

EXTRATOS DE CAFÉ DEMOSTRAM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE AO CRESCIMENTO DE *Escherichia coli*

L. A. Canci¹, D. L. Kalschne¹, A. P. I. Byler¹, M. L. Kossar¹, V. P. Feltrin¹, E. Colla¹

1-Departamento de Alimentos – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos – CEP: 85884-000 – Medianeira – PR – Brasil, Telefone: 55 (45) 3240-8109 – Fax: 55(45)3240-8101 – e-mail: (luizacanci1@gmail.com); (daneysa@hotmail.com); (anapaulabyler@outlook.com); (mariakossar@outlook.com); (feltrin@utfpr.edu.br); (ecolla@utfpr.edu.br).

RESUMO - O café tem sido associado a benefícios à saúde, incluindo efeitos antimicrobianos. Avaliou-se a atividade antimicrobiana dos extratos de *Coffea arabica* torrado (AT) e *Coffea canephora* torrado (CT) e verde (CV) frente ao crescimento da *E. coli*. Os extratos foram adicionados ao caldo BHI nas concentrações de 0,5%, 2,5% e 5,0% (m v⁻¹) seguido da inoculação do meio com o microrganismo. A densidade ótica dos ensaios foi avaliada em intervalos de 1 h para construção das curvas de crescimento ajustadas ao modelo de Gompertz modificado. Os extratos de café produzidos com as duas espécies de café, torrado e verde, tiveram efeito antimicrobiano frente a *E. coli*. Em geral, o efeito antimicrobiano dos cafés torrados foi mais pronunciado se comparado ao verde, de modo que as melanoidinas parecem ser o composto bioativo majoritário associado a este efeito. Uma concentração de 2,5% (m v⁻¹) de CT foi efetiva na inibição total da *E. coli*.

PALAVRAS-CHAVE: Ácido clorogênico, *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, Melanoidinas, Robusta.

ABSTRACT- Coffee has been linked to health benefits, including antimicrobial effects. The antimicrobial activity of the roasted *Coffea arabica* (AT) and roasted (CT) and green (CV) *Coffea canephora* extracts was evaluated against the growth of *E. coli*. The extracts were added to the BHI broth in concentrations 0.5%, 2.5% and 5.0% (m v⁻¹) followed by inoculation of the medium with the microorganism. The optical density of the experiments was evaluated at 1 h intervals to construct the growth curves adjusted to the modified Gompertz model. The coffee extracts produced with the two coffee species, roasted and green, presented an antimicrobial effect against *E. coli*. In general, the antimicrobial effect of roasted coffees was more pronounced compared to green, and melanoidins seem to be the bioactive compound mostly associated with the antimicrobial effect. A concentration of 2.5% (m v⁻¹) of CT was effective in the total inhibition of *E. coli*.

KEYWORDS: Chlorogenic acid, *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, Melanoidins, Robusta.

1. INTRODUÇÃO

A *E. coli* é um microrganismo Gram-negativo fermentador de lactose, pertencente ao grupo dos Coliformes termotolerantes, que por sua vez pertence ao grupo dos Coliformes totais (Silva et al., 2010). Microrganismos patogênicos como a *E. coli* podem contaminar alimentos crus e processados, causando doenças entéricas que são transmitidas pelos alimentos contaminados (Tortora; Funke; Case, 2012).

Dada a crescente preocupação com a segurança alimentar, o controle microbiano na cadeia produtiva de alimentos precisa ser mais efetivo, uma vez que os microrganismos se encontram naturalmente presentes no meio

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

ambiente, em animais e no ser humano. Como solução para o controle microbiano, o uso de antibióticos e sanitizantes tem sido empregado para redução do risco de patógenos e deteriorantes. O uso abusivo destes produtos químicos pode ter contribuído para a natureza da resistência de determinadas bactérias patogênicas aos sistemas de tratamento existentes.

