



EFEITO INIBITÓRIO DE EXTRATOS DE *Coffea arabica* E *Coffea canephora* FRENTE A *Salmonella Typhimurium*

L.A. Canci¹, D.L. Kalschne¹, N. K. Silva¹, C. Canan¹, F.D. Ferreira¹, 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); (nathaliakaren96@gmail.com); (canan@utfpr.edu.br); (flavioferreira@utfpr.edu.br); (ecolla@utfpr.edu.br).

RESUMO - A utilização de ingredientes a base de extratos de plantas tem demonstrado possuir atividade antimicrobiana. Nesta pesquisa, avaliou-se a atividade antimicrobiana dos extratos de *Coffea arabica* torrado (AT) e *Coffea canephora* torrado (CT) e verde (CV) frente ao crescimento da *Salmonella Typhimurium*. Soluções dos extratos, preparadas nas concentrações de 0,5%, 1,5%, 2,0%, 2,5% e 5,0% (m v⁻¹), foram testadas no tempo 0 e 20 dias após a impregnação em discos, que foram depositados sobre placas de Petri com meio sólido inoculado com o microrganismo. Os extratos de café avaliados mostraram atividade antimicrobiana no crescimento de *Salmonella Typhimurium*, sendo que não foram observados efeitos diferenciados quando avaliadas diferentes espécies de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) e extratos preparados com café torrado ou verde.

PALAVRAS-CHAVE: Ácido clorogênico, Atividade antimicrobiana, Café, Melanoidinas, Robusta.

ABSTRACT - The use of ingredients based on plant extracts has been shown to have antimicrobial activity. In this research, the antimicrobial activity of the roasted *Coffea arabica* (AT) and roasted (CT) and green (CV) *Coffea canephora* extracts was evaluated against the growth of *Salmonella Typhimurium*. Extract solutions, prepared in concentrations of 0.5%, 1.5%, 2.0%, 2.5% and 5.0% (m v⁻¹), were tested at 0 and 20 days after impregnation in discs, which were deposited on Petri dishes with solid medium inoculated with the microorganism. The evaluated coffee extracts show antimicrobial activity in the cell growth of *Salmonella Typhimurium*; differentiated effects were not observed by evaluating different coffee species (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) and extracts prepared with roasted or green coffee.

KEYWORDS: Chlorogenic acid, Antimicrobial activity, Coffee, Melanoidins, Robusta.

1. INTRODUÇÃO

No que tange o uso tecnologias limpas aplicadas para a conservação de alimentos, o emprego de extratos de origem vegetal que contém compostos bioativos é uma alternativa para as indústrias de processamento. Estes extratos são substâncias que contém princípios ativos com propriedades antioxidantes, possuem ação metabólica ou fisiológica já comprovada, e são de fácil aceitação pelo consumidor. Os extratos vegetais, possuem potencial como suplemento alimentar pró-saúde, com atividade antioxidante, anticâncer, desintoxicante e com atividade antibacteriana (Misra et al., 2017; Oestreich-Janzen, 2013; Langner; Rzeski, 2014).

Com grande potencial exploratório, os extratos vegetais que possuem atividade antibacteriana poderão ser um caminho alternativo para as indústrias de alimentos e farmacêutica, substituindo ou complementando os agentes com potencial bacteriano existentes.

A forma de atuação destes extratos no controle microbiológico abrange diversas possibilidades, seja pela atividade antimicrobiana bactericida ou bacteriostático ou pela inibição da formação de biofilmes (Mancini et al., 2018; Silva et al., 2016; Burt et al., 2014; Alvarez et al., 2012; Farah e Donangelo, 2006).

