9,0-13,0	11,0-16,0
Ácido clorogênico total	5,5-8,0	1,2-2,3	7,0-10,0	3,9-4,6
Ácidos alifáticos	1,5-2,0	1,0-1,5	1,5-2,0	1,0-1,5
Oligossacarídeos	6,0-8,0	0-3,5	5,0-7,0	0-3,5
Polissacarídeos totais	50,0-55,0	24,0-39,0	37,0-47,0	nd
Aminoácidos	2,0	nd	2,0	nd
Proteínas	11,0-13,0	13,0-15,0	11,0-13,0	13,0-15,0

Fonte: SMITH (1989); bs – base seca. nd - não detectado.

Durante a torração, ocorre a degradação da sacarose, sendo a sua velocidade função da intensidade. Na torração leve, em torno de 96% a 97% da sacarose é degradada. Na torração média, esse valor sobe para 99% e, na escura, 100% da sacarose é degradada. Glicose e frutose são progressivamente degradadas e variam

de acordo com o grau de torração empregado em diferentes países, podendo corresponder a 0,26% e 0,16% nos EUA, e a 0,3% e 0,05% na Alemanha, respectivamente (TRUGO, 1989).

Componentes nitrogenados são todos aqueles compostos que contém nitrogênio orgânico ou inorgânico (MACRAE, 1989). Dentre os compostos nitrogenados existentes no café, destacam-se a cafeína, a trigonelina, as proteínas, os aminoácidos, as aminas e alguns componentes voláteis. Esses compostos totalizam 25% da composição do grão de café cru (SMITH, 1989).

A perda de nitrogênio de aminoácidos em grãos de café torrados é dependente do grau de torração e pode variar entre 20% e 67%. Entretanto, a cafeína praticamente não apresenta alteração durante a torração (MACRAE, 1989).

A presença da trigonelina tem pouca influência na qualidade do café, pois esse composto está presente em pequenas quantidades nos grãos, correspondendo a 1,0% no café arábica e a 0,7% no café robusta (SMITH, 1989; DE MARIA et al., 1995), e segundo ZHENG & ASHIHARA (2004), o seu conteúdo corresponde a 2,0% do peso seco.

Entretanto, a grande importância da trigonelina se refere aos aspectos nutricionais, pois durante a torração essa substância é convertida a ácido nicotínico (niacina), fazendo do café uma fonte dessa vitamina na dieta. O café é um dos únicos produtos que, mediante um processo tão drástico como a torração, produz uma vitamina importante para o metabolismo humano. Durante essa etapa do processamento, a trigonelina é desmetilada para formar a niacina, em quantidades que podem chegar próximo a 20 mg por 100 g de café torrado (MAZZAFERA, 1991; MONTEIRO & TRUGO, 2005). O conteúdo de ácido nicotínico no grão cru varia de 1,6 a 4,4 mg por 100 g, aumentando, aproximadamente, 10 vezes após a torração, devido à degradação da trigonelina que é dependente do tempo e temperatura empregados (MACRAE, 1989).

CASAL et al. (2000) analisaram o conteúdo de trigonelina, ácido nicotínico e cafeína em café torrado e utilizaram esses compostos nitrogenados para a diferenciação das espécies de café *C. arabica* e *C. canephora*, provenientes de diferentes regiões geográficas e submetidas ao mesmo processo de torração. Segundo esses autores, as duas espécies de café foram diferenciadas pelo seu conteúdo de trigonelina (mais alto para o *C. arabica*) e cafeína (mais alto para o *C.*

canephora), entretanto, o ácido nicotínico não pôde ser empregado como fator discriminante e não houve associação desse com as origens geográficas das amostras.

O conteúdo de lipídeos nos grãos de café depende da espécie. Grãos do café arábica possuem 15% de lipídeos em sua constituição, em base seca, e o café robusta possui apenas 10%. NIKOLOVA-DAMYANOVA et al. (1998) identificaram 10 ácidos graxos em café. Ácidos palmítico e linoléico foram os ácidos graxos predominantes. O óleo do café contém quantidade moderada e quase igual de ácidos esteárico e oléico. O conteúdo de ácido mirístico, palmitoléico e behênico representa menos de 1%. GONZÁLEZ et al. (2001) determinaram o conteúdo de triglicérides e tocoferóis em grãos, verdes e torrados, de cafés arábica e robusta. Esses autores afirmaram que as diferenças na quantidade de tocoferóis foram significativas e poderiam ser empregadas na diferenciação de variedades de café após o processo de torração, sendo importante para autenticação do café.

Cafés verdes contêm uma grande variedade de polifenóis a exemplo do ácido clorogênico, ácido caféico, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico (RICHELLE et al., 2001). Os ácidos clorogênicos (CGA) e compostos relacionados são os principais componentes da fração fenólica dos grãos de café verde, alcançando teores de até 14% (em peso seco) (FARAH & DONANGELO, 2006).

O grão de café verde possui um conteúdo de CGA maior do que a maioria das plantas, enquanto o conteúdo no café torrado pode atingir até 7% da composição (TRUGO & MACRAE, 1984; MONTEIRO & TRUGO, 2005) e 5% segundo SMITH (1989). Uma grande parte dos ácidos clorogênicos, principalmente os ácidos quínicos perdidos estarão presentes nos pigmentos, na formação de compostos fenólicos e nos gases produzidos pelo processo. Os CGA determinam as variações das características químicas e a formação de aroma durante o processamento do café. Entre suas funções, destacam-se o controle do nível do ácido indol acético, a proteção contra infecção microbiana, insetos predadores, aves e mamíferos. Além disso, são precursores da biossíntese da lignina (CLIFFORD, 1989).

Os CGA são um conjunto de cinco grupos principais de compostos fenólicos e seus isômeros formados, principalmente, pela esterificação do ácido quínico com um dos seguintes ácidos derivados do ácido cinâmico (ácido caféico, ácido ferúlico, ou o *p*-cumárico). São eles: os ácidos cafeoilquínicos (CQA), com três isômeros principais (3-, 4-, e 5-CQA); os ácidos dicafeoilquínicos (diCQA), cujos isômeros principais são 3,4-diCQA; 3,5-diCQA; 4,5-diCQA; ácidos feruloilquínicos com três isômeros (3-, 4-, e 5-

FQA), ácidos *p*-cumaroilquínicos com três isômeros (3-, 4- e 5-pCoQA), e os ácidos cafeoilferuloilquínicos (FARAH et al., 2005; MONTEIRO & TRUGO, 2005; FARAH & DONANGELO, 2006).

Os conteúdos de CGA e de cafeína no café robusta são maiores do que no café arábica, enquanto que o conteúdo de trigonelina apresenta-se menor no café robusta (NOGUEIRA & TRUGO, 2003). No *C. canephora* e no *C. arabica* foram encontrados teores de 5 e 4-CQA de 6,85% e 3,06%, de cafeína de 2,54% e 1,22% e de trigonelina de 1,01% e 1,19%, respectivamente (KY et al., 2001).

O aroma do café é formado por uma mistura complexa de compostos voláteis que apresentam concentrações diferentes e, por isso, a sua contribuição para o aroma final do café é bem variada, podendo inclusive ocorrer interações sinérgicas e antagônicas entre os mesmos (MOREIRA & TRUGO, 2000). No café torrado, grande parte dos compostos voláteis é produto da reação de Maillard que ocorre durante a etapa de torração (DART & NURSTEN, 1989).

A ocorrência de uma grande variedade de grupos químicos como componentes do café tem levado muitos pesquisadores a investigar a sua bioatividade (DAGLIA et al., 2002).

1.3 Atividade biológica

Durante as últimas décadas, estudos *in vitro* e *in vivo* esclareceram os efeitos do café e de compostos químicos nele presentes à saúde humana. Investigações realizadas ao longo dos últimos anos permitiram concluir que o consumo moderado de café não apresenta risco para a saúde humana (ALMEIDA et al., 2003). Não parece haver associação positiva entre o consumo de café e a ocorrência de câncer em geral. Inclusive, muitos estudos apresentaram dados comprovando a existência de fatores ou substâncias presentes no café que diminuía o risco de câncer de cólon (ROSENBERG et al., 1989).

Várias funções farmacológicas têm sido atribuídas aos ácidos clorogênicos, tais como, a ligação a centros opióides do cérebro; atividade inibitória sobre as integrases que participam na replicação do vírus HIV; indução da diminuição dos níveis sanguíneos de glicose, por meio da inibição da enzima glicose-6-fosfatase; efeito indutor na replicação e na mobilidade de macrófagos de camundongos, o que

acarretaria um aumento da imunidade e característica antimutagênica (MONTEIRO & TRUGO, 2005).

Atualmente, além de terem sido esclarecidas várias controvérsias em relação ao efeito negativo do café à saúde humana, atribuem-se ao café e a compostos nele presentes, um grande número de propriedades benéficas à saúde (ALMEIDA et al., 2003; YEN et al., 2005; FARAH et al., 2006a) entre elas, a atividade antimicrobiana (DAGLIA et al., 2002; DOGAZAKI et al., 2002; FURUHATA et al., 2002).

O estudo desses compostos é extremamente complexo e merece atenção por parte dos pesquisadores. Os esforços nessa área estão direcionados para a pesquisa de compostos com atividades biológicas tais como, atividade antioxidante, anticarcinogênica, antiteratogênica, antimicrobiana, naturalmente presentes no café ou resultantes de reações durante o processamento. Pesquisas são necessárias para entender os fatores que afetam a manutenção e/ou a formação de substâncias de interesse no café e em produtos que os contêm.

1.3.1 Atividade antimicrobiana do café

Em relação à atividade antimicrobiana, MATTHEWS & HAAS (1993) observaram no broto do café atividade antimicrobiana para fungos como *Aspergillus niger* e *Penicillium camemberti* e baixa atividade contra bactérias como *E. coli*.

Por outro lado, DAGLIA et al. (1994a) avaliaram a atividade antibacteriana do café em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e observaram resultados positivos com *E. coli* e *S. aureus*. Esses autores observaram que o café com maior grau de torração possuiu atividade superior aos de torração média e baixa, e que o processo de preparo da bebida café não influenciou a atividade antibacteriana.

DAGLIA et al. (1994b) relacionaram a atividade antibacteriana contra *S. aureus* a compostos químicos presentes no café torrado. Esses autores desenvolveram um modelo capaz de prever a atividade antibacteriana de diferentes cafés, considerando a soma do conteúdo de trigonelina e ácido nicotínico e a razão do ácido 5-cafeoilquínico e a cafeína, que são dependentes do grau de torração e podem ser usados como forma de monitorar esse processo. DAGLIA et al. (1998) extraíram frações de café e isolaram um composto com forte atividade antibacteriana para *S. aureus* e *Streptococcus mutans*. O composto isolado possuía propriedade ácida fraca e baixa massa molecular, não ultrapassando 200 Da. Esses autores concluíram que o processo de torração induz à atividade antimicrobiana, devido a compostos gerados

pela reação de Maillard, pela caramelização de carboidratos, pela decomposição térmica e pela pirólise de compostos orgânicos.

DAGLIA et al. (2002) investigaram a influência de extratos de café verde e torrado na adesão de *S. mutans*. Todos os extratos de café investigados influenciaram na adesão da bactéria e exibiram alta atividade inibitória, que variou entre 40,5% e 98,1%, de acordo com a espécie e a origem geográfica da mesma. Foi observado que as oito amostras de *C. arabica* investigadas apresentaram uma média de 71,6% de inibição, enquanto que as oito amostras de *C. robusta* apresentaram 75,9%. Esses autores sugeriram que o café poderia prevenir cáries dentárias.

DAGLIA et al. (2002) e LANDUCCI et al. (2003) observaram interferência de extratos de café na adesão de *S. mutans* inoculado em superfícies de hidroxiapatita, cobertas com saliva. Segundo esses autores, essa atividade poderia ser relacionada a compostos de ocorrência natural no café (trigonelina, ácido nicotínico e ácido clorogênico) e também a melanoidinas de baixa massa molecular, formadas durante a torração

DAGLIA et al. (2002) concluíram não haver diferença entre o café com cafeína e o descafeinado, em relação à atividade antimicrobiana, sugerindo que a cafeína não estaria envolvida nesse processo. Por outro lado, outros pesquisadores observaram a atividade antimicrobiana da cafeína em fungos. BUCHANAN & FLETCHER (1978) observaram que a cafeína (2,0 mg/g) inibiu a produção de aflatoxina por *A. parasiticus* em meio líquido. Resultados similares foram relatados por NARTOWICZ et al. (1979), após avaliarem grãos de café verdes e torrados com cafeína e descafeinados inoculados com *A. parasiticus*. CHALFOUN et al. (2000) avaliaram o efeito de diferentes concentrações da cafeína sobre o crescimento dos fungos *Fusarium* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. flavus* e observaram uma elevação do grau de inibição proporcional à elevação nas concentrações de cafeína. Faz-se então necessário o entendimento do espectro da atividade antimicrobiana da cafeína.

FURUHATA et al. (2000) estudaram a atividade antibacteriana de 24 amostras de café, de diferentes origens, em *Legionella pneumophila* e observaram a inibição da referida bactéria por todos os extratos dos cafés avaliados. DOGAZAKI et al. (2002) identificaram a presença de diferentes compostos químicos com atividade antibacteriana em *L. pneumophila* em bebida de café. Esses autores fracionaram o extrato de café e isolaram frações com alta atividade antibacteriana. Na determinação

das suas estruturas químicas, identificaram os seguintes compostos: ácido caféico, ácido clorogênico e ácido protocatéico. FURUHATA et al. (2002) investigaram as atividades antimicrobianas desses ácidos contra *L. pneumophila* e determinaram que a concentração inibitória mínima de 90% (MIC90) do ácido protocatéico foi de 156,3 mg/L, demonstrando uma elevada atividade bactericida. O ácido caféico apresentou concentração inibitória de 50% (MIC50) de 312,5 mg/L e a MIC90 de 625 mg/L. Entretanto, para o ácido clorogênico, tanto a MIC50 quanto a MIC90 observadas foram de 625 mg/L, mostrando uma menor atividade em relação ao microrganismo teste.

2. COMPOSTOS QUÍMICOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMOS DE AÇÃO

2.1 Compostos fenólicos

2.1.1 Definição, formação e função

Os compostos fenólicos são ubíquos no reino vegetal e são produtos secundários de plantas, isto é, produtos que não apresentam uma função direta nas atividades bioquímicas primárias, responsáveis pelo crescimento, desenvolvimento e reprodução (CLIFFORD, 1989). Os compostos fenólicos estão envolvidos na adaptação a condições de estresse ambiental, seja na defesa contra a radiação ultravioleta ou agressão por patógenos (FARAH & DONANGELO, 2006).

Em torno de 40% dos compostos fenólicos provêm da via do acetato-polimalato, sendo os 60% restantes originados da rota do ácido chiquímico, a partir de carboidratos. Metabólitos derivados do acetato são originados do processo de condensação da unidade iniciadora, o acetil-SCoA com a unidade propagadora, o malonil-SCoA sendo a sua função fornecer unidade C₂ para a síntese de ácidos graxos, prostaglandinas e polifenóis, entre outros componentes (BRUNETON, 1991). A sua biossíntese é mais pronunciada durante o crescimento vegetal ou na fase de diferenciação celular (SIQUEIRA et al., 1991).

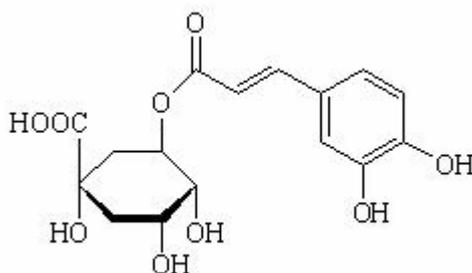
Os compostos fenólicos possuem um ou mais grupos hidroxila (OH) ligados a um anel aromático, podendo ter vários grupos substituintes, como carboxilas,

metoxilas, outras estruturas cíclicas não-aromáticas, entre outras (NYCHAS, 1995; CASTRO et al., 2004).

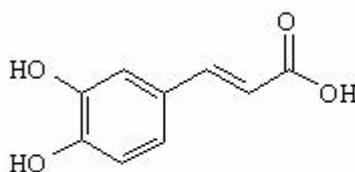
Entre os seres vivos, apenas os vegetais e os microrganismos são capazes de sintetizar compostos fenólicos (SIQUEIRA et al., 1991). Esses compostos estão entre as mais difundidas classes de metabólitos secundários, sendo conhecidos pela sua grande importância no sistema solo-planta. A maioria dos estudos relaciona os compostos fenólicos ao estresse metabólico, parede celular e exudatos de raízes e sementes. Esses compostos têm importância na pigmentação de flores e na proteção contra pragas e doenças (BRUNETON, 1991). A contribuição dos compostos fenólicos para os mecanismos de defesa dos vegetais e às características sensoriais e nutricionais já se encontra bem estabelecida (NYCHAS, 1995), no entanto, a função da maior parte dos compostos fenólicos ainda é obscura (SIQUEIRA et al., 1991).

Os principais compostos fenólicos comumente encontrados em vegetais superiores podem ser classificados em várias classes de acordo com tipo e número de anéis fenólicos, e em subclasses de acordo com substituições específicas na estrutura básica, associações com carboidratos e formas polimerizadas. Em uma das classes, encontram-se os compostos não flavonóides e são incluídas as subclasses dos ácidos benzóicos (ácido gálico, ácido protocatéico, ácido p-hidroxibenzóico), dos ácidos hidroxicinâmicos (ácido cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico), dos taninos hidrolizáveis, da lignina, entre outras. Em outra classe estão incluídos os compostos flavonóides, a exemplo de flavononas, proantocianinas, antocianidinas, isoflavonas (FARAH & DONANGELO, 2006).

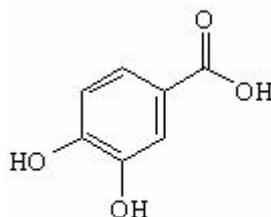
Na Figura 2 estão apresentadas as estruturas químicas dos ácidos clorogênico (a), caféico (b) e protocatéico (c), compostos fenólicos encontrados no café.



(a) ácido clorogênico



(b) ácido caféico



(c) ácido protocatéico

Figura 2. Estruturas químicas dos ácidos clorogênico, caféico e protocatéico.

2.1.2 Atividade antimicrobiana

Os resultados observados em relação à atividade antimicrobiana de compostos fenólicos, ao longo dos últimos 30 anos, têm sido contraditórios. CHENSON et al. (1982) mostraram que os ácidos *p*-cumárico e ferúlico inibiam totalmente o crescimento de bactérias do rúmem. BARANOWSKI & NAGEL (1982) encontraram pequena atividade antimicrobiana dos ácidos caféico, *p*-cumárico e ferúlico contra *Pseudomonas fluorescens*. HERALD & DAVIDSON (1983) também observaram atividade antimicrobiana dos mesmos ácidos contra *E. coli*, *B. cereus* e *S. aureus*. Esses autores demonstraram que o ácido ferúlico a 1000 µg/mL e o ácido *p*-cumárico a 500 e 1000 µg/mL inibiam o crescimento, principalmente das bactérias Gram-positivas *B.*

cereus e *S. aureus*. STEAD (1993) avaliou o efeito de soluções etanólicas de ácido caféico, *p*-cumárico e ferúlico no crescimento de espécies de *Lactobacillus*, bactérias deterioradoras de vinho, e observou que esses compostos, quando em baixas concentrações, estimulavam o crescimento e, em altas concentrações, inibiam. WEN et al. (2003) observaram um efeito bactericida dos ácidos hidroxicinâmicos em *L. monocytogenes* em pH 4,5 e um efeito bacteriostático em meios com pH mais elevados. Por outro lado, outros autores apresentaram resultados divergentes, mostrando ausência ou uma discreta atividade antibacteriana dessas substâncias (LEIFERTOVA et al., 1975; BARANOWSKI & NAGEL, 1982).

LEIFERTOVA et al. (1975) observaram um efeito antimicrobiano discreto de derivados dos ácidos hidroxicinâmicos contra espécies de fungos. Esses autores testaram 10 derivados, incluindo ácidos caféico, *p*-cumárico e ferúlico, empregando o método do disco difusão e concentrações de 300 µg/mL, e encontraram inibição apenas contra *Penicillium notatum*. PAYNE et al. (1989) avaliaram a atividade antimicrobiana de compostos fenólicos contra *L. monocytogenes* e verificaram que o antioxidante fenólico butilhidroquinona terciária apresentou um MIC de 64 µg/mL. PENNA et al. (2001) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de plantas originadas da Argentina, com tradicional ação anti-séptica, frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Esses autores isolaram por cromatografia em coluna vários compostos com atividade antimicrobiana, entre eles, galato de metila e o ácido protocatéico. O galato de metila apresentou uma maior atividade antibacteriana contra *S. aureus* (MIC = 128 µg/mL), enquanto o ácido protocatéico apresentou a maior atividade antifúngica para *Mucor* sp. (MIC = 128 µg/mL). Entretanto, concluíram que a atividade antimicrobiana apresentada por essas substâncias não era suficiente para justificar estudos adicionais.

KIM et al. (1995) estudaram a atividade antibacteriana de dois constituintes de óleos essenciais contra *Salmonella typhimurium* e demonstraram que carvacrol e geraniol possuíam uma potente atividade bactericida quando avaliadas em modelos alimentares à base de cubos de peixes. HELANDER et al. (1998) investigaram o efeito do carvacrol e do timol contra *E. coli* O157:H7 e *S. typhimurium* e verificaram atividade antimicrobiana.

VAQUERO et al. (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana de compostos fenólicos presentes em vinhos sobre bactérias patogênicas e investigaram entre outros, os ácidos caféico e protocatéico em concentrações que variaram entre 5 e 1000 mg/L,

empregando-se o método de difusão em ágar. Esses autores observaram maiores atividades para o ácido caféico (500 mg/L) contra *E. coli*, com zonas de inibição entre 4 e 5 mm e atividades moderadas do ácido protocatéico (1000 mg/L) contra *E. coli*, com zonas de inibição de 2 a 3 mm.

As diferenças nos resultados obtidos ao longo dos últimos 30 anos podem ter sido influenciadas por fatores tais como: diferenças na metodologia experimental, composição do meio, microrganismos empregados, concentrações investigadas, baixa solubilidade de muitos compostos fenólicos, dentre outros (DAVIDSON, 1993; WEN et al., 2003). Assim, o estudo da atividade antimicrobiana de compostos fenólicos presentes no café deve ser realizado empregando-se um grande número de microrganismos e uma metodologia experimental padronizada para comparação.

2.1.3 Mecanismo de ação antimicrobiana

A expressão da atividade antimicrobiana de compostos fenólicos apresenta-se clara, entretanto o seu mecanismo não está completamente entendido (HOLLEY & PATEL, 2005).

O modo de ação de agentes antimicrobianos é estabelecido considerando-se um entre os três a seguir: (1) reação com a membrana celular causando aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares; (2) inativação de sistemas enzimáticos ou enzimas essenciais, incluindo as envolvidas no processo de produção de energia e síntese de componentes estruturais; ou (3) destruição ou inativação funcional do material genético (DAVIDSON & BRANEN, 1993; KIM et al., 1995).

A membrana citoplasmática da bactéria e a membrana mitocondrial das leveduras são uma barreira permeável à passagem de pequenos íons como H^+ , K^+ , Na^+ e Ca^+ , além de serem responsáveis pela entrada e saída de diferentes compostos. Essa permeabilidade da célula é importante para várias funções celulares tais como, manutenção da energia no processo de transdução, transporte de solutos, regulação do metabolismo e controle da pressão (BOOTH, 1985; COX et al., 2000). Existe um consenso de que compostos aromáticos e fenólicos atuam na membrana citoplasmática, alteram sua estrutura e função, alteram o transporte ativo e coagulam o conteúdo celular (SIKKEMA et al., 1995; BURT, 2004).

WALSH et al. (2003) pesquisaram a atividade antimicrobiana e o mecanismo de ação de dois produtos fenólicos, eugenol e timol. Observou-se o extravasamento dos

constituintes celulares pela membrana, e verificou-se que a saída de potássio é um sinal precoce da disfunção da membrana. Os experimentos foram conduzidos, medindo a liberação do potássio, após a exposição de *E. coli* e de *S. aureus* aos agentes antimicrobianos pesquisados. Esses autores concluíram que o sítio de ação do timol e do eugenol é a membrana citoplasmática.

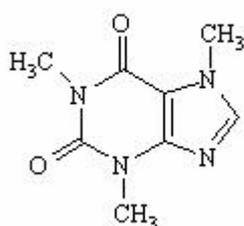
COX et al. (2000) investigaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, que consiste principalmente de monoterpenos cíclicos, contra *E. coli*, *S. aureus* e *Candida albicans*. Foram observadas diferenças na susceptibilidade entre os microrganismos testados, que foram atribuídas a variações na forma de penetração das substâncias através da membrana. A capacidade desses compostos na ruptura da permeabilidade da membrana celular, acompanhada pela perda do controle quimiostático, acarreta uma ação letal em concentrações baixas. Esse mecanismo de ação é o mesmo para *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* e é similar a outros fenóis de largo espectro, a exemplo de desinfetantes e conservantes, como derivados de fenóis, clorhexidina e derivados do ácido parabenzóico.

HANSCH & FUJITA (1964) mostraram a importância das características físico-químicas e outras propriedades estruturais na atividade biológica de substâncias. A eficiência de compostos fenólicos como anti-radicais e antioxidantes é variada e depende de vários fatores, tais como o número, a posição da ligação e a posição do(s) grupo(s) hidroxila no anel aromático (SROKA & CISOWSKI, 2003). Esses autores examinaram e compararam a atividade antioxidante e anti-radical de 14 compostos fenólicos e concluíram que quanto menor o número de hidroxilas ligadas ao anel aromático, menor a atividade antioxidante e anti-radical. Alguns autores acreditam que quanto maior o grau de hidroxilação de fenóis maior a sua toxicidade para microrganismos. Acredita-se que os compostos oxidados inibem a atividade enzimática por meio de uma reação de grupos sulfidríla ou por interações não específicas com proteínas (COWAN, 1999). No entanto, VELDHUIZEN et al. (2006), ao estudarem requerimentos estruturais relacionados à atividade antimicrobiana, obtiveram resultados diferentes. Esses autores compararam o carvacrol (substância encontrada em óleos essenciais) com compostos com estrutura relacionada (ausentes em óleos essenciais), e verificaram que a remoção de substituintes do anel alifático diminuía ligeiramente a atividade antimicrobiana sobre bactérias. Além disso, ao contrário do que se acreditava, o grupo hidroxila presente no carvacrol não é essencial para a atividade antimicrobiana.

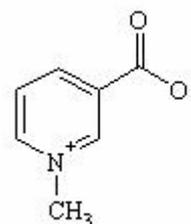
2.2 Compostos nitrogenados

2.2.1 Definição, formação e função

Cafeína e trigonelina (Figura 3) são metabólitos secundários de plantas derivados dos nucleotídeos purina e pirimidina.



(a) cafeína



(b) trigonelina

Figura 3. Estruturas químicas da cafeína e da trigonelina.

A cafeína é um composto farmacologicamente ativo, pertencente ao grupo das xantinas (1,3,7 -trimetilxantina). As principais fontes alimentares são café, mate e guaraná (KY et al., 2001; MONTEIRO & TRUGO, 2005). A cafeína é sintetizada a partir da xantosina, via 7-metilxantosina, 7-metilxantina e teobromina e o grupamento doador de metilas é a S-adenosilmetionina (BRUNETON, 1991).

A cafeína é inodora e possui sabor amargo bastante característico, contribuindo para o sabor da bebida do café. A cafeína é o componente do café mais conhecido, devido às suas propriedades fisiológicas e farmacológicas. Entre as diversas propriedades atribuídas à cafeína, algumas já apresentaram comprovação científica, como o efeito estimulante do sistema nervoso central e do músculo cardíaco e a diminuição do sono (MONTEIRO & TRUGO, 2005) e atividade antimicrobiana em bactérias e fungos (BUCHANAN et al., 1981; CHALFOUN et al., 2000; IBRAHIM et al., 2006).

A trigonelina (N-metil betaína) é encontrada em várias espécies de vegetais e de animais (ZHENG & ASHIHARA, 2004) sendo importante para o sabor e aroma do café. Contribui para essas características por meio da formação de produtos de degradação

durante a torração e, entre esses produtos, estão as piridinas e o N-metilpirrol (MONTEIRO & TRUGO, 2005).

2.2.2 Atividade antimicrobiana

Alguns trabalhos apresentaram dados sobre o efeito inibidor da cafeína sobre fungos produtores de micotoxinas (BUCHANAN & FLETCHER, 1978; BUCHANAN et al., 1981) e bactérias patogênicas (IBRAHIM et al., 2006), entretanto DAGLIA et al. (2002) não atribuíram a esse composto atividade antibacteriana. Esses autores concluíram não haver diferença entre o café com cafeína e o descafeinado, em relação à atividade antimicrobiana empregando *S. mutans* como bactéria teste.

BUCHANAN et al. (1981) estudaram os efeitos da cafeína sobre o crescimento dos fungos *A. ochraceus* e espécies toxigênicas de *Aspergillus* e *Penicillium*, e verificaram que a cafeína apresentou um pequeno efeito sobre o crescimento inicial dos fungos; e quando esses atingiram a fase estacionária do crescimento houve um decréscimo na massa micelial. CHALFOUN et al. (2000) também verificaram ação inibidora da cafeína sobre o crescimento micelial de fungos associados a grãos de café.

O potencial da cafeína como agente antimicrobiano no tratamento de infecção por *E. coli* O157:H7 e como conservante para alimentos foi destacado por IBRAHIM et al. (2006), após investigação *in vitro* com cinco cepas dessa bactéria e concentrações de cafeína que variaram entre 0% e 2%. Os meios de cultura contendo as diferentes concentrações da cafeína foram inoculados com 10^3 UFC/mL da bactéria e incubados a 37 °C por 24 h. O crescimento foi monitorado por leitura de densidade ótica durante todo o período. Foi observado que a cafeína apresentou uma significativa atividade antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7.

2.2.3 Mecanismo de ação antimicrobiana

No estudo realizado por IBRAHIM et al. (2006) sobre a aplicação da cafeína no controle de *E. coli* O157:H7 o mecanismo de ação não foi investigado. Entretanto, esses autores acreditam que a cafeína cause danos ao DNA da bactéria. GRIGG (1972) usou a cafeína para inibir o mecanismo de reparo por excisão em bactérias

mutantes e concluíram que a inibição estava provavelmente relacionada à capacidade da cafeína em se ligar ao DNA.

Não foram encontradas na literatura consultada informações sobre o mecanismo da atividade antimicrobiana da trigonelina.

3. MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

3.1 Métodos para investigação da atividade antimicrobiana

Uma grande variedade de métodos laboratoriais pode ser empregada para medir a susceptibilidade *in vitro* de bactérias a agentes antimicrobianos. Esses testes são também de grande importância em estudos sobre epidemiologia de resistência, e em investigações sobre novos agentes antimicrobianos (NCCLS, 2000).

Os principais métodos microbiológicos para a detecção de atividade antimicrobiana podem ser classificados em três tipos: ensaios bioautográficos, de difusão e de diluição (RIOS et al., 1988).

A concentração inibitória mínima (MIC) tem sido calculada por métodos *in vitro* e usada como parâmetro para avaliar a atividade antimicrobiana por vários autores. A MIC é a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento do microrganismo em tubos ou em placas de microtítulo em um tempo específico (DAVIDSON & PARISH, 1989; NCCLS, 2000), sendo a efetividade antimicrobiana de um composto freqüentemente descrita em termos de MIC (MANN & MARKHAM, 1998). Entretanto, a definição da MIC, muitas vezes difere entre artigos publicados na literatura e tem sido um obstáculo para comparação desses estudos. Em muitos casos, tanto a concentração mínima bactericida quanto bacteriostática tem sido denominada MIC (BURT, 2004). SMITH-PALMER et al. (1998) descreveram concentração bacteriostática e bactericida como a menor concentração na qual a bactéria deixa de crescer em caldo, mas desenvolve quando o caldo é repicado para outro meio de cultura ou não desenvolve quando repicada, respectivamente.

