

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS MEDIANEIRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

LUIZA ANDRÉA CANCI

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS DE CAFÉ NA
INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS**

DISSERTAÇÃO

MEDIANEIRA

2020

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS MEDIANEIRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

LUIZA ANDRÉA CANCI

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS DE CAFÉ NA
INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Medianeira, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Colla

Coorientadora: Dr^a. Daneysa L. Kalschne

MEDIANEIRA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Canci, Luiza Andréa

Potencial antimicrobiano de extratos de café na inibição de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas / Luiza Andréa Canci. – Medianeira, 2020.

1 arquivo de texto (62 f):PDF ; 3.362 KB.

Orientadora: Eliane Colla

Coorientadora: Daneysa Lahis Kalschne

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Medianeira, 2020.

Inclui bibliografia: f. 57-62

1.Café indústria. 2.Bebidas indústria. 3. Tecnologia de Alimentos – Dissertações. I. Cola, Eliane, orient. II. Kalschne, Daneysa Lahis, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

Biblioteca da UTFPR - Câmpus Medianeira

Bibliotecária/Documentalista:

Marci Lucia Nicodem Fischborn – CRB-9/1219



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

PPGTA UTFPR
Programa de Pós-Graduação
em Tecnologia de Alimentos

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos

TERMO DE APROVAÇÃO

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS DE CAFÉ NA INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS

Por

LUIZA ANDRÉA CANCI

Esta dissertação foi apresentada às catorze horas, do dia vinte e oito de maio de dois mil e vinte como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Ciência e Tecnologia de Produtos Alimentícios, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof^a. Dr^a. Eliane Colla (Orientadora–PPGTA)

Prof. Dr. Flávio Dias Ferreira (Membro Interno –PPGTA)

Prof^a. Dr^a. Jane Martha Graton Mikcha (Membro Externo – UTFPR)

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Programa

A mulher que muito inspira-me, minha
mãe Ernestina. Ensinou-me a ser forte,
agir com serenidade e nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, por todas as bênçãos e oportunidades que tenho recebido. A minha família por todo o apoio e compreensão.

Meu agradecimento a Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela oportunidade de adquirir conhecimento em tão renomada instituição.

Agradecimento e muita gratidão a professora Eliane Colla e a Daneysa L. Kalschne por terem aceitado o desafio de orientar-me nesta caminhada, direcionando-me de forma generosa, com sabedoria, conhecimento e por toda a paciência e contribuições que fizeram toda a diferença neste trabalho e em minha vida, muito obrigada.

Aos professores do PPGTA, por todo o conhecimento e direcionamento durante este período que fiz parte como aluna da instituição. O agradecimento em especial a professora Cristiane Canan por todo o auxílio e ajuda durante a utilização dos laboratórios. Aos professores Ilton Baraldi, Marta Benassi, Eder Flores, Juliana Bortoli, Oldair Leite e Deisy A. Drunkler, na disponibilidade e empréstimos de equipamentos e materiais. Aos professores Flavio D. Ferreira e Valdemar Padilha Feltrin, por todas as contribuições e considerações efetuadas para a finalização deste trabalho.

Muito obrigada a Frimesa, na pessoa da Karem de Luca Paz, Neusa Utzig e Andrielli Graff pela liberação das atividades dando-me a oportunidade para a realização desta especialização. A Café Iguaçu, pela disponibilização dos extratos de café, sem os quais não seria possível a realização dos testes.

A Ana Byler e Ana Rossi por toda ajuda, solidariedade e contribuição aos trabalhos realizados no Lamag, com a ajuda de vocês ficou mais fácil. As colegas do mestrado, por muitos momentos de companheirismo e ajuda em momentos difíceis, em especial a Eloisa Cola, Pauline Godoi, Maristela Rupp, Naiara Mucke e Elisandra Detoni.

Agradecimento as colegas de trabalho, Carla, Luana, Erica, Raquel, Larissa e Isis, pelo companheirismo e auxílio nas frequentes ausências.

Aos amigos pela compreensão, apoio e solidariedade em períodos de provas, realização de análises e pelas muitas palavras de incentivo. A todos os servidores da UTFPR pelo auxílio prestado em muitos momentos.

Só posso deixar aqui, a minha eterna gratidão a todos que contribuíram para o desenvolvimento e finalização deste trabalho, sem vocês nada seria possível, muito obrigada!

“Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar uma alma. E você aprende que amar não significa apoiar-se. E que companhia nem sempre significa segurança. Começa a aprender que beijos não são contratos e que presentes não são promessas. Começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança.”

William Shakespeare

RESUMO

CANCI, Luiza. A. Potencial antimicrobiano de extratos de café na inibição de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. 2020. 62 folhas. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2020.

Ingredientes a base de extratos de plantas como o café tem as características de serem naturais, seguros, saudáveis e possuem atividade antioxidante, devido a presença de compostos bioativos, como os ácidos clorogênicos, cafeína e as melanoidinas, os quais também podem apresentar atividade antibacteriana. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antibacteriano dos extratos de café arábica (*Coffea arábica*) torrado (AT), café canéfora (*Coffea canéfora*) torrado (CT) e café canéfora (*Coffea canéfora*) verde (CV) frente a *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus*. Inicialmente foi realizada a quantificação de melanoidinas, cafeína e ácidos clorogênicos nos extratos de café citados. Para a triagem inicial do efeito inibitório e dos microrganismos sensíveis aos extratos de café, foi avaliada a sensibilidade bacteriana, por meio da impregnação de discos estéreis com extratos nas concentrações de 0,5; 1,5; 2,0; 2,5; e 5,0% (m/v), os quais foram depositados em meios sólidos específicos inoculados com os microrganismos alvo e avaliados no tempo zero e vinte dias de armazenamento sob refrigeração. Como controle positivo foram utilizados discos contendo antibióticos de uso comercial (Amoxicilina ácido clavulânico, Trimetoprim (5 µg) e Ampicilina (10 µg)). *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* mostraram-se sensíveis aos extratos de café; logo, foram selecionadas três concentrações (0,5%, 2,5% e 5,0%) para o acompanhamento do crescimento celular em meio líquido, pela leitura da densidade óptica a 600 nm, em intervalos pré-definidos de 1 h. Os dados obtidos foram ajustados ao modelo matemático de Gompertz modificado (MGM), obtendo-se os parâmetros de crescimento duração da fase lag (λ), velocidade específica máxima de crescimento (μ) e população máxima atingida (A). Dentre os extratos de café, o CT a 5,0% apresentou a melhor atuação na atividade antibacteriana para *Salmonella* Typhimurium, com redução de 1,3 ciclos log, inibição da *Escherichia coli* (1.4 ciclos log) e *Staphylococcus aureus* (1.5 ciclos log). Este extrato apresentou o maior teor de melanoidinas comparado aos extratos de café AT e CV, indicando que a atividade inibitória pode estar associada a presença destes compostos nos extratos avaliados. Desta forma, o extrato de café CT a 5,0% foi utilizado para avaliação do desempenho em matriz alimentar (leite em pó desnatado reconstituído) inoculada com 0,1% (v/v) (contagem inicial 10^5 UFC mL⁻¹) de *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarum*, sendo uma amostra incubada a 5 °C e outra a 35 °C, para cada microrganismo. O crescimento microbiano foi acompanhado a cada 12 h, por inoculação em meios sólidos diferenciais para cada microrganismo, no intervalo de zero a 72 h. Os resultados foram ajustados ao modelo de Gompertz modificado (MGM), obtendo-se os parâmetros de μ e A . Foi possível observar o efeito antimicrobiano do extrato de café CT sem interferência da matriz alimentar, com a redução da população máxima (A) para *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Para *Salmonella* e *Escherichia coli*, houve uma diminuição na velocidade específica máxima de crescimento (μ) na faixa de temperatura de 5 °C, e uma redução de 1,12 e 1,58 ciclo