Dentre os extratos vegetais que tem se destacado em diferentes linhas de pesquisa os extratos de café



são caracterizados pela abrangência de aplicação e atuação, seja, pela promoção a saúde ou atuação como agente antimicrobiano. Os extratos de café processados como o café solúvel contem ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) que é o ácido clorogênico majoritário, estando em maior teor na espécie *Coffea arabica* em relação ao *Coffea canephora* torrado e em maior teor em extratos de café verde, em comparação ao torrado (Corso et al., 2016; Vignoli et al., 2011). Outro composto presente nos café submetidos ao processo de torra são as melanoidinas, com potencial de inibição frente a microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (Rufián-Henares; De La Cueva (2009).

A *Salmonella* é um dos microrganismos associado a doenças entéricas transmitidas por alimentos, e pesquisas tem demonstrado um aumento da sua resistência a determinados antibióticos (Meakins et al., 2008). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de inibição de extratos de café sobre o crescimento microbiano de *Salmonella* Typhimurium, com o intuito de propor uma nova alternativa de agente antimicrobiano as indústrias de processamento de alimentos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A atividade antimicrobiana dos extratos de café foi determinada utilizando-se a análise de concentração inibitória mínima (CIM). Seguiu-se a metodologia descrita por Cockerill (2012), com modificações, para a interpretação dos testes de susceptibilidade antimicrobiana e classificação da resposta *in vitro* ao agente antimicrobiano.

A cepa de *Salmonella* entérica sorovar Typhimurium ATCC 14028 foi mantida em bisel de ágar nutriente (AN; Merck, Darmstadt, Alemanha) sob refrigeração (5 ± 3 °C). A ativação da cepa foi realizada em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI; Merck, Darmstadt, Alemanha) incubado em estufa bacteriológica a 35 ± 1 °C (002CB, FANEM, São Paulo, Brasil) por 12 h. Após a ativação a suspensão bacteriana foi padronizada de modo a obter uma contagem de 10^7 UFC mL⁻¹ e inoculada (100 µL) em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo ágar Mueller-Hinton (Merck, Darmstadt, Alemanha) solidificado, e espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalski até completa absorção.

Os extratos de café utilizados como antimicrobianos foram preparados em uma planta piloto industrial localizada no município de Cornélio Procópio (PR), seguindo os padrões de processamento para café solúvel. Os extratos de café solúvel foram:

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

Foram preparadas soluções com os três extratos de café, nas concentrações de 0,5%, 1,5%, 2,0%, 2,5% e 5,0% (m v⁻¹) utilizando-se água destilada esterilizada em autoclave (CS 75 L, Prismatec, Itu, Brasil). As soluções obtidas foram impregnadas (20 µL) em discos estéreis com diâmetro de 6,3 a 6,4 mm e gramatura de 320 a 350 g (m²)⁻¹ (Kaj Lab, São Paulo, Brasil) utilizados nos testes da avaliação da CIM. Os discos impregnados foram mantidos em recipientes de boro silicato fechados com tampa de rosca sob refrigeração (5 ± 3 °C), uma vez que a CIM foi avaliada no tempo 0 e 20 dias após o preparo dos discos. Como controle negativo foram utilizados discos sem impregnar antimicrobianos. Como controle positivo foram utilizados discos com antibióticos comerciais impregnados com 5 µg de Clavacilin (Sensibiodisc, Norbrook, Brasil), 5 µg de Trimetoprim e com 10 µg de Ampicilina (Ladorelin, Paraná, Brasil).

Os discos impregnados com os extratos de café nas diferentes concentrações, controle negativo e controle positivo foram depositados com o uso de pinça estéril sobre o ágar Muller-Hinton solidificado e previamente inoculado com a *Salmonella* Typhimurium. As placas invertidas foram incubadas na temperatura de 35 ± 1 °C em estufa bacteriológica, por 16 a 20 h. Após o período de incubação, a inibição do crescimento foi evidenciada pela presença de um halo de inibição translúcido ao redor dos discos. O diâmetro dos halos foi medido utilizando um paquímetro digital (150 mm 6", Snauzer, China).