Um dos grandes problemas da indústria de alimentos diz respeito a formação de biofilmes que garante a adesão de certos microrganismos nos mais diversos tipos de superfícies, dificultando a remoção por métodos usuais de limpeza e sanitização. A disseminação de microrganismos em ambientes de produção e a sobrevivência dos mesmos está atrelada a capacidade de adaptação dos microrganismos formadores do biofilme. A *E. coli* é uma das bactérias produtoras de biofilme reconhecida por possuir características de sobrevivência e adaptação a condições ambientais extremas (Wijaya et al., 2016; Burt et al., 2014; Tortora et al., 2012; Silva et al., 2010).

No que tange a diminuição da resistência causada pelo uso de antibióticos e sanitizantes, o uso de compostos bioativos de origem alimentar vem despertando interesse. Quando a aplicação de compostos naturalmente presentes nos alimentos é viabilizada, tem-se como vantagem o uso de produtos que são reconhecidamente seguros em termos de ingestão, evitando a possível presença de resíduos com um determinado grau de toxicidade nos alimentos. De forma adicional, esses compostos bioativos podem, além de conferir maior estabilidade aos alimentos, fornecer um benefício na saúde dos consumidores quando presentes em concentrações adequadas.

O café é reconhecido como um alimento bioativo, com efeitos benéficos na saúde dos consumidores regulares. As espécies de café mais importantes comercialmente são o *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, sendo que o Brasil se destaca por ser o maior produtor e exportador mundial de café produzindo as duas espécies (CONAB, 2020). O café já foi muito estudado devido ao efeito fisiológico estimulante, mas atualmente sabe-se que ele gera outros benefícios à saúde, como efeito antioxidante, hepatoprotetor, hipoglicêmico, redução do risco de doenças degenerativas e cardiovasculares, câncer, diabetes tipo II, além da ação antiviral e bacteriostática frente a microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (Oestreich-Janzen, 2013; Farah; Donangelo, 2006).

No estudo da atividade antimicrobiana de novos compostos bioativos, a microbiologia preditiva destaca-se como uma ferramenta útil que faz uso de modelos matemáticos para prever o comportamento dos microrganismos, obtendo-se respostas da população bacteriana em condições experimentais controladas e com a manipulação de fatores que poderão ser reprodutíveis. O modelo de Gompertz tem sido amplamente empregado para prever os parâmetros de crescimentos de diversos microrganismos patogênicos e deteriorantes, permitindo obter respostas como a população máxima atingida (A), velocidade específica máxima de crescimento (μ) e duração da fase lag (λ) (Nakashima et al., 2000; Kalschne et al., 2014; Ross, McMeekin, 1994).

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a inibição do crescimento da *E. coli* frente a ação de extratos de café verde e torrado. Os dados obtidos foram ajustados ao modelo preditivo de Gompertz modificado (MGM) para a obtenção dos parâmetros de crescimento (população máxima atingida (A), velocidade específica máxima de crescimento (μ) e duração da fase lag (λ)).

2. MATERIAL E MÉTODOS

A cepa de *E. coli* 43888 da coleção da American Type Culture Collection (ATCC) foi previamente ativada em caldo de crescimento *Brain Heart infusion* (BHI; Merck, Darmstadt, Alemanha) e incubada em estufa bacteriológica a 35 ± 1 °C (002CB, FANEM, São Paulo, Brasil) por 12 h.

Foram preparados extratos de café seguindo-se o processo produtivo de café instantâneo em uma planta piloto industrial localizada no município de Cornélio Procópio, Paraná. As matérias primas utilizadas na produção dos extratos foram das duas principais espécies de café produzidas no Brasil, sendo os grãos torrados e verde (não torrado):

- Coffea arabica* torrado (AT);
- Coffea canephora* torrado (CT);
- Coffea canephora* verde (CV).

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br

Os extratos de café foram caracterizados quanto a cor (luminosidade e tonalidade cromática), pH, teor de cafeína, ácido 5-cafeiolquínico e melanoidinas conforme descrito por Kalschne et al. (2019).