log na população máxima atingida, respectivamente. No entanto, a 35 °C a redução da população foi inferior (0,29 e 0,62 ciclos log) quando comparada aos controles. Para o *Staphylococcus aureus*, nas temperaturas de 5°C e 35°C, observou-se a redução da população máxima de 1,72 e 2,83 ciclos log, respectivamente, valores estes justificados pela diminuição na velocidade específica máxima de crescimento. Para o *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarum* não houve inibição do crescimento na matriz alimentar com o extrato de café CT a 5,0%, nas temperaturas aplicadas. Conclui-se que a concentração de 5,0% de café canéfora torrado (CT) demonstrou êxito na inibição dos patógenos *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* quando cultivados em meio líquido e também quando inoculados em leite em pó reconstituído, demonstrando a capacidade de inibição da atividade biológica. No entanto, este extrato de café (CT a 5,0%), não demonstrou atividade inibitória frente ao *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarum* tanto nos testes iniciais de sensibilidade em ágar quanto na matriz leite em pó, demonstrando ser aplicável em matrizes contendo estes probióticos, sem causar a inibição dos mesmos.

Palavras-chave: ácidos clorogênicos, melanoidinas, *Coffea arabica*, *Coffea canephora*.

ABSTRACT

CANCI, Luiza. A. Antimicrobial potential of coffee extracts to inhibit Gram-positive and Gram-negative bacteria inhibition. 2020. 62 sheets. Dissertation (Master in Food Technology) - Graduate Program in Food Technology, Federal Technological University of Paraná. Medianeira, 2020.

Plant extracts ingredients as coffee have the characteristic of being natural, safe, and healthy, mainly due its antioxidant activity ensured by the presence of bioactive compounds as chlorogenic acids, caffeine, and melanoidins, which may also have antibacterial activity. The objective of this study was to evaluate the antibacterial effect of arabica roasted (*Coffea arabica*) extracts (AT), robusta roasted (*Coffea canephora*) coffee (CT) and robusta green (*Coffea canephora*) coffee (CV) against *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, and *Lactobacillus rhamnosus*. Initially, the determination of melanoidins, caffeine, and chlorogenic acids was performed in the coffee extracts mentioned. For the initial screening of the coffee extract inhibitory effect bacterial sensitivity was assessed by the evaluation sterile discs impregnation with coffee extracts in concentrations of 0.5; 1.5; 2.0; 2.5; and 5.0% (m v⁻¹), which were deposited in specific solid media inoculated with the target microorganisms; the inhibitory effect was evaluated at zero and twenty days of storage under refrigeration. As a positive control, disks containing antibiotics for commercial use as Amoxicillin clavulanic acid and Trimetoprim (5 µg), and Ampicillin (10 µg). *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* showed coffee extract sensitive, and three concentrations (0.5%, 2.5%, and 5.0%) were selected for cell growth monitoring in liquid medium. The tests were evaluated by optical density reading at 600 nm, at predefined intervals of 1 h and the data obtained were adjusted to the modified Gompertz mathematical model (MGM), in order to obtain the growth parameters of lag phase duration (λ), maximum specific growth rate (μ), and logarithmic increase in the population (A). Among coffee extracts, 5.0% CT showed the best performance in antibacterial activity reduction for *Salmonella* Typhimurium (1.3 log cycle), for *Escherichia coli* (1.4 log cycle), and for *Staphylococcus aureus* (1.5 log cycle). The coffee extract CT presented the highest content of melanoidins compared to others, indicating that the inhibitory biological activity may be associated with the presence of these compounds in the evaluated extracts. Moreover, the CT extract was used to evaluate the antibacterial performance in food matrix (reconstituted skimmed-milk powder) by the addition of 5.0% and inoculated with 0.1% (v/v) (initial count of 10⁵ UFC mL⁻¹) of *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Lactobacillus plantarum*, with a sample incubated at 5 °C and another at 35 °C, for each microorganism. Microbial growth was monitored every 12 h, by inoculation in suitable solid media for each microorganism, up to 72 h. The results were adjusted to the

modified Gompertz model (MGM), obtaining the parameters of μ and A. It was possible to observe the antimicrobial effect of the coffee extract CT without interference from the food matrix, with the reduction of the logarithmic increase in the population (A) for *Salmonella*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. For *Salmonella* and *Escherichia coli*, there was a decrease in the maximum specific growth rate (μ) in the temperature of 5 °C, and a reduction of 1.12 and 1.58 log cycle, respectively; however, at 35 °C the microorganisms reduction was lower, 0.29 and 0.62 log cycle if compared to controls. For *Staphylococcus aureus*, at temperatures of 5 °C and 35 °C, a reduction in the logarithmic increase in the population of 1.72 and 2.83 log cycle was observed, respectively, values justified by the decrease in the maximum specific growth rate. For *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus plantarum* there was no growth inhibition in the food matrix with 5.0% CT coffee extract, at the temperatures evaluated. It is concluded that the 5.0% concentration of robusta roasted coffee (CT) demonstrated success in inhibiting the pathogens *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* grown in liquid medium and food matrix reconstituted powdered milk. However, this coffee extract (CT at 5.0%), did not show inhibitory activity against *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus plantarum* in the initial agar sensitivity and in the milk powder matrix tests, demonstrating to be applicable in matrices containing these probiotics.