3.1.1 Ensaios bioautográficos

Os ensaios bioautográficos são métodos que empregam a placa de cromatografia de camada delgada (CCD) para a análise. Os compostos são separados por CCD e colocados por contato ou imersão em placas de ágar, previamente inoculadas com o microrganismo teste. Zonas de inibição de crescimento microbiano indicam a presença de substâncias antimicrobianas (RIOS et al., 1988; BRANDÃO, 2004). Esses métodos têm importância particular na pesquisa de compostos antimicrobianos em vegetais, pois permitem a localização direta dos constituintes ativos a partir de uma matriz complexa (HOSTETTMANN & MARSTON, 1994).

3.1.2 Ensaios de difusão

Os ensaios de difusão são métodos quantitativos nos quais o efeito pode ser graduado. Fundamentam-se na difusão da substância a ser ensaiada em um meio de cultura sólido, e inoculado com um microrganismo. A partir da difusão, ocorre o aparecimento de um halo, onde não há crescimento do microrganismo, denominado halo de inibição.

Diferentes tipos de reservatórios podem ser empregados, incluindo discos de papel, cilindros de porcelana ou de aço inoxidável e orifícios feitos no meio de cultura (VANDEN BERGHE & VLIETINCK, 1991). A substância ou extrato a ser testado é colocado em contato com o meio de cultura inoculado, e a maneira como se processa esse contato define os diferentes métodos de difusão, dentre eles, método do disco difusão ou difusão em ágar, método dos cilindros e métodos dos orifícios (RIOS et al., 1988). Após a incubação, os diâmetros dos halos de inibição produzidos são medidos com régua, paquímetro ou leitor de halos.

A atividade antimicrobiana pode ser significativamente influenciada pelo tipo e tamanho do disco ou orifício, pH, pela capacidade do composto em se difundir no meio de cultura, pelas propriedades do meio e pelo microrganismo investigado (BRANEN, 1993).

Nesse método, a presença de matéria particulada na amostra pode interferir na difusão da substância antimicrobiana no ágar. Entretanto, o pequeno volume de amostra necessário e a possibilidade de testar cinco a seis compostos por placa, frente

a um único microrganismo, são vantagens do método de difusão em ágar (VANDEN BERGHE & VLIETINCK, 1991).

Dentre os métodos de difusão, o que utiliza disco é o mais adequado para se trabalhar com extratos vegetais extraídos com solventes orgânicos, pois é possível evaporar o solvente do disco, antes da colocação desse no meio de cultura (RIOS et al., 1988).

3.1.3 Ensaios de diluição

Os métodos de diluição são aqueles nos quais os extratos ou substâncias a serem testados são adicionados a meios de culturas líquidos ou sólidos adequados, previamente inoculados com o microrganismo teste. Após a incubação, o crescimento do microrganismo é determinado pela comparação direta ou turbidimétrica da cultura teste com o controle negativo (meio de cultura inoculado sem adição de substância inibidora) ou pelo uso de espectrofotômetro em comprimento de onda apropriado (VANDEN BERGHE & VLIETINCK, 1991).

O método de diluição em meio líquido é o que apresenta metodologia mais complexa, entretanto é o mais preciso. Esse método é recomendado principalmente para a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) (RIOS et al., 1988).

O método de diluição pode ser realizado de várias formas, dentre elas, o método turbidimétrico (THE UNITED..., 2006) e a diluição em placa de microtítulo (VANDEN BERGHE & VLIETINCK, 1991; ELOFF, 1998; BRANDÃO, 2004).

Métodos que empregam placas de microtitulação são mais econômicos, por permitirem avaliar simultaneamente diversas concentrações da substância potencialmente antimicrobiana (MANN & MARKHAM, 1998).

4. ESTUDOS DE EFICIÊNCIA DE CONSERVANTES

4.1 Conservação de alimentos

A busca de meios para conservação de alimentos é uma preocupação dos homens desde os tempos pré-históricos. Tradicionalmente, os alimentos eram conservados pelo uso do calor, frio, secagem e fermentação. Em algumas situações,

substâncias químicas eram empregadas para conservação. Entretanto, o uso extensivo de aditivos químicos é uma característica da indústria de alimentos moderna, em que, muitas vezes, alguns meses, ou até anos, podem se passar desde a produção até o consumo de um alimento (BRANEN, 1993).

A principal necessidade da indústria de alimentos é a conservação dos alimentos (MATTHEWS & HAAS, 1993). As principais tecnologias empregadas para conservação da qualidade e garantia da segurança microbiológica de alimentos incluem procedimentos que previnem o acesso dos microrganismos aos alimentos, que inativam os microrganismos, que previnam ou diminuam o seu crescimento. Embora os procedimentos tradicionais considerem essas tecnologias, existe a tendência de modificá-las, buscando-se a redução da severidade das técnicas mais extremas. Além disso, a melhoria e o desenvolvimento dos métodos de conservação de alimentos é uma necessidade constante (GOULD, 1995). Métodos combinados para a conservação de alimentos têm ganhado a atenção das indústrias em países desenvolvidos (LEISTNER, 1992). A conservação de alimentos tem se tornado cada vez mais complexa. Novos produtos alimentares têm sido introduzidos no mercado e, cada vez mais, requerem uma ampliação na vida de prateleira e ausência de microrganismos patogênicos (NYCHAS, 1995).

A indústria de alimentos necessita, muitas vezes, de empregar agentes antimicrobianos para aumentar a vida de prateleira e conservar o frescor dos alimentos (DAVIDSON & PARISH, 1989). Apesar da reconhecida necessidade da aplicação de aditivos na produção de alimentos, os aspectos envolvendo a segurança para o consumidor têm sido questionados. O aumento do conhecimento sobre a segurança e o aumento da capacidade para avaliá-la tem colocado, nos últimos anos, vários aditivos sob suspeita (BRANEN, 1993).

A pesquisa de novas substâncias para serem empregadas como conservantes para alimentos deve atender a restrições regulamentadas e a pressões públicas contra aditivos químicos em geral (NYCHAS, 1995). O consumidor tem a preferência por alimentos "naturais" (MATTHEWS & HAAS, 1993). Esses obstáculos geram novas oportunidades para a busca de rotas alternativas na pesquisa de novos conservantes para alimentos (NYCHAS, 1995). A segurança deve representar uma consideração primária para se pesquisar agentes antimicrobianos, principalmente para uso em alimentos (KUBO & FUJITA, 2001). Substâncias extraídas de vegetais têm sido extensivamente empregadas como ingredientes de "flavour" em uma grande variedade

de alimentos e bebidas e muitos desses compostos têm sido classificados como GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguros – Generally Recognized as Safe) (KIM et al., 1995).

4.2 Testes de aplicação e variáveis interferentes

A maioria dos trabalhos sobre atividade antimicrobiana de compostos naturais tem sido conduzida em modelos experimentais onde se utilizam somente os meios de cultura, conseqüentemente, pouco é entendido sobre a efetividade das substâncias em matrizes mais complexas, como as de alimentos (SMITH-PALMER et al., 2001).

Enquanto os testes em meios de cultura fornecem informações gerais sobre a atividade antimicrobiana do composto investigado sobre grupos e microrganismos específicos, os testes de aplicação em modelos alimentares podem permitir a avaliação da interação do agente com os componentes do alimento e a influência na eficiência, assim como, investigar nesse modelo, variáveis de interesse (DAVIDSON & PARISH, 1989; DEVLIEGHERE et al., 2004).

A avaliação da atividade antimicrobiana em modelos alimentares é essencial para se entender a importância de fatores intrínsecos ao alimento como a composição (proteínas, gorduras, sais e pH do meio) e fatores extrínsecos (temperatura, limitação de oxigênio) que afetam o comportamento da bactéria naquele ecossistema alimentar, e que podem, ainda, atuar sinergisticamente, com o agente antimicrobiano (NYCHAS, 1995; KOUTSOUMANIS et al., 1999).

A eficiência de um agente conservante pode ser avaliada de várias maneiras. No entanto, vários fatores podem afetar a atividade de agentes antimicrobianos, entre eles: (i) microrganismo - a atividade antimicrobiana pode depender do tipo, gênero e espécie do microrganismo usado como teste (DAVIDSON & PARISH, 1989); e (ii) pH - a atividade de vários agentes antimicrobianos é afetada pelo pH (MARQUIS et al., 2003).

Todos os microrganismos apresentam valores de pH mínimo, máximo e ótimo para o crescimento, e alterações podem influenciar no crescimento ou inibição desses organismos. Em geral, bactérias são mais exigentes e preferem um pH próximo à neutralidade (pH 6,5 a 7,5), podendo, entretanto, tolerar uma faixa de pH de 4 a 9. As leveduras são mais tolerantes aos valores de pH mais baixos do que as bactérias, enquanto os fungos filamentosos são capazes de tolerar uma faixa mais ampla. A

tolerância dos microrganismos a faixas de pH diferentes é um parâmetro de seleção de uma espécie ou grupo microbiano em diferentes alimentos (DOORES, 1993).

O efeito antimicrobiano de ácidos orgânicos pode ser atribuído à porção não dissociada da molécula. Dessa maneira, a atividade é diretamente afetada pelos valores de pKa e pelo pH do alimento (DAVIDSON & PARISH, 1989). O valor de pKa da maioria dos ácidos orgânicos encontra-se entre 3 e 5, e, assim, é vantajoso o emprego de ácidos orgânicos abaixo desses valores de pH (DOORES, 1993).

Outro aspecto fundamental para a aplicação prática de compostos naturais como conservantes é alguma possível alteração em propriedades sensoriais e de textura do alimento (DEVLIEGHERE et al., 2004).

4.3 Estudos de eficiência conservante em modelos alimentares

Alguns trabalhos encontrados na literatura avaliaram a atividade antimicrobiana de substâncias potenciais para conservação de alimentos em modelos alimentares (PAYNE et al., 1989; KIM et al., 1995; LACHOWICZ et al., 1998; KOUTSOUMANIS et al., 1999; SMITH-PALMER et al., 2001; THOMAS et al., 2004), entretanto, não foi observado um método padrão para a avaliação. Diferentes parâmetros, tais como, microrganismos testes, temperaturas de incubação, períodos de estocagem e inóculo inicial foram empregados, o que torna difícil uma comparação dos resultados entre os diferentes agentes antimicrobianos investigados.

PAYNE et al. (1989) avaliaram a efetividade de propilparabeno e da butilhidroquinona terciária, comparados com sorbato de potássio, contra *L. monocytogenes* inoculada em leite desnatado em pó reconstituído a 10% como modelo alimentar. Foram investigados duas concentrações de inóculo, 10 UFC/mL e 1000 UFC/mL e o crescimento foi acompanhado por 24 horas a 35 °C. Verificou-se que ambos os compostos fenólicos foram mais efetivos do que o sorbato de potássio contra *L. monocytogenes*, causando um visível aumento na fase lag da bactéria.

KIM et al. (1995) examinaram a efetividade bactericida de três compostos presentes em óleos essenciais contra *S. typhimurium* em cubos de peixe crus. Esses autores inocularam os cubos, previamente mantidos a -20 °C por 2 h, com uma suspensão da bactéria contendo 10⁷ UFC/mL e após preparo e tratamento com carvacrol, citral e geraniol, estocaram o produto a 4 °C, por um período de 4 dias. O

efeito bactericida do carvacrol e do geraniol ressaltou seu potencial de aplicação como agente antibacteriano em sistemas alimentares.

Em 1999, KOUTSOUMANIS et al. investigaram o efeito isolado e combinado do óleo essencial do orégano com pH e temperatura de estocagem, na sobrevivência de *S. enteritidis*, em uma salada grega à base de bacalhau, durante 16 dias. Foi proposto um modelo, com função quadrática, para descrever a inativação em função do pH, temperatura de estocagem e concentração do óleo essencial de orégano. Foi observado que a inativação do microrganismo foi maior em pH mais baixo, o que foi atribuído tanto ao efeito direto do pH, quanto ao fato de que óleos essenciais se tornam mais hidrofóbicos a um pH mais baixo, e podem se dissolver melhor na fase lipídica da membrana da bactéria (JUVEN et al., 1994).

SMITH-PALMER et al. (2001) investigaram a eficiência de óleos essenciais de louro, cravo da índia e canela como conservantes naturais para queijos cremosos integrais e com baixo teor de gordura. Esses queijos foram inoculados com *L. monocytogenes* e *S. enteritidis*, e mantidos às temperaturas de 4 °C e 10 °C durante 14 dias. A uma concentração de 1%, tanto o óleo de cravo quanto o de canela, reduziram a contagem no queijo com baixo teor de gordura, após 3 dias, enquanto o óleo de cravo foi capaz de reduzir a contagem de *L. monocytogenes* em queijo fabricado com leite integral.

THOMAS et al. (2004) investigaram a eficiência de um antibacteriano produzido por fungos (ascopirona) como conservante alimentar em sopa de frango, leite e suco de maçã utilizando *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *P. fluorescens*, *Salmonella* e *E. coli* com inóculo inicial 10^3 UFC/mL. Os autores realizaram contagens de células viáveis até atingirem 10^6 UFC/mL e verificaram que uma concentração de 2000 mg/Kg foi eficiente na conservação dos alimentos, quando estocados em temperaturas de refrigeração.

Verifica-se que estudos, encontrados na literatura, com diferentes substâncias com potencial de uso como conservantes em modelos alimentares levaram em consideração diferentes parâmetros, tais como, alimentos, microrganismo teste, inóculo inicial, tempo e temperatura de estocagem. Assim, os resultados obtidos são de difícil comparação.

5. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Para estudos da morfologia de bactérias são empregadas a microscopia ótica e a microscopia eletrônica de varredura (Gustafson et al., 1998). Entretanto, outras oportunidades têm sido abertas, empregando-se a microscopia de força atômica (MFA) (BRAGA & RICCI, 1998; 2001). Embora, a microscopia eletrônica de varredura seja frequentemente usada, a introdução da técnica de MFA apresenta benefícios substanciais, tais como, a observação da amostra em três dimensões, tempo mínimo de preparação, condições de preparo simplificadas, tornando-se desnecessário a aplicação do vácuo e a metalização da amostra com ouro (BRAGA & RICCI, 1998; 2002).

Na MFA, uma sonda de silício é suavemente forçada sobre a amostra e, à medida que ela se move ao longo da superfície da amostra, seus movimentos são registrados, e uma imagem tridimensional é produzida. A grande vantagem da MFA é a possibilidade de se observar a célula nas dimensões x, y e z (BRAGA & RICCI, 1998; 2002).

6. CONSIDERAÇÕES

Ao longo dos últimos 10 anos, vários estudos foram realizados avaliando-se a atividade antimicrobiana do café e de substâncias nele presentes, empregando-se um número limitado de microrganismos e diferentes metodologias experimentais. Resultados contraditórios foram relatados, como por exemplo, em relação à atividade antimicrobiana da cafeína. Pela revisão da literatura, seria importante investigar a atividade antimicrobiana do café e de compostos químicos selecionados, empregando-se diferentes microrganismos para uma avaliação ampla do espectro de ação, em especial os ligados às infecções alimentares. Seria também importante, no caso de se verificar atividade antimicrobiana, determinar a especificidade do efeito por meio de curvas dose-resposta e cinética de ação em relação ao tempo de contato das substâncias com o microrganismo teste. Outro aspecto relevante seria investigar possíveis aplicações, como por exemplo, conservação de alimentos e testes de

aplicação em um modelo alimentar. Além disso, hipóteses sobre a ação das substâncias avaliadas poderiam ser levantadas por meio de estudos da morfologia da bactéria injuriada após tempo de contato de 24 h, utilizando-se microscopias ótica e de força atômica.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antimicrobiana de extratos e de compostos fenólicos e nitrogenados presentes no café e realizar estudos cinéticos (concentração *versus* tempo), determinar a concentração inibitória, estudar a influência do pH e a eficiência conservante em modelo alimentar, bem como visualizar por microscopia as possíveis alterações morfológicas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium após contato com compostos químicos do café.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato aquoso e de compostos fenólicos e nitrogenados presentes no café sobre espécies de bactérias, leveduras e um fungo filamentoso;
2. avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato aquoso em associação com compostos fenólicos e nitrogenados;
3. avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos de café, de diferentes extratores e métodos de preparo sobre *Streptococcus mutans*;
4. investigar o efeito da concentração da cafeína e do tempo de contato sobre a atividade antimicrobiana em *S. mutans*;
5. avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos aquosos de café de compostos fenólicos e nitrogenados sobre algumas enterobactérias;
6. determinar as concentrações inibitórias dos ácidos caféico, clorogênico, protocatéico, da cafeína e da trigonelina em *S. enterica*;
7. investigar o efeito da concentração dos ácidos caféico, clorogênico, protocatéico, da cafeína e da trigonelina e do tempo de contato na atividade antimicrobiana sobre *S. enterica*;
8. avaliar a influência do pH na atividade antimicrobiana *in vitro* dos ácidos clorogênico e protocatéico e da cafeína e trigonelina sobre *S. enterica*;

-
9. avaliar a eficiência conservante da cafeína e do ácido protocatéico em um modelo alimentar em pH 4,5 e 5,5 frente a *S. enterica*;
 10. investigar o efeito do ácido protocatéico e da cafeína na morfologia microscópica de *S. enterica*.

Para a realização desses objetivos foram delineados experimentos, os quais estão apresentados a seguir na forma de capítulos.

CAPÍTULO I

TEORES DE ÁCIDOS FENÓLICOS, CAFEÍNA E TRIGONELINA, CARACTERÍSTICAS DE COR DE DIFERENTES AMOSTRAS DE CAFÉ E INFLUÊNCIA DO TIPO DE EXTRAÇÃO NO pH DO EXTRATO

RESUMO

Quatro amostras de café arábica em grãos torrados, de marcas diferentes adquiridas no comércio de Belo Horizonte, MG, foram analisadas quanto a algumas características físico-químicas. Os grãos de café foram moídos, tamisados e analisados quanto à cor pelo sistema CIE L*, a*, b*. Extratos aquosos obtidos após ebulição por 3 min, seguida de filtração foram analisados quanto ao pH e aos teores de cafeína, trigonelina e ácidos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Extratos aquosos do café expresso e extratos etanólicos foram analisados quanto ao pH. A luminosidade, os valores de b e o croma diferiram significativamente entre as amostras. O pH dos extratos variou, sendo valores significativamente maiores, encontrados no extrato etanólico. Os teores de cafeína variaram de 2,10 a 2,23 mg/mL, não diferindo significativamente entre as amostras. Foram identificados três ácidos clorogênicos, sendo o ácido 5-cafeoilquínico o mais abundante. Os ácidos caféico e protocatéico não foram encontrados nas amostras analisadas. Os menores valores de luminosidade e teores de trigonelina e ácidos clorogênicos foram observados nas amostras A e B, sugerindo que essas foram submetidas a condições de torração mais severas do que as amostras C e D.

I.1. INTRODUÇÃO

O café é uma mistura complexa de compostos químicos de ocorrência natural e daqueles formados durante o processo de torração (CLARKE & MACRAE, 1989). O grão de café contém em sua composição água, carboidratos, na forma de oligossacarídeos e polissacarídeos, lipídios, ácidos fenólicos, minerais, aminoácidos e proteínas.

Dentre as substâncias nitrogenadas, destacam-se a cafeína e a trigonelina. A cafeína é um composto farmacologicamente ativo, pertencente ao grupo das xantinas (1,3,7 trimetilxantina) (KY et al., 2001; MONTEIRO & TRUGO, 2005). A trigonelina é uma N-metil betaína derivada da piridina encontrada em café verde na concentração de 1,34 g/100 g (ZHENG & ASHIHARA, 2004; FARAH et al., 2006a). Esse composto contribui para as características de sabor e aroma que ocorrem pela degradação do café, durante a torração, e concomitante formação de produtos, dentre eles as piridinas e o N-metilpirrol (MONTEIRO & TRUGO, 2005).

Com relação à fração fenólica dos grãos de café verde, os ácidos clorogênicos (CGA) são os principais componentes presentes (FARAH & DONANGELO, 2006). Os ácidos clorogênicos são um conjunto de cinco grupos principais de compostos fenólicos e seus isômeros formados, principalmente, pela esterificação do ácido quínico com um dos seguintes ácidos derivados do ácido cinâmico: o ácido caféico, o ferúlico, ou o *p*-cumárico. Esses grupos são os ácidos cafeoilquínicos (CQA), com três isômeros principais (3-, 4-, e 5-CQA); os ácidos dicafeoilquínicos (diCQA), cujos isômeros principais são 3,4-diCQA; 3,5-diCQA; e 4,5-diCQA; ácidos feruloilquínicos com três isômeros (3-, 4-, e 5-FQA), ácidos *p*-cumaroilquínicos com três isômeros (3-, 4- e 5-*p*CoQA); e os ácidos cafeoilferuloilquínicos (MOREIRA & TRUGO, 2000; FARAH et al., 2006a; 2006b; FARAH & DONANGELO, 2006). Os ácidos clorogênicos representam entre 6 e 12 g/100 g, em massa, dos constituintes do café verde (FARAH & DONANGELO, 2006).

Durante o processo de torração, ocorrem consideráveis alterações na composição química: substâncias lábeis são degradadas, enquanto outras interagem para formar produtos complexos. Por essa razão, o café é um dos alimentos que mais se altera durante o processamento (SMITH, 1989). No grão de café torrado ocorre a

perda dos CGA (CLIFFORD, 1989) e o conteúdo de ácido nicotínico aumenta aproximadamente 10 vezes, devido à degradação da trigonelina, resultante da torração (MACRAE, 1989).

Este trabalho teve como objetivo caracterizar as amostras de café empregadas neste estudo. O café foi moído, tamisado e analisado quanto às características de cor pelo sistema CIE L*, a*, b*. Os extratos aquosos dessas amostras foram analisados, quanto aos teores de cafeína, trigonelina e ácidos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Extratos etanólicos e aquosos foram analisados quanto ao pH.

I.2. MATERIAL E MÉTODOS

I.2.1 MATERIAL

I.2.1.1 Amostras de café

Quatro amostras de diferentes marcas (A, B, C, D) de grãos de café torrado (*C. arabica*) foram adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG. Os grãos foram moídos em moinho doméstico (Braun, EUA), tamisados a 20 mesh (série Tyler) e analisados, quanto às características de cor pelo sistema CIE L*a*b*. O café moído e tamisado foi submetido a diferentes processos de extração e os extratos aquosos (obtidos por ebulição seguida de filtração) foram analisados quanto ao pH e teores de cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos, caféico e protocatéico. Os extratos etanólicos e aquosos (obtidos em máquina de café expresso) foram analisados, quanto ao pH.

I.2.1.2 Compostos químicos

Os ácidos caféico (Sigma, St. Louis, MO, EUA, C0625-26), clorogênico (Aldrich, Milwaukee, WI, EUA, C44206) e protocatéico (Sigma, St. Louis, MO, EUA, P5630) na concentração de 2,0 mg/mL foram dissolvidos em água destilada esterilizada, com auxílio de aparelho ultrasom (30 s), colocados em seguida em banho-maria fervente (30 s). Os ácidos 3-cafeoilquínico (3-CQA) e 4-cafeoilquínico (4-CQA) foram

preparados a partir do ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), conforme descrito por FARAH et al. (2006b).

A cafeína (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e a trigonelina (Sigma, St. Louis, MO, EUA, T5509) na concentração de 2 mg/mL foram diluídas em água destilada esterilizada.

I.2.2 MÉTODOS

I.2.2.1 Preparo das amostras e extratos de café

As amostras de café moídas e tamisadas (20 mesh, série Tyler) foram submetidas à análise de cor. Para as demais análises, foram preparados extratos aquosos adicionando-se 8,0 g de pó em 40 mL de água em ebulição (20% p/v) e mantidos em banho em ebulição por 3 min, sob agitação, seguido de filtração em papel de filtro qualitativo (VITORINO et al., 2001).

Os extratos de café foram obtidos, utilizando-se dois tipos de solventes extratores (aquoso e etanólico) e dois métodos de extração aquosa (ebulição seguida de filtração e expresso).

Para a extração aquosa (ebulição seguida de filtração), os extratos de café foram preparados, adicionando-se 8,0 g de pó em 40 mL de água em ebulição (20% p/v) e mantidos em banho em ebulição por 3 min, sob agitação, seguido de filtração em papel de filtro qualitativo (VITORINO et al., 2001). O café expresso (extração aquosa em máquina de café expresso) foi preparado, pela extração de 8,0 g de amostra com 40 mL de água (20% p/v), em um processador de café expresso (Cremissimo Ariete, Fashion Coffee, Itália).

Para a extração etanólica, os extratos foram obtidos, adicionando-se 8,0 g de pó em 40 mL etanol (20% p/v) e mantidos em banho de ultrassom, a 24 ± 1 °C, durante 15 min.

I.2.2.2 Métodos de análise

Determinação das características da cor. Foram efetuadas medidas dos parâmetros L^* , a^* e b^* em triplicata, utilizando-se o colorímetro Color tec PCM (Accuracy Microsensor, Pittsford, NY, EUA). O croma [$c = (a^2 + b^2)^{1/2}$] e a tonalidade [$h = \arctg a/b$] foram obtidos, empregando-se o software Colorpro (COLORPRO, 2004).

Determinação de cafeína e trigonelina. O extrato aquoso (ebulição/3min, seguida de filtração) de café foi clarificado, adicionando-se 200 µL de extrato, 97,8 mL de água purificada em Mili-Q (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) e 2 mL de solução saturada de acetato de chumbo a 20% (Merck, EUA)(TRUGO, 1984). A mistura foi agitada por 5 s, deixada em repouso por 20 min e filtrada em papel de filtro nº 1 (Whatman, Maidestone, UK). Uma alíquota do filtrado foi centrifugada a 13.500 rpm por 2 min (Microfuge E, Beckman, Groton, CT, EUA) e o sobrenadante foi empregado diretamente na análise.

A determinação da cafeína e da trigonelina foi feita por CLAE em sistema isocrático, utilizando-se coluna (5 µm, 250 x 4,6 mm) e pré-coluna (5 µm, 10 x 3 mm) Rexchrom C-18 (Regis Technologies, Morton Grove, IL, EUA) e detector UV (Shimadzu, Kyoto, Japão) a 265 nm para a trigonelina e 272 nm para a cafeína. A fase móvel consistiu de metanol a 5% para trigonelina e a 40% para cafeína, a um fluxo de 1,0 mL/min. A identificação foi possível pela comparação dos tempos de retenção dos picos suspeitos com os dos padrões, e a confirmação foi feita por adição do padrão suspeito à amostra. A quantificação foi feita por interpolação das áreas obtidas em curvas analíticas externas (TRUGO, 1984).

Determinação dos ácidos fenólicos. O extrato aquoso (ebulição/3 min, seguida de filtração) de café foi clarificado, adicionando-se 2,0 mL de extrato, 90,0 mL de água purificada em Mili-Q (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) e 1,0 mL de solução de Carrez I e II. A mistura foi transferida para um balão de 100 mL e o volume foi completado com água até 100 mL. A mistura foi agitada por 5 s, deixada em repouso por 20 min e filtrada em papel de filtro nº 1 (Whatman, Maidestone, UK). Uma alíquota do filtrado foi centrifugada, a 13.500 rpm por 2 min (Microfuge E, Beckman, Groton, CT, EUA) e o sobrenadante foi empregado diretamente na análise em CLAE (FARAH et al., 2005).

Foram determinados os três principais ácidos clorogênicos do café (ácidos 3-cafeoilquínico, 4-cafeoilquínico e 5-cafeoilquínico), o ácido caféico e o ácido protocatéico por CLAE em fase reversa (FARAH et al., 2005), utilizando-se coluna (5 µm, 250 x 4,6 mm) e pré-coluna (5 µm, 10 x 3 mm) Rexchrom C-18 (Regis Technologies, Morton Grove, IL, EUA). Foram empregados um sistema cromatográfico (LC-10, Shimadzu, Kyoto, Japão) e um detector UV (SCL-10A, Shimadzu, Kyoto,

Japão), operado a 310 nm para o ácido protocatéico e a 325 nm para os demais ácidos. As condições cromatográficas para o gradiente estão apresentadas na Tabela I.1.

Tabela I.1. Programa de gradiente para a determinação de ácidos fenólicos por CLAE

Tempo (min)	Eluente A (% v/v)	Eluente B (% v/v)
0,01	100	0
19	100	0
25	80	20
35	80	20
50	60	40
60	60	40
61	100	0

Eluente A: 80% de solução de ácido cítrico 10 mmol/L (pH 2,5) e 20% de metanol e eluente B: metanol.

A identificação foi possível, pela comparação dos tempos de retenção dos picos suspeitos, com os dos padrões e a confirmação foi feita por adição do padrão suspeito à amostra. A quantificação foi feita por interpolação das áreas obtidas em curvas analíticas externas. O limite de detecção para o 5-CQA, sob as condições empregadas neste estudo, foi de 0,03 µg/mL.

Determinação do pH. O pH dos extratos aquosos e etanólicos e do café expresso foi determinado, empregando-se um pHmetro (DM20 Digimed, Santo Amaro, SP, Brasil), previamente calibrado com soluções tampão com pH 4,0 e 7,0, à temperatura ambiente.

Análise estatística. Todas as análises foram efetuadas com três repetições. Os resultados foram avaliados estatisticamente, por meio da análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

I.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

I.3.1 CARACTERÍSTICAS DE COR DE DIFERENTES MARCAS DE CAFÉ MOÍDO

As características de cor das amostras de café moído das diferentes marcas, investigadas neste estudo, estão indicadas na Tabela I.2. Essas foram determinadas, com o objetivo de inferir sobre o grau de torração das amostras.

Não foi observada diferença estatística para os valores de a^* e de h^* entre as amostras. Entretanto, a luminosidade (L^*), os valores b^* e o croma variaram significativamente. A luminosidade relaciona-se ao grau de escurecimento do café, variando de 0 (preto) a 100 (branco), e com correlação significativa inversa entre os seus valores e o grau de torração (BORGES et al., 2002). Observaram-se, valores significativamente maiores de L^* para as marcas C e D, sugerindo que essas amostras podem ter sido submetidas a um menor grau de torração.

Tabela I.2. Características de cor (CIE $L^*a^*b^*$) de amostras de café arábica moído

Parâmetros de cor	Valores / Marcas de café moído			
	A	B	C	D
CIE $L^*a^*b^*$				
L^*	20,9 ± 1,18 ^b	21,2 ± 1,99 ^b	29,4 ± 0,37 ^a	26,4 ± 1,08 ^a
a^*	5,98 ± 2,99	5,89 ± 0,29	10,3 ± 1,36	8,53 ± 2,16
b^*	11,7 ± 2,08 ^b	12,0 ± 3,15 ^b	26,0 ± 0,77 ^a	20,8 ± 2,17 ^a
croma	13,3 ± 2,26 ^c	13,5 ± 2,64 ^c	28,0 ± 0,24 ^a	22,6 ± 1,37 ^b
h^*	63,4 ± 12,9	62,8 ± 8,03	68,4 ± 3,16	67,5 ± 7,07

L^* = luminosidade; c^* = croma; h^* = tonalidade.

Médias de triplicatas (\pm desvio padrão) com letras diferentes na mesma linha (a,b,c) são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

I.3.2 TEORES DE CAFÉINA E TRIGONELINA EM DIFERENTES MARCAS DE CAFÉ

Os teores de cafeína e trigonelina encontrados nas amostras de café estão indicados na Tabela I.3. Os teores de cafeína variaram de 2,10 a 2,23 mg/mL, e isso

indicou uma variação para a cafeína entre as amostras. Esses valores foram similares aos encontrados por outros autores em amostras de café arábica (KY et al., 2001; FARAH et al., 2006a). Pode-se verificar que, mesmo com as altas temperaturas utilizadas durante a torração, a perda de cafeína foi insignificante, o que comprova os dados da literatura (MACRAE, 1989).