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos pela média \pm erro padrão. Os dados foram avaliados por ANOVA (Análise de Variância) e teste de Tukey ($p \leq 0,05$) utilizando-se o programa *Statistica* 8.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da CIM mostraram a presença de halos de inibição, caracterizados por uma zona sem crescimento microbiano circundada nos discos impregnados com os extratos de café e controle positivo, evidenciado por uma zona transparente, contrastando com regiões opacas causadas pelo crescimento microbiológico da *Salmonella* Typhimurium (Figura 1).

Figura 1 – Halos de inibição da *Salmonella* Typhimurium causados pela ação antimicrobiana dos extratos de café.



Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da CIM nos tempos 0 e 20 dias, com os extratos de café. No tempo zero, o extrato AT mostrou-se mais efetivo na inibição da *Salmonella* Typhimurium, gerando halos maiores, em concentrações de 1,5% ou maior ($p \leq 0,05$). Em contrapartida, os extratos CT e CV demonstraram ser efetivos na inibição do microrganismo mesmo na concentração de 0,5%. A atividade antimicrobiana evidenciada pelos extratos de café parece estar associada tanto com as melanoidinas como com o ácido clorogênico presente no café, uma vez que os extratos de café torrados apresentam maior teor de melanoidinas (estimativa de melanoidinas no extrato $0,57 \text{ mg mL}^{-1}$ a 420 nm : AT = $0,638 \text{ AU}$; CT = $0,686 \text{ AU}$; e CV = $0,302 \text{ AU}$) e um teor de ácido 5-cafeioilquínico menor (AT = $1,35 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$; CT = $0,67 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) em comparação ao CV ($6,76 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$).

Tabela 1 - Diâmetro dos halos de inibição (mm) da *Salmonella* Typhimurium devido a ação dos extratos de café como agente antimicrobiano no tempo zero (T0) e 20 dias (T20).

Extrato de café	Tempo (dias)	Concentração (m v ⁻¹)				
		0,5%	1,5%	2,0%	2,5%	5,0%
AT	T0	$8,9 \pm 0,5^{b,B}$	$10,0 \pm 0,7^{a,b,B}$	$10,4 \pm 0,1^{a,b,A}$	$11,2 \pm 0,4^{a,A}$	$10,5 \pm 0,7^{a,A}$
	T20	$6,7 \pm 0,1^{c,C}$	$7,2 \pm 0,4^{a,b,c,C}$	$8,2 \pm 0,4^{a,b,C}$	$8,3 \pm 0,8^{a,C}$	$7,2 \pm 0,4^{b,c,C}$
CT	T0	$10,6 \pm 0,6^{a,b,A}$	$11,7 \pm 0,2^{a,A}$	$9,0 \pm 0,0^{b,B,C}$	$11,0 \pm 0,0^{a,A}$	$12,0 \pm 1,3^{a,A}$
	T20	$7,6 \pm 0,3^{a,b,C}$	$7,4 \pm 0,2^{b,C}$	$8,6 \pm 0,1^{a,b,C}$	$9,0 \pm 0,8^{a,B,C}$	$8,0 \pm 0,2^{a,b,B,C}$
CV	T0	$11,2 \pm 0,9^{a,A,B}$	$10,5 \pm 0,7^{a,B}$	$9,9 \pm 0,1^{a,A,B}$	$10,3 \pm 0,1^{a,A,B}$	$10,7 \pm 0,5^{a,A,B}$
	T20	$7,1 \pm 0,4^{c,C}$	$8,0 \pm 0,1^{b,C}$	$9,3 \pm 0,7^{a,B,C}$	$7,2 \pm 0,1^{b,c,C}$	$8,4 \pm 0,2^{a,b,B,C}$

AT: *Coffea arabica* torrado; CT: *Coffea canephora* torrado; CV: *Coffea canephora* verde; letras sobrescritas minúsculas na mesma linha indicam diferença entre as diferentes concentrações de um mesmo extrato de café ($p \leq 0,05$); letras sobrescritas maiúsculas na mesma coluna indicam diferença entre os tempos T0 e T20 e entre diferentes extratos numa mesma concentração ($p \leq 0,05$).