Keywords: chlorogenic acids, melanoidins, *Coffea arabica*, *Coffea canephora*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Extratos de café, conservação dos discos e adição em ágar diferencial. ...	29
Figura 2- Amostras de café, incubação e leitura da densidade ótica.	30
Figura 3- Suspensões de leite em pó com inóculo	31
Figura 4- Halos de inibição	35
Figura 5- Curva de crescimento do ensaio adicionado de <i>Coffea canephora</i> torrado 0,5% e ensaio controle para (A) <i>Salmonella</i> Typhimurium, (B) <i>Escherichia coli</i> e (C) <i>Staphylococcus aureus</i>	44
Figura 6- Curvas de crescimento dos ensaios na matriz leite em pó reconstituído adicionada de <i>Coffea canephora</i> torrado 5,0% e ensaios controle para (A) <i>Salmonella</i> Typhimurium, (B) <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> (C), <i>Lactobacillus plantarum</i> (D), <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (E).	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Caracterização dos extratos de café.....	33
Tabela 2- Diâmetro dos halos de inibição (em mm) <i>Salmonella</i> para Typhimurium, <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Lactobacillus rhamnosus</i> frente a ação dos extratos de café como agente inibidor no tempo zero (T0) e vinte dias (T20) de armazenamento.....	37
Tabela 3- Parâmetros de crescimento A , μ e λ obtidos para <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo Gompertz modificado e índices estatísticos para avaliação do ajuste do modelo aos dados experimentais.....	42
Tabela 4- Correlação de Pearson entre os parâmetros de caracterização dos extratos de café e parâmetros de crescimentos dos microrganismos estudados.	46
Tabela 5- Parâmetros de crescimento A , μ e λ obtidos para <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Lactobacillus rhamnosus</i> pelo ajuste dos dados experimentais do crescimento em leite em pó reconstituído ao modelo de Gompertz modificado e índices estatísticos para avaliação do ajuste do modelo aos dados experimentais.	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 PROCESSAMENTO DO CAFÉ E PRESENÇA DE COMPOSTOS BIOATIVOS ..	19
3.2 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS E DETERIORANTES DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS	22
3.3 APLICAÇÃO DE EXTRATOS DE CAFÉ COMO AGENTE COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 MEIOS DE CULTURA, EXTRATOS DE CAFÉ E MICRORGANISMOS	25
4.1.1 Meios de cultura	25
4.1.1.1 Extratos de café	25
4.1.2 Microrganismos	26
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE CAFÉ	27
4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS DE CAFÉ ..	28
4.3.1 Teste de sensibilidade dos microrganismos aos extratos de café.	28
4.3.2 Potencial de inibição dos extratos de café nos cultivos em meios líquidos	29
4.3.3 Avaliação do potencial de inibição dos extratos de café em matriz alimentar	30
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE CAFÉ	33
5.2 AÇÃO INIBITÓRIA DOS EXTRATOS DE CAFÉ	34
5.2.1 Determinação da sensibilidade microbiana aos extratos de café	34
5.2.2 Potencial de inibição dos extratos de café nos cultivos em meios líquidos	41
5.2.3 Potencial de inibição dos extratos de café nos cultivos em leite em pó reconstituído	49
6 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

Métodos tradicionalmente conhecidos para a conservação de alimentos e estendimento da vida útil, pela aplicação de aditivos e conservantes, associados a temperatura controlada são usados para o controle microbiano. No entanto a aplicação de aditivos naturais que permitam o entendimento da fase lag é uma nova alternativa ao controle microbiológico de patógenos e deteriorantes (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Os aditivos alimentares utilizados tradicionalmente no controle de alterações em alimentos, vem dando espaço a novos aditivos com um apelo mais consciente, pela substituição por aditivos naturais, na industrialização de alimentos (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015). Além da deterioração de alimentos, os microrganismos podem estar associados a doenças de origem alimentar (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012), destacando-se como uma necessidade científica atual a busca por substâncias antimicrobianas, especialmente as de origem natural (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015) e que atuem promovendo a segurança de alimentos (SINGH, VEER PAL, 2018).

Os compostos bioativos encontrados em extratos vegetais e em grãos como o café tem despertado o interesse de pesquisadores, devido ao fato de possuírem ação inibitória frente a alguns microrganismos e podendo ser aplicáveis a indústria, especialmente de alimentos. No café, o composto bioativo mais abundante é a cafeína, conhecido pelo seu efeito estimulante. Outros compostos bioativos como os ácidos clorogênicos estão presentes em maior proporção no café não torrado (verde), sofrendo uma redução no processo de torra, formando novos compostos. As alterações durante a torra ocorrem entre os grupos redutores de açúcares e os grupos amino livres de proteínas ou aminoácidos, originando as melanoidinas (VIGNOLI et al., 2014).

Diversos pesquisadores têm se dedicado ao estudo dos efeitos benéficos do café na saúde humana, com foco na composição dos extratos e na exploração da sua capacidade antioxidante, anticâncer, desintoxicante e antibacteriana (OESTREICH-JANZEN, 2013; LANGNER; RZESKI, 2013). Dentre estes estudos, a possibilidade de aplicação dos extratos de café como agente antimicrobiano tem se destacado, seja

pela diversidade de aplicações ou pela facilidade de incorporação em matrizes alimentares, devido as características sensoriais bem conhecidas do café por parte dos consumidores.

Os extratos de café têm atividade comprovada frente a microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (MONENTE et al., 2014), devido a presença de flavonoides e melanoidinas, essas últimas em maior concentração nos cafés torrados (OESTREICH-JANZEN,2013).

Os extratos de café podem ser utilizados como um ingrediente alimentar adicional, com capacidade de promover a segurança de alimentos devido a propriedade de inibir ou retardar o crescimento de microrganismos patogênicos como *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e *E. coli* (MONENTE et al., 2014; LANGNER; RZESKI, 2013).

A forma de atuação e utilização destes extratos no controle microbiológico abrange diversas possibilidades, seja pela atividade antimicrobiana bactericida ou bacteriostática, na inibição da formação de biofilmes ou agindo em biofilmes pré-existentes, atuando como antioxidante, na inibição da agregação de neuroprotetores (Doenças de Alzheimer e Parkinson) e na inibição do mecanismo de comunicação microbiana (MANCINI; WANG; WEAVER, 2018; SILVA et al., 2016; BURT et al., 2014; ALVAREZ; MOREIRA; PONCE, 2012).

Baseado neste contexto, o extrato de café pode ser uma alternativa na inibição das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, caracterizando-se como um ingrediente natural que pode trazer benefícios aos alimentos, com características sensoriais diferenciadas. Os extratos de café poderão ser aplicados mantendo a atividade das bactérias lácticas, enquanto podem retardar ou inibir a atividade biológica de bactérias patogênicas, promovendo a segurança de alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o efeito de extratos de *Coffea arabica* torrado (AT), *Coffea canephora* torrado (CT), e *Coffea canephora* verde (CV) na inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e selecionar o extrato de café com melhor desempenho microbiológico para aplicação em matriz alimentar (leite em pó desnatado) para avaliação da estabilidade microbiológica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os extratos de café quanto ao teor de cafeína, ácido-5-cafeiolquínico, e melanoidinas, e quanto aos parâmetros de cor e pH;
- Determinar a sensibilidade bacteriana de bactérias Gram-negativas (*Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus*) frente aos extratos de *Coffea arabica* torrado (AT), *Coffea canephora* torrado (CT), e *Coffea canephora* verde (CV) em testes de difusão em ágar;
- Avaliar a cinética de crescimento celular em meio líquido dos microrganismos sensíveis aos extratos de café, avaliando-se os extratos/concentrações com maior atividade antibacteriana e ajustar os dados experimentais ao modelo de Gompertz modificado (MGM) para a obtenção dos parâmetros de crescimento [(duração da fase *lag* (λ), velocidade específica máxima de crescimento (μ) e população máxima atingida (A)];
- Aplicar o extrato de café em matriz alimentar (leite em pó reconstituído) para avaliação do potencial de inibição do crescimento microbiano, avaliando os parâmetros de crescimento (λ , μ , A) obtidos pelo ajuste dos dados de crescimento celular em meio sólido ao modelo matemático de Gompertz modificado (MGM).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PROCESSAMENTO DO CAFÉ E PRESENÇA DE COMPOSTOS BIOATIVOS

O café é uma das bebidas mais conhecidas e consumidas no mundo, possuindo características aromáticas e efeito estimulante psicoativo. As principais formas de café comercialmente disponíveis estão na forma de pó, pela torra dos grãos e moagem, ou na forma atomizada ou liofilizada para preparações instantâneas. O café torrado (endosperma) corresponde ao grão beneficiado do fruto maduro de espécies do gênero *Coffea*, que é submetido ao tratamento térmico até atingir o ponto de torra escolhido (BRASIL, 2005).