Tabela I.3. Teores de cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos em extrato aquoso de café de diferentes marcas obtido por ebulição por 3 min e filtração

Parâmetros	Teores (mg/mL) / Marcas			
	A	B	C	D
Cafeína	2,23 ± 0,03 ^a	2,10 ± 0,03 ^b	2,18 ± 0,03 ^{a,b}	2,11 ± 0,04 ^b
Trigonelina	0,49 ± 0,05 ^d	0,82 ± 0,04 ^c	1,63 ± 0,04 ^a	1,50 ± 0,02 ^b
Ácidos clorogênicos				
3-CQA	0,08 ± 0,00 ^d	0,26 ± 0,00 ^c	0,88 ± 0,01 ^a	0,71 ± 0,01 ^b
4-CQA	0,09 ± 0,00 ^d	0,27 ± 0,01 ^c	1,11 ± 0,02 ^a	0,90 ± 0,01 ^b
5-CQA	0,12 ± 0,01 ^d	0,45 ± 0,00 ^c	1,79 ± 0,03 ^a	1,46 ± 0,01 ^b

CQA ácidos cafeoilquínicos: 3-CQA ácido 3-cafeoilquínico, 4-CQA ácido 4-cafeoilquínico e 5-CQA ácido 5-cafeoilquínico.

Médias de triplicatas (± desvio padrão) com letras diferentes na mesma linha (a,b,c,d) são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Teores significativamente menores de trigonelina foram verificados na amostra A. Na amostra B a mesma situação foi observada, apesar dos teores médios terem sido superiores aos da amostra A. Nas amostras C e D, os teores de trigonelina foram superiores aos das amostras A e B.

Os teores de trigonelina em todas as amostras foram iguais ou inferiores a 1,63 mg/mL o que corresponde, em g/100 g, a 0,81 g/100 g. Esses teores foram similares aos encontrados por MONTEIRO & TRUGO (2005) que observaram valores entre 0,2 e 0,5 g/100 g para amostras de café torrado e moído. Os baixos teores observados para as amostras A e B sugerem uma torração mais intensa. De acordo com MACRAE (1989), os teores de trigonelina são usualmente baixos em café torrado, considerando-se sua sensibilidade às temperaturas de torração, que são capazes de causar significativa degradação.

I.3.3 TEORES DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM DIFERENTES MARCAS DE CAFÉ

Entre os ácidos clorogênicos, os ácidos cafeoilquínicos – CQA (3-CQA, 4-CQA e 5-CQA) foram detectados em todas amostras (Tabela I.3), com teores, variando significativamente, entre as marcas. Foram detectados teores mais altos de ácidos clorogênicos na marca C, seguida das marcas D, B e A.

Em todas as marcas investigadas, o 5-CQA foi o isômero do ácido clorogênico prevalente, seguido do 4-CQA e do 3-CQA. Os teores de 5-CQA variaram de 0,12 a 1,79 mg/mL, o que corresponde a uma variação de 60,2 a 893 mg/100 g. O 4-CQA variou de 0,09 a 1,11 mg/mL (44,1 a 528 mg/100 g) e o 3-CQA variou de 0,08 a 0,88 mg/mL (38,7 a 433 mg/100 g). Esses valores encontram-se menores do que os teores de ácidos clorogênicos encontrados por MONTEIRO & TRUGO (2005) que verificaram variação entre 350 e 1590 mg/100 g em amostras de café torrado. Em todas as amostras estudadas por esses autores, houve um predomínio dos ácidos cafeoilquínicos, que representaram 77% a 82% do total de CGA. FARAH et al. (2005) identificaram os mesmos ácidos clorogênicos em *C. arabica* cv Bourbon. Ao investigar a influência do tempo de torração nos teores de ácidos clorogênicos, esses autores observaram teores significativamente menores, em amostras submetidas a 10 min de torração, quando comparadas a 7 min. MONTEIRO & TRUGO (2005) também observaram a degradação de ácidos clorogênicos, durante a torração do café, pois as amostras que foram submetidas a um processo de torração mais drástico, apresentaram menores teores de ácidos clorogênicos totais.

Entre os ácidos fenólicos investigados, os ácidos caféico e protocatéico não foram identificados em nenhuma das amostras analisadas. No entanto, DOGASAKI et al. (2002) identificaram esses compostos em extratos de café por meio de ressonância magnética nuclear (RMN), CLAE e espectrometria de massa. De acordo com FARAH et al. (2006a), o ácido caféico é geralmente encontrado em café verde, enquanto, apenas uma pequena quantidade, pode ser identificada em algumas amostras de café torrado. Acredita-se, que as amostras usadas por DOGASAKI et al. (2002) foram, provavelmente, submetidas a condições suaves de torração, quando comparadas com as amostras incluídas no presente estudo.

Considerando-se a degradação dos ácidos clorogênicos e da trigonelina durante o processo de torração e as características de cor, as amostras A e B, provavelmente, foram submetidas a condições mais severas de torração. Entretanto, todas as

amostras seriam classificadas como muito escuras (FARAH et al., 2006a). Apesar dos resultados obtidos para trigonelina, ácidos clorogênicos e pH terem apresentado diferenças significativas entre as amostras utilizadas, de acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Café (ABIC), todas as amostras seriam classificadas, com referência à cor, como muito escuras pelo grau de torração.

I.3.4 INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE PREPARO E DO TIPO DE EXTRAÇÃO NOS VALORES DE pH DE DIFERENTES MARCAS DE CAFÉ

Os valores de pH dos diferentes extratos das amostras de café estão apresentados na Figura I.1. Observa-se um efeito significativo do método de preparo (extrato aquoso por ebulição/filtração ou extrato aquoso expresso) e do tipo de solvente (água ou etanol) nos valores de pH, obtidos para os extratos de café. Para todas as marcas de café investigadas, um maior valor de pH foi observado para o extrato etanólico (pH = 6,32 a 7,17), seguido do expresso (pH = 5,32 a 6,07) e do extrato aquoso (pH = 4,88 a 5,29). Esses resultados indicam que a extração aquosa (ebulição/3 min seguida de filtração) foi capaz de extrair teores significativamente maiores de componentes ácidos do café, comparado aos demais métodos, conferindo assim à amostra valores de pH significativamente menores. De acordo com SNYDER & KIRKLAND (1997), a alta polaridade da água, comparada ao etanol, pode facilitar a extração de compostos ácidos das amostras de café.

Quando comparados os valores de pH, para os extratos aquosos (ebulição/3 min seguida de filtração) obtidos, a partir de cada marca de café (Figura I.1), observa-se que as amostras das marcas A e B apresentaram valores médios de pH significativamente mais elevados (5,29 e 5,23), seguidas da amostra D (5,02) e da C (4,88).

A diferença nos valores de pH, entre as marcas de café estudadas, pode ter sido acarretada por vários fatores, tais como, práticas agrícolas, grau de amadurecimento durante a colheita, fermentação das cerejas, grau e método de torração (MAZZAFERA, 1999; PIMENTA et al., 2000; FRANCA et al., 2005). De acordo com SABBAGH & YOKOMIZO (1976), quanto mais severas as condições de torração do café, maiores os valores de pH obtidos. Esses autores obtiveram os seguintes valores de pH para café arábica-duro, após a torração a 180 °C, com perdas de peso, de 12%, 15% e 17%: 5,12; 5,09 e 5,44, respectivamente.

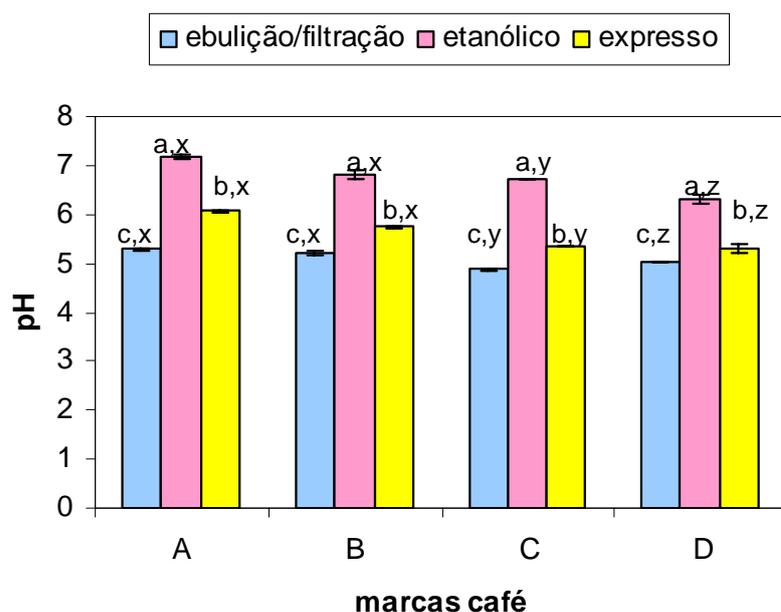


Figura I.1. Valores de pH dos extratos aquosos por ebulição/filtração, dos extratos etanólicos e dos extratos aquosos (expresso) para as marcas de café.

Médias de triplicatas (\pm desvio padrão) com letras diferentes (a,b,c) dentro de cada amostra e (x,y,z) para cada tipo de extração são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

I.4. CONCLUSÕES

As amostras de café arábica apresentaram características físico-químicas distintas. De acordo com a luminosidade, teores de trigonelina e ácidos clorogênicos e valores de pH das amostras analisadas, pode-se inferir que as amostras A e B foram submetidas a condições de torração mais severas.

O tipo de extração influenciou o pH, sendo um maior valor de pH encontrado no extrato etanólico, seguido pelo expresso e pelo extrato aquoso, em todas as marcas de café investigadas.

CAPÍTULO II

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE EXTRATO E DE COMPOSTOS FENÓLICOS E NITROGENADOS DO CAFÉ ISOLADOS E EM ASSOCIAÇÃO

RESUMO

O potencial antimicrobiano do extrato aquoso de café e dos ácidos caféico, clorogênico, protocatéico e da cafeína e trigonelina, e de associações de extrato de café com esses compostos foi investigado *in vitro*. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em ágar, utilizando-se as bactérias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e duas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*; as leveduras *Candida albicans* e *Candida tropicalis* e o fungo filamentoso *Aspergillus niger*. Os halos de inibição do crescimento microbiano foram medidos após a incubação. Observou-se atividade antimicrobiana do extrato e das substâncias químicas do café sobre as bactérias *E. coli*, *S. enterica*, *S. aureus* e uma das cepas de *P. aeruginosa* (ATCC 9027). Nas associações (extrato aquoso e substâncias), não foi observado aumento na atividade sobre os microrganismos, exceto para *B. subtilis*, para o qual, a associação do extrato aquoso do café com a cafeína ocasionou um aumento significativo na atividade antimicrobiana. Não se observou atividade para o fungo filamentoso e as leveduras. Os resultados evidenciaram que, nas condições testadas, os extratos aquosos de café e os compostos químicos isolados ou em associação possuem atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e não apresentam atividade antifúngica.

II.1. INTRODUÇÃO

Estudos têm descrito o efeito inibidor de extratos vegetais sobre o crescimento microbiano (RAMOS-NINO, 1996; WEISS et al., 1998; MATSUMOTO et al., 1999). Frutas frescas e vegetais contêm uma variedade de compostos antimicrobianos, sendo alguns importantes na proteção contra infecções por patógenos (WALKER, 1994; WEN, 2003).

Alguns estudos foram realizados com o objetivo de pesquisar a presença e a formação de compostos com atividade antimicrobiana no café. DAGLIA et al. (1994a) avaliaram a atividade antibacteriana de extratos do café frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e encontraram resultados positivos para *S. aureus* e *E. coli*. Esses autores concluíram que o processo de preparo da bebida não influenciou a atividade antibacteriana e que, entre as espécies de café estudadas, *C. robusta* teve uma atividade antibacteriana maior que *C. arabica*. Observaram ainda, que o café com maior grau de torração possuiu atividade superior aos de torração média e baixa. DAGLIA et al. (1994b) atribuíram a atividade antibacteriana a compostos químicos presentes no café torrado, empregando como microrganismo teste *S. aureus*. Entretanto, esses autores não avaliaram substâncias presentes não resultantes da reação de Maillard, assim como não investigaram o efeito contra fungos.

FURUHATA et al. (2002) estudaram a atividade antibacteriana de café frente a *L. pneumophila* e observaram a inibição da referida bactéria. Em estudo subsequente, DOGAZAKI et al. (2002) isolaram do extrato de café diferentes compostos químicos que apresentaram efeito antibacteriano contra *L. pneumophila*, sendo esses identificados como ácido caféico, ácido clorogênico e ácido protocatéico. Entretanto, esses autores focaram seus estudos em uma única bactéria.

O estudo sobre a presença de atividade antimicrobiana no café permitirá a seleção de substâncias com potencial emprego como antimicrobiano em diversas áreas. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antimicrobiana de extrato aquoso de café, de substâncias químicas presentes no café e de associações de extratos com as substâncias, frente a algumas bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos.

II.2. MATERIAL E MÉTODOS

II.2.1 MATERIAL

II.2.1.1 Amostras de café

Grãos de café (*Coffea arabica*) torrados da marca D foram adquiridos no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG. Os grãos foram moídos em moinho doméstico (Braun, EUA) e tamisados (20 mesh série Tyler). O extrato aquoso de café foi obtido, adicionando-se 8,0 g de pó de café em 40 mL de água em ebulição, mantido em banho em ebulição por 3 min, sob agitação, seguido de filtração em filtro qualitativo (VITORINO et al., 2001).

II.2.1.2 Compostos químicos do café

Os ácidos caféico (Sigma, St. Louis, MO, EUA, C0625-26), clorogênico (Aldrich, Milwaukee, WI, EUA, C44206) e protocatéico (Sigma, St. Louis, MO, EUA, P5630) na concentração de 2,0 mg/mL foram dissolvidos em água destilada esterilizada, com auxílio de aparelho de ultra-som (30 s), colocados em seguida em banho maria fervente (30 s). A cafeína (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e a trigonelina (Sigma, St. Louis, MO, EUA, T5509) na concentração de 2,0 mg/mL foram diluídas em água destilada esterilizada. As associações de substâncias químicas do café foram preparadas com 2,0 mg de cada substância, associadas a 1 mL do extrato aquoso do café.

II.2.1.3 Microrganismos

Os microrganismos empregados foram as bactérias *B. subtilis* (ATCC 6633), *E. coli* (ATCC 8739), *S. enterica* (ATCC 14028), *S. aureus* (ATCC 6538), *S. mutans* (UFRJ), *P. aeruginosa* a (ATCC 9027), *P. aeruginosa* b (ATCC 25619), as leveduras *C. albicans* (ATCC 10259) e *C. tropicalis* (ATCC 15114) e o fungo filamentoso *A. niger* (ATCC 16404). As cepas foram mantidas a -70 °C em caldo infuso de cérebro e coração (BHI) com 20% de glicerol (bactérias) e em caldo Saboraud com 20% de glicerol (leveduras e fungo filamentoso). Os microrganismos foram reativados pela transferência para ágar nutriente (bactérias) e ágar batata (leveduras e fungo filamentoso) e incubados a $36,5 \pm 1,0$ °C, durante 24 h (bactérias e leveduras) e a 25,0

$\pm 1,0$ °C, durante 72 h (fungos). *S. mutans* foi inoculado em ágar nutriente, adicionado de 5% de sacarose e incubado em jarra de anaerobiose, com 5% de O₂, nas mesmas condições de tempo e temperatura das bactérias, em todo o experimento.

II.2.1.4 Meios de cultura

Foram empregados os meios de cultura ágar nutriente, ágar batata, ágar Saboraud, ágar Mueller-Hinton, caldo infuso de cérebro e coração e caldo Sabouraud da Dialab Diagnósticos (Montes Claros, MG, Brasil).

II.2.2 MÉTODOS

II.2.2.1 Determinação da atividade antimicrobiana

Para avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato aquoso de café foi usado o método de difusão em ágar (NUNAN et al., 1985; NCCLS, 2000), utilizando-se discos estéreis (Sensibiodisc, Cecon, SP) de 6 mm de diâmetro. Esses discos foram impregnados no extrato aquoso de café, nas soluções dos compostos químicos e no extrato associado, com cada composto químico.

As culturas das bactérias foram plaqueadas em ágar nutriente e incubadas em estufa (Forma Scientific, Marietta, OH, EUA) a $36,5 \pm 1,0$ °C, por 24 h, com exceção de *S. mutans* que foi plaqueado no ágar nutriente, adicionado de 5% de sacarose e incubado em estufa, dentro de uma jarra de anaerobiose com 5% de O₂, nas mesmas condições. As culturas de leveduras foram plaqueadas em ágar batata e incubadas em estufa a $36,5 \pm 1,0$ °C, por 24 h e a do fungo em ágar Sabouraud e incubada em BOD (Tecnal, modelo TE391, Ourinhos, SP, Brasil) a $25,0 \pm 1,0$ °C, por 72 h. O inóculo foi padronizado, transferindo-se os microrganismos em crescimento para um tubo de solução salina esterilizada, até obter-se uma turbidez equivalente a 50% de transmitância em espectrofotômetro (Coleman, modelo 6120, Maywood, IL, EUA) a 580 nm, a qual, após plaqueamento, correspondeu a 10^8 UFC/mL. Dessa suspensão foram retirados 200 µL e semeados homoganeamente, com auxílio de alça de Drigalski, na superfície de placas de Petri de 150 mm de diâmetro, contendo ágar Mueller-Hinton para as bactérias, ágar batata para as leveduras e ágar Saboraud para o fungo filamentoso. Os discos foram impregnados com 20 µL do extrato (4,0 mg/disco), das substâncias (40 µg/disco) e das associações (extrato + cada substância) e depositados na superfície do ágar, semeado com cada um dos microrganismos. As placas foram

incubadas a $36,5 \pm 1,0$ °C, por 48 h, para as bactérias e leveduras e $25,0 \pm 1,0$ °C, por 72 h, para o fungo filamentoso.

Discos contendo os antibióticos cloranfenicol (30 µg), amoxicilina (30 µg), gentamicina (10 µg) (Cecon, São Paulo, SP, Brasil) e anfotericina B (40 µg) (Fungizon -[®]Squibb) foram usados como controles positivos.

Os halos de inibição foram medidos com paquímetro (mm) e considerou-se o diâmetro total, incluindo o do disco. As análises foram efetuadas com três repetições e com duas réplicas em cada. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Bonferroni ($p \leq 0,05$), empregando-se o software GraphPad Prism versão 4.03.

II.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.3.1 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO AQUOSO DO CAFÉ, DE COMPOSTOS QUÍMICOS E DE ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO E COMPOSTOS QUÍMICOS

Na Tabela II.1 são apresentados os resultados da atividade antibacteriana do extrato e de alguns compostos químicos do café frente a algumas bactérias, utilizando-se o método de difusão em ágar. Observou-se atividade antimicrobiana contra as bactérias avaliadas pelo extrato aquoso do café e pelas substâncias testadas (ácidos clorogênico, caféico, protocatéico, cafeína e trigonelina). Halos maiores foram observados, tanto com extrato aquoso, quanto com os compostos químicos do café para *S. enterica*, sugerindo ser essa a bactéria mais sensível às substâncias avaliadas. Para as demais bactérias, os halos de inibição observados com o extrato aquoso de café não diferiram estatisticamente, exceto para *P. aeruginosa* b, para a qual os halos foram significativamente menores.

Os halos resultantes da atividade do ácido caféico contra *S. enterica*, *S. aureus*, *S. mutans* e *E. coli* foram os maiores observados, mas não diferiram entre si, enquanto, halos menores foram observados para *B. subtilis* e as duas cepas de *P. aeruginosa* (a e b). Resultados semelhantes foram observados para a trigonelina.

Pelos resultados observados, comprova-se a existência de atividade antimicrobiana do extrato do café e das substâncias investigadas. Resultados

semelhantes foram verificados em trabalhos publicados em que foi identificada atividade antimicrobiana com extratos de café sobre *E. coli*, *S. aureus* e *S. pyogenes* (DAGLIA et al., 1994a) e sobre *L. pneumophila* (FURUHATA et al., 2002) pelo extrato e por algumas substâncias do café (ácido cafêico, ácido clorogênico e ácido protocatéico).

Tabela II.1. Diâmetro dos halos de inibição obtidos pelo método de difusão em ágar para o extrato aquoso de café (4,0 mg/disco) e de compostos químicos (40 µg/disco) frente a bactérias

Bactérias teste	Halos de inibição (mm)					
	Extrato de café	Ácido cafêico	Ácido clorogênico	Ácido protocatéico	Cafeína	Trigone-lina
<i>B. subtilis</i>	6,25 ± 0,25 _{bc}	6,33 ± 0,29 _b	6,50 ± 0,50 _{bc}	6,50 ± 0,50 _{bc}	7,00 ± 0,00 _{bc}	6,58 ± 0,52 _b
<i>E. coli</i>	7,33 ± 0,80 _b	7,58 ± 1,23 _{ab}	7,83 ± 0,76 _b	7,75 ± 0,90 _b	6,25 ± 0,35 _b	7,42 ± 1,42 _{ab}
<i>S. enterica</i>	9,75 ± 1,75 _a	8,67 ± 0,58 _a	9,25 ± 1,00 _a	9,17 ± 1,15 _a	8,25 ± 0,36 _a	8,83 ± 0,76 _a
<i>S. aureus</i>	7,75 ± 0,66 _b	7,58 ± 0,14 _{ab}	8,08 ± 1,13 _{a,b}	7,67 ± 0,63 _b	7,50 ± 0,0 _{ab}	7,50 ± 0,50 _a
<i>S. mutans</i>	7,00 ± 1,00 _{bc}	7,33 ± 0,29 _{ab}	7,58 ± 0,38 _b	7,50 ± 0,50 _b	7,50 ± 0,50 _{ab}	7,33 ± 0,29 _{ab}
<i>P. aeruginosa</i> a	7,25 ± 1,09 _b	6,50 ± 0,50 _b	6,50 ± 0,50 _{bc}	6,50 ± 0,50 _c	6,00 ± 0,00 _c	6,50 ± 0,50 _b
<i>P. aeruginosa</i> b	6,17 ± 0,29 _c	6,33 ± 0,58 _b	6,17 ± 0,29 _c	6,00 ± 0,00 _c	(-)	6,17 ± 0,29 _b

Médias de triplicatas (± desvio padrão) com letras diferentes (a,b,c) na mesma coluna são significativamente diferentes (Teste de Bonferroni, $p \leq 0,05$). Não houve diferença significativa entre as médias nas linhas. (-) não realizado.

Controle antibióticos (halos mm ± desvio padrão). Cloranfenicol: *B. subtilis* (29,33 ± 3,05); *E. coli* (24,5 ± 2,29); *S. enterica* (24,83 ± 3,33); Amoxicilina: *S. mutans* (20,5 ± 0,71); Gentamicina: *P. aeruginosa* a (17,17 ± 1,61); *P. aeruginosa* b (17,75 ± 1,06).

Uma considerável atividade antimicrobiana do ácido cafêico foi descrita contra *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* e *Pseudomonas* (BARANOWSKI & NAGEL, 1982; HERALD & DAVIDSON, 1983; GARROTE et al., 2004). DOGAZAKI et al. (2002) observaram atividade antimicrobiana dos ácidos cafêico e protocatéico sobre *L. pneumophila*. Diversos autores estudaram a atividade antimicrobiana da cafeína. BUCHANAN & FLETCHER (1978) observaram que a cafeína (2 mg/mL) inibiu a produção de aflatoxina pelo fungo filamentosso *A. parasiticus* em meio líquido. Resultados similares

foram relatados por NARTOWICZ et al. (1979), após avaliarem grãos de café com e sem cafeína. DAGLIA et al. (2002) inferiram que a cafeína não apresentava atividade antimicrobiana sobre *S. mutans*, ao investigarem o efeito de café com e sem cafeína.

Os resultados encontrados nesse estudo, em relação à *S. enterica*, apontaram essa bactéria como uma das mais sensíveis tanto ao extrato de café, quanto aos compostos químicos do café. Resultados esses que diferiram dos encontrados por DAGLIA et al. (1994a), que verificaram altas concentrações da concentração inibitória para os extratos de café (12 a > 60 mg/mL) para *S. typhimurium* (ATCC 14028), empregando-se o método de diluição em meio líquido e um inóculo inicial de $10^4 - 10^5$ UFC/mL. É importante salientar que, a bactéria usada por DAGLIA et al. (1994a), é a mesma cepa ATCC usada no presente estudo, embora, em 1994, ela tenha sido classificada pela ATCC como *S. typhimurium* e atualmente, como *S. enterica*.

Na Tabela II.2 são apresentados os resultados da atividade antibacteriana das associações do extrato aquoso com os ácidos caféico, clorogênico e protocatéico, com a cafeína e a trigonelina. Foi observado que as associações do extrato do café com o ácido caféico e com o ácido clorogênico foram mais eficazes contra *S. enterica* e *S. mutans*. Essas substâncias, associadas ao extrato de café, agiram da mesma forma tanto para bactérias Gram-negativas, quanto para Gram-positivas. Em relação às associações do extrato aquoso de café com o ácido protocatéico e com a trigonelina, *S. enterica* foi a bactéria mais sensível, seguida de *S. mutans*, *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* a. Para todas as associações do extrato aquoso de café com os compostos químicos testados, *B. subtilis* e *P. aeruginosa* b foram as bactérias menos sensíveis. Os resultados referentes às associações trabalhadas constituem uma das partes inéditas deste trabalho.

Nas tabelas II.1 e II.2 foram comparadas as atividades antimicrobianas das substâncias e das associações, separadamente. Buscando-se perceber um possível efeito potencializador, foi realizada a análise de variância dos resultados obtidos, comparando-se as substâncias com o extrato aquoso de café e com a associação (extrato aquoso de café + substância) (Tabela II.3).

Pelos resultados, verifica-se que para *S. enterica* os halos de inibição obtidos com o extrato de café foram significativamente maiores do que os halos obtidos para a cafeína e sua associação. Esses resultados sugerem que a atividade antimicrobiana foi maior pelos extratos de café do que pela associação com a cafeína. Para a análise discriminatória de diferenças, foi utilizado o teste de Bonferroni, pois a literatura

descreve esse teste com alto poder para a detecção de diferenças entre médias. Entretanto, o teste de Bonferroni pode, em algumas situações, não controlar as taxas de erro tipo I (SANTOS et al., 2001). É conveniente salientar que, embora tenha sido padronizada a utilização da probabilidade de 5%, quando se observa a comparação das médias com o teste de Bonferroni ao nível de 1% de probabilidade, não se observa diferença entre o extrato aquoso de café e a associação. Assim, usando-se 1% de probabilidade o extrato aquoso de café e a associação seriam estatisticamente iguais e superiores à cafeína pura, o que se mostra mais coerente com os resultados apresentados para as outras substâncias.

Tabela II.2. Diâmetro dos halos de inibição obtidos pelo método de difusão em ágar para o extrato aquoso de café e associações desse extrato com compostos químicos do café frente a bactérias

Bactérias teste	Halos de inibição (mm)					
	Extrato aquoso café (EA)	EA + ac. caféico	EA + ac. clorogênico	EA + ac. protocateíco	EA + cafeína	EA + trigonelina
<i>B. subtilis</i>	6,25 ± 0,25 _{d,y}	6,42 ± 0,72 _{b,y}	6,42 ± 0,72 ^{bc,y}	6,58 ± 0,63 _{bc,y}	8,00 ± 0,00 _{ab,x}	6,58 ± 0,63 _{b,y}
<i>E. coli</i>	7,33 ± 0,80 _{bc}	7,75 ± 1,09 _{ab}	7,58 ± 1,23 ^{ab}	7,83 ± 0,58 _{ab}	7,75 ± 0,35 _{ab}	7,58 ± 1,01 _b
<i>S. enterica</i>	9,75 ± 1,75 _a	8,67 ± 0,58 _a	7,83 ± 1,76 ^{ab}	8,25 ± 0,43 _a	8,5 ± 0,35 ^a	9,42 ± 0,80 _a
<i>S. aureus</i>	7,75 ± 0,66 _{bc}	7,50 ± 0,50 _{ab}	7,25 ± 0,25 ^{ab}	7,33 ± 0,29 _{ab}	7,75 ± 1,06 _{ab}	7,58 ± 0,52 _{ab}
<i>S. mutans</i>	7,00 ± 1,00 _{bc}	8,67 ± 0,29 _a	8,25 ± 0,66 ^a	8,50 ± 0,50 ^{ab}	8,33 ± 0,38 _a	8,33 ± 0,58 _{ab}
<i>P. aeruginosa</i> a	7,25 ± 1,09 _{bc}	7,08 ± 0,63 _{bc}	6,75 ± 0,43 ^{bc}	7,25 ± 0,66 _{ab}	6,25 ± 0,35 ^c	7,17 ± 0,58 _{bc}
<i>P. aeruginosa</i> b	6,17 ± 0,29 _{bc}	6,25 ± 0,43 _c	6,00 ± 0,00 _c	6,25 ± 0,43 _c	(-)	6,17 ± 0,29 _{bc}

Médias de triplicatas (± desvio padrão) com letras diferentes (a,b,c,d) na mesma coluna e (x,y) na mesma linha são significativamente diferentes (Teste de Bonferroni, $p \leq 0,05$).

Controle antibióticos (halos mm ± desvio padrão). Cloranfenicol: *B. subtilis* (29,33 ± 3,05); *E. coli* (24,5 ± 2,29); *S. enterica* (24,83 ± 3,33); Amoxicilina: *S. mutans* (20,5 ± 0,71); Gentamicina: *P. aeruginosa* a (17,17 ± 1,61); *P. aeruginosa* b (17,75 ± 1,06).

Por outro lado, verifica-se que para *B. subtilis* o halo de inibição obtido com a associação foi estatisticamente maior do que os halos formados pelo extrato de café e pela cafeína, separadamente. Pelo aumento observado na inibição pela associação, para a referida bactéria, percebe-se que houve uma influência da cafeína e isso sugere

que, para uma maior inibição de *B. subtilis*, é necessária uma maior concentração de cafeína, ou ainda, a associação desses compostos com algum outro carreado pela extração aquosa.

Para os ácidos caféico, clorogênico, protocatéico e trigonelina não foram verificadas diferenças significativas entre as médias dos halos obtidos pelos três tratamentos (extrato de café, substância pura e substância associada ao extrato de café), para todas as bactérias investigadas, e isso indicou que a concentração de 2,0 mg/mL, associada ao extrato aquoso de café, não foi capaz de promover uma elevação na inibição.

II.3.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO AQUOSO DO CAFÉ E DE ALGUNS COMPOSTOS QUÍMICOS

Não se observou atividade antimicrobiana do extrato aquoso de café e das substâncias investigadas sobre as duas espécies de leveduras e o fungo filamentososo, empregando-se o método de difusão em ágar. Esses resultados são diferentes daqueles descritos na literatura por BUCHANAN et al. (1981), que verificaram que a cafeína (1 e 2 mg/mL) inibiu o crescimento dos fungos *Aspergillus ochraceus* e espécies toxigênicas de *Aspergillus* e *Penicilium*. No entanto, esses autores utilizaram uma metodologia diferente da usada neste trabalho. Foi empregado o método de crescimento em meio de cultura durante 7 dias, contendo a cafeína, e pesagem do micélio desenvolvido.

CHALFOUN et al. (2000) também verificaram ação inibidora da cafeína a 1,0% e 2,0% sobre fungos associados a grãos de café (*Cladosporium* e *Fusarium*), empregando-se uma metodologia diferente da usada neste estudo. Esses autores inocularam placas de Petri, contendo ágar batata suplementado com diferentes concentrações de cafeína (0,0%, 0,8%, 1,0% e 2,0%), com um disco de micélio de 0,5 cm e avaliaram o crescimento micelial, após 20 dias de incubação. A diferença de métodos usados para avaliar a atividade antimicrobiana em trabalhos descritos na literatura, poderia justificar a divergência nos resultados obtidos no presente estudo.