O controle negativo evidenciou que não houve a presença de halos de inibição, indicando que a *Salmonella* Typhimurium cresceu nas placas contendo o ágar Muller-Hinton. No caso do controle positivo, verificou-se a suscetibilidade bacteriana aos antibióticos comerciais testados. Experimentalmente, a *Salmonella* Typhimurium foi sensível a utilização dos três antibióticos testados, com um halo de inibição de $23,89 \pm 1,18 \text{ mm}$ para o Clavacilin, de $20,89 \pm 1,82 \text{ mm}$ para o Trimetoprim e de $18,14 \pm 1,06 \text{ mm}$ para a Ampicilina, caracterizando a ausência de resistência microbiana da cepa frente aos antibióticos de uso comercial.

Segundo Vignoli et al. (2014), as melanoidinas e ácidos clorogênicos são responsáveis pela atividade antioxidante nos cafês. A forma de atuação ainda não está bem elucidada, mas alguns estudos têm demonstrado



que compostos como as melanoidinas atuam sobre a parede celular dos microrganismos. No entanto, alguns fatores parecem interferir na estabilidade e integridade da membrana das bactérias. Uma das formas de atuação das melanoidinas relatadas está ligada a capacidade de quelar os íons Mg^{2+} da membrana externa da célula, causando a desestabilização da membrana interna (Rufián-Henares; De La Cueva, 2009).

Em relação aos ácidos clorogênicos, efeitos sobre a membrana celular também foram relatados, iniciando-se pela formação de poros na membrana externa, o que aumenta a permeabilidade e pode resultar no rompimento celular (Duangjai et al., 2016; Lou et al., 2011). O efeito inibitório dos extratos de café pode estar relacionado as diferenças na constituição da parede celular das bactérias ou pelo fato de possuir o poder redutor de metais e a capacidade sequestrante de radicais livres (Oestreich-Janzen, 2013; Alvarez et al., 2012; Abrahão et al., 2010; Rufián-henares; De La Cueva, 2009). Segundo Tortora et al., (2012), uma das formas de atuação estaria associada a membrana externa, uma barreira seletiva devido a formação de canais ligado a atuação de proteínas da membrana (porinas), que permitiria a passagem de algumas moléculas como os compostos bioativos do café.

De forma similar, outras pesquisas com diferentes microrganismos também evidenciaram a atividade inibitória dos extratos de café em bactérias Gram-positivas como o *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*, e bactérias Gram-negativas como a *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Pseudomonas aeruginosa* (Duangjai et al., 2016; Runti et al., 2014).

Após 20 dias de armazenamento dos discos previamente preparados, observou-se uma redução no poder de inibição da *Salmonella* Typhimurium para todos os extratos de café em comparação com o tempo zero. Acredita-se que a diminuição da atividade antimicrobiana dos extratos de café tem relação com um dos principais compostos bioativos do café, o ácido clorogênico, que tem o seu teor reduzido quando armazenado por longos períodos; esta alteração ocorre devido a capacidade dos compostos clorogênicos participarem em reações de oxidação, sendo então degradados (Rendón et al., 2014, Rodrigues et al., 2013). Ressalta-se que, mesmo armazenados em frasco de boro silicato, os discos impregnados com os extratos de café tiveram contato com o oxigênio, o que pode ter favorecido as reações oxidativas.

Comparando-se os três extratos de café, destaca-se que todos demonstraram potencial antimicrobiano evidenciado pela presença de halos de inibição ao redor dos discos depositados nas placas com meios de cultura. Com base nos testes da CIM utilizando os discos impregnados com os extratos de café, observou-se que as duas espécies de café torrado avaliadas (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*), bem como o extrato de café verde tiveram atividade antimicrobiana potencial na inibição da *Salmonella* Typhimurium.