O processo para a obtenção do café solúvel ou instantâneo resulta da desidratação do extrato aquoso, obtido do café torrado. A extração é realizada em altas temperaturas, seguida da concentração e secagem dos extratos. A classificação é de acordo com o processo de desidratação, podendo ser por atomização, onde o extrato aquoso no estado líquido é pulverizado em atmosfera aquecida, ocorrendo a evaporação da água e a formação das partículas secas. Outra forma de obtenção do café solúvel é por liofilização. Neste processo, o café no estado líquido é congelado com posterior remoção da água por sublimação, e a formação de partículas secas (BRASIL, 1999; CORSO; VIGNOLI; BENASSI, 2016; OESTREICH-JANZEN, 2013).

O processo de torrefação dos grãos de café é essencial para a produção de uma bebida com atributos desejáveis de sabor e aroma. As principais alterações das características visuais ocorrem pela formação de uma pigmentação marrom, as melanoidinas, que são formadas pela reação de Maillard; estas alterações estão relacionadas a decomposição de alguns compostos como aminoácidos e carboidratos e a formação de outros em reações químicas complexas (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009).

As melanoidinas tem sido associadas com propriedades biológicas incluindo a atividade antioxidante (CONTRERAS-CALDERÓN et al., 2016; PASTORIZA; RUFÍÁN-HENARES, 2014), atividade antimicrobiana (RUFÍÁN-HENARES; CUEVA, 2009), ambas influenciadas pelo poder de quelar metais (PASTORIZA; RUFÍÁN-HENARES, 2014). O teor de melanoidinas no café solúvel pode variar de 18,07 a

29,64 g 100 g⁻¹ para o *Coffea arabica* e de 19,66 a 30,44 g 100 g⁻¹ para o *Coffea canephora* (VIGNOLI; BASSOLLI; BENASSI, 2011).

No processo de torra também ocorre a formação de compostos aromáticos voláteis com cerca de 20% da matéria seca e cerca de 80% de compostos de baixo peso molecular (3 kDa), e resíduos de alto peso molecular (12 kDa) com possível atividade antimicrobiana (OESTREICH-JANZEN, 2013; ABRAHÃO et al., 2010; BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009).

As espécies de café para as quais são encontrados mais dados científicos sobre a composição química são *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, com as suas cultivares. Originalmente o café foi estudado pelo seu efeito fisiológico estimulante, e posteriormente o uso dos seus extratos trouxe novos conceitos e um novo foco a bebida. A disponibilidade de tecnologias permitiu avaliar os compostos dos extratos e verificar a sua atividade biológica e o potencial como antioxidante, hepatoprotetor, hipoglicêmico, atuação frente a doenças degenerativas, cardiovasculares e diabetes tipo II, além da ação antiviral e bacteriostática frente a microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (OESTREICH-JANZEN, 2013; FARAH; DONANGELO, 2006).

A cafeína é o principal alcaloide encontrado no café e um de seus componentes mais estudados (MOREIRA; TRUGO; MARIA, 2000). A sua biossíntese ocorre nas folhas, pericarpo, e externamente no fruto, e posteriormente se acumula no endosperma (OESTREICH-JANZEN, 2013). A cafeína tem sido investigada por sua ação antioxidante e propriedades anticarcinogênicas, atribuída a atividade sequestrante contra espécies reativas de oxigênio (hidroxil, peroxil e oxigênio singlete) (GEORGE; RAMALAKSHMI; RAO, 2008; SHI; DALAL; JAIN, 1991).

A cafeína é um bioativo estável ao processo de torra e dependente da espécie de café (ABRAHÃO et al., 2010). Foram reportadas médias de 4,70 g 100 g⁻¹ e 4,20 g 100 g⁻¹, respectivamente para o *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (VIGNOLI et al., 2014). Para extratos de café solúvel, um teor de 2,84 a 4,12 g 100 g⁻¹ foram relatados para a espécie *Coffea arabica*, e de 3,80 a 5,82 g 100 g⁻¹ para o *Coffea canephora* (CORSO; VIGNOLI; BENASSI, 2016; VIGNOLI; BASSOLLI; BENASSI, 2011).

Os compostos fenólicos mais abundantes são os ácidos clorogênicos (ACG), e estão em maior teor em grãos com qualidade inferior por estarem associados a condições de estresse das plantas (ABRAHÃO et al., 2010; FARAH; DONANGELO, 2006). São metabólitos secundários nas plantas, que se acumulam no endosperma, e são encontrados em maior quantidade no café verde (OESTREICH-JANZEN, 2013;

ABRAHÃO et al., 2010). O ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) é o ácido clorogênico majoritário encontrado no café (PERRONE et al., 2008; RUNTI et al., 2014; VIGNOLI et al., 2014).

O *Coffea arabica*, em diferentes graus de torra, possui de 5,96 a 0,22 g 100 g⁻¹ de 5-ACQ, enquanto o *Coffea canephora* possui de 6,19 a 0,12 g 100 g⁻¹, considerando ainda que o 5-ACQ é instável às temperaturas da torra, podendo alcançar um decréscimo superior a 95% do teor inicial no café verde com o avanço do grau de torra (VIGNOLI et al., 2014). Em extratos de café solúvel obtidos a partir da espécie *Coffea arabica* e *Coffea canephora* o teor de 5-ACQ variou de 0,40 a 4,11 g 100 g⁻¹ e 0,21 a 4,19 g 100 g⁻¹, respectivamente (CORSO; VIGNOLI; BENASSI, 2016; VIGNOLI; BASSOLLI; BENASSI, 2011).

No processo de torra ocorre a decomposição dos ácidos clorogênicos livres a ácido quínico e ácido cafeico, para formação das quinidas, que são incorporados as melanoidinas com diferentes pesos moleculares. As altas temperaturas resultam na formação de lactonas clorogênicas (quinetos) formados durante uma torra mais leve. Outra importante transformação se faz via descarboxilação e ciclização a fenilindanos, componente este, identificado por um forte amargor do café, e está associado a torras mais escuras. A reação de polimerização dos ácidos clorogênicos está associada a formação da pigmentação marrom escuro (MANCINI; WANG; WEAVER, 2018; VIGNOLI et al., 2014; OESTREICH-JANZEN, 2013; ABRAHÃO et al., 2010; BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009; FARAH; DONANGELO, 2006).