Tabela II.3. Diâmetro dos halos de inibição obtidos pelo método de difusão em ágar para o extrato aquoso de café, a substância pura (ácidos caféico, clorogênico, protocatéico, cafeína e trigonelina) e a associação do extrato com a substância, frente a bactérias

Substância/ Bactéria (ATCC)	Halos de inibição (mm)		
	Extrato de café	Substância pura	Associação
Ácido caféico			
<i>B. subtilis</i> (6633)	6,25 ± 0,25 ^a	6,33 ± 0,29 ^a	6,42 ± 0,72 ^a
<i>E. coli</i> (8739)	7,33 ± 0,80 ^a	7,58 ± 1,23 ^a	7,75 ± 1,09 ^a
<i>S. enterica</i> (14028)	9,75 ± 1,75 ^a	8,67 ± 0,58 ^a	8,67 ± 0,58 ^a
<i>S. aureus</i> (6538)	7,75 ± 0,66 ^a	7,58 ± 0,14 ^a	7,50 ± 0,50 ^a
<i>S. mutans</i> (UFRJ)	7,00 ± 1,00 ^a	7,33 ± 0,29 ^a	8,67 ± 0,29 ^a
<i>P. aeruginosa</i> a (9027)	7,25 ± 1,09 ^a	6,50 ± 0,50 ^a	7,08 ± 0,63 ^a
<i>P. aeruginosa</i> b (25619)	6,17 ± 0,29 ^a	6,33 ± 0,58 ^a	6,25 ± 0,43 ^a
Ácido clorogênico			
<i>B. subtilis</i> (6633)	6,25 ± 0,25 ^a	6,50 ± 0,50 ^a	6,42 ± 0,72 ^a
<i>E. coli</i> (8739)	7,33 ± 0,80 ^a	7,83 ± 0,76 ^a	7,58 ± 1,23 ^a
<i>S. enterica</i> (14028)	9,75 ± 1,75 ^a	9,25 ± 1,00 ^a	7,83 ± 1,76 ^a
<i>S. aureus</i> (6538)	7,75 ± 0,66 ^a	8,08 ± 1,13 ^a	7,25 ± 0,25 ^a
<i>S. mutans</i> (UFRJ)	7,00 ± 1,00 ^a	7,58 ± 0,38 ^a	8,25 ± 0,66 ^a
<i>P. aeruginosa</i> a (9027)	7,25 ± 1,09 ^a	6,50 ± 0,50 ^a	6,75 ± 0,43 ^a
<i>P. aeruginosa</i> b (25619)	6,17 ± 0,29 ^a	6,17 ± 0,29 ^a	6,00 ± 0,00 ^a
Ácido protocatéico			
<i>B. subtilis</i> (6633)	6,25 ± 0,25 ^a	6,50 ± 0,50 ^a	6,58 ± 0,63 ^a
<i>E. coli</i> (8739)	7,33 ± 0,80 ^a	7,75 ± 0,90 ^a	7,83 ± 0,58 ^a
<i>S. enterica</i> (14028)	9,75 ± 1,75 ^a	9,17 ± 1,15 ^a	8,25 ± 0,43 ^a
<i>S. aureus</i> (6538)	7,75 ± 0,66 ^a	7,67 ± 0,63 ^a	7,33 ± 0,29 ^a
<i>S. mutans</i> (UFRJ)	7,00 ± 1,00 ^a	7,50 ± 0,50 ^a	8,50 ± 0,50 ^a
<i>P. aeruginosa</i> a (9027)	7,25 ± 1,09 ^a	6,50 ± 0,50 ^a	7,25 ± 0,66 ^a
<i>P. aeruginosa</i> b (25619)	6,17 ± 0,29 ^a	6,00 ± 0,00 ^a	6,25 ± 0,43 ^a
Cafeína			
<i>B. subtilis</i> (6633)	6,25 ± 0,25 ^b	7,00 ± 0,00 ^b	8,00 ± 0,0 ^a
<i>E. coli</i> (8739)	7,33 ± 0,80 ^a	6,25 ± 0,35 ^a	7,75 ± 0,35 ^a
<i>S. enterica</i> (14028)	9,75 ± 1,75 ^a	8,25 ± 0,36 ^b	8,50 ± 0,35 ^b
<i>S. aureus</i> (6538)	7,75 ± 0,66 ^a	7,50 ± 0,00 ^a	7,75 ± 1,06 ^a
<i>S. mutans</i> (UFRJ)	7,00 ± 1,00 ^a	7,50 ± 0,50 ^a	8,33 ± 0,38 ^a
<i>P. aeruginosa</i> a (9027)	7,25 ± 1,09 ^a	6,00 ± 0,00 ^a	6,25 ± 0,35 ^a
Trigonelina			
<i>B. subtilis</i> (6633)	6,25 ± 0,25 ^a	6,58 ± 0,52 ^a	6,58 ± 0,63 ^a
<i>E. coli</i> (8739)	7,33 ± 0,80 ^a	7,42 ± 1,42 ^a	7,58 ± 1,01 ^a
<i>S. enterica</i> (14028)	9,75 ± 1,75 ^a	8,83 ± 0,76 ^a	9,42 ± 0,80 ^a
<i>S. aureus</i> (6538)	7,75 ± 0,66 ^a	7,50 ± 0,50 ^a	7,58 ± 0,52 ^a
<i>S. mutans</i> (UFRJ)	7,00 ± 1,00 ^a	7,33 ± 0,29 ^a	8,33 ± 0,58 ^a
<i>P. aeruginosa</i> a (9027)	7,25 ± 1,09 ^a	6,50 ± 0,50 ^a	7,17 ± 0,58 ^a
<i>P. aeruginosa</i> b (25619)	6,17 ± 0,29 ^a	6,17 ± 0,29 ^a	6,17 ± 0,29 ^a

Médias de triplicatas (± desvio padrão) com letras diferentes (a,b) na mesma linha são significativamente diferentes (Teste de Bonferroni, $p \leq 0,05$).

II.4. CONCLUSÕES

O extrato aquoso de café e os cinco compostos químicos testados (ácidos clorogênico, caféico, protocatéico, cafeína e trigonelina) apresentaram atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. enterica*, *S. aureus* e *S. mutans*.

S. enterica foi a bactéria mais susceptível ao extrato e a alguns compostos químicos do café.

Para *B. subtilis* e as duas cepas de *P. aeruginosa* utilizadas, observou-se uma atividade antimicrobiana incipiente do extrato aquoso de café e dos cinco compostos químicos testados.

A associação do extrato aquoso do café com a cafeína ocasionou um aumento na atividade antimicrobiana sobre *B. subtilis*.

Não foi observado efeito antimicrobiano do extrato aquoso do café e das cinco substâncias químicas testadas contra as leveduras e o fungo filamentoso investigados.

CAPÍTULO III

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE EXTRATOS DE CAFÉ E DA CAFEÍNA SOBRE *Streptococcus mutans*

RESUMO

O potencial antimicrobiano de extratos de café foi avaliado sobre *S. mutans*, que é o principal agente causador de carie dentária em seres humanos. Os extratos de café foram obtidos por diferentes processos (filtração e expresso) e utilizando-se diferentes líquidos extratores (água e etanol). A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em ágar. Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos após 48 h de incubação a 36,5 °C, com 5% de O₂. Observou-se atividade antimicrobiana para todos os extratos investigados. Não foi observada influência do tipo de solvente na atividade antimicrobiana para três amostras, entretanto, em uma das amostras o etanol foi mais eficiente. Não foi observada influência do método de preparo na atividade antimicrobiana. Para a cafeína, foi realizado um estudo cinético, utilizando-se o método turbidimétrico e observou-se um perfil diferente em cada uma das concentrações estudadas. Na concentração de 2,0 mg/mL, que representa a concentração de cafeína na bebida do café, a inibição, após 24 h de contato, correspondeu a 5,6%, entretanto, uma atividade mais pronunciada só foi alcançada em concentrações acima de 4,0 mg/mL.

III.1. INTRODUÇÃO

Streptococcus mutans é identificada como uma bactéria capaz de produzir cárie dentária em animais e seres humanos (HAMADA et al., 1984; PETTI & HAUSEN, 2000). O potencial para *S. mutans* formar cáries é determinado pela sua capacidade em aderir ao dente e produzir compostos metabólicos ácidos (HAMADA et al., 1984; TAO & TANZER, 2002). A aderência à superfície do dente envolve dois estágios: um inicial com uma interação reversível entre o microrganismo e a película adquirida sobre o esmalte do dente; e um estágio irreversível, em que a interação é principalmente mediada pelas glucanas insolúveis em água, sintetizadas a partir da sacarose pela ação enzimática da glucosiltransferase (HAMADA et al., 1984).

A aplicação tópica da própolis duas vezes ao dia e a sua inclusão na água de beber *ad libitum* reduziu a incidência de cárie dentária em ratos (KOO et al., 2002). KOO et al. (2003) identificaram compostos polifenólicos, presentes na própolis, responsáveis pela redução da cárie dentária em ratos. MARTINS et al. (2002) estudaram a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de própolis frente a *C. albicans* e observaram inibição dessa levedura.

DAGLIA et al. (1998) extraíram frações de café e isolaram um composto com forte atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *S. mutans*. DAGLIA et al. (2002) investigaram a propriedade antiaderente de extratos de café verde e torrado, utilizando *S. mutans* e observaram que todos os extratos de café investigados exibiram altas atividades antiadesiva e inibitória. DAGLIA et al. (2002) e LANDUCCI et al. (2003) observaram propriedade antiadesiva de extratos de café em *S. mutans*, inoculado em superfícies de hidroxiapatita, cobertas com saliva e relacionaram essa atividade a compostos de ocorrência natural no café (trigonelina, ácido nicotínico e ácido clorogênico) e também a melanoidinas de baixa massa molecular, formadas durante a torração.

O objetivo deste estudo foi investigar a atividade antimicrobiana do café sobre *S. mutans*. *S. mutans* foi uma das bactérias que se destacou no estudo envolvendo três bactérias Gram-positivas e quatro bactérias Gram-negativas, por apresentar uma grande sensibilidade ao extrato de café e aos compostos químicos investigados.

Foram avaliados diferentes métodos de extração, marcas de café, e tipos de extratores. Foi realizado um estudo cinético com a cafeína em diferentes concentrações frente ao *S. mutans*, durante 24 h.

III.2. MATERIAL E MÉTODOS

III.2.1 MATERIAL

III.2.1.1 Amostras de café

Quatro amostras de diferentes marcas (A, B, C, D) de grãos de café torrado (C. arabica) foram adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG. Os grãos foram moídos em moinho doméstico (Braun, EUA) e tamisados a 20 mesh (série Tyler).

III.2.1.2 Extratos aquosos e etanólicos e cafeína

Extratos de café foram obtidos, utilizando-se dois tipos de extração (aquosa e etanólica) e dois métodos de extração aquosa (ebulição seguida de filtração e expresso). Para a extração aquosa (ebulição seguida de filtração), os extratos de café foram obtidos, adicionando-se 8,0 g de pó a 40 mL de água em ebulição (20% p/v), por 3 min, seguido de filtração em papel de filtro qualitativo (VITORINO et al., 2001). O café expresso (extração aquosa em máquina de café expresso) foi preparado pela extração de 8,0 g de amostra com 40 mL de água (20% p/v), em um processador de café expresso (Cremissimo Ariete, Fashion Coffee, Itália).

Para a extração etanólica, os extratos foram obtidos, adicionando-se 8,0 g de pó a 40 mL de etanol (20% p/v) e mantidos em banho de ultrassom, a 24 ± 1 °C, durante 15 min.

A cafeína (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foi preparada nas concentrações de 0,5 a 8,0 mg/mL com água destilada esterilizada.

III.2.1.3 Microrganismo, meios de cultura, discos e antibióticos

O microrganismo empregado foi a bactéria *S. mutans* obtida da Coleção da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A cultura foi

mantida a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ em BHI com 20% de glicerol e, para a realização dos testes, as culturas foram reativadas pela transferência para ágar nutriente com 5% de sacarose e incubação em jarra de anaerobiose, contendo 5% de O_2 em estufa (Forma Scientific, Marietta, OH, EUA) a $36,5 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 h.

Foram empregados os meios de cultura ágar nutriente, ágar Mueller-Hinton e BHI da Dialab diagnósticos (Montes Claros, MG, Brasil). Discos estéreis (6 mm diâmetro, Sensibiodisc, Cecon, SP, Brasil) e discos contendo 30 μg do antibiótico amoxicilina e ácido clavulânico foram obtidos da Cecon (São Paulo, SP, Brasil).

III.2.2 MÉTODOS

III.2.2.1 Determinação da atividade antimicrobiana

Para avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato aquoso de café foi usado o método de difusão em ágar (NUNAN et al., 1985; NCCLS, 2000), utilizando-se discos estéreis de 6 mm de diâmetro. O inóculo foi padronizado, transferindo-se os microrganismos em crescimento para um tubo de solução salina esterilizada até obter uma turbidez equivalente a 50% de transmitância em espectrofotômetro (Coleman, modelo 6120, Maywood, IL, EUA) a 580 nm, a qual, após plaqueamento, correspondeu a 10^8 UFC/mL. Dessa suspensão, foram retirados 200 μL e semeados, homogeneamente, na superfície de placas de Petri de 150 mm de diâmetro, contendo ágar Mueller Hinton. Os discos foram impregnados com 20 μL dos extratos e colocados na superfície do ágar Mueller-Hinton, semeado com *S. mutans*. As placas foram incubadas a $36,5 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h em jarra, contendo 5% de O_2 . Os halos de inibição foram medidos com paquímetro e considerou-se o diâmetro total, incluindo o disco. Discos contendo os antibióticos amoxicilina e ácido clavulânico (30 μg), etanol 98 °GL e água destilada foram usados como controles positivo e negativo.

III.2.2.2 Influência da concentração da cafeína na atividade antimicrobiana pelo método turbidimétrico

Para o estudo cinético da influência da concentração de cafeína na inibição de *S. mutans* por um período de 24 h foi empregado o método turbidimétrico (NCCLS, 2000; THE UNITED..., 2006). Foi investigada a cafeína nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; e 8,0 mg/mL, nos tempos de 0 a 8 h (em intervalos de 2 h) e em 24 h. Em tubos,

contendo 9 mL de BHI adicionados de 5% de sacarose, foram colocados 1000 µL das substâncias em cada uma das concentrações e 100 µL do inóculo. O inóculo foi padronizado, transferindo-se os microrganismos em crescimento para um tubo de solução salina esterilizada até obter-se uma turbidez equivalente a 25% de transmitância em espectrofotômetro (Coleman, modelo 6120, Maywood, IL, EUA) a 580 nm, a qual, após plaqueamento, correspondeu a 10^9 UFC/mL. Os tubos foram incubados a $36,5 \pm 1,0$ °C em jarra contendo 5% de O₂ e foi realizada a leitura de transmitância a 530 nm.

Os dados foram transformados em absorbância ($A = 2 - \log T$) e os resultados expressos em percentagem de inibição pela fórmula % inibição = $100(Ac - As)/Ac$ (THE UNITED..., 2006), sendo A a absorbância para o controle (Ac) e para as amostras (As).

Foram preparados controles negativo (contendo amoxicilina) e positivo (sem substância inibidora). Esse último foi preparado, inoculando o meio de cultura (BHI) com 100 µL do inóculo. Cada experimento foi realizado três vezes com duas réplicas em cada.

III.2.2.3 Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

III.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.3.1 INFLUÊNCIA DO SOLVENTE E DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO NA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Na Tabela III.1 estão apresentados os resultados da atividade antibacteriana dos extratos aquosos, etanólicos e café expresso de diferentes marcas frente a *S. mutans* pelo método de difusão em ágar. Observa-se que todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* contra *S. mutans*. Para o extrato etanólico foram observados maiores diâmetros dos halos de inibição, sendo a diferença significativa apenas para a amostra C.

Essa amostra foi a que apresentou valores significativamente maiores de L* (Tabela I.2) e maiores concentrações dos ácidos clorogênicos (3-CQA, 4-CQA e 5-CQA) e da trigonelina (Tabela I.3). Baseado nesses valores, a amostra C foi considerada aquela submetida a condições menos severas de torração. A diferença significativa para os extratos etanólicos sugere que o etanol foi capaz de extrair substâncias que permanecem em concentrações mais elevadas em condições de torração menos severas.

Tabela III.1. Diâmetro dos halos de inibição de *S. mutans* obtidos pelo método de difusão em ágar de extratos aquosos, etanólicos e café expresso (4,0 mg/disco) de diferentes marcas de café

Extrato	Halos de inibição (mm)			
	A	B	C	D
Etanólico	8,33 ± 1,61	9,00 ± 1,00	9,33 ± 0,58 ^a	8,33 ± 0,58
Aquoso	7,33 ± 1,26	6,92 ± 0,88	7,00 ± 1,00 ^b	7,00 ± 1,00
Expresso	7,33 ± 1,53	7,17 ± 0,76	7,00 ± 1,00 ^b	7,17 ± 0,76

Médias de triplicatas (\pm desvio padrão) com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$). Não foi observada diferença significativa entre as marcas para um mesmo extrato. Diâmetro do halo de inibição: etanol e água = 6,00 mm; amoxicilina e ácido clavulânico = 23,00 \pm 2,00 mm.

Não foi observada diferença significativa quando comparados o extrato aquoso, representando o café filtrado, e o café obtido em máquina de café expresso. Resultados similares foram obtidos por DAGLIA et al. (1994b) e FURUHATA et al. (2002) que não observaram efeito significativo da variação do método de preparo na atividade antimicrobiana em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e em *L. pneumophila*, respectivamente.

III.3.2 INFLUÊNCIA DAS MARCAS DE CAFÉ NA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Todas as marcas de café investigadas apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. mutans* (Tabela III.1). Entretanto, não foi observada diferença significativa entre os halos de inibição quando se utilizou diferentes marcas, independente do solvente empregado na extração e do método de extração, com exceção da marca C.

O pH dos extratos de café e os diferentes graus de torração aos quais cada amostra de café foi submetida, como pode ser indicado pelas diferenças de características de cor e teores de trigonelina e ácidos clorogênicos (Tabela I.1) não afetaram a atividade antimicrobiana. Esses resultados sugerem que, além dos fatores investigados neste estudo, possivelmente existem outros capazes de afetar a atividade antimicrobiana causada pelos extratos de café.

Esses resultados associados à propriedade antiadesiva em *S. mutans*, reportada por DAGLIA et al. (2002) e LANDUCCI et al. (2003), fazem dos extratos de café um inibidor potencial das cáries dentárias.

III.3.3 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DA CAFEÍNA E DO TEMPO DE CONTATO NA ATIVIDADE ANTIBACTERINA SOBRE *S. mutans*

Considerando-se os resultados obtidos em relação aos teores de cafeína nos extratos de café (2,10 a 2,23 mg/mL), foi realizado um estudo sobre a influência da concentração de cafeína na inibição de *S. mutans*. Na Figura III.1 estão apresentadas as curvas de absorvância *versus* tempo, determinada pelo método turbidimétrico e acompanhadas durante 24 h de contato, para diferentes concentrações de cafeína. A curva de crescimento de *S. mutans* em BHI pode ser usada como referência para se avaliar a atividade inibitória da cafeína. Após 8 h de contato, essa apresentou o mesmo traçado da curva contendo a cafeína na concentração de 0,5 mg/mL. Dessa forma, podem ser considerados os seguintes tempos na curva de crescimento de *S. mutans*: 0 a 2 h, correspondendo à fase de adaptação ou fase lag, entre 2 e 6 h fase exponencial de crescimento e após 6 h atingindo a fase estacionária. Verificou-se a ação das substâncias avaliadas sobre *S. mutans* na fase exponencial de crescimento.

Observou-se para a cafeína um comportamento diferente em cada uma das concentrações estudadas. Na concentração de 8,0 mg/mL esse composto inibiu a bactéria, em todos os tempos de contato avaliados.

Nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL as curvas de crescimento foram paralelas à curva padrão, porém com um patamar inferior, indicando redução proporcional à concentração, até 8 h de contato. Após 8 h, para a concentração da cafeína de 0,5 mg/mL não foi observado um efeito inibitório. Após 8 h de contato, essa inibição correspondeu a 4,4%.

Na concentração de 2,0 mg/mL, que representa a concentração de cafeína na bebida do café, a inibição, após 24 h de contato, correspondeu a 5,6%. Nas concentrações de 4,0 e 8,0 mg/mL, até 8 h de contato, observou-se um efeito maior na concentração de 8,0 mg/mL. Entretanto, após 8 h de contato, a atividade apresentou-se praticamente igual, atingindo ao final de 24 h de contato uma inibição correspondente a 44% e 47%, respectivamente. Assim, pode-se observar que a cafeína na concentração encontrada no extrato aquoso de café apresenta uma inibição de *S. mutans* discreta. Uma atividade mais pronunciada só é alcançada em concentrações acima de 4,0 mg/mL.

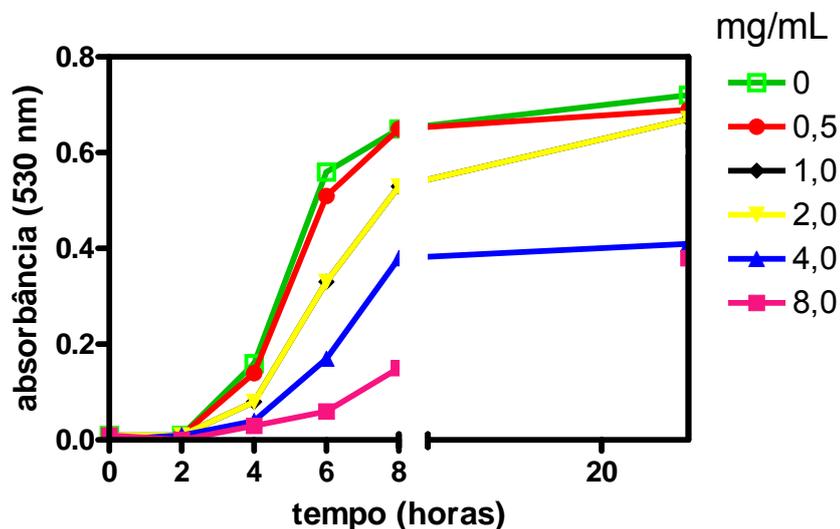


Figura III.1. Influência da concentração e do tempo de contato da cafeína sobre o crescimento de *S. mutans*.

III.4. CONCLUSÕES

Os extratos de café avaliados, independente do solvente e do método de extração, apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. mutans*.

A atividade antimicrobiana não foi afetada pelo tipo de solvente empregado na extração (água e etanol). Entretanto, a amostra que apresentou as maiores concentrações de ácido clorogênico e trigonelina e os maiores valores de L^* , sendo,

provavelmente, aquela exposta a condições menos severas de torração, quando extraída com etanol conferiu uma maior atividade antimicrobiana.

Os métodos de obtenção do extrato aquoso (filtrado e expresso) não interferiram na atividade antimicrobiana.

O uso da cafeína como potencial inibidor da cárie dentária só seria viável em concentrações acima de 4,0 mg/mL. Assim, a concentração de cafeína encontrada na bebida café (2,0 mg/mL) não representaria uma inibição significativa de *S. mutans* presente na microbiota oral.

CAPÍTULO IV

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE EXTRATOS E DE COMPOSTOS FENÓLICOS E NITROGENADOS DO CAFÉ SOBRE ENTEROBACTÉRIAS

RESUMO

O potencial antimicrobiano de extratos aquosos de diferentes marcas de café e do ácido caféico, ácido clorogênico, ácido protocatéico, cafeína e trigonelina foi avaliado, utilizando-se nove enterobactérias: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiela oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Proteus hauseri*, *Salmonella enterica* e *Serratia marcescens*. Foi observada atividade antimicrobiana para todos os extratos e compostos investigados. As concentrações inibitórias de 50% e de 90% das substâncias foram determinadas pelo método de diluição em placa de microtítulo, utilizando-se como microrganismo teste *S. enterica*. Para as substâncias mais ativas - trigonelina, cafeína e ácido protocatéico - realizou-se um estudo cinético, utilizando-se o método turbidimétrico e *S. enterica* como microrganismo teste. Dentre as substâncias testadas, os maiores efeitos antimicrobianos foram verificados para a cafeína e para o ácido protocatéico nas concentrações de 2,0 a 8,0 mg/mL, após 24 h de contato. A cafeína mostrou melhor desempenho, apresentando um aumento significativo da resposta com aumento da dose na faixa avaliada. Verificou-se que o ácido protocatéico, a cafeína e a trigonelina são potenciais agentes antimicrobianos sobre enterobactérias.

IV.1. INTRODUÇÃO

As enterobactérias são microrganismos ubíquos, capazes de sobreviver em condições ambientais adversas e de colonizar diversos nichos ecológicos, inclusive os alimentos. Podem causar infecções hospitalares, toxinfecções alimentares, além de apresentarem uma crescente resistência a antibióticos (DIEKMA et al., 1999; KIDD et al., 2002; YAN et al., 2003).

As salmoneloses estão entre as doenças de origem alimentar de maior ocorrência. A salmonelose é uma infecção causada por bactérias do gênero *Salmonella* e é resultante da ingestão de células viáveis dessas bactérias. Surtos de toxinfecção alimentar causados por *Salmonella* são conhecidos, envolvendo os mais variados tipos de alimentos. Verifica-se, no entanto, que carnes de aves e outros tipos de carnes, além de produtos laticínios, contendo leite cru, ou inadequadamente pasteurizado, são os mais freqüentemente envolvidos (KUBO et al., 2004a; FRANCO & LANDGRAF, 1996). No entanto, entre 1993 e 1997, frutas e vegetais foram mais envolvidos em surtos de salmonelose humana do que carne de porco, frango, peru e leite (BARBER et al., 2003). Outras fontes de transmissão de *Salmonella* que se destacam são: homem como reservatório, introduzindo a bactéria em qualquer ponto da cadeia alimentar; homem alimentando animais; animais de estimação, tais como, cachorros, gatos, répteis e anfíbios (BARBER et al., 2003; YAN et al., 2003).

Salmonelas são bastonetes Gram-negativos, não formadores de esporos que fermentam a glicose, usualmente com formação de gás (FRANCO & LANDGRAF, 1996). Existem mais de 2500 sorotipos, sendo que todos são potencialmente patogênicos para os homens.

Sabe-se que plantas contêm uma grande variedade de agentes antibacterianos contra sorotipos de *Salmonella* (KUBO & FUJITA, 2001). De acordo com KUBO et al. (2004a; 2004b), não existe um agente anti-*Salmonella* seguro e efetivo disponível para alimentos.

O estudo da atividade antimicrobiana no café permitirá a seleção de substâncias com potencial emprego na conservação de alimentos, considerando-se a demanda por conservantes não tóxicos e naturais. Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar a atividade antimicrobiana de extratos e de compostos fenólicos e

nitrogenados presentes no café, frente a enterobactérias. Foram determinadas as concentrações inibitórias de 50% (IC₅₀) e de 90% (IC₉₀) pelo método de diluição em placa de microtítulo e realizados estudos cinéticos pelo método turbidimétrico, avaliando-se a influência da concentração das substâncias durante 24 h de contato na inibição de *S. enterica*.

IV.2. MATERIAL E MÉTODOS

IV.2.1 MATERIAL

IV.2.1.1 Amostras de café

Amostras de três marcas diferentes (A, B e C) de grãos de café (*C. arabica*) torrados foram adquiridas no mercado de Belo Horizonte, MG. Os grãos foram moídos em moinho doméstico (Braun, EUA) e tamisados (20 # série Tyler). Extratos aquosos do café foram obtidos, adicionando-se 8 g de pó de café a 40 mL de água em ebulição e mantidos em ebulição por 3 min, sob agitação, seguido de filtração em filtro qualitativo (VITORINO et al., 2001).

IV.2.1.2 Compostos químicos do café

Os ácidos caféico (Sigma, St. Louis, MO, EUA, C0625-26), clorogênico (Aldrich, Milwaukee, WI, EUA, C44206) e protocatéico (Sigma, St. Louis, MO, EUA, P5630) em concentrações que variaram de 2,0 a 12,0 mg/mL foram dissolvidos em água destilada esterilizada, com auxílio de aparelho de ultrassom (30 s), colocados em seguida em banho maria fervente (30 s). A cafeína (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e a trigonelina (Sigma, St. Louis, MO, EUA, T5509) nas mesmas concentrações (2,0 a 12,0 mg/mL) foram diluídas em água destilada esterilizada.

IV.2.1.3 Microrganismos, meios de cultura, discos e antibióticos

Os microrganismos empregados foram bactérias da American Type Culture Collection (ATCC): *C. freundii* (ATCC 8090), *E. aerogenes* (ATCC 13048), *E. cloacae* (ATCC 23355), *E. coli* (ATCC 25922), *K. oxytoca* (ATCC 49131), *P. mirabilis* (ATCC 25933), *P. hauseri* (ATCC 13315), *S. enterica* (ATCC 14028) e *S. marcescens* (ATCC

8100). Para a verificação da pureza dessas espécies, foram utilizados método de coloração de Gram e testes bioquímicos (Bactray, Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). As cepas foram mantidas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ em BHI com 20% de glicerol e para a realização dos testes as culturas foram reativadas, por transferência para ágar nutriente e incubação a $36,5 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 18 h.

Os meios de cultura ágar nutriente, ágar Mueller-Hinton e BHI foram fornecidos pela Dialab diagnósticos (Montes Claros, MG, Brasil). Discos estéreis (6 mm diâmetro, Sensibiodisc) e discos, contendo 30 μg do antibiótico cloranfenicol foram obtidos da Cecon (São Paulo, SP, Brasil).

IV.2.2 MÉTODOS

IV.2.2.1 Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos e compostos químicos do café frente a enterobactérias pelo método de difusão em ágar

Foram avaliadas as atividades antimicrobianas de três extratos aquosos de café (marcas A, B e C) e das substâncias: ácidos caféico, clorogênico e protocatéico, cafeína e trigonelina, na concentração de 2 mg/mL sobre enterobactérias. Foi usado o método de difusão em ágar (NUNAN et al., 1985; NCCLS, 2000), utilizando-se discos estéreis (Sensibiodisc, Cecon, SP) de 6 mm de diâmetro. Culturas de cada bactéria foram plaqueadas em ágar nutriente e incubadas em estufa (Forma Scientific, Marietta, OH, EUA) a $36,5 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 24 h. O inóculo foi padronizado, transferindo-se colônias do ágar nutriente para um tubo de solução salina esterilizada até obter turbidez de 50% de transmitância em espectrofotômetro (Coleman, modelo 6120, Maywood, IL, EUA) a 580 nm, o que, após plaqueamento, correspondeu a 10^8 UFC/mL. Dessa suspensão foram retirados 200 μL e semeados homogeneamente, em superfície de placas de Petri de 150 mm, contendo ágar Mueller Hinton, com auxílio de alça de Drigalski. Os discos foram impregnados com 20 μL dos extratos e das substâncias do café e colocados na superfície do ágar, semeado com cada uma das bactérias. As placas foram mantidas por 30 min à temperatura ambiente e incubadas a $36,5 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 48 h. Os halos de inibição foram medidos com paquímetro, considerando-se o diâmetro total, incluindo o disco. Discos contendo 20 μL de água destilada esterilizada e o antibiótico cloranfenicol (30 μg , Cecon, SP, Brasil) foram empregadas como controle. As análises foram efetuadas com três repetições e os

resultados expressos pela média do diâmetro dos halos de inibição. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), empregando-se o software GraphPad Prism versão 4.03.

IV.2.2 2 Determinação da influência da concentração dos compostos químicos do café na inibição de *S. enterica* pelo método de diluição em placa de microtítulo

A influência das diferentes concentrações dos ácidos caféico, clorogênico e protocatéico e da cafeína e trigonelina, sobre o crescimento de *S. enterica*, foi determinada pelo método de diluição em placa de microtítulo.