A inibição da *E. coli* foi avaliada em três concentrações para cada um dos extratos de café, sendo elas 0,5%; 2,5%; e 5,0% ($m v^{-1}$). Na condução dos ensaios, a cultura previamente ativada foi adicionada (1,0%; $v v^{-1}$) a Erlenmeyers de 250 mL contendo 200 mL de caldo BHI adicionado das proporções de cada extrato de café. Em paralelo, foi conduzido um ensaio controle somente com caldo BHI, sem a adição de extratos de café. A incubação foi realizada em estufa bacteriológica a $35 \pm 1^\circ C$. A cada 1 h foram retiradas alíquotas de 2 mL para medida da densidade ótica em triplicata (600 nm) em espectrofotômetro (Lambda XLS, Perkin Elmer, Beaconsfield, Reino Unido). A cinética de crescimento foi acompanhada por intervalos de tempo de até 20 h até que o microrganismo atingisse a fase estacionária.

Os dados obtidos foram ajustados ao modelo matemático de Gompertz modificado para a obtenção dos parâmetros das curvas de crescimento: duração da fase lag (λ); velocidade específica máxima de crescimento (μ); e população máxima atingida (A). Foram determinados os índices estatísticos coeficiente de determinação (R^2), erro médio quadrático (MSE), fator *bias* (FB) e fator de exatidão (FE) para avaliação do ajuste dos dados ao modelo preditivo. Os dados da caracterização dos extratos de café e os parâmetros da curva de crescimento foram analisados pela correlação de *Pearson* ($p < 0,05$). Nas análises estatísticas foi utilizado o programa *Statistica* 8.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados dos parâmetros de crescimento da *E. coli* frente a ação dos extratos de café. Verificou-se que na concentração de 5,0% para o extrato AT e de 2,5% e 5,0% para o extrato CT houve a completa inibição da *E. coli*. Em contrapartida, o CV teve uma menor atividade inibitória para o microrganismo se comparada com os cafés torrados (AT e CT); entretanto, se comparado ao controle, os três extratos de café mostraram atividade antimicrobiana para *E. coli*. O aumento da fase *lag* também foi observado por Rufián-Henares e Cueva (2009) com extratos de café em concentrações de 1,0 a 5,0 $mg mL^{-1}$ para *E. coli* e, de 1,0 a 8,0 $mg mL^{-1}$ para estirpes sideróforos de *E. coli*, para a qual observou-se um acréscimo de aproximadamente 4 h na fase *lag*.

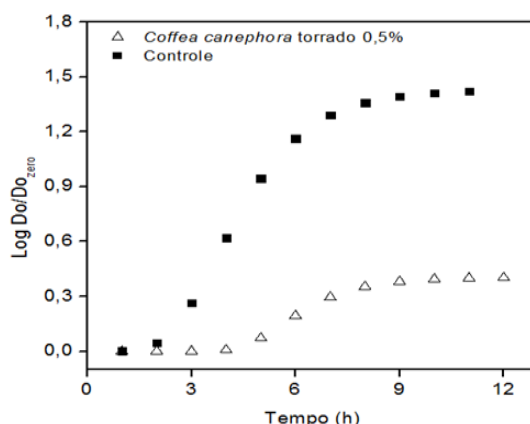
Tabela 1 - Parâmetros de crescimento da *E. coli* obtidos pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo de Gompertz modificado e índices estatísticos para avaliação do ajuste dos dados observados e preditos.