As principais alterações das características visuais no processamento do café ocorrem durante a torra dos grãos de café pela reação de Maillard, com a decomposição de compostos como aminoácidos e carboidratos e a formação de outros em reações químicas complexas (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009). As melanoidinas tem sido associadas com propriedades biológicas incluindo a atividade antioxidante (CONTRERAS-CALDERÓN et al., 2016; PASTORIZA; RUFÍÁN-HENARES, 2014), atividade antimicrobiana (RUFÍÁN-HENARES; CUEVA, 2009), ambas influenciadas pelo poder de quelar metais (PASTORIZA; RUFÍÁN-HENARES, 2014). O teor de melanoidinas no café solúvel pode variar de 18,07 a 29,64 g 100 g⁻¹ para o *Coffea arabica* e de 19,66 a 30,44 g 100 g⁻¹ para o *Coffea canephora* (VIGNOLI; BASSOLLI; BENASSI, 2011).

3.2 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS E DETERIORANTES DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS

Os microrganismos estão amplamente distribuídos no ambiente, no qual contribuem para manter o equilíbrio do ambiente, pela reciclagem de elementos como o carbono e o nitrogênio. Quando aplicados na indústria de alimentos os microrganismos podem sintetizar e produzir uma grande variedade de compostos de interesse, como ácidos orgânicos, enzimas, álcoois, fármacos, mas também podem ser causadores de uma grande variedade de doenças, entre elas as transmitidas por alimentos, sendo que a principal forma de contaminação é pela ingestão de alimentos contaminados, o que pode levar a ocorrência de infecções ou intoxicações alimentares (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Os principais microrganismos envolvidos em doenças de origem alimentar e associados a intoxicação alimentar são *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; SILVA et al., 2010).

Salmonella é um dos microrganismos que causam a febre tifoide e a salmonelose ou gastroenterite causada por *Salmonelas*. A característica principal deste grupo de microrganismo é a invasão da mucosa intestinal onde se multiplicam. O período de incubação de 12 a 36 horas e a reação em humanos é geralmente de uma febre moderada, acompanhada de náuseas, dor abdominal cólicas e diarreia. Os produtos mais suscetíveis de contaminação por *Salmonella* são as carnes, alguns vegetais e cereais, além da possível presença em ovos devido a aves contaminadas, contaminando alimentos preparados a base de ovos crus ou mal cozidos. Destaca-se também que *Salmonella* tem a capacidade de sobreviver em alimentos com baixa atividade de água (FARAKOS; FRANK; SCHAFFNER, 2013; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; SILVA et al., 2010).

Escherichia coli é um dos microrganismos patogênicos que podem estar presente em alimentos, têm reconhecido habitat de origem intestinal de animais e humanos. Possui fimbrias onde se ligam a certas células do epitélio intestinal, podendo produzir toxinas e causando distúrbios gastrointestinais. *Escherichia coli* quando presente em alimentos processados, evidencia práticas inadequadas de manipulação e processamento de alimentos, e possui a capacidade de formar

biofilmes nos mais diversos materiais (SILVA et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; SILVA et al., 2010).

Uma das principais causas de intoxicação alimentar é a estafilocócica, causada pela ingestão de uma enterotoxina termoestável que é produzida por *Staphylococcus aureus*. O habitat natural deste microrganismo são as fossas nasais e lesões cutâneas, dos quais podem contaminar os alimentos. Se a temperatura estiver adequada ao microrganismo, ocorre a multiplicação, produção e liberação de enterotoxinas, causando a intoxicação. Os alimentos processados inadequadamente podem apresentar alto risco de contaminação, incluindo os pudins, cremes, presuntos, produtos derivados de aves quando manipulados e dispostos em temperatura ambiente. Quando do consumo de um alimento com a presença da toxina estafilocócica, normalmente observam-se sintomas como cólicas abdominais e diarreia (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; SILVA et al., 2010).

As bactérias lácticas são utilizadas no melhoramento do processamento de alimentos como culturas iniciadoras ou probióticos, produzindo ácido láctico, com atributos desejáveis, melhoras do sabor, aroma e textura em fermentados lácteos, cárneos e vegetais. No entanto podem estar disseminadas em diferentes *habitats*, e quando presentes em ambientes de produção de alimentos, sem a adição intencional, produzem deterioração e alterações não desejáveis em produtos industrializados como sucos, polpas de frutas, vegetais e em produtos cárneos como presuntos embalados com baixa concentração de oxigênio (KALSCHNE et al., 2014; SILVA et al., 2010).

3.3 APLICAÇÃO DE EXTRATOS DE CAFÉ COMO AGENTE COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Segundo Misra et al (2017) tendências do mercado consumidor têm surgido, como o “processamento verde”, caracterizado por uma produção de alimentos respeitando o ambiente e o consumidor. A produção de alimentos minimamente processados, livres de herbicidas, com menor teor de aditivos químicos e que minimizem a produção de resíduos, também tem se mostrado como fatores considerados por uma parcela do público consumidor.

Isso trouxe novos desafios as indústrias de processamento alimentar, sendo necessário o uso de novas tecnologias ou a combinação de tecnologias direcionadas a necessidade atual de substituir os conservantes artificiais por naturais, reaproveitar subprodutos com potencial aplicação alimentar buscando menor desperdício de matéria prima, e que sejam seguros ao consumo e atendam aos requisitos de qualidade (MISRA et al., 2017; CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015).

Os extratos vegetais de forma geral possuem alto teor de compostos fenólicos, com potencial atividade antioxidante para aplicação na indústria de fármacos e de alimentos. Na indústria de fármacos os extratos vegetais como da *Alchornea laxiflora* e café podem ter aplicações como neuroprotetora, antioxidante, atividade anti-HIV, e ação contra doenças gastrointestinais, respiratórias, do trato urinário e cutâneas (SIWE-NOUNDOU et al., 2019; JUNSATHIAN et al., 2018; MUELLER et al., 2011). Podem ainda apresentar atividade anti-adesão contra a formação de biofilmes (STAUDER et al., 2010), efeito protetor em doenças degenerativas, cardiovasculares, neoplasias e diabetes tipo II (OESTREICH-JANZEN, 2013), propiciar cicatrização acelerada (WANG et al., 2018) e apresentar atividade anti-inflamatória (JUNG et al., 2017).

Nas indústrias de processamento de alimentos, o uso de extratos naturais como do café poderão promover a inibição do crescimento microbiano e controle de patógenos em alimentos (ARORA, KAUR, KAUR, 2009), prolongando a vida útil de alimentos, mantendo as características e com a propriedade de ser seguro e benéfico a saúde (JUNSATHIAN et al., 2018; MANCINI; WANG; WEAVER, 2018; MUELLER et al., 2011). Além da deterioração de alimentos, os microrganismos podem estar associados a doenças de origem alimentar (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012), sendo uma necessidade científica atual a busca por substâncias antimicrobianas, especialmente as de origem natural (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015) e que atuem promovendo a segurança de alimentos (SINGH, VEER PAL, 2018).