Foram empregadas placas de microtítulo, com 96 cavidades, e nos primeiros poços foram adicionados 200 μ L de cada substância nas concentrações de 8,0, 10,0 e 12,0 mg/mL. Nos demais poços foram depositados 100 μ L de água destilada esterilizada, que foi usada para as diluições. Foram feitas diluições seriadas com 100 μ L, a partir dos primeiros poços, empregando-se uma micropipeta multicanal (Wheaton, Ecublens, Suíça), resultando em 12 concentrações para cada substância (1,0; 1,25; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 12,0 mg/mL). Em cada poço, foram adicionados 95 μ L de BHI e 5 μ L de inóculo padronizado de *S. enterica* (10^8 UFC/mL), para obtenção de um volume final de 200 μ L. As placas foram agitadas em mesa agitadora (Tecnal, modelo TE 140, SP, Brasil) por 1 min a 150 rpm e incubadas a $36,5 \pm 1,0$ °C. Após 18 h, foram adicionados 20 μ L de solução (5 mg/mL) de sal de tetrazólio [brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazol – MTT, Sigma, St. Louis, EUA] filtrado em unidade filtrante esterilizada (poro 0,22 μ m, Millipore, São Paulo, SP, Brasil), em cada poço. Em seguida, cada placa foi agitada por 1 min a 150 rpm, e mantida a $36,5 \pm 1,0$ °C, por 30 min. A leitura de absorbância a 595 nm foi realizada em espectrofotômetro leitor de microplaca (Bio-Rad, modelo 550, EUA). Foram preparados controle negativo, contendo cloranfenicol e controle positivo, sem substância inibidora. A percentagem de inibição foi calculada de acordo com a equação: % inibição = $100(Ac-As)/Ac$ (THE UNITED..., 2006), sendo A a absorbância para o controle (Ac) e para as amostras (As). Cada experimento foi realizado três vezes com cinco réplicas em cada.

IV.2.2.3 Determinação das concentrações inibitórias de 50% (IC₅₀) e 90% (IC₉₀) de alguns compostos químicos do café na *S. enterica*

As concentrações inibitórias de 50% e de 90% (IC₅₀ e IC₉₀) de *S. enterica* foram determinadas para os ácidos clorogênico, protocatéico e caféico, cafeína e trigonelina. O ajuste dos dados obtidos no item anterior foi realizado por regressão não-linear, empregando-se o logaritmo da concentração versus a percentagem de inibição. Os valores das IC₅₀ e IC₉₀ calculados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), usando o software GraphPad Prism (4.03).

IV.2.2.4 Influência da concentração de alguns compostos químicos do café e do tempo de contato na inibição de *S. enterica*

Para o estudo cinético da influência da concentração de compostos químicos sobre o crescimento de *S. enterica* foi empregado o método turbidimétrico (NCCLS, 2000; THE UNITED..., 2006). Foram avaliadas as seguintes substâncias: ácido protocatéico, cafeína e trigonelina, nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg/mL, nos tempos de 0 a 8 h (em intervalos de 1 h) e em 24 h. A tubos contendo 9 mL de BHI adicionou-se 1 mL das concentrações de cada substância e 100 µL do inóculo. O inóculo foi padronizado, transferindo-se colônias do ágar nutriente para um tubo de solução salina esterilizada, em que foi medida a turbidez a 25% de transmitância em espectrofotômetro (Coleman, modelo 6120, Maywood, IL, EUA) a 580 nm, o que, após plaqueamento, correspondeu a 10⁹ UFC/mL. Os tubos foram incubados a 36,5 ± 1,0 °C e foi realizada a leitura de transmitância a 530 nm.

Os dados foram transformados em absorbância ($A = 2 - \log T$) e os resultados expressos em percentagem de inibição $\% \text{ inibição} = 100(Ac - As)/Ac$ (THE UNITED..., 2006), sendo A a absorbância para o controle (Ac) e para as amostras (As).

Foram preparados controles negativos (contendo cloranfenicol) e positivo (sem substância inibidora). Esse último foi preparado inoculando o meio de cultura (BHI) com 100 µL do inóculo. Cada experimento foi realizado três vezes com três réplicas em cada.

IV.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.3.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS E COMPOSTOS FENÓLICOS E NITROGENADOS DO CAFÉ FRENTE A ENTEROBACTÉRIAS

Na Tabela IV.1 estão apresentados os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos aquosos de café, utilizando-se o método de difusão em ágar frente a algumas espécies de enterobactérias.

Tabela IV.1. Diâmetro dos halos de inibição obtidos pelo método de difusão em ágar para extratos aquosos de café frente a espécies de enterobactérias

Microorganismos	Halos de inibição (mm)			Controle *
	Extratos aquosos			
	A	B	C	
<i>C. freundii</i>	7,1 ± 0,6 ^b	6,9 ± 0,5 ^b	7,0 ± 0,5 ^c	32,7 ± 1,7
<i>E. aerogenes</i>	8,4 ± 0,6 ^{ab}	8,2 ± 0,7 ^{ab}	8,7 ± 0,3 ^{ab}	25,0 ± 2,3
<i>E. cloacae</i>	9,0 ± 1,0 ^a	9,3 ± 1,3 ^a	9,7 ± 1,3 ^{ab}	32,2 ± 1,2
<i>E. coli</i>	8,1 ± 0,4 ^{ab}	8,1 ± 0,3 ^{ab}	8,2 ± 0,5 ^{ab}	28,3 ± 1,5
<i>K. oxytoca</i>	7,5 ± 0,7 ^{ab}	7,7 ± 0,3 ^{ab}	7,5 ± 0,5 ^b	30,8 ± 0,8
<i>P. hauseri</i>	9,2 ± 1,1 ^a	9,3 ± 1,1 ^a	9,8 ± 0,6 ^a	20,9 ± 1,1
<i>P. mirabilis</i>	8,1 ± 0,5 ^{ab}	8,8 ± 0,3 ^{ab}	8,8 ± 0,4 ^{ab}	21,2 ± 0,8
<i>S. enterica</i>	8,1 ± 1,3 ^{ab}	7,9 ± 1,2 ^{ab}	8,3 ± 1,6 ^{ab}	27,3 ± 0,9
<i>S. marcescens</i>	9,2 ± 0,3 ^a	9,2 ± 0,8 ^{ab}	9,1 ± 0,1 ^{ab}	27,4 ± 1,6

Médias de triplicatas (± desvio padrão) com letras diferentes (a,b,c) na mesma coluna são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$). Não houve diferença significativa entre as médias nas linhas.* cloranfenicol.

Não foram observadas diferenças significativas na atividade antimicrobiana dos extratos obtidos de diferentes marcas de café para as espécies pesquisadas. Isso ocorreu apesar das diferenças nas características físico-químicas, como pH, cor e teores de cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos, entre as marcas de café. Dessa forma, as variações observadas para pH (4,88 a 5,29), para luminosidade (20,92 a 29,4), para teores de cafeína (2,10 a 2,23 mg/mL), de trigonelina (0,49 a 1,63 mg/mL) e de ácidos clorogênicos (0,08 a 1,79 mg/mL) não foram suficientes para afetar o efeito antibacteriano.

Por outro lado, foram observadas diferenças significativas na sensibilidade das diferentes espécies de enterobactérias pesquisadas. Halos de inibição maiores foram observados para *P. hauseri*, para todas as marcas de café estudadas, indicando uma maior sensibilidade dessa espécie aos extratos de café, em relação às demais. *E. cloacae* apresentou halos maiores em relação a duas das marcas de café investigadas, porém, igual a *P. hauseri*. Halos menores foram observados para *C. freundii*, indicando uma menor sensibilidade desse aos extratos do café. Para as outras espécies avaliadas, observou-se uma sensibilidade intermediária.

Na Tabela IV.2 estão apresentados os resultados da atividade antimicrobiana de alguns compostos químicos do café, sobre as enterobactérias, empregando-se o método de difusão em ágar.

Todas as substâncias apresentaram atividade antibacteriana na concentração testada (2 mg/mL). Os efeitos inibitórios do ácido caféico e da trigonelina foram estatisticamente iguais em relação às enterobactérias utilizadas. Entretanto, para os ácidos clorogênico e protocatéico observou-se uma variação na atividade. Halos maiores foram observados para *S. marcescens* e menores para *C. freundii*, comparados aos obtidos para as demais enterobactérias. A cafeína apresentou atividade sobre todas as enterobactérias, sendo mais efetiva contra *P. hauseri* e *S. marcescens* e menos, para *C. freundii*, *E. aerogenes*, *K. oxytoca* e *P. mirabilis*.

De uma maneira geral, não foram verificadas diferenças na atividade antimicrobiana entre as substâncias em relação a cada uma das enterobactérias estudadas. Porém, tanto para *E. cloacae*, quanto para *E. aerogenes*, uma menor sensibilidade foi observada em relação à cafeína.

IBRAHIM et al. (2006) observaram atividade antimicrobiana da cafeína para *E. coli* O157:H7 em diferentes concentrações (0,25 - 2,00 g/ 100 mL). No presente estudo, a atividade antimicrobiana da cafeína foi relatada pela primeira vez para enterobactérias, exceto para *E. coli* para a qual foi confirmada.

De acordo com a literatura, compostos fenólicos como os ácidos caféico e protocatéico apresentam atividade antimicrobiana pela alteração da estrutura e função da membrana citoplasmática, ruptura da força motriz do próton, do fluxo de elétrons e do transporte ativo (SIKKEMA et al., 1995; WALSH et al., 2003; BURT, 2004). O mecanismo de ação tóxica dos compostos fenólicos para os microrganismos inclui também a oxidação de compostos, possivelmente envolvendo reação dos grupos sulfidrílica, ou por meio de reações não-específicas com proteínas (COWAN, 1999). No

entanto, levando-se em conta o grande número de compostos químicos presentes nos extratos de café, considera-se que a atividade antimicrobiana não possa ser atribuída a apenas uma substância, podendo assim, envolver vários tipos de mecanismo para a ação inibitória (BURT, 2004).

Tabela IV.2. Diâmetro dos halos de inibição obtidos pelo método de difusão em ágar para compostos químicos do café a 2 mg/mL frente a espécies de enterobactérias

Microrganismos	Halos de inibição (mm)					Controle *
	Substâncias					
	Ácido caféico	Ac. clorogênico	Ac. Protocatéico	Cafeína	Trigonelina	
<i>C. freundii</i>	7,2 ± 0,8	6,8 ± 0,4 ^b	7,0 ± 0,5 ^b	7,0 ± 0,0 ^b	7,0 ± 0,5	32,7 ± 1,7
<i>E. aerogenes</i>	8,4 ± 0,8 ^x	8,6 ± 0,4 ^{abx}	8,4 ± 0,1 ^{abx}	7,0 ± 0,0 ^{by}	8,6 ± 1,2 ^x	25,0 ± 2,3
<i>E. cloacae</i>	10,0 ± 1,3 ^x	9,6 ± 1,2 ^{ax}	10,0 ± 0,9 ^{ax}	7,7 ± 1,2 ^{aby}	9,1 ± 0,8 ^x	32,2 ± 1,2
<i>E. coli</i>	8,0 ± 0,4	8,0 ± 0,5 ^{ab}	8,0 ± 0,5 ^{ab}	8,0 ± 1,0 ^{ab}	8,1 ± 0,5	28,3 ± 1,5
<i>K. oxytoca</i>	7,5 ± 0,5	7,8 ± 1,0 ^{ab}	7,6 ± 0,5 ^{ab}	7,0 ± 0,0 ^b	7,4 ± 0,5	30,8 ± 0,8
<i>P. hauseri</i>	8,7 ± 0,8	9,1 ± 1,1 ^{ab}	9,3 ± 0,8 ^{ab}	9,7 ± 1,5 ^a	8,6 ± 0,8	20,9 ± 1,1
<i>P. mirabilis</i>	8,3 ± 0,3	8,9 ± 0,4 ^{ab}	8,0 ± 0,5 ^{ab}	7,3 ± 0,6 ^b	8,9 ± 0,8	21,2 ± 0,8
<i>S. enterica</i>	8,3 ± 1,8	7,9 ± 1,2 ^{ab}	8,4 ± 1,4 ^{ab}	8,3 ± 0,6 ^{ab}	8,8 ± 1,2	27,3 ± 0,9
<i>S. marcescens</i>	9,2 ± 0,8	9,7 ± 0,9 ^a	10,0 ± 2,2 ^a	7,2 ± 0,3 ^a	9,6 ± 1,9	27,4 ± 1,6

Médias de triplicatas (± desvio padrão) com letras diferentes (a,b) e (x,y) na mesma coluna e na mesma linha, respectivamente, são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

* cloranfenicol.

IV.3.2 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DO CAFÉ NA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Na Figura IV.1 podem ser visualizadas as alterações obtidas na placa de microtítulo, após a adição do sal de tetrazólio (MTT). Observa-se, que na cavidade no qual o meio de cultura apresentou coloração amarela, o crescimento não foi evidenciado pela reação com o MTT. Na cavidade na qual ocorreu a mudança de cor do meio de cultura para roxo, houve a reação com o MTT com a formação da formazana, evidenciando a presença de células viáveis (TWENTYMAN & LUSCOMBE, 1987). No entanto, é importante salientar que a leitura de absorbância (595 nm) foi realizada em espectrofotômetro leitor de microplacas.

Na Figura IV.2 pode ser observada a influência da concentração das substâncias investigadas sobre o crescimento de *S. enterica*, utilizando-se o método de diluição em placa de microtítulo. Foi calculado o percentual de inibição de crescimento de *S.*

enterica atribuído às substâncias do café, em diferentes concentrações, em relação ao controle (meio de cultura inoculado com *S. enterica*).

Foi observado que o ácido protocatéico, a cafeína e a trigonelina promoveram uma considerável inibição, mesmo nas concentrações mais baixas, enquanto o ácido clorogênico (CGA) inibiu 50% do crescimento do microrganismo teste nas concentrações acima de 8,0 mg/mL. A concentração de cafeína encontrada nos extratos de café (2,10 a 2,23 mg/mL) é suficiente para garantir uma inibição de *S. enterica* próxima a 50%.

Na Tabela IV.3 estão apresentados os resultados da absorbância em caldo BHI inoculado com *S. enterica*, após contato, a $36,5 \pm 1,0$ °C por 18 h, com algumas substâncias do café em diversas concentrações. Foram utilizados 12 pontos, correspondendo a 12 concentrações, para verificar também o perfil das substâncias em um tempo fixo de contato (18 h).

Observou-se para todas as substâncias que, à medida que a concentração aumentava, maior era a atividade (menores valores de absorbância). Para substâncias como a trigonelina, a cafeína e o ácido protocatéico, foi visto que a partir de 8,0 mg/mL, mesmo com um aumento da concentração, não se verificou um aumento da atividade.

A partir dos dados apresentados na Tabela IV.3, foi possível calcular, para cada substância, a concentração inibitória a 50% e a 90% (IC₅₀ e IC₉₀). Para o cálculo foi utilizado um programa computacional (Graphpad Prism versão 4.03) que permitiu verificar a melhor adequação de modelo não linear para a curva dose-resposta.

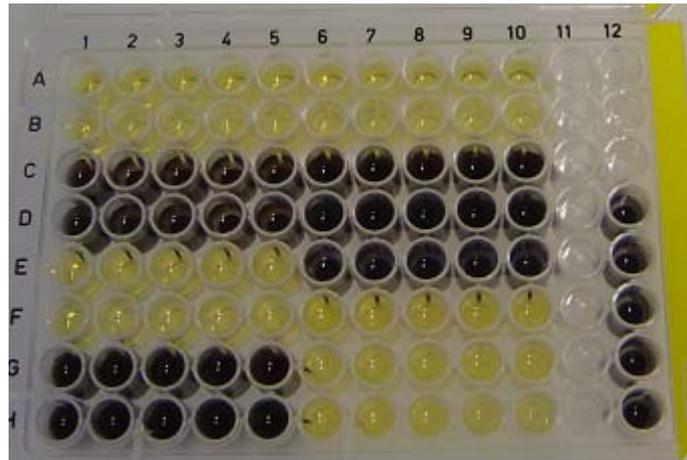


Figura IV.1. Fotografia de uma placa de microtítulo inoculada com *S. enterica*, após 18 h de incubação a 36,5 °C. amarelo – ausência de crescimento, roxo – crescimento.

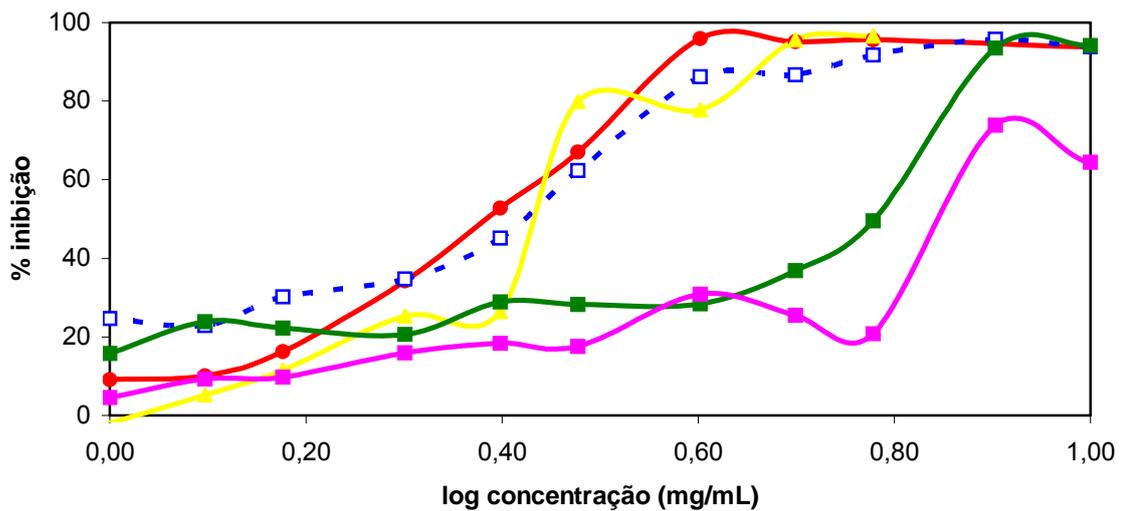


Figura IV.2. Percentual de inibição de *S. enterica* para diferentes concentrações de substâncias químicas do café obtido pelo método de diluição em placa de microtítulo após 18 h de incubação a 36,5 °C. [ácido protocatéico (—●—), cafeína (—□—), trigonelina (—▲—), ácido clorogênico (—■—) e ácido caféico (—■—)].

Na Tabela IV.4 estão apresentadas as equações de regressão não-linear, resultantes do ajuste das curvas pelo modelo sigmoidal dose-resposta, e as IC₅₀ e IC₉₀.

Tabela IV.3. Absorbância a 595 nm em caldo BHI inoculado com *S. enterica* após 18 h de contato com diferentes concentrações de ácido caféico, ácido clorogênico, ácido protocatéico, cafeína e trigonelina em placa de microtítulo

Concentração (mg/mL)	Substância/Absorbância a 595 nm				
	Ácido caféico	Ácido clorogênico	Ácido protocatéico	Cafeína	Trigonelina
1,0	1,96 ± 0,36	1,54 ± 0,25	1,95 ± 0,07	1,61 ± 0,30	1,89 ± 0,32
1,25	1,87 ± 0,17	1,39 ± 0,14	1,93 ± 0,03	1,65 ± 0,29	1,75 ± 0,43
1,5	1,86 ± 0,25	1,42 ± 0,11	1,80 ± 0,11	1,48 ± 0,28	1,63 ± 0,35
2,0	1,73 ± 0,20	1,67 ± 0,34	1,41 ± 0,16	1,46 ± 0,13	1,38 ± 0,81
2,5	1,68 ± 0,18	1,60 ± 0,38	1,01 ± 0,12	1,22 ± 0,22	1,36 ± 0,74
3,0	1,70 ± 0,18	1,54 ± 0,35	0,71 ± 0,26	0,84 ± 0,13	0,37 ± 0,15
4,0	1,42 ± 0,42	1,43 ± 0,24	0,09 ± 0,01	0,31 ± 0,06	0,41 ± 0,30
5,0	1,53 ± 0,18	1,30 ± 0,44	0,10 ± 0,02	0,30 ± 0,09	0,08 ± 0,02
6,0	1,63 ± 0,14	0,82 ± 0,57	0,09 ± 0,01	0,19 ± 0,07	0,06 ± 0,01
8,0	0,54 ± 0,13	0,20 ± 0,13	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,01
10,0	0,73 ± 0,37	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,06 ± 0,01
12,0	0,57 ± 0,12	0,08 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,06 ± 0,01

Médias de triplicatas (\pm desvio padrão).

A análise estatística indicou que os dados obtidos pelo método de placa de microtítulo seriam ajustados, usando-se uma regressão não linear e um modelo sigmoidal dose resposta com inclinação variável, obtendo-se para esse modelo valores de coeficiente de determinação (R^2) superiores a 0,83 (Tabela IV.4). As equações da regressão foram usadas para calcular os valores das IC_{50} e IC_{90} dos compostos químicos do café para *S. enterica*.

Valores mais baixos das IC_{50} e IC_{90} , significando maior atividade antimicrobiana, foram encontrados para ácido protocatéico, cafeína e trigonelina, não havendo, porém, diferença entre eles. Para os ácidos caféico e clorogênico foram obtidos valores mais altos das IC_{50} e IC_{90} , confirmando que essas substâncias são menos eficientes na inibição do crescimento de *S. enterica*.

Os valores encontrados de 4,14 mg/mL e 9,27 mg/mL de IC_{90} dos ácidos protocatéico e caféico para a inibição da *S. enterica* foram maiores do que os observados por FURUHATA et al. (2002) para inibição de *L. pneumophila*, que foram de 0,156 e 0,625 mg/mL, respectivamente.

Tabela IV.4. Equações e coeficientes de determinação das regressões obtidas para algumas substâncias do café por modelo sigmoidal de relação dose resposta e concentrações inibitórias de 50% e de 90% para *S. enterica*

Compostos	Regressão não-linear		Concentração inibitória (mg/mL)	
	Modelo sigmoidal dose resposta ^A	R ²	IC ₅₀	IC ₉₀
Ácido caféico	$Y = 24,57 + [52,53 / 1 + (10^{0,82-X}) * 13,59]$	0,91	6,62 ± 0,2 _a	9,27 ± 0,2 _a
Ácido clorogênico	$Y = 20,88 + [79,12 / 1 + (10^{0,72-X}) * 6,31]$	0,83	4,84 ± 0,9 _b	7,12 ± 0,7 _b
Ácido protocatéico	$Y = 8,66 + [91,28 / 1 + (10^{0,40-X}) * 4,52]$	0,97	2,45 ± 0,2 _c	4,14 ± 0,3 _c
Cafeína	$Y = 25,58 + [66,39 / 1 + (10^{0,46-X}) * 5,71]$	0,91	2,58 ± 0,2 _c	4,96 ± 0,8 _c
Trigonelina	$Y = 3,47 + [96,53 / 1 + (10^{0,35-X}) * 3,20]$	0,84	2,15 ± 0,5 _c	3,82 ± 0,8 _c

^A Inclinação variável. Médias de triplicatas (± desvio padrão) com letras diferentes na mesma coluna (a,b,c) são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Pelo método de diluição em placa de microtítulo foi possível verificar diferenças na atividade antimicrobiana, entre as substâncias estudadas, não verificadas anteriormente pelo método de difusão em ágar.

Considerando-se os resultados obtidos pelo método de diluição em placa de microtítulo, realizou-se um estudo cinético para investigar o efeito das substâncias que apresentaram os menores valores de IC, a saber: ácido protocatéico, cafeína e trigonelina. Na Figura IV.3 (a,b,c) têm-se as curvas de absorvância *versus* tempo que representam o estudo cinético das substâncias estudadas, em relação a diferentes concentrações.

A inibição causada por diferentes concentrações das substâncias selecionadas foi investigada pelo método turbidimétrico e acompanhada durante 24 h de contato. A curva de crescimento padrão de *S. enterica* pode ser observada a partir da curva originada do crescimento na ausência de substância inibidora. Dessa forma, podem ser considerados os seguintes tempos na curva de crescimento da bactéria: 0 a 2 h, correspondendo à fase de adaptação ou fase lag; entre 2 e 5 h, fase exponencial de crescimento; e, após 5 h, atingindo a fase estacionária. Verificou-se, assim, a ação das substâncias avaliadas sobre *S. enterica* na fase exponencial de crescimento.

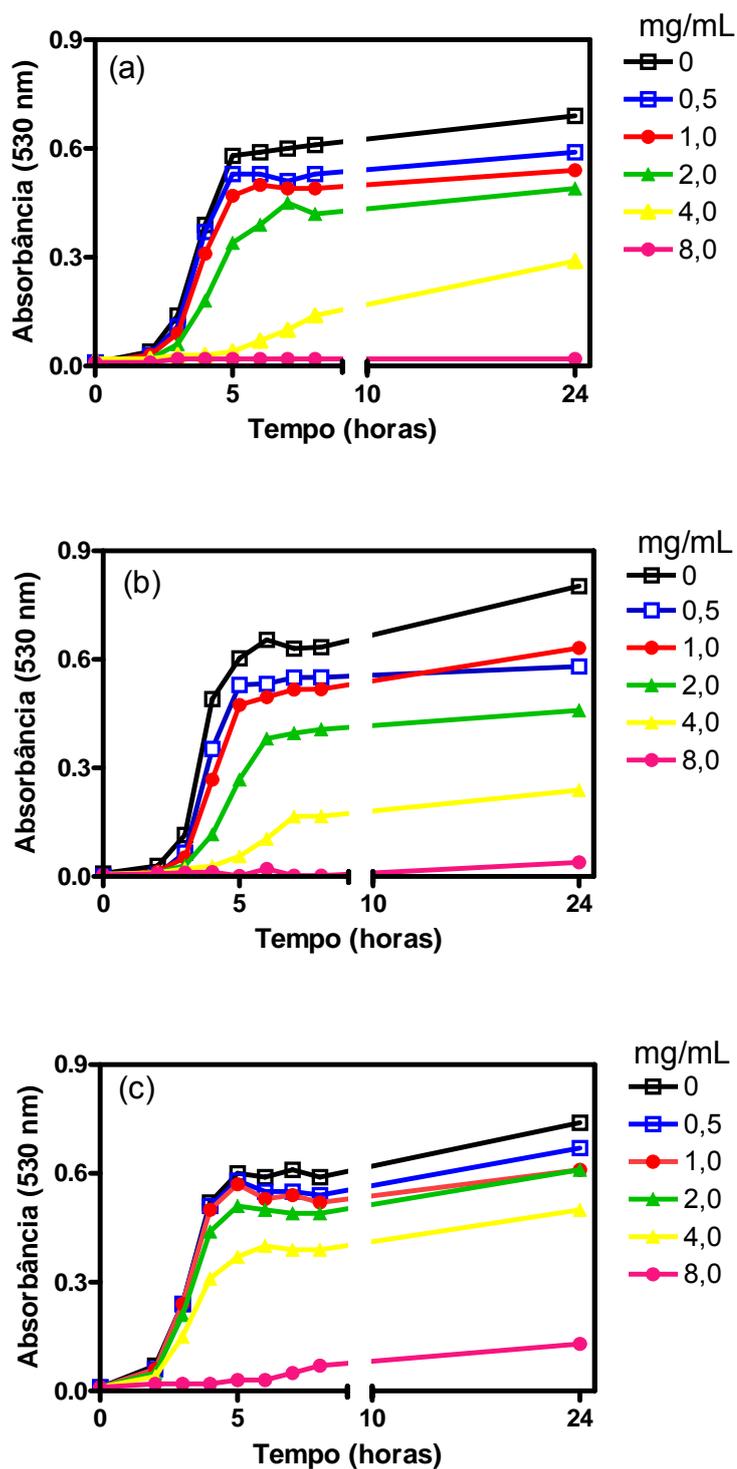


Figura IV.3. Influência da concentração e do tempo de contato do ácido protocatechuico (a), cafeína (b) e trigonelina (c) sobre o crescimento de *S. enterica*.

Observou-se para o ácido protocatéico (Figura IV.3a) e para a cafeína (Figura IV.3b) uma atividade similar em todas as concentrações estudadas. Na concentração de 8,0 mg/mL, essas substâncias inibiram completamente a bactéria, em todos os tempos de contato avaliados. Nas concentrações de 0,5; 1,0; e 2,0 mg/mL as curvas de crescimento foram paralelas à curva padrão, porém, com um patamar inferior, indicando redução proporcional à concentração.

O ácido protocatéico na concentração de 4,0 mg/mL atuou imediatamente após o contato com o microrganismo, impedindo por completo o seu crescimento, até 5 h. Pode-se notar uma alteração no perfil da curva de crescimento, encontrando-se a fase de crescimento exponencial após 5 h.

Assim, pode-se observar que o ácido protocatéico e a cafeína apresentaram um perfil antimicrobiano melhor, com manutenção da atividade ao longo de todo o período, seguindo-se a eles a trigonelina.

A percentagem de inibição das diferentes concentrações das substâncias do café sobre *S. enterica*, pelo método turbidimétrico, após 24 h de incubação, está apresentada na Tabela IV.5.

Os maiores efeitos antimicrobianos foram verificados pela cafeína e pelo ácido protocatéico nas concentrações entre 2,0 e 8,0 mg/mL, após 24 h de contato. Observa-se que as maiores percentagens de inibição (83% a 97%) sobre *S. enterica* foram alcançadas para todas as substâncias na concentração de 8,0 mg/mL. Na concentração de 4,0 mg/mL, tanto o ácido protocatéico, quanto a cafeína inibiram a *S. enterica* significativamente (59% e 70%), seguidos pela trigonelina (32%). Na concentração de 2,0 mg/mL a cafeína foi responsável por uma inibição de 43% e, na concentração de 1,0 mg/mL, a percentagem de inibição foi de 27%.

Tabela IV.5. Percentagem de inibição para diferentes concentrações das substâncias do café sobre *S. enterica* pelo método turbidimétrico, após 24 h de contato

Concentração (mg/mL)	% inibição/Substâncias		
	Ácido protocatéico	Cafeína	Trigonelina
0,5	14,0 ± 3,0 ^{x,a}	21,0 ± 4,0 ^{y,a}	12,0 ± 1,0 ^{x,a}
1,0	21,0 ± 7,0 ^a	27,0 ± 2,0 ^a	19,0 ± 3,0 ^a
2,0	29,0 ± 5,0 ^{xy,a}	43,0 ± 4,0 ^{y,b}	19,0 ± 2,0 ^{x,a}
4,0	59,0 ± 9,0 ^{yz,b}	70,0 ± 2,0 ^{z,c}	32,0 ± 6,0 ^{xy,a}
8,0	97,0 ± 2,0 ^{y,c}	95,0 ± 1,0 ^{y,d}	83,0 ± 9,0 ^{x,b}

Médias de triplicatas (± desvio padrão) com letras diferentes (x,y,z) nas linhas e (a,b,c,d) nas colunas são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Para o ácido protocatéico e para a trigonelina, nas menores concentrações utilizadas (2,0 mg/mL e 1,0 mg/mL), a percentagem de inibição calculada foi em torno de 20%. Verificou-se assim que, mesmo as menores concentrações estudadas provocaram uma inibição relevante.

Diferenças que não foram detectadas entre as substâncias selecionadas do café, empregando-se o método do disco difusão, foram verificadas pelos métodos de diluição em placa de microtítulo e turbidimétrico. No entanto, o método de difusão em ágar tem sido o mais recomendado para uma fase de prospecção de substâncias (“screening”). Esse método pode ser afetado pela velocidade e pela constante de difusão dos compostos no ágar e, dessa forma, não seria capaz de medir a atividade real (HEWITT, 1977; HERALD & DAVIDSON, 1983). Os métodos turbidimétrico e o de diluição em placa de microtítulo são recomendados para investigação da influência da concentração no efeito inibitório.