4. CONCLUSÃO

Os extratos de café avaliados mostraram atividade antimicrobiana na inibição da *Salmonella* Typhimurium, sendo observados efeitos quando avaliadas diferentes espécies de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) e extratos preparados com café torrado ou verde. Os bioativos melanoidinas e ácidos clorogênicos parecem ser os principais compostos envolvidos na atividade antimicrobiana. A comprovada ação antimicrobiana dos extratos de café frente a inibição da *Salmonella* Typhimurium abre novas possibilidades de utilização destes extratos como um composto alternativo ao controle do crescimento microbiano em alimentos.

5. AGRADECIMENTOS

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



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez, M. V.; Moreira, M. R.; Ponce, A. (2012). Antiquorum sensing and antimicrobial activity of natural agents with potential use in food. *Journal of Food Safety*. 32, 379-387.
- Abrahão, S.A., Pereira, R.G.F.A., Duarte, S. M. d. S., Lima, A.R., Alvarenga, D.J., Ferreira, E.B. (2010). Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). *Ciência e Agrotecnologia*. 34(2) 414-420.
- 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.
- Cockerill, R. F., Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard: M07-A9. (2012). Clinical and Laboratory Standards Institute. 32 (5)1-88. Disponível em: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07>.
- Corso, M. P.; Vignoli, J. A.; Benassi, M. T. (2016). Development of an instant coffee enriched with chlorogenic acids. *Journal of Food Science and Technology*. 53(3), 1380-1388.
- Duangjai, A., Suphromb, N., Wungrathc, J., Ontawonga, A., Nuengchamngongd, N., Yosboonruange, A. (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.
- Langner, E., Rzeski, W. (2014). 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. M: Food Microbiology & Safety: *Journal of Food Science*. 76(6), 398-403.
- Mancini, R. S.; Wang, Y; Weaver, D. F. (2018). Phenylindanes in Brewed Coffee Inhibit Amyloid-Beta and Tau Aggregation. *Frontiers in Neuroscience*. 12, 1-14.
- Meakins, S., Fisher, I.S.T., Berghold, C., Gerner-Smidt, P., Tscha, H., Cormican, M., Luzzi, I., Schneider, F., Wannett, W., Coia, J., Echeita, A., Threlfall, E.J. (2008). Antimicrobial Drug Resistance in Human Nontyphoidal Salmonella Isolates in Europe 2000-2004: A Report from the Enter-net International Surveillance Network. *Microbial Drug resistance*. 14 (1) 31-35.
- Misra, N. N., Koubaab, M., Roohinejad, S., Julianoe, P., Alpasf, H., Inácio, R. S., Saraivag, J. A., Barbah, F. J. (2017). Landmarks in the historical development of twenty first century food processing technologies. *Food Research International*, 97, 318-339.
- Rendón, M. Y., Salva, T. D. J. G., Bragagnolo, N. (2014). Impact of chemical changes on the sensory characteristics of coffee beans during storage. *Food Chemistry*. 147, 279-286.
- 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, L. N., Zimmer, K. R., Macedo, A. J., Trentin, D.S. (2016). Plant natural products targeting bacterial virulence factors. *American Chemical Society*. 116, 9162-9236.
- Rodrigues, N. P., Benassi, M. T., Bragagnolo, N. (2013). Scavenging capacity of coffee brews against oxygen and nitrogen reactive species and the correlation with bioactive compounds by multivariate analysis. *Food Research International*. 61, 228-235.
- Runti, G., Pacor, S., Colomban, S., Gennaro, R., Navarini, L., Scocchi, M. (2014). Arabica coffee extract shows antibacterial activity against *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis* and low toxicity towards a human cell line. *LWT - Food Science and Technology*. 62(1), 108-114.
- Tortora, G. J; Funke, B. R; Case, C. L. (2012). Microbiologia. (10. ed.) Porto Alegre: Artmed.
- Vignoli, J. A.; Bassolli, D. J.; Benassi, M. T. (2011). Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*. 124(2), 863-868.
- 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.