Extrato	% ($m v^{-1}$)	A	μ	λ	R^2	MSE	Fator <i>bias</i>	Fator de exatidão
AT	0.5	0,476	0,141	3,523	0,996	0,000	1,017	1,066
	2.5	0,166	0,020	5,446	0,995	0,000	0,992	1,112
	5.0	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-
CT	0.5	0,403	0,127	3,470	0,996	0,000	1,016	1,061
	2.5	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-
	5.0	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-
CV	0.5	0,979	0,320	2,619	0,997	0,001	1,021	1,066
	2.5	0,501	0,123	3,101	0,997	0,000	1,038	1,095
	5.0	0,351	0,060	3,900	0,999	0,000	1,010	1,055
Controle	-	1,429	0,370	1,326	0,994	0,004	1,008	1,092

AT: *Coffea arabica* torrado; CT: *Coffea canephora* torrado; CV: *Coffea canephora* verde; A: aumento logarítmico da população ($\log DO/DO$ inicial); μ : velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}); λ : duração da fase lag (h); R^2 : coeficiente de determinação; MSE: erro médio quadrático.

Considerando todos os ensaios da cinética de crescimento realizados, observou-se um ajuste satisfatório das curvas de crescimento obtidas e preditas, com valores de R^2 entre 0,992 e 0,999, erro médio quadrático entre 0,000 e 0,004, fator *bias* entre 0,944 e 1,059 e fator de exatidão entre 1,002 e 1,128. As curvas de crescimento preditas de para o controle e extrato CT 0,5% estão demonstradas na Figura 1.

Figura 1 - Curva de crescimento da *E. coli* para o ensaio adicionado de *Coffea canephora* torrado 0,5% e ensaio controle.



Com o objetivo de elucidar quais características de composição dos extratos de café poderiam estar associadas com o efeito antimicrobiano, observou-se a correlação entre o teor de 5-ACQ e melanoidinas (Tabela 2), que indicou que o aumento de um dos compostos impacta na redução do outro. Outra correlação observada indica que amostras com maior teor de 5-ACQ apresentaram coloração marrom mais clara, indicado pelo maior valor de L* e h°. Em contrapartida, uma relação inversa entre o valor de L* e o teor de melanoidinas foi observada, logo amostras com maior teor de melanoidinas tinham cor marrom mais intensa, com menor valor de L*. Essas correlações podem ser associadas as modificações que ocorrem nos grãos de café durante o processo de torra. O extrato de café verde teve maior teor de 5-ACQ, menor teor de melanoidinas e cor menos intensa se comparado aos extratos de café torrado (AT e CT) (Tabela 3). Durante o processo de torra, as melanoidinas são produzidas devido a ocorrência da reação de Maillard, e os ácidos clorogênicos são em parte incorporados as melanoidinas (Clifford et al., 2018).

Tabela 2 – Correlação de Pearson entre os parâmetros de caracterização dos extratos de café e parâmetros de crescimentos da *E. coli* na concentração dos extratos de café 2,5% (*p < 0,05; ** p < 0,10).

Parâmetros	Cafeína	5-ACQ	Melanoidinas	L*	h	pH	A <i>E. coli</i>	μ <i>E. coli</i>	λ <i>E. coli</i>
Cafeína	-	0,61	-0,60	0,61	0,73	0,36	0,41	0,57	-0,67
5-ACQ	0,61	-	-0,99*	1,00*	0,99**	0,96	0,97	0,99*	0,18
Melanoidinas	-0,60	-0,99*	-	-0,99*	-0,98	-0,97	-0,98	-0,99*	-0,19
L*	0,61	0,99*	-0,99*	-	0,99**	0,96	0,97	0,99*	0,18
h°	0,73	0,99**	-0,98	0,99**	-	0,90	0,92	0,98	0,01
pH	0,36	0,96	-0,97	0,96	0,90	-	0,99*	0,97	0,44
A- <i>E. coli</i>	0,41	0,97	-0,98	0,97	0,92	0,99*	-	0,98	0,40
μ- <i>E. coli</i>	0,57	0,99*	-0,99*	0,99*	0,98	0,97	0,98	-	0,23
- <i>E. coli</i>	-0,67	0,18	-0,19	0,18	0,01	0,44	0,40	0,23	-

Tabela 3 - Caracterização dos extratos de café.