IV.4. CONCLUSÕES

Os extratos de café e os compostos químicos ácido caféico, ácido clorogênico, ácido protocatéico, cafeína e trigonelina apresentaram atividade antimicrobiana para as enterobactérias estudadas.

Não foram observadas diferenças na atividade antimicrobiana dos compostos químicos do café testados pelo método de difusão em ágar, em relação às enterobactérias avaliadas; porém, foi visto que entre as espécies pode haver diferença de sensibilidade.

O efeito inibitório das substâncias químicas investigadas sobre *S. enterica* foi afetado significativamente pelo aumento da concentração, até a concentração de 8,0 mg/mL, na qual o efeito não mais aumenta com o incremento da concentração.

Os menores valores de IC₅₀ e IC₉₀ encontrados para o ácido protocatéico, a cafeína e a trigonelina indicaram uma maior atividade dessas substâncias, quando comparadas com os ácidos clorogênico e caféico.

A concentração de cafeína encontrada nos extratos de café (2,10 a 2,23 mg/mL) é suficiente para garantir uma inibição de *S. enterica* próxima a 50%.

O ácido protocatéico e a cafeína apresentaram um melhor perfil antimicrobiano, sendo a atividade mantida ao longo de todo o período, até o tempo final de 24 h.

Pelo estudo cinético, a cafeína mostrou melhor desempenho, apresentando um aumento significativo da atividade antimicrobiana com aumento da dose, em todo o intervalo testado.

O ácido protocatéico, a cafeína e a trigonelina são potenciais agentes antimicrobianos naturais contra enterobactérias.

CAPÍTULO V

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS QUÍMICOS DO CAFÉ EM DIFERENTES VALORES DE pH E EFICIÊNCIA CONSERVANTE EM UM MODELO ALIMENTAR

RESUMO

A influência do pH na atividade antimicrobiana do ácido clorogênico, ácido protocatéico, cafeína e trigonelina contra *S. enterica* sorovar Typhimurium foi investigada em caldo infuso de cérebro e coração, pelo método de microplacas. A atividade antimicrobiana foi determinada por leitura da absorbância a 595 nm, após reação com sal de tetrazólio, empregando-se espectrofotômetro leitor de microplacas. Observou-se que o pH a 4,5, seguido de 5,5, promoveu um maior efeito inibitório, quando comparado aos valores de pH 6,5 e 7,5 para todos os compostos investigados. Verificou-se que o pH modulou o efeito antimicrobiano desses compostos em meio de cultura. Foi também avaliado o efeito conservante do ácido protocatéico e da cafeína em leite desnatado inoculado com *S. enterica*, empregando-se um teste de eficiência conservante. O teste foi realizado em pH 4,5 e 5,5, durante 28 dias a 25 °C. Tanto o ácido protocatéico quanto a cafeína foram eficientes no controle de *S. enterica* no leite desnatado ajustado para pH 4,5, sendo que o ácido protocatéico foi capaz de inibir o crescimento em três ciclos logarítmicos.

V.1. INTRODUÇÃO

Leite e produtos derivados são susceptíveis à contaminação por microrganismos potencialmente patogênicos. *Salmonella*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* têm sido isolados e implicados em infecções e intoxicações com esses produtos (HOLLIDAY & BEUCHAT, 2003).

A deterioração de alimentos é o principal motivo de perdas e ocorre principalmente pela presença de bactérias e fungos. Existe uma tendência da indústria alimentícia em utilizar aditivos antimicrobianos para aumentar a vida de prateleira dos alimentos (NAZER et al., 2005). O uso excessivo de aditivos químicos, muitos deles suspeitos de causar danos à saúde humana, tem levado a indústria a buscar novas alternativas, seja a utilização de processos que permitam a retirada dos conservantes ou a adoção de formas mais naturais para a manutenção e aumento da vida de prateleira (TASSOU & NYCHAS, 1995). A demanda por aditivos seguros e inócuos tem levado à pesquisa de novas substâncias, especialmente as de origem natural. Nesse sentido, novas perspectivas são abertas para a investigação de novos conservantes para alimentos (NYCHAS, 1995; NEGI et al., 2004). Dessa forma, o estudo de substâncias presentes em alimentos e plantas comestíveis com propriedades antimicrobianas e o seu uso como conservante natural é uma alternativa para prolongar a vida de prateleira de alimentos (MATTHEWS & HAAS, 1993; RAMOS-NINO et al., 1996).

Alguns estudos têm descrito a atividade antimicrobiana de extratos e de compostos químicos presentes no café (DAGLIA et al., 1994a; FURUHATA et al., 2002; IBRAHIM et al., 2006). Entre os compostos presentes no café, com atividade antimicrobiana, a cafeína e o ácido protocatéico mostraram promissoras propriedades contra enterobactérias (ALMEIDA et al., 2006). Entretanto, estudos sobre a eficiência conservante dessas substâncias em modelos alimentares não foram encontrados na literatura. Dois aspectos são cruciais quando se trata da aplicação prática de compostos químicos na conservação de alimentos. O primeiro, relaciona-se às alterações, após a sua adição, nas propriedades organolépticas e na textura dos alimentos. O segundo está relacionado às interações desses compostos com ingredientes do alimento e a influência dessa interação na atividade antimicrobiana

(DEVLIEGHERE et al., 2004). Muitos estudos foram conduzidos *in vitro*, empregando-se extratos ou compostos químicos de café contra microrganismos. Entretanto, não foram encontrados na literatura estudos em modelos alimentares considerando fatores tais como pH, tempo, dentre outros, o que foi realizado no presente trabalho.

Este trabalho teve como objetivo investigar a influência de diferentes valores de pH na atividade antimicrobiana dos ácidos clorogênico, protocatéico e da cafeína e trigonelina sobre *S. enterica*. Foi também estudada a eficiência do ácido protocatéico e da cafeína como agentes conservantes em leite desnatado reconstituído, como um modelo alimentar.

V.2. MATERIAL E MÉTODOS

V.2.1 MATERIAL

V.2.1.1 Microrganismo e meios de cultura

Como microrganismo teste, foi utilizada uma linhagem de *S. enterica* sorovar Typhimurium (ATCC 14028). Essa cultura foi mantida a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ em caldo infuso de cérebro e coração (BHI – Dialab, Montes Claros, MG, Brasil) e 20% de glicerol. Para a realização dos testes, as cepas foram reativadas pela transferência para ágar nutriente (Dialab, Montes Claros, MG, Brasil) e incubadas a $36,5 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 18 h.

V.2.1.2 Compostos químicos do café

Os compostos químicos do café utilizados foram o ácido clorogênico (Aldrich, Milwaukee, WI, EUA, C44206), o ácido protocatéico, (Sigma, St. Louis, MO, EUA, P5630), a cafeína (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e a trigonelina (Sigma, St. Louis, MO, EUA, T5509).

V.2.1.3 Modelo alimentar

Como modelo alimentar, foi empregado leite em pó desnatado reconstituído (LDR) com água destilada na concentração de 10 g/100 mL. Este foi esterilizado em autoclave em vapor fluente ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$), durante 30 min.

V.2.2 MÉTODOS

V.2.2.1 Estudo da influência do pH na atividade antimicrobiana dos ácidos clorogênico e protocatéico e da cafeína e trigonelina sobre *S. enterica*

O método de microplacas (VANDEN BERGHE & VLIETINCK, 1991; BRANDÃO, 2004) foi usado para investigar a atividade antimicrobiana das substâncias nos diferentes valores de pH. O ácido clorogênico, o ácido protocatéico, a cafeína e a trigonelina foram usados nas concentrações de 4,84; 2,45; 2,58 e 2,15 mg/mL, respectivamente, o que equivale às IC₅₀ dessas substâncias (Tabela IV.4). Cada uma das substâncias foi adicionada separadamente ao meio BHI com os seguintes valores de pH, 4,5; 5,5; 6,5 e 7,5 (ajustado com H₃PO₄ ou NaOH). Alíquotas (195 µL) do meio, com o pH ajustado, e com as substâncias foram adicionadas a cavidades das placas de microtitulação (96 poços) que, em seguida, foram inoculadas com 5 µL do inóculo padronizado. O inóculo foi padronizado, transferindo-se colônias do ágar nutriente para um tubo de solução salina esterilizada, no qual foi feita a medida de turbidez a 50% de transmitância em espectrofotômetro (Coleman, modelo 6120, Maywood, IL, EUA) a 580 nm, o que, após plaqueamento, correspondeu a 10⁸ UFC/mL. As placas foram agitadas em mesa agitadora (Tecnal, modelo TE 140, SP, Brasil), por 1 min a 150 rpm, e incubadas a 36,5 ± 1,0 °C. Após 18 h, foram adicionados em cada poço 20 µL de solução (5 mg/mL) de sal de tetrazólio [brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazol – MTT, Sigma, St. Louis, EUA] filtrado em unidade filtrante esterilizada (poro 0,22 µm, Millipore, São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, cada placa foi agitada em mesa agitadora por 1 min a 150 rpm, e mantida a 36,5 ± 1,0 °C, por 30 min. A leitura da absorbância a 595 nm foi realizada em espectrofotômetro leitor de microplaca (Bio-Rad, modelo 550, EUA). Os resultados foram expressos em percentagem de inibição em relação ao controle (BHI inoculado com a bactéria). Essa percentagem foi calculada de acordo com a equação % inibição = 100(Ac-As)/Ac (THE UNITED..., 2006), sendo A a absorbância para o controle (Ac) e para a amostra (As). O controle foi preparado inoculando-se o BHI (195 µL) com 5 µL do inóculo. Foram também preparados controles (BHI + inóculo) com pH ajustado para 4,5; 5,5 e 6,5. O controle negativo foi preparado inoculando-se o BHI (195 µL) com 5 µL do inóculo e cloranfenicol (30 µg/200 µL).

Cada experimento foi realizado três vezes com três réplicas em cada. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Bonferroni ($p \leq 0,05$), empregando-se o software GraphPad Prism versão 4.03.

V.2.2.2 Estudo da eficiência do ácido protocatéico e da cafeína como conservante em um modelo alimentar

Para este estudo foram empregadas as concentrações inibitórias de 90%, anteriormente calculadas (capítulo IV), para o ácido protocatéico e para a cafeína, utilizando-se *S. enterica* e um protocolo para avaliação da eficiência conservante adaptado da Farmacopéia Americana (THE UNITED..., 2006).

Para verificar a eficiência das substâncias selecionadas como conservantes para leite como modelo alimentar, adicionou-se ácido protocatéico (4,14 mg/mL) e cafeína (4,96 mg/mL) individualmente a tubos, contendo 18 mL de LDR, esterilizado, com pH ajustado para os valores de 4,5 e 5,5. Os tubos foram inoculados com *S. enterica* (10% v/v) e incubados a 25 ± 1 °C, durante 28 dias. O inóculo foi padronizado transferindo-se colônias do ágar nutriente para um tubo de solução salina esterilizada, em que foi medida a turbidez a 50% de transmitância em espectrofotômetro (Coleman, modelo 6120, Maywood, IL, EUA) a 580 nm. A partir desse tubo, foi preparada a diluição 10^{-1} e foram retiradas alíquotas de 2 mL, que foram usadas para inocular as amostras de leite (18 mL). Após tempos de contato específicos (0, 1, 7, 14, 21 e 28 dias), foram retiradas amostras para a contagem das células viáveis. A determinação das células viáveis foi feita por semeadura em profundidade de diluições apropriadas das amostras em ágar nutriente e incubação a $36,5 \pm 1$ °C, por 48 h.

O controle foi preparado, inoculando-se o LDR com *S. enterica* (10% v/v), incubando e realizando as contagens de células viáveis nos mesmos intervalos de tempo das amostras. Foram ainda preparados dois controles LDR: um com pH ajustado para 4,5 e outro para 5,5. Cada experimento foi realizado três vezes, com duas réplicas em cada. As curvas foram comparadas, empregando-se a área sob as curvas e fazendo a análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), empregando-se o software GraphPad Prism versão 4.03.

V.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.3.1 INFLUÊNCIA DO pH SOBRE A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Na Tabela V.1 estão apresentados os percentuais de inibição de *S. enterica* pelas substâncias avaliadas nos valores de pH investigados. Foi evidenciado que o pH interferiu na atividade antimicrobiana sobre *S. enterica*. Observou-se que, em pH 4,5, tanto a cafeína, quanto o ácido protocatéico, causaram inibições superiores a 96%, enquanto a trigonelina e o ácido clorogênico atingiram percentuais de inibição próximos a 80%. Esses percentuais de inibição foram significativamente maiores do que aqueles observados com pH 5,5, que foram estatisticamente diferentes dos percentuais observados com pH 6,5 e 7,5. A percentagem de inibição exercida pela cafeína se manteve elevada na faixa de pH de 4,5 a 5,5 (96% a 77%), mas apresentou diferença significativa entre esses valores. Em pH 7,5, a percentagem de inibição encontrada para a cafeína foi menor (10,3%), mas não diferiu da inibição encontrada para o ácido protocatéico (12,0%). A trigonelina, e o ácido clorogênico não apresentaram inibição significativa de *S. enterica* em pH 7,5, observando-se percentuais de inibição inferiores a 5%.

Tabela V.1. Influência do pH na inibição de *S. enterica* por compostos químicos do café em caldo BHI, após 18 h de contato

Substância	Percentual de inibição da <i>S. enterica</i> /pH			
	4,5	5,5	6,5	7,5
Ácido clorogênico	83,7 ± 1,4 ^{xy,a}	42,1 ± 1,4 ^{xy,b}	15,4 ± 1,1 ^{y,c}	4,3 ± 0,8 ^{xy,d}
Ácido protocatéico	96,7 ± 0,3 ^{x,a}	37,5 ± 4,1 ^{y,b}	21,0 ± 4,16 ^{y,c}	12,0 ± 0,2 ^{x,c}
Cafeína	96,0 ± 0,9 ^{x,a}	77,3 ± 3,4 ^{x,b}	42,9 ± 3,3 ^{x,c}	10,3 ± 1,0 ^{x,d}
Trigonelina	79,3 ± 0,6 ^{y,a}	33,0 ± 2,4 ^{y,b}	19,2 ± 3,9 ^{y,c}	1,2 ± 0,9 ^{y,d}

Médias de triplicatas (± desvio padrão) com letras diferentes (a,b,c,d) na mesma linha e (x,y) na mesma coluna são significativamente diferentes (Teste de Bonferroni, $p \leq 0,05$). Percentagem de inibição no controle com caldo BHI e ajuste de pH para 4,5 (80,5%); 5,5 (32,4%) e 6,5 (0%).

No caldo BHI com valores de pH ajustados para 4,5 e 5,5 foi constatada inibição nos valores de 80,5% e 32,4%, respectivamente. No pH 6,5 não houve inibição.

Verificou-se que o pH na faixa ácida foi capaz de inibir *S. enterica*, mesmo sem a presença de substâncias inibidoras.

A influência do pH na atividade antimicrobiana das substâncias do café investigadas assemelha-se à relatada na literatura, para substâncias do tipo ácido fraco e para os óleos essenciais. NYCHAS (1995), TASSOU et al. (1995) e BURT (2004), ao investigarem as propriedades antibacterianas de óleos essenciais, destacaram o fato de que condições físicas determinadas, tais como, baixo pH, baixas temperaturas e baixas concentrações de oxigênio aumentavam a ação antimicrobiana. Em estudo realizado em produtos de panificação, empregando-se ácidos fracos como conservantes para inibição de fungos, foi observado que nenhum dos compostos empregados teve um efeito inibitório em pH neutro (MARIN et al., 2002). WEN et al. (2003) ao avaliarem atividade anti-*Listeria* de ácidos fenólicos em valores de pH 4,5; 5,5 e 6,5, observaram uma forte correlação entre pH e atividade antimicrobiana. Eles observaram que a inibição promovida pelos ácidos *p*-cumárico, ferúlico e caféico aumentava, à medida que o pH diminuía, e que, pelo ácido clorogênico, a inibição de *Listeria* foi maior em pH ajustado para 6,5, fato esse, não observado no presente trabalho para o ácido clorogênico, em relação aos percentuais de inibição sobre *S. enterica*.

Está estabelecido na literatura que a atividade antimicrobiana dos ácidos fracos é dependente do pH, devido à influência desse parâmetro na proporção de moléculas não-dissociadas na solução (MARQUIS et al., 2003; WEN et al., 2003).

As constantes de dissociação (pKa) para alguns dos ácidos fenólicos foram apresentadas por RAMOS-NINO (1996), dentre eles, o ácido caféico com pKa de 4,45. No presente trabalho, os compostos fenólicos, como os ácidos clorogênico e protocatéico, provavelmente, apresentaram uma maior proporção de moléculas não-dissociadas, nos valores menores de pH. Esse resultado está de acordo com o trabalho realizado por WEN et al. (2003), que verificaram que a atividade dos ácidos hidroxicinâmicos investigados foi acentuada com o aumento concomitante na proporção dos ácidos não-dissociados, quando o pH do meio foi reduzido de 6,5 para 4,5.

V.3.2 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA CONSERVANTE DA CAFEÍNA E DO ÁCIDO PROTOCATÉICO EM UM MODELO ALIMENTAR

A cafeína e o ácido protocatéico foram selecionados para o estudo da eficiência conservante em um modelo alimentar, à base de LDR, pois essas substâncias apresentaram percentuais de inibição superiores e estatisticamente diferentes do controle tanto no pH 4,5, quanto no pH 5,5.

As contagens obtidas a partir do LDR inoculado com 10^6 UFC/mL de *S. enterica*, mantido a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 28 dias, com valores de pH ajustados para 4,5 e 5,5, na presença ou não da cafeína e do ácido protocatéico estão apresentadas na Figura V.1.

Verificou-se, ao final de 28 dias, um aumento de três ciclos logarítmicos na contagem de células viáveis de *S. enterica* em LDR e que tanto o ácido protocatéico, quanto a cafeína, inibiram o crescimento da bactéria durante este período. Entretanto, o efeito mais pronunciado foi observado na presença do ácido protocatéico em pH 4,5, que foi capaz de inibir o crescimento em até três ciclos logarítmicos, após 28 dias de contato, comparado com o controle.

No LDR, com ajuste de pH para 4,5 e 5,5, houve um crescimento menor do que no LDR, sem ajuste de pH. Entretanto, no crescimento de *S. enterica* no LDR adicionado de ácido protocatéico, ajustado para os valores de pH 4,5 e 5,5, a inibição foi maior do que no LDR adicionado de cafeína.

O percentual de inibição de *S. enterica* pela cafeína foi calculado, após 28 dias a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, considerando-se o controle (100% de crescimento). Essa substância apresentou percentual de inibição de *S. enterica*, tanto com o pH de 4,5, quanto com o pH de 5,5, de 14%. Essa inibição observada no modelo alimentar, quando comparada com 96% e 77%, em meio de cultura com pH 4,5 e 5,5 (Tabela V.1), respectivamente, foi menor. A mesma comparação pode ser feita para o ácido protocatéico, que contribuiu com 96% (pH=4,5) e 37% (pH=5,5) de inibição de *S. enterica* no experimento em meio de cultura, e 32% (pH=4,5) e 21% (pH=5,5) no modelo alimentar, mostrando-se menos eficiente no último. No entanto, quando comparado com a cafeína, o ácido protocatéico apresentou uma maior atividade no modelo alimentar. HOLLEY & PATEL (2005) relataram o efeito da presença de gorduras, carboidratos, proteínas e sais diminuindo a efetividade de agentes antimicrobianos em alimentos. Mesmo com a ausência de gordura no leite em pó desnatado reconstituído, os outros constituintes

presentes no leite influenciaram negativamente a atividade antimicrobiana da cafeína e do ácido protocatéico contra *S. enterica*.

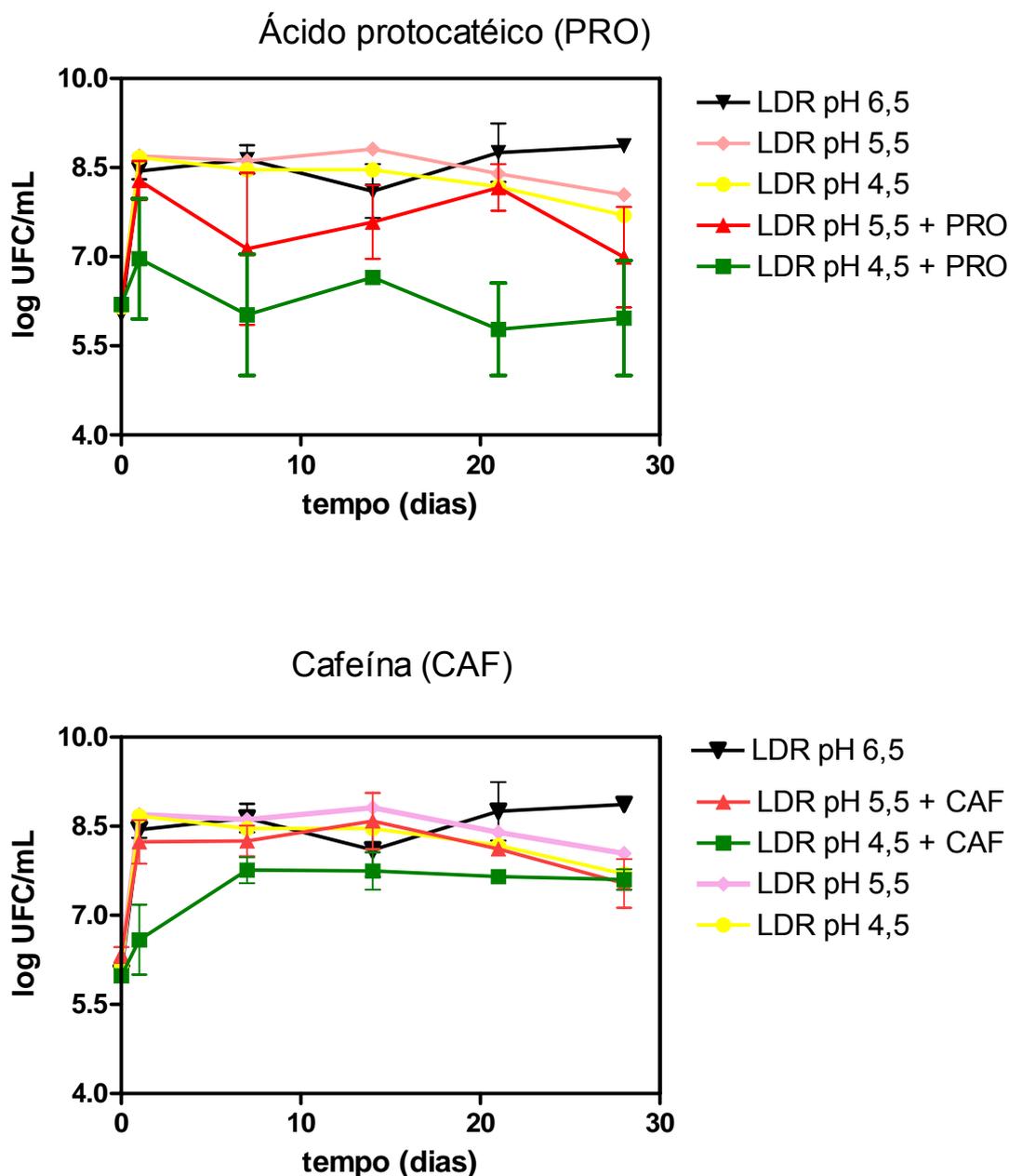


Figura V.1. Contagem de células viáveis de *S. enterica* em LDR (pH 4,5 e 5,5) na presença de ácido protocatéico (4,14 mg/mL) e de cafeína (4,96 mg/mL), durante 28 dias de contato, a 25 °C.

A comparação estatística da área sob a curva de crescimento para as substâncias (ácido protocatéico e cafeína) nos dois valores de pH e dos controles (sem

ajuste de pH, com ajuste de pH para 4,5 e 5,5) pode ser vista na Tabela V.2. Observa-se que a área sob a curva de crescimento de *S. enterica* na presença de ácido protocatéico com pH 4,5 e 5,5 foi menor do que nos outros tratamentos, inclusive nos controles (LDR). A área sob a curva de crescimento de *S. enterica* na presença de cafeína, em ambos os pH, não diferiu estatisticamente nem dos controles, nem do tratamento com ácido protocatéico. Esse fato indica que o ácido protocatéico foi mais eficiente, no controle do crescimento de *S. enterica*, do que a cafeína. Para os controles (LDR sem ajuste de pH e com pH 5,5 e 4,5) não foi observada diferença estatística entre as áreas sob a curva, o que pode ser devido ao efeito tamponante do leite.

Tabela V.2. Área sob a curva de crescimento de *S. enterica* em LDR (pH 4,5 e 5,5) na presença de cafeína (4,96 mg/mL) e de ácido protocatéico (4,14 mg/mL), durante 28 dias de contato a 25 °C

Tratamento	Área sob a curva
Controle	68,7 ± 2,6 ^a
Controle pH 5,5	64,4 ± 0,0 ^a
Controle pH 4,5	59,8 ± 0,0 ^a
Cafeína pH 5,5	51,2 ± 0,0 ^{ab}
Cafeína pH 4,5	43,4 ± 0,0 ^{ab}
Ácido protocatéico pH 5,5	40,3 ± 17,0 ^b
Ácido protocatéico pH 4,5	19,9 ± 7,7 ^b

Médias de triplicatas (± desvio padrão) com letras diferentes (a,b,c,d) são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Controle: meio de cultura inoculado com a *S. enterica* em pH sem ajuste e com ajuste para 5,5 e 4,5.

Considerando-se a ausência de um protocolo padrão para estudos de eficiência de conservante em alimentos, a comparação dos resultados obtidos no presente estudo com dados da literatura fica, em parte, comprometida por alguns aspectos, dentre eles, objetivos e delineamentos experimentais diferentes; temperaturas de incubação, variando entre 4 e 37 °C; faixa de pH, variando entre 4 e 8; tempo de exposição, variando entre horas a semanas e inóculo inicial variado (PAYNE et al., 1989; KIM et al., 1995; KOUTSOUMANIS et al., 1999; SMITH-PALMER et al., 2001; HOLLEY & PATEL, 2005). No entanto, em estudos comparando o crescimento de microrganismos (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *Salmonella*) inoculados em alimentos, contendo microrganismos produtores de substâncias antimicrobianas, com o controle sem essa cultura, foram observadas reduções que variaram de um a cinco ciclos logarítmicos. Essas reduções foram consideradas efetivas na conservação de

alimentos, quando utilizadas culturas em associação às boas práticas de fabricação, armazenamento e condições de distribuição (DEVLIEGHERE et al., 2004). Assim, o ácido protocatéico que foi capaz de causar uma inibição de três ciclos logarítmicos no crescimento de *S. enterica* em LDR (pH 4,5), quando associado a outro método de conservação, tal como a temperatura de refrigeração, ou alguma nova tecnologia de preservação, apresenta um potencial para aplicação como agente conservante em alimentos ácidos. Além disso, o uso de métodos combinados tem sido proposto na literatura, considerando-se a teoria de barreiras, somando-se os efeitos de parâmetros físicos e químicos (LEISTNER, 1992).

Verificou-se que durante os 28 dias em que o LDR 10% foi mantido a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ em contato com o ácido protocatéico e a cafeína, apesar da coagulação observada, principalmente em pH 4,5, não foi observada nenhuma alteração na cor do produto. OWEN & PALOMBO (2006) observaram alteração de cor, em produto derivado do leite, ao investigarem a atividade antibacteriana de extratos de plantas, contra *Listeria*. De acordo com esses autores, a coloração verde observada no produto poderia causar uma rejeição do produto pelo consumidor.

Em revisão sobre novas tecnologias para preservação de alimentos, DEVLIEGHERE et al. (2004) destacaram que duas das limitações para o uso de produtos naturais como conservantes são as mudanças sensoriais e a interação do composto com ingredientes do alimento. Apesar de não ter sido observada alteração de cor, e nem de odor no modelo alimentar estudado, houve um efeito negativo causado pelos componentes do leite na atividade antimicrobiana das substâncias testadas.

É importante avaliar substâncias com atividade antimicrobiana em modelos alimentares, para verificar uma possível interferência como a interação ou a diminuição do efeito da substância investigada, com a composição, temperatura, pH, entre outros parâmetros dos alimentos (NYCHAS, 1995; KOUTSOUMANIS et al., 1999; BURT, 2004). Muitas vezes, uma maior concentração do composto é requerida no alimento para atingir o mesmo efeito inibitório observado em meio de cultura (SHELEF, 1983; BURT, 2004).

V.4. CONCLUSÕES

O pH modulou o efeito antimicrobiano da cafeína e do ácido protocatéico, em meio de cultura, sobre *S. enterica*, sendo a maior atividade em pH 4,5 comparada com 5,5; 6,5 e 7,5.

No meio de cultura com pH 4,5 e com adição de cafeína ou do ácido protocatéico observaram-se inibições iguais ou superiores a 96%.

No meio de cultura com pH 4,5 e com adição da trigonelina e do ácido clorogênico, os percentuais de inibição foram próximos a 80%.

Utilizando como matriz alimentar o leite desnatado, com pH 4,5 e 5,5, tanto a cafeína, quanto o ácido protocatéico, apresentaram atividade antimicrobiana sobre a bactéria investigada.

Não foi verificada a influência do pH isoladamente sobre o crescimento de *S. enterica* no modelo alimentar.

Os componentes do leite reduziram a ação antimicrobiana das substâncias investigadas, no entanto, esses compostos apresentaram um percentual de inibição impactante para um possível uso como conservantes em produtos alimentícios.

CAPÍTULO VI

AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DE *Salmonella enterica* POR MICROSCOPIAS ÓTICA E DE FORÇA ATÔMICA, APÓS CONTATO COM ÁCIDO PROTOCATÉICO E CAFEÍNA

RESUMO

Foi investigado o efeito do ácido protocatéico e da cafeína sobre a morfologia de *S. enterica* sorovar Typhimurium, após 24 h de contato. Foram empregadas as microscopias ótica e de força atômica. Pela microscopia ótica, foram observadas algumas alterações na morfologia da célula, porém, a microscopia de força atômica possibilitou uma observação mais detalhada das células, possibilitando inclusive, a realização de medições. Foi observado que *S. enterica* atingiu, após 24 h de crescimento, um comprimento de 2 μm . Após contato durante 24 h, com o ácido protocatéico a célula apresentou-se menor, atingindo comprimento de 1 μm . Após contato com a cafeína, observou-se um aumento no comprimento de aproximadamente 3,5 vezes e pode-se inferir que o mecanismo de ação da cafeína esteja relacionado à formação do septo, durante a divisão celular. A microscopia de força atômica mostrou-se sensível para estudos de morfologia de bactéria, com a vantagem de facilitar e reduzir o tempo de preparo da amostra.

VI.1. INTRODUÇÃO

A expressão da atividade antimicrobiana é freqüentemente muito clara, mas, em muitos casos, o mecanismo de ação de uma substância antimicrobiana é completamente desconhecido ou pouco conhecido (HOLLEY & PATEL, 2005).

Na MFA, uma sonda de silício é suavemente forçada sobre a amostra e, à medida que ela se move ao longo da superfície da amostra, seus movimentos são registrados, e uma imagem tridimensional é produzida. A grande vantagem da MFA é a possibilidade de se observar a célula nas dimensões x, y e z (BRAGA & RICCI, 1998; 2002).

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do ácido protocatéico e da cafeína sobre a morfologia de *S. enterica*, após 24 h de contato. Foi avaliado o crescimento por leitura de transmitância e foram empregadas duas técnicas para avaliação da morfologia da bactéria teste - a microscopia ótica e a microscopia de força atômica.

VI.2. MATERIAL E MÉTODOS

VI.2.1 MATERIAL

VI.2.1.1 Compostos químicos do café

Foram empregados o ácido protocatéico (Sigma, St. Louis, MO, EUA, P5630) e a cafeína (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

VI.2.1.2 Microrganismo e meios de cultura

Foi utilizada uma linhagem de *S. enterica* sorovar Typhimurium (ATCC 14028). Essa cultura foi mantida a -70 °C em caldo infuso de cérebro e coração (BHI, Dialab, Montes Claros, MG) e 20% de glicerol.