Extratos de café possuem compostos de diferentes pesos moleculares com atividade antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans* (STAUDER et al., 2010). Outro fator importante que tem sido observado experimentalmente, é a extensão da fase *lag* microbiana, quando associado ao uso destes extratos, o que o torna aplicável em alimentos pela segurança de alimentos e possibilidade de estender a vida útil de forma segura, tornando-se uma alternativa a conservação de alimentos (FARAH; DONANGELO, 2006; KORNACKI, GURTLER, STAWICK, 2015).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MEIOS DE CULTURA, EXTRATOS DE CAFÉ E MICRORGANISMOS

4.1.1 Meios de cultura

Padrões, solventes e materiais de grau analítico foram empregados: padrões de cafeína e ácido-5-cafeiolquínico (Sigma-Aldrich, Saint Louise, EUA); ácido acético (pureza > 99,8%, Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA); acetonitrila (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA); discos estéreis (diâmetro 6,3 a 6,4 mm e gramatura de 320 a 350 g.m⁻² (Kaj Lab, São Paulo, Brasil); discos impregnados com 5 µg Amoxicilina ácido clavulânico (Sensibiodisc, Norbrook, Brasil); discos impregnados com 5 µg de Trimetoprim e com 10 µg de Ampicilina (Laborclin, Paraná, Brasil), e 2,3,5-Trifeniltetrazólio cloreto (TTC), (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Os meios de cultura na forma de caldo e ágar desidratados utilizados foram: caldo *Brain Heart Infusion* (BHI); ágar *Plate Count Agar* (PCA); ágar Mueller-Hinton; caldo e ágar *De Man, Rogosa e Sharpe* (MRS), *Agar Baird Parker* (BP), Ágar VRB com Mug (Merck, Darmstadt, Alemanha), Solução de gema de ovo com Telurito (Laborclin, Paraná, Brasil). A água ultrapura foi obtida em ultrapurificador (Master System®, Gehaka, São Paulo, Brasil).

A matriz alimentar utilizada foi o leite em pó desnatado (Nestlé, São Paulo, Brasil).

4.1.1.1 Extratos de café

Os extratos de café foram processados em uma planta piloto industrial localizada em Cornélio Procópio-PR, seguindo os padrões de processamento para café solúvel. As amostras (café torrado e verde) foram submetidas à extração convencional em colunas de bateria. Durante esse processo, o vapor de água (180

°C) foi introduzido no primeiro estágio de percolação (coluna com o café mais antigo) percorrendo os estágios subsequentes até atingir o último estágio, para que o extrato atingisse o café recentemente carregado. Durante o processo, os sólidos solúveis extraídos aumentaram e a temperatura diminuiu, e na coluna final (com café fresco) o café foi extraído a uma temperatura inferior a 100 °C. Os extratos de café foram submetidos a secagem por liofilização, sendo subsequentemente acondicionados em embalagens de vidro e mantidos sob congelamento (-18 °C).

4.1.2 Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram cepas oriundas de coleção da *American Type Culture Collection* (ATCC). Foram estudados os microrganismos Gram-negativos *Salmonella entérica* sorovar Typhimurium ATCC 14028 e *Escherichia coli* ATCC 43888. Dentre os Gram-positivos foram avaliados *Staphylococcus aureus* subspécie *aureus* ATCC 29213, *Lactobacillus plantarum* BG 112 e *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103. As culturas bacteriológicas foram mantidas em *bisel* de ágar nutriente (AN; Merck, Darmstadt, Alemanha) sob refrigeração (5 ± 3 °C) para posterior ativação em caldos de crescimento específico.

Para a ativação das cepas, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus* foram repicadas para o caldo BHI, enquanto o *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* foram repicados em caldo MRS. *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* e *Lactobacillus* foram incubados por 12 h e *Staphylococcus aureus* por 30 h em estufa bacteriológica a 35 ± 1 °C (002CB, FANEM, São Paulo, Brasil). Após a ativação, as suspensões bacterianas foram padronizadas de modo a obter uma contagem de 10^7 UFC mL⁻¹ para as análises da sensibilidade aos extratos de café e cinética de crescimento em meio líquido; na etapa de avaliações da estabilidade microbiológica em leite em pó desnatado reconstituído, a contagem inicial padronizada foi de 10^5 UFC mL⁻¹.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE CAFÉ

Os extratos de café foram caracterizados quanto ao teor de cafeína, ácido-5-cafeiolquínico (5-ACQ), melanoidinas, luminosidade (L^*), tonalidade cromática (h°) e pH. A determinação da cafeína e ácido-5-cafeiolquínico foi realizada nas amostras dos extratos diluídas em solução de ácido acético 5,0% (5:95; v/v) por Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (UHPLC; Ultimate 3000, Thermo Scientific, Germering, Alemanha). O cromatógrafo estava equipado com injetor automático de amostras, forno, e sistema detector UV-VIS com arranjos de diodo (Libra S22, Biochrom, Cambridge, Inglaterra), controlado pelo programa *Chromeleon 7.0*. Utilizou-se a coluna C18 Acclaim TM Polar advantage II (3 μm , 120 Å , 4.6 x 150 mm) (Thermo Fisher Scientific, Germering, Alemanha) e eluição gradiente com fluxo de 0,6 mL min⁻¹ para uma solução (A) de ácido acético 5,0% (5:95 (v/v)) e (B) acetonitrila: 1 min 5,0% B; 6 min 13% B. A cafeína foi detectada a 272 nm e o ácido-5-cafeiolquínico a 320 nm. A quantificação foi realizada por padronização externa, através de curvas analíticas com 6 pontos em triplicata no intervalo de 20 a 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a cafeína ($R^2 = 0,9993$) e 0,5 a 30,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o ácido-5-cafeoilquínico ($R^2 = 0,9992$) (KALSCHNE et al., 2019; CORSO; VIGNOLI; BENASSI, 2016).

O teor de melanoidinas nos extratos foi estimado de acordo com Corso, Vignoli e Benassi (2016). Os extratos de café foram ressuspensos em água com concentração de 0,57 mg mL⁻¹ para a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 420 nm (Lambda XLS, Perkin Elmer, Beaconsfield, Reino Unido). O mesmo extrato foi utilizado para a análise do pH (PG 1800, Gehaka, São Paulo, Brasil).

Para determinação da luminosidade e tonalidade cromática os extratos de café foram macerados em almofariz e colocados em recipientes adequados para leitura em colorímetro (CR400, Konica Minolta, Osaka, Japão) (CORSO; VIGNOLI; BENASSI, 2016).

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos pela média \pm desvio padrão.

4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS DE CAFÉ

4.3.1 Teste de sensibilidade dos microrganismos aos extratos de café

Para a avaliação inicial dos extratos de café quanto a atividade antibacteriana, foram realizados testes de difusão em ágar. As cepas que se mostraram sensíveis aos extratos de café foram então submetidas a testes de crescimento em meio líquido, na presença dos extratos de café.

Foram preparadas soluções com os três extratos de café (AT, CT e CV) nas concentrações de 0,5%, 1,5%, 2,0%, 2,5% e 5,0% (m/v) utilizando-se água destilada esterilizada em autoclave (CS 75 L, Primatec, Itu, Brasil). As soluções obtidas foram impregnadas em discos estéreis (20 µL) destinados aos testes de sensibilidade aos extratos de café. Os discos preparados com as soluções de café foram acondicionados em frascos de boro silicato estéril e mantidos fechados sob refrigeração (5 ± 3 °C); a avaliação da atividade antibacteriana foi realizada nos tempos de zero e vinte dias após o preparo (Figura 1). Paralelamente, para fins de comparação e verificação da susceptibilidade microbiana das cepas, foram testados antibióticos de uso comercial (Amoxicilina ácido clavulânico (5 µg), Trimetoprim (5 µg) e Ampicilina (10 µg) como controle positivo de inibição bacteriana.