	AT	CT	CV
Cafeína (g 100g ⁻¹)	2,82 ^b ± 0,04	3,30 ^a ± 0,06	3,45 ^a ± 0,15
Ácido-5-cafeoilquínico (g 100g ⁻¹)	1,35 ^b ± 0,07	0,67 ^c ± 0,04	6,76 ^a ± 0,26
Melanoidinas (AU)	0,638 ^b ± 0,001	0,686 ^a ± 0,001	0,302 ^c ± 0,001
Luminosidade	40,97 ^b ± 0,16	40,00 ^c ± 0,20	48,97 ^a ± 0,12
Tonalidade cromática	71,04 ^c ± 0,09	71,32 ^b ± 0,06	74,69 ^a ± 0,05
pH	4,68 ^b ± 0,01	4,65 ^c ± 0,01	4,73 ^a ± 0,01

AT: *Coffea arabica* torrado; CT: *Coffea canephora* torrado; CV: *Coffea canephora* verde.

Observou-se que o pH teve uma correlação positiva com a população máxima atingida, indicando que um pH maior favorece a multiplicação da *E. coli*, e conseqüentemente um maior número de células. Logo, extratos de café mais ácidos tendem a aumentar a inibição do crescimento da *E. coli*.



Em relação aos bioativos do café, uma correlação positiva entre a velocidade específica máxima de crescimento e o teor de 5-ACQ foi observada, indicando que um maior teor de 5-ACQ favorece a multiplicação mais rápida da *E. coli*. Em contraste, um maior teor de melanoidinas teve correlação negativa com a velocidade específica máxima de crescimento, indicando que quanto maior foi o teor de melanoidinas no extrato de café, maior foi a inibição, devido a menor velocidade de multiplicação das células. Como ficou indicado que amostras mais ricas em melanoidinas possuem cores marrom mais intensas, também foi observada uma correlação positiva entre a velocidade específica máxima de crescimento e o valor de L^* .

Dentre os compostos presentes nos extratos de café, observa-se que a cafeína parece não interferir na inibição microbiana da *E. coli*. Em contrapartida, existem relatos de que os ácidos clorogênicos, devido a ação antioxidante, tenham também efeitos antimicrobianos. O efeito estaria associado a membrana celular, iniciando-se pela formação de poros na membrana, o que aumentaria a permeabilidade e poderia resultar no rompimento celular (Duangjai et al., 2016; Lou et al., 2011). De forma adicional, as melanoidinas do café são consideradas compostos antioxidantes (Vignoli et al., 2014), que no presente estudo mostram-se as principais envolvidas na inibição da *E. coli*. A forma de atuação das melanoidinas sobre os microrganismos está relacionada às características da parede celular, entretanto o mecanismo de atuação ainda não está bem elucidado. No entanto, alguns fatores parecem interferir na estabilidade e integridade da membrana das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mas com diferentes propriedades na inibição entre os dois grupos. Uma das formas de atuação das melanoidinas relatadas sobre a *E. coli* está ligada a capacidade de quelar os íons Mg^{2+} da membrana externa da célula, causando a desestabilização da membrana interna (Monente et al., 2015; Langner; Rzeski, 2011; Rufián-Henares; Cueva, 2009).

De uma maneira geral, a espécie de café teve um efeito menor no potencial antimicrobiano dos extratos de café; em contrapartida, os cafés torrados mostraram-se mais promissores em detrimento ao café verde.