VI.2.1.3 Condições de cultivo

A bactéria foi inoculada em ágar nutriente (Dialab, Montes Claros, MG) e incubada a $36,5 \pm 1,0$ °C, durante 24 h em estufa (Forma Scientific, Marietta, OH, EUA). O inóculo foi padronizado, transferindo-se os microrganismos em crescimento para um tubo de solução salina esterilizada, até obter uma turbidez equivalente a 50% de transmitância, em espectrofotômetro (Coleman, modelo 6120, Maywood, IL, EUA) a 580 nm, a qual, após plaqueamento, correspondeu a 10^8 UFC/mL. Dessa suspensão, foram retirados 1000 µL e semeados em 9 mL de caldo BHI. Foram avaliados os seguintes parâmetros: (i) adição do ácido protocatéico (4,14 mg/mL); (ii) adição do ácido protocatéico (4,14 mg/mL) com ajuste do pH do meio de cultura para 4,5; (iii) adição da cafeína (4,96 mg/mL); (iv) adição da cafeína (4,96 mg/mL) com ajuste do pH do meio de cultura para 4,5; (v) controle sem adição de agente antimicrobiano; (vi) controle sem adição de agente antimicrobiano e com ajuste do pH do meio de cultura para 4,5. Os tubos foram incubados a $36,5 \pm 1,0$ °C por 24 h.

VI.2.2 MÉTODOS

VI.2.1 Avaliação do crescimento e do pH

No início do experimento (tempo = 0) e após 24 h de incubação, os tubos, contendo caldo BHI, em todas as condições especificadas anteriormente, foram agitados em agitador do tipo vórtex (Phoenix AP56) e levados para leitura de transmitância a 580 nm em espectrofotômetro (Coleman, modelo 6120, Maywood, IL, EUA), para monitoramento do crescimento. A transmitância foi posteriormente transformada em absorbância ($A = 2 - \log T$), para o cálculo da percentagem de inibição pela fórmula $\% \text{ inibição} = 100(A_c - A_s)/A_c$, sendo A a absorbância nos tubos controle (A_c) e na amostra (A_s).

A leitura do pH dos meios de cultura, em cada uma das condições descritas após 24 h, foi realizada em um pHmetro (DM20 Digimed, Santo Amaro, SP, Brasil).

Após 24 h, foi retirada uma alíquota de 100 μL , de cada cultura, para plaqueamento em ágar nutriente por semeadura em profundidade. As placas foram incubadas a $36,5 \pm 1,0$ °C, por 24 h e a leitura foi realizada, considerando-se a presença, ou não, de crescimento bacteriano.

VI.2.2 Preparo das amostras e observação por microscopia ótica

Após crescimento por 24 h, o material dos tubos controle (controle sem adição de agente antimicrobiano), dos tubos com o ácido protocatéico (adição do ácido e ajuste do pH do meio de cultura para 4,5) e com a cafeína (adição da cafeína e ajuste do pH do meio de cultura para 4,5) foram levados para centrifugação (Fanen, Excelsa modelo 206, São Paulo, SP), a 4000 rpm, durante 5 min. Após essa etapa, o sobrenadante foi descartado, foram adicionados 3 mL de tampão fosfato (pH = 7,1) no tubo contendo o centrifugado e repetida a centrifugação (4000 rpm/5 min). Após o descarte do sobrenadante, o centrifugado foi ressuspendido com tampão fosfato e depositado, com auxílio de alça de níquel-cromo, em lâmina de vidro. Após a secagem e fixação, foi realizada a coloração de Gram e as lâminas foram observadas em microscópio ótico Olympus (PX 40) equipado com sistema de microfotografia. As microfotografias foram efetuadas com objetiva de 100 x e com óleo de imersão, resultando em um aumento de 1000 x.

VI.2.3 Preparo das amostras e observação por microscopia de força atômica

Após crescimento durante 24 h, o material dos tubos foi centrifugado, conforme descrito no item VI.2.2. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 5 mL de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato (pH = 7,1) e mantido durante 1 h na temperatura ambiente, para fixação. Após esse período, foram adicionados 2 mL de tampão fosfato (pH = 7,1) e centrifugado a 4000 rpm, durante 5 min, duas vezes. Uma parte do centrifugado obtido foi depositado em uma lamínula de vidro e seco à temperatura ambiente. Um microscópio de força atômica, operando no modo de contato intermitente (Dimension 3100, Digital Instruments, Santa Bárbara, Califórnia, EUA), foi usado para todas as imagens de MFA. O microscópio, equipado com um “scanner”, possuía uma faixa máxima x-y de 100 por 100 μm e um controlador (Nanoscope IIIa, Digital Instruments, Santa Barbara, CA, EUA). Foi empregada uma sonda de silício (Nanosensors), com constante de força de 3,0 – 7,1 N/m, frequência de oscilação de 75-98 Khz e raio de curvatura nominal de 5-10 nm. Todas as imagens foram capturadas, usando-se ajuste de 512 x 512 pixels, e processadas.

Um campo de 30 por 30 μm foi usado, para determinar a posição exata das bactérias e, em seguida, menores escalas foram empregadas para aproximação e avaliação dos detalhes. As secções de interesse foram capturadas, analisadas e as células foram medidas, empregando-se o “software” para análise de imagens do microscópio (Nanoscope versão 5.13 r10 sr3, Digital Instruments, Santa Barbara, CA, EUA).

VI.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

VI.3.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E DO pH

As leituras de transmitância a 580 nm após 24 h de contato, para cada uma das situações avaliadas, a percentagem de inibição e os valores de pH estão apresentados na Tabela VI.1. Foram observadas diferenças nas percentagens de inibição dos diferentes tratamentos. Observa-se que tanto o ácido protocatéico quanto a cafeína, em meio de cultura com ajuste do pH para 4,5, causaram uma inibição de *S. enterica* superior a 90%, o que sugere que esse valor de pH é importante para a atividade antimicrobiana. No meio de cultura, contendo as substâncias, sem o ajuste do pH, as percentagens de inibição foram de 54,9% e 37,7%, para o ácido protocatéico e a cafeína, respectivamente, sendo inferior à inibição causada apenas pelo pH ajustado para 4,5, sem adição de substância (64,6%). Percebe-se que o pH isoladamente, causou uma inibição bastante expressiva no crescimento de *S. enterica*, o que explica a maior atividade observada para as substâncias no pH ajustado para 4,5.

Verificou-se a presença de colônias após o plaqueamento das amostras originadas dos diferentes tratamentos. Observou-se, que as amostras com o pH ajustado para 4,5 apresentavam uma densidade menor de colônias. Sob essas condições experimentais, detectou-se, que tanto o ácido protocatéico, quanto a cafeína interferiram no crescimento da bactéria teste, caracterizando um efeito bacteriostático.

Tabela VI.1. Transmitância e absorvância, percentagem de inibição e pH após 24 h de incubação de *S. enterica* em caldo BHI na presença ou não de ácido protocatéico ou cafeína, e em pH ajustado ou não para 4,5

Caldo BHI com	Transmitância (580 nm)		Absorvância 24 h	Inibição (% controle)	pH final
	0 h	24 h			
Ácido protocatéico					
pH 4,5	92,7 ± 1,5	87,2 ± 8,9	0,06 ± 0,05 ^d	90,8	4,32
pH não ajustado	93,0 ± 4,2	19,2 ± 1,1	0,29 ± 0,02 ^c	54,9	5,69
Cafeína					
pH 4,5	99,0 ± 1,4	88,5 ± 5,2	0,05 ± 0,03 ^d	91,8	4,55
pH não ajustado	97,0 ± 1,4	39,5 ± 2,1	0,40 ± 0,02 ^b	37,7	6,34
Controle					
pH 4,5	96,0 ± 3,5	59,0 ± 0,0	0,23 ± 0,00 ^c	64,6	4,74
pH não ajustado	95,3 ± 1,1	22,5 ± 3,9	0,66 ± 0,10 ^a	0	6,5

Controle = sem substância. Médias de triplicatas ± desvio padrão com diferentes letras (a,b,c,d) para os dados de absorvância são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

V.3.2 ESTUDO DA MORFOLOGIA DE *S. enterica* APÓS CONTATO COM ÁCIDO PROTOCATÉICO E CAFEÍNA POR MICROSCOPIA ÓTICA

A microscopia ótica (MO) possibilitou a avaliação da morfologia das bactérias nos diferentes tratamentos. Na Figura VI.1a tem-se uma microfotografia por MO de uma cultura de *S. enterica* após 24 h de crescimento em caldo BHI, corada pelo método de Gram. Nas Figuras VI.1b e VI.1c estão as microfotografias em MO de culturas de *S. enterica* em caldo BHI, após contato com o ácido protocatéico (4,14 mg/mL) e com a cafeína (4,96 mg/mL), respectivamente. Observa-se, que na amostra controle (Figura VI.1a), os microrganismos apresentaram-se na forma de bastonetes pequenos Gram-negativos, característicos das bactérias do gênero *Salmonella*. Na presença do ácido protocatéico (Figura VI.1b), as células do microrganismo apresentaram-se de tamanho menor que aquelas sem adição de substância antimicrobiana (Figura VI.1a). Observa-se ainda que as células apresentaram um formato mais arredondado e um aspecto de cocos. Portanto, houve alteração morfológica na bactéria causada pelo ácido protocatéico.

Comparando as Figuras VI.1a e VI.1c, observa-se que na presença da cafeína os bastonetes apresentaram-se alongados, sugerindo um aumento da célula de cerca de três vezes. No entanto, mesmo com o maior aumento da MO (1000x), não foi possível avaliar detalhes da superfície da bactéria, nem o comprimento dos bastonetes.

Dessa forma, foi essencial a aplicação de uma metodologia mais sensível, que permitisse uma observação mais detalhada, e o entendimento das alterações na morfologia da bactéria, causada pelas substâncias em estudo.

VI.3.3 ESTUDO DA MORFOLOGIA DE *S. enterica* APÓS CONTATO COM ÁCIDO PROTOCATÉICO E CAFEÍNA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Na Figura VI.2, estão apresentadas as imagens de *S. enterica* por microscopia de força atômica (MFA), controle e após contato com ácido protocatéico e cafeína. Todas as imagens foram obtidas a partir do crescimento de *S. enterica* em caldo BHI, após 24 h de incubação a 36,5 °C.

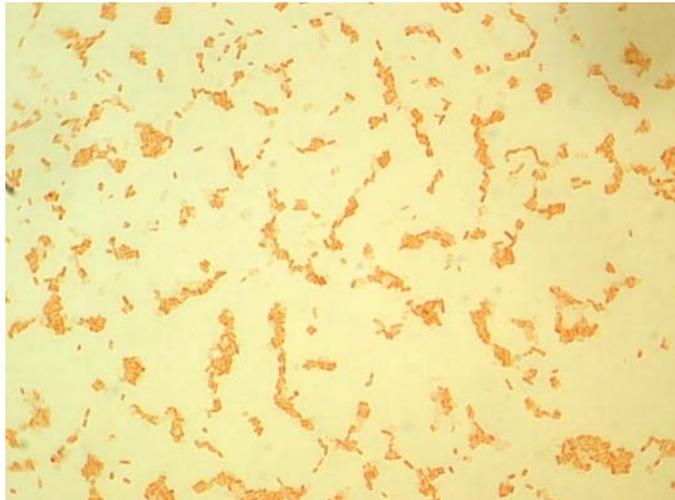
Na Figura VI.2a, está apresentada a imagem obtida da superfície da lâmina de *S. enterica*, em um campo de 15 por 15 µm, em condições normais de crescimento, isto é, em caldo BHI sem o acréscimo de qualquer substância. Na Figura VI.2b, está apresentada a imagem, em um campo de 30 por 30 µm, de *S. enterica* após contato com o ácido protocatéico. Na Figura VI.2c, está apresentada a imagem de MFA, em um campo de 15 por 15 µm, de *S. enterica*, após contato com a cafeína durante 24 h.

Pela imagem apresentada na Figura VI.2a, detecta-se que a metodologia empregada no preparo da amostra para a MFA não alterou a morfologia nem o arranjo das células, o que é essencial para a comparação com as imagens originadas a partir de cultivos com tratamento com substâncias antimicrobianas. Observa-se ainda que a bactéria apresentou-se na forma de bastonetes cilíndricos, com extremidades arredondadas e dispostas em células isoladas, o que caracteriza a morfologia e o arranjo dessa bactéria, em condições normais de crescimento. Observa-se também que a superfície da célula apresenta-se uniforme e sem alterações aparentes.

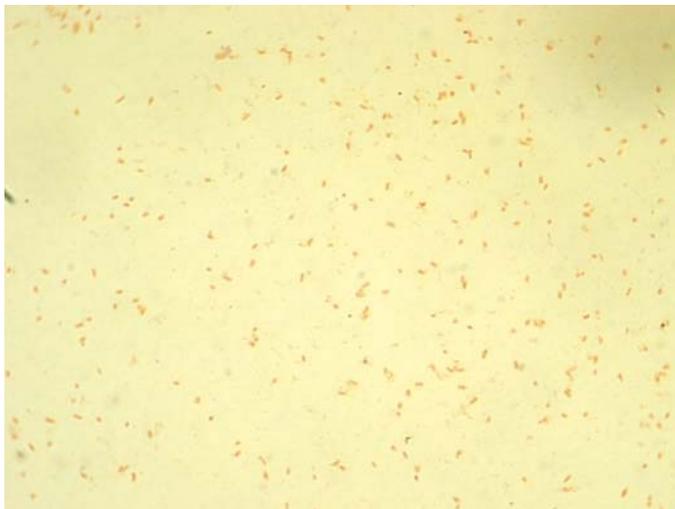
Observa-se na Figura VI.2b que as células, após contato com o ácido protocatéico, apresentaram-se menores e com a superfície alterada. Em algumas partes do campo, verifica-se a presença de células com aspecto cocóide unidas, às vezes, em grupos de três. Em outras partes, verifica-se que a superfície da célula apresenta-se irregular e com aparência rugosa, diferente da estrutura observada na Figura VI.2a.

Observa-se na Figura VI.2c que algumas células apresentaram-se com alteração na superfície. Identificou-se, em alguns pontos, um início da formação de um possível septo, mas sem a real divisão da célula.

(a)



(b)



(c)

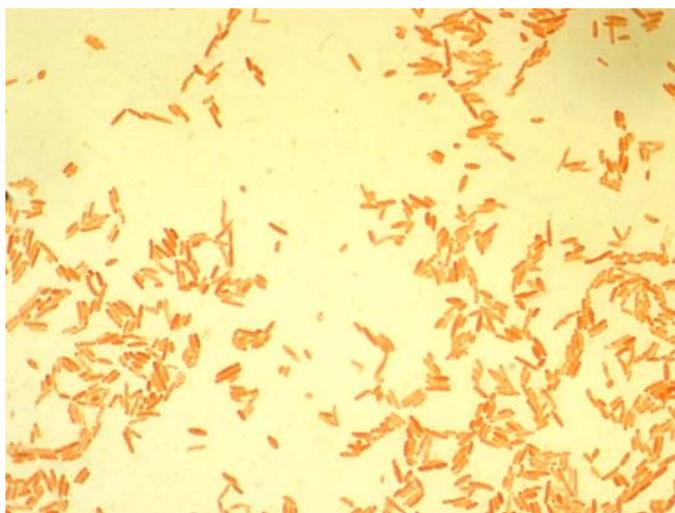


Figura VI.1. Microfotografia em microscópio ótico de uma cultura de *S. enterica*, após 24 h de crescimento em caldo BHI a 36,5 °C na ausência (a) controle, e na presença de (b) 4,14 mg/mL de ácido protocatéico e (c) 4,96 mg/mL de cafeína, corada pelo método Gram com aumento de 1000 x.

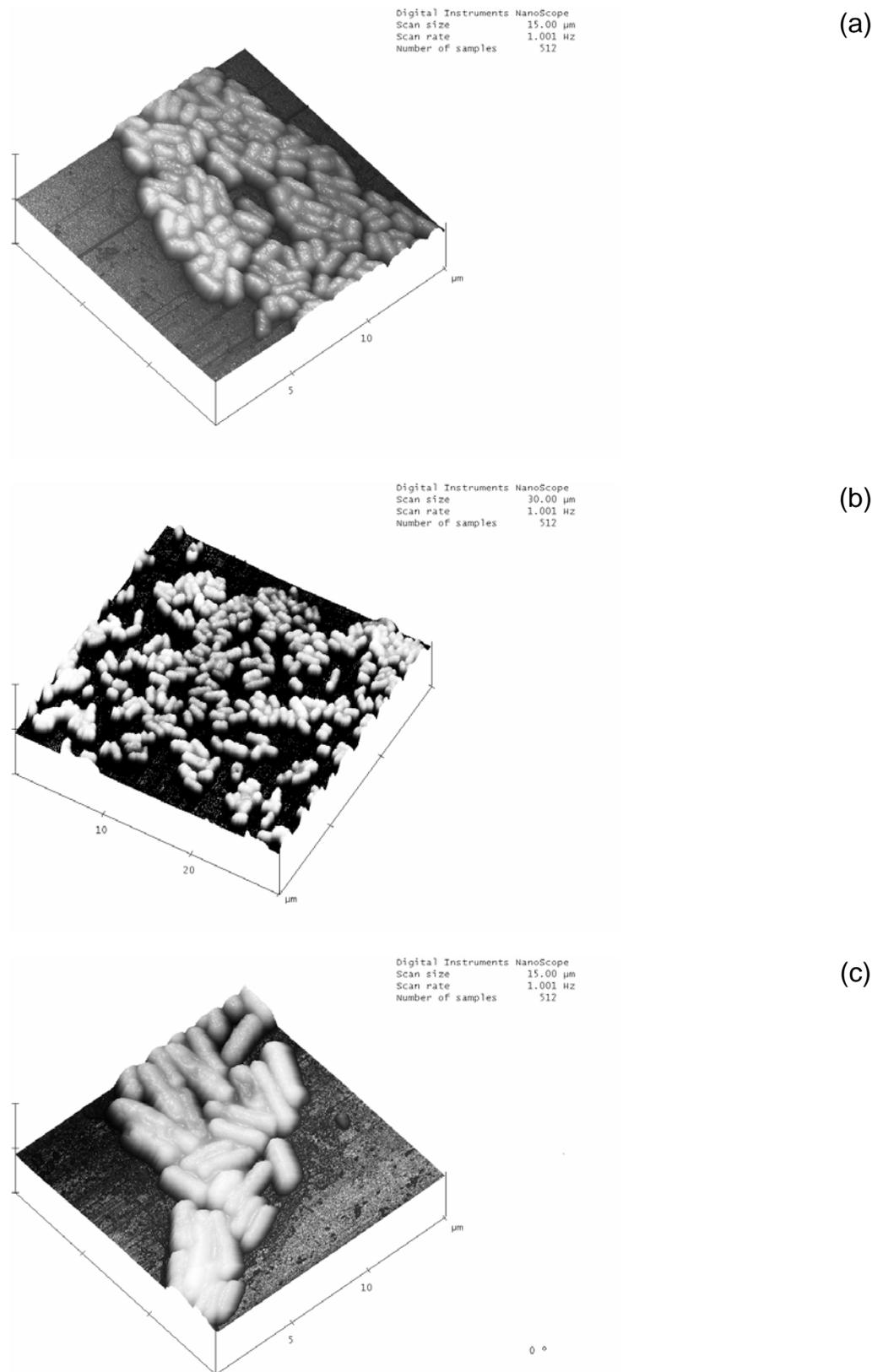


Figura VI.2. Imagens de microscopia de força atômica de *S. enterica* após 24 h de crescimento em caldo BHI a 36,5 °C na ausência (a) controle (15x15 μm), e na presença de (b) 4,14 mg/mL de ácido protocatéico (30x30 μm), e (c) 4,96 mg/mL de cafeína (15x15 μm).

Pela comparação das imagens apresentadas na Figura VI.2a e VI.2c, observam-se dois tipos distintos de células. Os bastonetes que cresceram na presença da cafeína (Figura VI.2c) diferenciam-se daqueles originados do crescimento, em condições normais (VI.2a). Observa-se que a morfologia das células após o contato com a cafeína apresenta-se alterada. Para essas células, visualizam-se variações no comprimento e na largura, apresentando-se assim maiores que a bactéria normal.

Pelas imagens obtidas pela MO e pela MFA, nota-se que a MFA permitiu a observação da bactéria com uma maior riqueza de detalhes, podendo-se visualizar as três dimensões da célula. Isso possibilita uma comparação da morfologia normal da bactéria teste, com a morfologia após o contato com as substâncias investigadas, o que confere à MFA uma maior sensibilidade para este tipo de estudo.

As imagens capturadas foram tratadas de diferentes formas (visualização do topo, da superfície, medições) com o “software” para análise de imagens do microscópio de força atômica.

Na Figura VI.3a, está apresentada a mesma imagem mostrada na Figura VI.2a, com um tratamento diferente, que possibilitou medir o comprimento da célula, em condições normais. Pelas medidas realizadas, verifica-se que a célula típica de *S. enterica*, após crescimento durante 24 h, atingiu um comprimento que variou entre 1,5 e 2,0 μm e uma largura de aproximadamente 1 μm . Esses resultados estão de acordo com CHADFIELD & HINTON (2004), que observaram por microscopia eletrônica de varredura, que *S. enterica* atingiu comprimento de aproximadamente 2 μm .

Na Figura VI.3b, está apresentada a mesma imagem mostrada na Figura VI.2b, com um tratamento da imagem diferente, possibilitando medir o comprimento da célula, após o contato com o ácido protocatéico. Pelas medidas realizadas, verifica-se que nessas condições a célula de *S. enterica*, após crescimento durante 24 h, atingiu um comprimento de 1,2 μm .

Na Figura VI.3c, está apresentada a mesma imagem mostrada na Figura VI.2c, com um tratamento da imagem diferente, possibilitando a realização da medida do comprimento após contato com a cafeína. Pelas medidas, verifica-se que nessas condições, a célula de *S. enterica* apresentou, aproximadamente, um comprimento 3,5 vezes maior, em relação à célula normal. Foram realizadas medidas das células, que chegaram a atingir o comprimento de 5,51 μm e com valores médios de 4,6 μm .

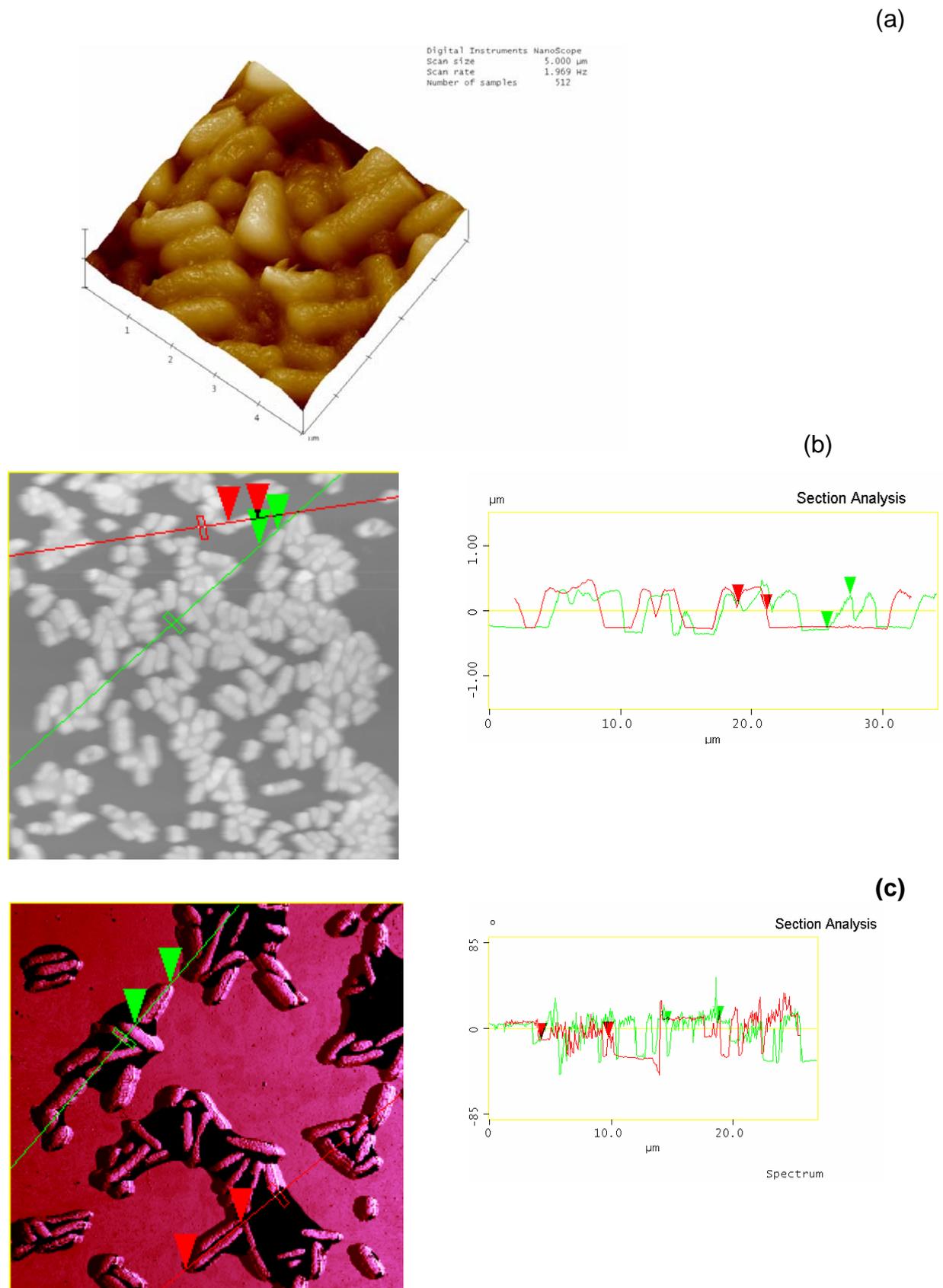


Figura VI.3. Imagens de microscopia de força atômica de *S. enterica* após 24 h de crescimento em caldo BHI a 36,5 °C na ausência (a) controle (15x15 μm), e na presença de (b) 4,14 mg/mL de ácido protocatéico (30x30 μm), e (c) 4,96 mg/mL de cafeína (15x15 μm).

Pelas imagens observadas, acredita-se que a cafeína possa interferir no processo de divisão celular da bactéria, o qual envolve replicação do cromossomo, segregação do material nuclear, septação e separação física das células (NAGAI & TAMURA, 1972). Na década de 1970, vários pesquisadores investigaram mutantes de *E. coli* com proteínas termosensíveis e a sua relação com o processo de divisão celular (RUFF et al., 1971; NAGAI & TAMURA, 1972; SANTOS & ALMEIDA, 1975). NAGAI & TAMURA, (1972) observaram que ao manterem culturas de *E. coli* em temperaturas elevadas (42 °C/60 min), as bactérias apresentavam-se na forma de filamentos, três a quatro vezes mais longos do que a célula normal, o que foi atribuído a uma proteína termosensível. SANTOS & ALMEIDA (1975) estudaram esses mutantes e verificaram o efeito de diferentes temperaturas no alongamento da célula. Esses autores verificaram que, após 4 h de incubação, nas temperaturas de 30 °C e 42 °C, o número de células viáveis aumentava em 30 °C e decrescia em 42 °C. Entretanto, a densidade ótica aumentava em ambas as situações, o que comprovava que a massa celular continuava crescendo, apesar de não haver divisão. CHADFIELD & HINTON (2004) avaliaram o efeito de derivados do nitrofurano sobre a morfologia de *S. enterica*. Esses autores verificaram, por microscopia de varredura, que a substância investigada causava uma inibição da divisão celular, promovendo um aumento das células que chegavam a atingir 20 a 30 µm.

Ao calcular a densidade ótica em absorbância, a partir da fórmula $A=2-\log T$, para os tratamentos empregados no presente estudo, foram observadas diferenças. Para o caldo BHI adicionado de cafeína com pH 4,5, a absorbância obtida foi de 0,05, enquanto, para o controle, foi de 0,66. Ao comparar esse resultado com o obtido por SANTOS & ALMEIDA (1975), pode-se verificar que a cafeína, além de causar um alongamento da bactéria, evidenciado pelas imagens, também causou uma diminuição no seu crescimento. Considerando-se o exposto, pode-se pressupor que além da interferência em algum mecanismo da divisão celular, possivelmente, na formação do septo, a cafeína também influencia na multiplicação.

Em relação ao mecanismo de ação do ácido protocatéico, muitos autores verificaram que compostos fenólicos tem seu sítio de ação na membrana citoplasmática, alterando sua estrutura e função, alterando o transporte ativo e coagulando o conteúdo celular (SIKKEMA et al., 1995; BURT, 2004). No entanto, não foi verificado pela microscopia extravasamento de constituintes celulares após contato da bactéria com o ácido protocatéico.

VI.4. CONCLUSÕES

O ácido protocatéico e a cafeína causaram alterações morfológicas nas células de *S. enterica*. Após 24 h de crescimento, em condições normais, *S. enterica* atingiu um comprimento de 2 μm . A bactéria, entretanto, em contato com o ácido protocatéico, apresentou morfologia cocóide e comprimento de 1 μm , após 24 h de crescimento. Por outro lado, a bactéria, em contato com a cafeína, apresentou forma de bastonete e comprimento de até 5,5 μm , após 24 h de crescimento.

Pode-se inferir que o mecanismo de ação da cafeína esteja relacionado à formação do septo, durante a divisão celular. Entretanto, o mecanismo de ação do ácido protocatéico não pôde ser explicado pela morfologia observada por meio das microscopias ótica e de força atômica.

CONCLUSÕES INTEGRADAS

As quatro amostras de café empregadas neste estudo apresentaram teores de ácidos clorogênicos e trigonelina e valores de L^* distintos, sugerindo diferentes graus de torração.

Os extratos de café e os compostos - ácidos caféico, clorogênico, protocatéico, cafeína e trigonelina - apresentaram atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo nove enterobactérias investigadas.

Uma atividade antimicrobiana relevante foi observada para o extrato aquoso de café e os cinco compostos químicos testados sobre *E. coli*, *S. enterica*, *S. aureus* e *S. mutans*.

Não foi observada atividade antifúngica pelos extratos e compostos químicos do café sobre as duas leveduras e o fungo filamentoso investigados.

A associação do extrato aquoso do café com a cafeína apresentou um maior efeito inibitório contra *B. subtilis*, não havendo um aumento na atividade para as demais bactérias investigadas.

Não foi observada influência da marca de café, do tipo de solvente extrator e do processo de extração na inibição de *S. mutans*.

S. enterica se destacou, como a bactéria mais susceptível ao extrato e a alguns compostos químicos do café, sendo que as concentrações investigadas afetaram significativamente a atividade antibacteriana.

O ácido protocatéico, a cafeína e a trigonelina apresentaram os menores valores de IC_{50} e IC_{90} para *S. enterica*, indicando uma maior atividade antimicrobiana dessas substâncias comparadas aos ácidos clorogênico e caféico.

A concentração de cafeína encontrada nos extratos aquosos de café (2,10 a 2,23 mg/mL) é suficiente para garantir uma inibição de *S. enterica* próxima a 50%.

O ácido protocatéico e a cafeína apresentaram um melhor perfil antimicrobiano para *S. enterica* no estudo cinético, sendo a atividade mantida ao longo de todo o período do teste até o tempo final de 24 h.

O pH modulou o efeito antimicrobiano da cafeína e do ácido protocatéico sobre *S. enterica* em meio de cultura, sendo a maior atividade em pH 4,5.

No teste de eficiência conservante em leite desnatado, usado como modelo alimentar, em pH 4,5 e 5,5, tanto a cafeína quanto o ácido protocatéico apresentaram atividade antimicrobiana sobre a bactéria investigada.