Em testes preliminares também foram avaliadas as concentrações de 0,2% e 8,0% para os três extratos de café. Entretanto, na concentração de 0,2% não houve resultado positivo na inibição bacteriana (observada pela ausência de halos de inibição) e na concentração de 8,0% ocorreu a migração dos extratos de café, interferindo na visualização do diâmetro dos halos.

As análises para a avaliação da sensibilidade bacteriana aos extratos de café foram realizadas segundo a metodologia descrita por Cockerill et al. (2015), com modificações para a interpretação dos testes de susceptibilidade antimicrobiana e classificação da resposta *in vitro* ao agente antimicrobiano. Após ativação as suspensões bacterianas foram inoculadas (100 µL) na superfície dos meios sólidos e espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalski, em placas de Petri, até completa absorção. Utilizou-se o ágar Mueller-Hinton para *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Para *Lactobacillus plantarum* e

Lactobacillus rhamnosus utilizou-se o ágar Mueller-Hinton e o ágar MRS. Os discos impregnados com as soluções dos extratos de café, discos sem adição de extratos de café (controle), e os discos impregnados com os antibióticos comerciais foram depositados com o uso de pinça estéril sobre o ágar inoculado, em triplicata. As placas invertidas foram incubadas na temperatura de $35 \pm 1^\circ \text{C}$ em estufa bacteriológica, por 16 a 20 h. Para *Lactobacilos* as placas foram incubadas em jarras de anaerobiose (BD Gaspak EZ, Sparks, EUA). Após o período de incubação, a inibição do crescimento microbiano foi evidenciada pela presença de um halo de inibição translúcido ao redor dos discos depositados sobre o ágar. O diâmetro dos halos foi medido utilizando um paquímetro digital (150 mm 6", Snauzer, China). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos pela média \pm desvio padrão.

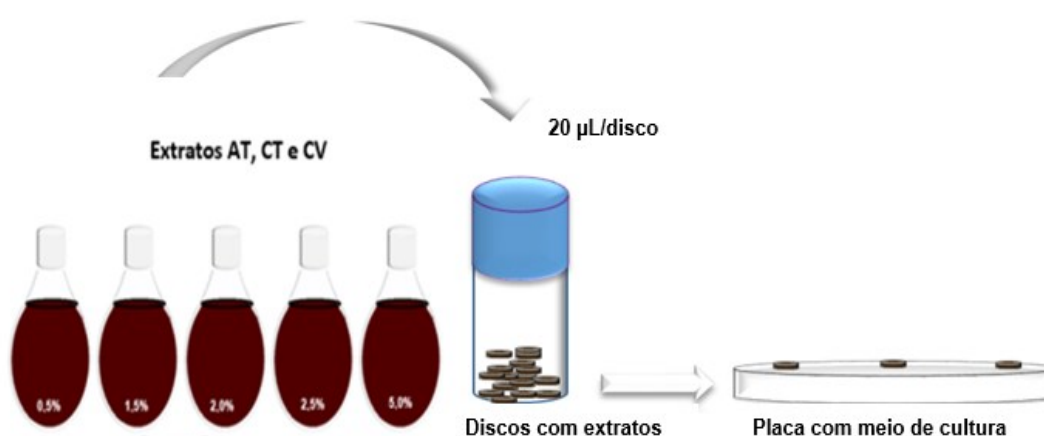


Figura 1- Extratos de café, conservação dos discos e adição em ágar diferencial.
Fonte: Autoria própria.

4.3.2 Potencial de inibição dos extratos de café nos cultivos em meios líquidos

Os microrganismos sensíveis aos extratos de café nos testes de difusão, caracterizados por uma zona de inibição ao redor dos discos, foram cultivados em meios líquidos para avaliação da cinética de crescimento. Os estudos foram conduzidos em frascos de boro silicato estéreis de 250 mL, contendo 200 mL de caldo

BHI adicionado dos extratos de café (AT, CT e CV) separadamente, em três concentrações (0,5%, 2,5% e 5,0%) como demonstrado na Figura 2. As culturas previamente ativadas foram adicionadas nos frascos na proporção de 1% (v/v) padronizadas. A incubação dos frascos foi realizada a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, em estufa bacteriológica. A cada 1 h foram retiradas alíquotas de 2 mL para medida da densidade ótica em triplicata, em espectrofotômetro (600 nm), no intervalo de 10 a 22 h, ou até ser observado o início da fase estacionária nos ensaios onde ocorreu crescimento microbiano.

Os dados obtidos foram ajustados ao modelo de Gompertz modificado para a obtenção dos parâmetros de crescimento: duração da fase *lag* (λ); velocidade específica máxima de crescimento (μ) e população máxima atingida (A). A adequação dos modelos preditos para o crescimento dos microrganismos foi avaliada por meio dos índices estatísticos erro médio quadrático (MSE), fator de viés, fator de exatidão e coeficiente de determinação (R^2) (KALSCHNE et al., 2014; GEITENES et al., 2013).

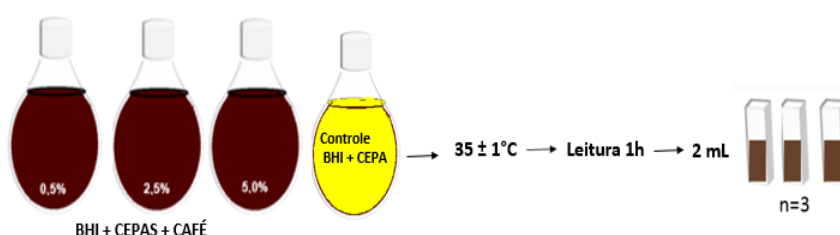


Figura 2- Amostras de café, incubação e leitura da densidade ótica.
Fonte: Autoria própria.

4.3.3 Avaliação do potencial de inibição dos extratos de café em matriz alimentar

Para a avaliação do potencial de inibição microbiana dos extratos de café em uma matriz alimentar, foi utilizado leite em pó desnatado reconstituído. Esta matriz foi escolhida em função da sua constituição, permitindo o desenvolvimento da maior parte dos microrganismos testados, além de possuir estabilidade microbiológica, fácil reconstituição e permitir a homogeneização e distribuição uniforme dos

microrganismos testados. O leite em pó foi reconstituído na proporção descrita pelo fabricante (10%, m/v) em frascos de boro silicato contendo 100 mL de água destilada, previamente esterilizados.

O extrato de café CT na concentração de 5,0% (v/v), a qual demonstrou ser mais eficiente na etapa de estudo em meio líquido, foi avaliado quanto ao potencial de inibição contra o crescimento de *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* no leite em pó reconstituído. Foram testadas também para este extrato, as cepas *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus*.

Para cada cepa foram realizados dois ensaios, em duplicata, na presença de 5,0% (v/v) de extrato de café CT, e incubados um na temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ e outro na temperatura de 5°C . Foi preparada uma amostra controle (leite reconstituído na presença das cepas a serem testadas). Para cada ensaio foram inoculados $100\ \mu\text{L}$ das cepas ativadas ($10^5\ \text{UFC mL}^{-1}$) em 100 mL do leite reconstituído e inicializadas as análises para a avaliação do crescimento microbiano, conforme esquematizado na Figura 3.