4. CONCLUSÃO

Observou-se que os extratos de café produzidos com as duas espécies (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*), bem como o café torrado e o verde tiveram efeito antimicrobiano frente ao crescimento da *E. coli*. Entretanto, o efeito antimicrobiano gerado pelos cafés torrados foi mais pronunciado se comparado ao café verde. Uma concentração de 2,5% ($m v^{-1}$) de *Coffea canephora* torrado foi efetiva na inibição total do crescimento da *E. coli*. Dentre os bioativos presentes nos extratos de café, as melanoidinas parecem ser o composto majoritariamente associado com o efeito antimicrobiano do café frente a *E. coli*, uma vez que estão presentes em maior teor nos extratos de café torrado.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES (Código 001), e Fundação Araucária.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Burt, S. A., Ojo-Fakunle, V. T. A., Woertman, J., Veldhuizen, E. J. A. (2014). The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in chromobacterium violaceum and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. *Plos One*. 9,1-6.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. (2020). *Acompanhamento da safra brasileira de café*. Acompanhamento Da Safra Brasileira de Grãos, 6(1), 1-62.
- Clifford, M. N., Ludwig, I. A., Crozier, A. (2018). Chemical composition of coffee beans: an overview. In: Lashermes P. (ed.), *Achieving sustainable cultivation of coffee breeding and quality traits*. Cambridge: Burleigh Dodds. p. 1-20.

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

- Duangjai, A., Suphrom, N., Wungrath, J. (2016). Comparison of antioxidant, antimicrobial activities and chemical profiles of three coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extracts. *Integrative Medicine Research*. 5(4), 324–331.
- Farah, A., Donangelo, C. M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal Plant Physiology*. 18(1), 23-36.
- Kalschne, D. L., Geitenes, S., Veit, M. R., Sarmento, C. M. P., Colla, E. (2014). Growth inhibition of lactic acid bacteria in ham by nisin: A model approach. *Meat Science*. 98, 744–752.
- Kalschne, D. L., Viegas, M. C., De Conti, A. J., Corso, M. P., Benassi, M.T. (2019). Effect of steam treatment on the profile of bioactive compounds and antioxidant activity of defective roasted coffee (*Coffea canephora*). *LWT - Food Science and Technology*. 99, 364–370.
- Langner, E., Rzeski, W. (2011). Biological Properties of Melanoidins: A Review. *International Journal of Food Properties*. 17(2), 344-353.
- Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Ma, C., Wang, Z. (2011). Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Chlorogenic Acid. *Journal of Food Science*. 76(6), 398-403.
- Monente, C., Bravo, J., Vitas, A. I., Arbillaga, L., Peña, M. P. D., Cid, C. (2015). Coffee and spent coffee extracts protect against cell mutagens and inhibit growth of food-borne pathogen microorganisms. *Journal of Functional Foods*. 12, 365–374.
- Nakashima, S. M. K., André, C. D. S., Franco, B. D. G. M. (2000). Basic Aspects of Predictive Microbiology. *Brazilian Journal of Food Technology*. 3, 41-51.
- Oestreich-Janzen, S. *Chemistry of Coffee*. In: Liu, H-W. B., Mander, L. (eds), *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*. Hamburg: Elsevier. p. 1085-1117.
- Ross, T., McMeekin, T.A. (1994). Review Paper Predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology*. 23, 241-264.
- Rufián-Henares, J. A.; Cueva, S. P. (2009). Antimicrobial Activity of Coffee Melanoidins – A Study of Their Metal-Chelating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 432–438.
- Silva, N. D., Junqueira, V.C.A., Silveira, N. F.A., Taniwaki, M. H., Santos, R. F. S.d., Gomes, R.A.R. (2010). *Manual de Métodos de Análises Microbiológica de Alimentos e água* (4. ed.) São Paulo: Varela.
- Tortora, G. J; Funke, B. R; Case, C. L. (2012). *Microbiologia*. (10. ed). Porto Alegre: Artmed.
- Vignoli, J. A., Viegas, M.C., Bassoli, D. G., Benassi, M.T. (2014). Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. *Food Research International*. 61, 279–285.
- Wijaya, W., Ridwan, R. D., Budi, H. S. (2016). The Natural Antimicrobial Carvacrol Inhibits Quorum Sensing in *Chromobacterium violaceum* and Reduces Bacterial Biofilm Formation at Sub-Lethal Concentrations. *Dental Journal*. 49(2), 99–103.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br