Os componentes do leite reduziram a ação antimicrobiana do ácido protocatéico e da cafeína, no entanto, essas substâncias antibacterianas apresentaram uma inibição interessante para um possível uso como conservantes em produtos alimentícios.

Por meio da microscopia ótica e da microscopia de força atômica verificaram-se alterações morfológicas de *S. enterica* após contato de 24 h com ácido protocatéico e cafeína, ou seja, redução à metade e aumento de até três vezes, respectivamente no comprimento. Pode-se inferir que o mecanismo de ação da cafeína esteja relacionado à formação do septo, durante a divisão celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIC. Estatísticas. Produção agrícola. Disponível em: <www.abic.com.br/estatisticas.html>. Acesso em: 02 de outubro de 2006.
- ALMEIDA, A.A.P.; OLIVEIRA, L.S.; MORAES-SANTOS, T.; GLÓRIA, M.B.A. Café e saúde: três décadas de estudos. *Rev. Bras. Armaz.*, especial café, n. 7, p. 56-63, 2003.
- ALMEIDA, A.A.P.; SILVEIRA, T.M.L.; NUNAN, E.A.; SANTOS, V.R.; GLÓRIA, M.B.A. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de leite em pó. *Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes*, v. 59, p. 208-211, 2004.
- ALMEIDA, A.A.P.; FARAH, A.; SILVA, D.A.M.; NUNAN, E.A.; GLÓRIA, B.A. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, n. 23, p. 8738-8743, 2006.
- BARANOWSKI, J.D.; NAGEL, C.W. Inhibition of *Pseudomonas fluorescens* by hydroxycinnamic acids and their alkyl esters. *J. Food Sci.*, v. 47, p. 1587-1589, 1982.
- BARBER, D.A.; MILLER, G.Y.; MACNAMARA, P.E. Models of antimicrobial resistance and foodborne illness examining assumptions and practical applications. *J. Food Protect.* v. 66, n. 4, p. 700-709, 2003.
- BERNAL, J.L.; DEL NOZAL, M.J.; TORIBIO, L.; DEL ALAMO, M. HPLC analysis of carbohydrates in wines and instant coffees using anion exchange chromatography accopled to pulsed amperometric detection. *J. Agric. Food Chem.*, v. 44, p. 507-511, 1996.
- BOOTH, I.R. Regulation of cytoplasmatic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.*, v. 49, p. 359-378, 1985.
- BORGES, M.L.A.; FRANÇA, A.S.; OLIVEIRA, L.S.; CORREA, P.C.; GLORIA, M.B.A. Estudo da variação da coloração de café arábica durante a torrefação em diferentes condições de aquecimento. *Rev. Bras. Armaz.*, v. especial, n. 5, p. 3-8, 2002.
- BRAGA, P.C.; RICCI, D. Atomic force microscopy application to investigation of *Escherichia coli* morphology before and after exposure to cefodizime. *Antimicrob. Ag. Chemoth.*, v. 42, n. 1, p. 18-22, 1998.

- BRAGA, P.C.; RICCI, D. Atomic force microscopy. In: GILLESPIE, S.H. (Ed.) *Methods in molecular medicine*. Totowa: Human Press Inc., 2001. v. 48, p. 199-207.
- BRAGA, P.C.; RICCI, D. Differences in the susceptibility of *Streptococcus pyogenes* to rokitamycin and a erythromycin A revealed by morphostructural atomic force microscopy. *J. Antimicrob. Chemoth.*, v. 50, p. 457-460, 2002.
- BRANDÃO, G.C. Isolamento biomonitorado de substâncias antimicrobianas de *Polygonum spectabilis* e Mart e determinação da CIM para uma chalcona antimicrobiana. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2004. 194 p (Dissertação, Mestrado em Ciências Farmacêuticas).
- BRANEN, A.L. Introduction to the use of antimicrobials. In: DAVIDSON, P.M.; BRANEN, A.L. (Ed.) *Antimicrobials in foods*, 2 ed., New York: Marcel Dekker, 1993, p. 1-9.
- BRUL, S.; COOTE, P.; OOMES, S.; MENSONIDES, F.; HELLINGWERT, K.; KLIS, F. Physiological actions of preservative agents; prospective of use of modern microbiological techniques in assessing microbial behavior in food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* v. 79, n. 1-2, p. 55-64, 2002.
- BRUNETON, J. *Elementos de fitoquímica y de farmacognosia*. Zaragoza: Ed. Acribia S.A., 1991, 1 ed., 594 p.
- BUCHANAN, R.L.; FLETCHER, A.M. Methylxanthine inhibition of aflatoxin production. *J. Food Sci.*, v. 43, p. 654-655, 1978.
- BUCHANAN, R.L.; HOOVER, D.G.; JONES, S.B. Caffeine inhibition of ochratoxin A production. *J. Food Sci.*, v. 47, p. 319-321, 1981.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 94, p. 223-253, 2004.
- CASAL, S.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; ALVES, M.R.; FERREIRA, M.A. Discriminate analysis of roasted coffee varieties for trigonelline, nicotinic acid and caffeine content. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, p. 3420-3424, 2000.
- CEDILLO-RIVERA, R.; RAMÍREZ, A.; MUNOZ, O. A rapid colorimetric assay with the tetrazolium salt MTT and phenazine methosulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.*, v. 23, n. 2, p. 59-61, 1992.
- CHADFIELD, M.S.; HINTON, M.H. *In vitro* activity of nitrofurantoin derivatives on growth and morphology of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *J. Appl. Microbiol.*, v. 96, p. 1002-1012, 2004.

- CHALFOUN, S.M.; PEREIRA, M.C.; ANGÉLICO, C.L. Efeito da cafeína (1,3,7-trimethylxantina) sobre crescimento micelial de fungos associados ao café. *Rev. Bras. Armaz.*, v. 1, p. 50-53, 2000.
- CHENSON, A.; STEWARD, C.; WALLACE, R. Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 44, n. 3, p. 597-603, 1982.
- CLARKE, R.J.; MACRAE, R. *Coffee: chemistry*, 2 ed., Londres: Elsevier Applied Science, 1989. 306 p.
- CLARKE, R.J. Water and mineral contents. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Ed.) *Coffee chemistry*. v. 1. London: Elsevier Applied Science, 1989. p. 42-82.
- CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Ed.) *Coffee chemistry*. v. 1, London: Elsevier Applied Science, 1989. p. 153-202.
- COLORPRO. Disponível em: <<http://www.colorpro.com/info/tools/convert.htm>>. Acesso em: 29 maio 2004.
- COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 12, p. 564-582, 1999.
- COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C.; GUSTAFSON, J.E.; WARMINGTON, J.R.; WYLLIE, S.G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* v. 88, p. 170-175, 2000.
- DAGLIA, M.; CUZZONI, M.T.; DACARRO, C. Antibacterial activity of coffee. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, p. 2270-2272, 1994a.
- DAGLIA, M.; CUZZONI, M.T.; DACARRO, C. Antibacterial activity of coffee relationship between biological activity and chemical markers. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, p. 2273-2277, 1994b.
- DAGLIA, M.; PAPETTI, A.; DACARRO, C.; GAZZANI, G. Isolation of an antibacterial component from roasted coffee. *J. Pharmac. Biomed. Anal.*, v. 18, p. 219-225, 1998.
- DAGLIA, M.; TARSI, R.; PAPETTI, A.; GRISOLI, P.; DACARRO, C.; PRUZZO, C.; GAZZANI, G. Antiadhesive effect of green and roasted coffee on *Streptococcus mutans* adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 1225-1229, 2002.
- DART, S.K.; NURSTEN, H.E. Volatile components. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Ed.) *Coffee: chemistry*. London: Elsevier Applied Science, 1989. p. 223-265.

- DASTIDAR, S.G.; MANNA, A.; KUMAR, K.A.; MAZUMDAR, K.; DUTTA, N.K.; CHAKRABARTY, A.N.; MOTOHASHI, N.; SHIRATAKI, Y. Studies on the antimicrobial potentiality of isoflavones. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 23, p. 99-102, 2004.
- DAVIDSON, P.M.; BRANEN, A.L. (Ed.) *Antimicrobials in foods*. New York: Marcel Dekker, 1993. 647 p.
- DAVIDSON, P.M. Parabens and phenolic compounds. In: DAVIDSON, P.M.; BRANEN, A.L. (Ed.) *Antimicrobials in foods*, 2 ed., New York: Marcel Dekker, 1993. p. 1-9.
- DAVIDSON, P.M.; PARISH, M.E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol.*, January, p. 148-155, 1989.
- DE MARIA, C.A.B.; TRUGO, L.C.; MOREIRA, R.F.A. Simultaneous determination of total chlorogenic acid, trigonelline and caffeine in green coffee samples by high performance gel filtration chromatography. *Food Chem.*, v. 52, p. 447-449, 1995.
- DEMARCHI, M. Café aspectos econômicos. Curitiba: SEAB, Departamento de Economia Rural, 2003. 89 p.
- DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies possibilities and limitations. *Int. Dairy J.*, v. 14, p. 273-285, 2004.
- DIEKMA, D.J.; PFALLER, M.A.; JONES, R.N. Survey of bloodstream infections due to Gram-negative bacilli. Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, v. 29, p. 595-607, 1999.
- DOGASAKI, C.; SHINDO, T.; FURUHATA, K.; FUKUYAMA, M. Identification of chemical antibacterial components against *Legionella pneumophila* in a coffee beverage. *J. Pharm. Soc. Japan*, v. 122, n. 7, p. 487-494, 2002.
- DOORES, S. Organic acids. In: DAVIDSON, P.M.; BRANEN, A.L. (Ed.) *Antimicrobials in foods*, 2 ed., New York: Marcel Dekker, 1993. p. 1-9.
- ELOFF, J.N.P. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med.*, v. 64, p. 711-713, 1998.
- FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant Physiol.*, v. 18, n. 1, p. 23-36, 2006.
- FARAH, A.; MONTEIRO, M.C.; CALADO, V.; FRANCA, A.; TRUGO, L.C. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chem.*, v. 98, p. 373-380, 2006a.
- FARAH, A.; PAULIS, T.; TRUGO, L.C.; MARTIN, P.R. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 1505-1513, 2005.

- FARAH, A.; PAULIS, T.; MOREIRA, D.P.; TRUGO, L.C.; MARTIN, P.R. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, p. 374-381, 2006b.
- FRANCA, A.S., OLIVEIRA, L.S., MENDONÇA, J.C.F.; SILVA, X.A. Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans. *Food Chem.*, v. 90, p. 84-89. 2005.
- FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M. (Ed) *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. 182 p.
- FURUHATA, K.; SUGIYAMA, J.; DOGASAKI, C.; FURUYAMA, M. Antibacterial activities of several coffee samples against *Legionella pneumophila*. *J. Antibact. Antifung. Agents*, v. 28, n. 2, p. 87-91, 2000.
- FURUHATA, K.; DOGASAKI, C.; HARA, M.; FURUYAMA, M. Inactivation of *Legionella pneumophila* by phenol compounds contained in coffee. *J. Antibact. Antifung. Agents*, v. 30, p. 291-297, 2002.
- GARROTE, G.; CRUZ, J.M.; MOURE, A.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J.C. Antioxidant activity of byproducts from the hydrolytic processing of selected lignocellulosic materials. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 15, p. 191-200, 2004.
- GONZÁLEZ, A.G.; PABLOS, F.; MARTIN, M.J.; LEÓN-CAMACHO, M.; VALDENE BRO, M.S. HPLC analysis of tocopherols and triglycerides in coffee and their use as authentication parameters. *Food Chem.*, v. 73, p. 93-101, 2001.
- GOULD, G.W. *New Methods of food preservation*. London: Blackie Academic & Professional, 1995. 324 p.
- GRIGG, G. Effects of coumarin pyronin Y, 6,9-dimethyl-2-methylthiopurine and a caffeine on excision repair and recombination repair in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, v. 70, p. 221-230, 1972.
- GUSTAFSON, J.E.; LIEW, Y.C.; CHEW, S.; MARKHAM, J.; BELL, H.C.; WYLLIE, S.G.; WARMINGTON, J.R. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 26, p. 194-198, 1998.
- HAMADA, S.; KOGA, T.; OOSHIMA, T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. *J. Dent. Res.*, v. 63, p. 407-411, 1984.
- HANSCH, C.; FUJITA, F. Analysis of a method for the correlation of biological activity and chemical structure. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 86, p. 1616-1626, 1964.
- HELANDER, I.M.; ALAKOMI, H.L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M.; WRIGHT, A. Characterization of the action of selected

- essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, v. 46, 3590-3595, 1998.
- HERALD, P.J.; DAVIDSON, P.M. Antibacterial activity of selected hydroxycinnamic acids. *J. Food Sci.*, v. 48, p. 1378-1379, 1983.
- HEWITT, W. *Microbiological assay - an introduction to quantitative principles and evaluation*. Orlando: Academic Press, 1977. 283 p.
- HOLLEY, R.A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobial. *Food Microbiol.*, v. 22, p. 273-292, 2005.
- HOLLIDAY, S.L.; BEUCHAT, L.R. Viability of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in yellow fat spreads as affected by storage temperature. *J. Food. Protect.*, v. 66, n. 4, p. 549-558, 2003.
- HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Search for new antifungal compounds from higher plants. *Pure Appl. Chem.*, v. 66, n. 10/11, p. 2231-2234, 1994.
- HWANG, C.A.; TAMPLIN, M.L. The influence of mayonnaise pH and storage temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* in seafood salad. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 102, p. 277-285, 2005.
- IBRAHIM, S.A.; SALAMEH, M.M.; PHETSOMPHOU, S.; YANG, H.; SEO, C.W. Application of caffeine, 1,3,7-trimethylxantine to control *Escherichia coli* O157:H7. *Food Chem.*, v. 99, p. 645-650, 2006.
- JUVEN, B.J.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 76, p. 626-631, 1994.
- KIDD, R.S.; ROSSIGNOL, A.M.; GAMROTH, M.J. *Salmonella* and other Enterobacteriaceae in dairy-cow feed ingredients: antimicrobial resistance in western Oregon. *J. Environ. Health*, v. 64, n. 9, p. 1-9, 2002.
- KIM, J.M.; MARSHALL, M.R.; CORNELL, J.A.; PRESTON, J.F.; WEI, C.I. Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *J. Food Sci.*, v. 60, n. 6, p. 1364-1374, 1995.
- KOO, H.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; PARK, Y.K.; BOWEN, W.H. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and glucosyltransferase activity. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 46, n. 15, p. 1302-1309, 2002.
- KOO, H.; PEARSON, S.K.; SCOTT-ANNE, K.; ABRANCHES, J.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; PARK, Y.K.; MARQUIS, R.E.; BOWEN, W.H. Effects of apigenin and tt-farnesol on

- glucosyltransferase activity biofilm viability and caries development in rats. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 17, p. 337-343, 2003.
- KOUTSOUMANIS, K.; LAMBROPOULOU, K.; NYCHAS, G.J.E. A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 49, p. 63-74, 1999.
- KUBO, I.; FUJITA, K. Naturally occurring anti-*Salmonella* agents. *J. Agric. Food Chem.*, v. 49, p. 5750-5754, 2001.
- KUBO, I.; FUJITA, K.; KUBO, A.; NIHEI, K.; OGURA, T. Antibacterial activity of coriander volatile against *Salmonella choleraesuis*. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, p. 3329-3332, 2004a.
- KUBO, I.; FUJITA, K.; NIHEI, K.; KUBO, A. Anti-*Salmonella* activity of (2E)-alkenals. *J. Appl. Microbiol.*, v. 96, p. 693-699, 2004b.
- KY, C.L.; LOUARN, J.; DUSSERT, B.G.; HAMON, S.; NOIROT, M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chem.*, v. 75, p. 223-230, 2001.
- LACHOWICZ, K.J.; JONES, G.P.; BRIGGS, D.R.; BIENVENU, F.E.; WAN, J.; WILCOCK, A.; COVENTRY, M.J. The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 26, p. 209-214, 1998.
- LANDUCCI, L.F.; OLIVEIRA, L.D.; BRANDÃO, E.H.S.; KOGA-ITO, C.Y.; JARDIM, E.G.; JORGE, A.O.C. Efeitos de *Coffea arabica* sobre a aderência de *Streptococcus mutans* à superfície de vidro. *Cienc. Odontol. Bras.*, v. 6, n. 3, p. 58-64, 2003.
- LEIFERTOVA, I.; HEIJTMANKOVA, N.; HLAVA, H.; KUDRNACOVA, J.; SANTAVY, F. Antifungal and antibacterial effects of phenolic substances. *Acta Univ. PalackiOlomuc. Fac. Med.*, v. 74, p. 83-89, 1975.
- LEISTNER, L. Food preservation by combined methods. *Food Res. Intern.*, v. 25, p. 151-158, 1992.
- LODOVICI, M.; GUGLIELMI, F.; MEONI, M.; DOLARA, P. Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation *in vitro*. *Food Chem. Toxicol.*, v. 39, p. 1205-1210, 2001.
- LUNA-FILHO, E.P. Cafés do Brasil e indicações geográficas. Disponível em: <<http://www.coffee.break.com.br/ocafezal.asp?SE=8&ID=99>>. Acesso em: 05 agosto 2004.
- MACRAE, R. Nitrogenous components. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Ed.) *Coffee: chemistry*. London: Elsevier Applied Science, 1989. p. 115–152.

- MALTA, M.R.; CHAGAS, S.J.R.; OLIVEIRA, W.M. Composição físico-química e qualidade do café submetido a diferentes formas de pré-processamento. *Rev. Bras. Armaz.*, v. Especial Café, n. 6, p. 37-41, 2003.
- MANN, C.M.; MARKHAM, J.L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J. Appl. Microbiol.*, v. 84, p. 538-544, 1998.
- MARIN, S.; GUYNOT, M.E.; NEIRA, P.; BERNADO, M.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J. Risk assessment of the use of sub-optimal levels of weak-acid preservatives in the control of mould growth on bakery products. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 79, p. 203-211, 2002.
- MARQUIS, R.E.; CLOCK, S.A.; MOTA-MEIRA, M. Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology. *Microb. Rev.*, v. 26, p. 493-510, 2003.
- MARTINS, R.S.; PEREIRA, E.S.J.; LIMA, S.M.; SENNA, M.I.B.; MESQUITA, R.A.; SANTOS, V.R. Effect of commercial ethanol propolis extract on the *in vitro* growth of *Candida albicans* collected from HIV-seropositive and HIV-seronegative Brazilian patients with oral candidiasis. *J. Oral Sci.*, v. 44, n. 1, p. 41-48, 2002.
- MATTHEWS, P.D.; HAAS, G.J. Antimicrobial activity of some edible plants: Lotus (*Nelumbo nucifera*), coffee, and others. *J. Food Protect.*, v. 56, n. 1, p. 66-68, 1993.
- MATSUMOTO, M.; MINAMI, T.; SASAKI, H.; SOBUE, S.; HAMADA, S. Inhibitory effects of oolong tea extract on caries-inducing properties of mutans streptococci. *Caries Res.*, v. 33, p. 441-445, 1999.
- MAZZAFERA, P. Trigonelline in coffee. *Phytochem.*, v. 30, n. 7, p. 2309-2310, 1991.
- MONTANO, K.P.; VARGAS, F.A. Péptidos antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro antimicrobial peptides: a defense mechanism with ample future. *Intercien.*, v. 27, n. 1, p. 21-27, 2002.
- MONTEIRO, M.C.; TRUGO, L.C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Quim. Nova*, v. 28, n. 4, p. 637-641, 2005.
- MOREIRA, R.F.A.; TRUGO, L.C. Componentes voláteis do café torrado, parte II compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. *Quim. Nova*, v. 23, n. 2, p. 195-203, 2000.
- NAGAI, K.; TAMURA, G. Mutant of *Escherichia coli* with thermosensitive protein in the process of cellular division. *J. Bacteriol.*, v. 112, n. 2, p. 959-966, 1972.
- NARTOWICZ, V.B.; BUCHANAN, R.L.; SEGALL, S. Aflatoxin production in regular and decaffeinated coffee beans. *J. Food Sci.*, v. 44, p. 446-448, 1979.

- NAZER, A.I.; KOBILINSKY, A.; THOLOZAN, J.L.; DUBOIS-BRISSENET, F. Combinations of foods antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? *Food Microbiol.*, v. 22, p. 391-398, 2005.
- NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. In: *NCCLS document - Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*, approved standard. Wayne: 15 ed., M7-A5, v. 20, n. 2, 2000. 33p.
- NEGI, P.S.; CHAUHAN, A.S.; SADIA, G.A.; ROHINISHREE, Y.S.; RAMTEKE, R.S. Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed extracts. *Food Chem.*, v. 4, n. 20, p. 234-242, 2004.
- NIKOLOVA-DAMYANOVA, B.; VELIKOVA, R.; GULAB, N.J. Lipid classes, fatty acid composition and triacylglycerol molecular species in crude coffee beans harvest in Brazil. *Food Res. Int.*, v. 31, p. 479-486, 1998.
- NOGUEIRA, M.; TRUGO, L.C. Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e conteúdo de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. *Cienc. Tec. Alim.*, n. 23, v. 2, p. 296-299, 2003.
- NUNAN, E.A.; CAMPOS, L.M.M.; PAIVA, R.L.R.; OLIVEIRA, S.T.; DAUDOUN, H.A.; OLIVEIRA, A.B. Estudo da atividade antimicrobiana de extrato de folha de *Aristolochia gigantea* Mart. e Zucc. *Rev. Farm. Bioq.*, v. 6, p. 33-40, 1985.
- NYCHAS, G.J.E. Natural antimicrobials from plants. In: GOULD, G.W. (Ed.). *New methods of food preservation*. Londres: Blackie Academic & Professional, 1995. p. 59-87.
- OWEN, R.J.; PALOMBO, E.A. Anti-listerial of ethanolic extracts of medicinal plants, *Erwmophila alternifolia* and *Eremophila duttonii* in food homogenates and milk. *Food Control*, v.18, n. 15, p. 387-390, 2006.
- PAYNE, K.D.; RICO-MUNOZ, E.; DAVIDSON, P.M. The antimicrobial activity of phenolic compounds against *Listeria monocytogenes* and their effectiveness in a model milk system. *J. Food Protect.*, v. 52, n. 3, p. 151-153, 1989.
- PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUANES, M.C.; MUNOZ, J.D.; CRUANES, G.F.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *J. Ethnopharmac.*, v. 77, p. 37-40, 2001.
- PETTI, S.; HAUSEN, H.W. Caries prediction by multiple salivary mutans streptococcal counts in caries-free children with different levels of fluoride exposure, oral hygiene and sucrose intake. *Caries Res.*, v. 34, p. 380-387, 2000.
- PETTIGREW, J. *Café*. São Paulo: Nobel, 1999. 96 p.

- PIMENTA, C.J. ; COSTA, L.; CHAGAS, S.J.R.C. Peso, acidez, sólidos solúveis, açúcares e compostos fenólicos em café (*Coffea arabica* L.), colhidos em diferentes estádios de maturação. *Rev. Bras. Armaz.*, v. 1, p. 23-30, 2000.
- RAMOS-NINO, M.E.; CLIFFORD, M.N.; ADAMS, M.R. Quantitative structure activity relationship for the effect of benzoic acids, cinnamic acids and benzaldehydes on *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 80, p. 303-310, 1996.
- RICHELE, M.; TAVAZZI, I.; OFFORD, E. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (Coffee, Cocoa, and Tea) prepared per cup serving. *J. Agric. Food Chem.*, v. 49, p. 3438-3442, 2001.
- RIOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J. Ethnopharmacol.*, v. 23, p. 127-149, 1988.
- ROSENBERG, L.; WERLER, M.M.; PALMER, J.R.; KAUFMAN, D.W.; WARSHAUER, M.E.; STOLLEY, P.D.; SHAPIRO, S. The risks of cancers of the colon and rectum in relation to coffee consumption. *Am. J. Epidemiol.*, v. 130, n. 5, p. 895-903, 1989.
- SABBAGH, N.K.; YOKOMIZO, Y.; FARIA, J.B. Influência da torrefação nos conteúdos de monossacarídeos de café arábica, robusta e do híbrido icatu. *Col. Inst. Tecnol. Alim.*, v. 8, p. 111-161, 1977.
- SABBAGH, N.K.; YOKOMIZO, Y. Efeito da torração sobre algumas propriedades químicas de cafés arábica e robusta. *Col. Inst. Tecnol. Alim.*, v. 7, p. 147-161, 1976.
- SANTOS, D.; ALMEIDA, D.F. Isolation and characterization of a new temperature-sensitive cell division mutant of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, v. 124, n. 3, p. 1502-1507, 1975.
- SANTOS, C.; FERREIRA, D.F.; BUENO FILHO, J.S.S. Novas alternativas de testes de agrupamento avaliadas por meio de simulação Monte Carlo. *Cienc. Agrotec.*, v. 25, n. 6, p. 1382-1392, 2001.
- SHELEF, L.A. Antimicrobial effects of spices. *J. Food Safety*, v. 6, p. 29-44, 1983.
- SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.*, v. 59, p. 201-222, 1995.
- SINDICAFÉ. Sindicato da Indústria de Café de São Paulo. Disponível em: <<http://www.sindicafesp.com.br>>. Acesso em: 02 de outubro de 2006.
- SIQUEIRA, J.O.; NAIR, M.G.; HAMMESRSCHIMIDT, R.; SAFIR, G.R. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. *Crit. Rev. Plant Sci.*, v. 10, n. 1, p. 63-121, 1991.

- SMITH, A.W. Introduction. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Ed.) *Coffee chemistry*, v. 1. London: Elsevier Applied Science, 1989. p. 1-41.
- SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. Food Microbiol.*, v. 26, p. 118-122, 1998.
- SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiol.*, v. 18, p. 463-470, 2001.
- SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.L. *Practical HPLC method development*, 2 ed., New York: Jonhweily & Sons, 1997. 765 p.
- SROKA, C.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem. Toxicol.*, v. 41, p. 753-758, 2003.
- STEAD, D. The effect of hydroxycinnamic acids on the growth of wine-spoilage lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 75, p. 135-141, 1993.
- TAO, L.; TANZER, J.M. Novel sucrose-dependent adhesion co-factors in *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.*, v. 81, n. 7, p. 505-510, 2002.
- TASSOU, C.; DROSINOS, E.H.; NYCHAS, G.J.E. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4°C e 10°C. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 78, p. 593-600, 1995.
- TASSOU, C.C.; NYCHAS, G.J.E. Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. *chia*) on Gram positive and Gram negative bacteria in broth and in model food system. *Int. Biodet. Biodeg.*, v. 95, p. 411-420, 1995.
- THE UNITED States Pharmacopeia, USP 23, NF 18, 1995. 2391p.
- THE UNITED States Pharmacopeia, USP 29, NF 24, 2006. 3539p.
- THOMAS, L.V.; INGRAM, R.E.; YU, S.; DELVES-BROUGHTON, J. Investigation of the effectiveness of Ascopyrone P as a food preservative. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 93, p. 319-323, 2004.
- TRUGO, L.C. Carbohydrates. . In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Ed.) *Coffee chemistry*, v. 1. London: Elsevier Applied Science, 1989. p. 83-113.
- TRUGO, L.C.; MACRAE, R. A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chem.*, v. 15, p. 219-228, 1984.
- TRUGO, L.C. *HPLC in coffee analysis*. University of Reading, UK, 1984.(Tese, PhD).
- TWENTYMAN, P.R.; LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br. J. Câncer*, v. 56, p. 279-285, 1987.

- VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: HOSTETTMANN, K. (Ed.) *Methods in plant biochemistry, assays for bioactivity*. London: Academic Press, 1991. p. 47-69.
- VAQUERO, M.J.R.; ALBERTO, M.C.; NADRA, M.C.M. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, v. 18, p. 93-101, 2007.
- VELDHUIZEN, E.J.A.; BOKHOVEN, J.L.M.T.; ZZWEIJTZER, C.; BURT, S.A.; HAAGSMAN, H.P. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, p. 1874-1879, 2006.
- VITORINO, M.D.; FRANÇA, A.S.; OLIVEIRA, L.S.; BORGES, M.L.A. Metodologias de obtenção de extrato de café visando a dosagem de compostos não-voláteis. *Rev. Bras. Armaz.*, v. 3, p. 17-24, 2001.
- WALKER, J.R.L. Antimicrobial compounds in food plants. In: Dillon, V.M.; Board, R.G. (Ed.) *Natural antimicrobial systems and food prevention*. Wallingford, 1994. p. 181-204.
- WALSH, S.E.; MAILLARD, J.Y.; RUSSEL, A.D.; CATRENICH, C.E.; CHARBONNEAU, D.L.; BARTOLO, R.G. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, v. 94, p. 240-247, 2003.
- WEISS, E.; LEV-DOR, R.; KASHAM, Y.; GOLDHAR, J.; SHARON, N.; OFEK, I. Inhibiting interspecies coaggregation of plaque bacteria with a cranberry juice constituent. *JADA*, v. 129, p. 1719-1723, 1998.
- WEN, A.; DELAQUIS, P.; STANICH, K.; TOIVONEN, P. Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiol.*, v. 20, p. 305-311, 2003.
- YAN, S.S.; PENDRAK, M.L.; ABELA-RIDDER, B.; PUNDERSON, J.W.; FEDORKO, D.P.; FOLEY, S.L. An overview of *Salmonella* typing public health perspectives. *Clin. Appl. Immunol. Rev.*, v. 4, p. 189-204, 2003.
- YEN, W.J.; WANG, B.S.; CHANG, L.W.; DUH, P.D. Antioxidant properties of roasted coffee residues. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 2658-2663, 2005.
- ZHENG, X.; ASHIHARA, H. Distribution, biosynthesis and function of purine and pyridine alkaloids in *Coffea arabica* seedlings. *Plant Sci.*, v. 166, p. 807-813, 2004.

ANEXO A

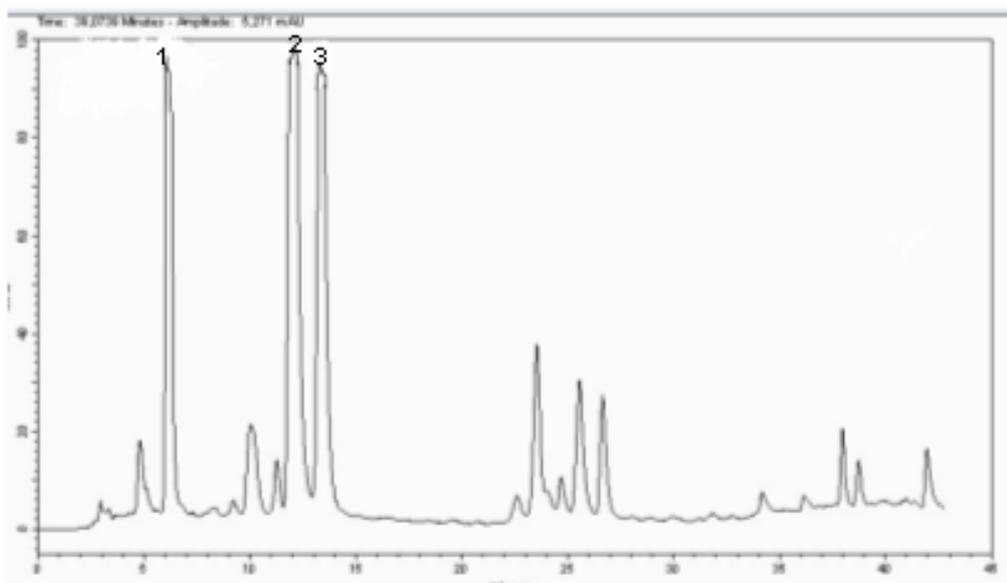


Figura A.1 Perfil cromatográfico dos ácidos clorogênicos de uma amostra de café 1-3CQA, 2- 5-CQA, 3- 4-CQA.

Condições cromatográficas coluna C-18 (5 µm, 250 x 4,6 mm), detector UV a 325 nm.