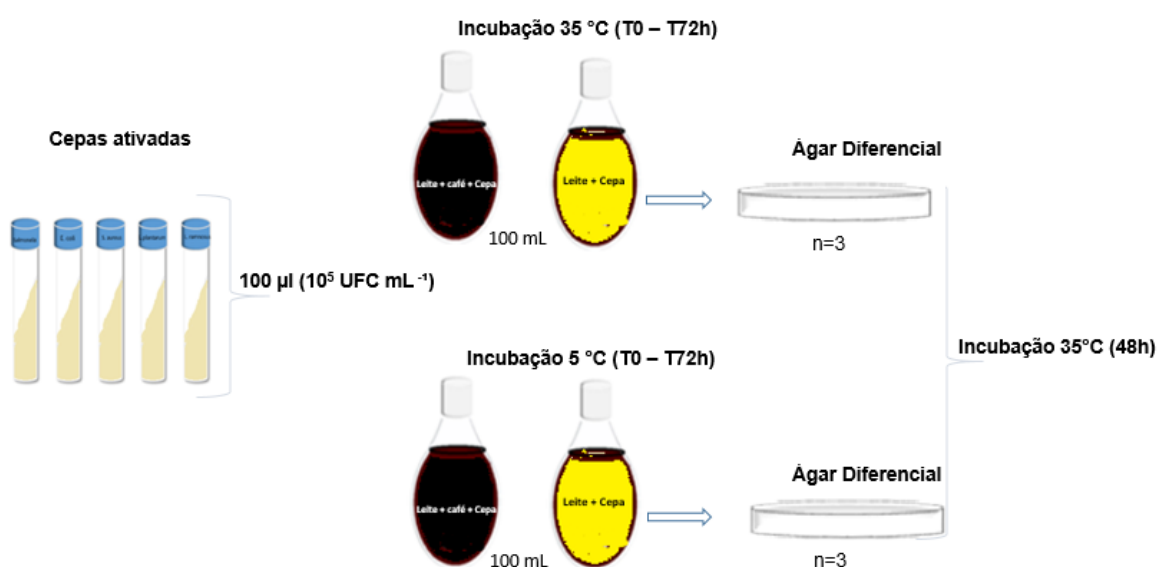


Figura 3- Suspensões de leite em pó com inóculo.

Fonte: Autoria própria.

A avaliação do crescimento microbiano foi realizada por contagem em placas, com o ágar diferencial de cada microrganismo testado. Os meios de cultura empregados para as análises foram ágar PCA com TTC para a quantificação de *Salmonella* Typhimurium, ágar VRB com Mug para a *Escherichia Coli*, ágar BP para o *Staphylococcus aureus*, e o ágar MRS para os *L. plantarum* e *rhamnosus*. A inoculação foi feita em profundidade (1,0 mL) para *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* e para o *Staphylococcus aureus*, foi feita na superfície do ágar (0,1 mL). As inoculações em placas foram realizadas em triplicata no tempo zero e a cada 12 h, até atingir 72 h, com a incubação das placas invertidas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48h. Para os *Lactobacillus* as placas foram incubadas em jarras de anaerobiose com gerador de anaerobiose. Após a incubação foram feitas as contagens das colônias com o auxílio de um dispositivo para a contagem (Phoenix EC 89 Araraquara, São Paulo) e os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados das análises de caracterização dos extratos de café e o diâmetro dos halos de inibição foram expressos como média \pm desvio padrão; as médias foram comparadas por ANOVA e pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os ensaios da cinética foram ajustados ao modelo matemático de Gompertz modificado e os índices estatísticos foram calculados para avaliar o ajuste do modelo aos dados experimentais. Para a análise de dados, utilizou-se o programa *Statistica 8.0* (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE CAFÉ

Os resultados da caracterização dos extratos de café encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Caracterização dos extratos de café

Parâmetros	AT	CT	CV
Cafeína (g 100 g ⁻¹)	2,82 ^b ± 0,04	3,30 ^a ± 0,06	3,45 ^a ± 0,15
Ácido-5-cafeoilquínico (g 100 g ⁻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.

Médias marcadas por letras diferentes na mesma linha apresentam diferenças estatisticamente significativa pelo Teste de Tukey (p<0,05).

Fonte: Autoria própria.

Os extratos de *Coffea canephora* (CT e CV) tiveram maior concentração de cafeína que o de *Coffea arabica* (AT); a dependência da espécie de café e o teor de cafeína é uma relação amplamente demonstrada na literatura, sendo que o *Coffea canephora* é reconhecido por conter maior teor que o *Coffea arabica* (KALSCHNE et al., 2018; CORSO; VIGNOLI; BENASSI, 2016; VIGNOLI et al., 2014).

O teor de ácido-5-cafeoilquínico do extrato de café verde foi maior que dos extratos de café torrado (AT e CT). O ácido-5-cafeoilquínico é um composto bioativo instável termicamente, o que justifica o teor inferior nas amostras submetidas ao processo de torra (KALSCHNE et al., 2019). De forma similar, Corso et al. (2016) reportaram um teor de ácido-5-cafeoilquínico variando de 1,21 a 2,06 g 100 g⁻¹ para *Coffea arabica* torrado escuro e médio, respectivamente; de 0,56 e 1,04 para *Coffea canephora* torrado escuro e médio; e de 7,52 g 100 g⁻¹ para *Coffea canephora* verde.

A estimativa das melanoidinas mostrou que os extratos de café torrado (AT e CT) tiveram valores em torno de 2 vezes superior que o de café verde ($p \leq 0,05$). As melanoidinas são compostos bioativos escuros formados durante o processo de torra pela Reação de Maillard, que confere ao café torrado a característica de cor marrom, aroma e sabor de torrado (VIGNOLI et al., 2014). Segundo Perrone et al. (2012), os ácidos clorogênicos são, principalmente, incorporados às melanoidinas no início do processo de torra, sofrendo alterações na estrutura química e sendo posteriormente degradados. Nesse contexto, justifica-se o maior teor de ácido-5-cafeoilquínico e menor teor de melanoidinas observado no extrato de café verde em comparação aos extratos de café torrado (AT e CT), que continham menor teor de ácido-5-cafeoilquínico e maior teor de melanoidinas.

A luminosidade e a tonalidade cromática do extrato de café verde foram superiores em comparação aos valores dos extratos de café torrado (AT e CT), considerando que a amostra tinha coloração mais clara, uma vez que não foi submetida ao processo de torra. De forma similar, Corso et al. (2016) também reportou maior valor de luminosidade e tonalidade cromática para o café verde (52,48 e 67,09, respectivamente) em comparação às amostras de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* torrado médio e escuro (luminosidade: 36,22 a 43,93; tonalidade cromática: 60,42 a 63,27).

O pH dos extratos de café variou de 4,65 a 4,73, sendo que o do café verde teve o pH mais alto. O pH dos extratos avaliados mostrou-se inferior aos dados disponíveis na literatura, variando de 4,86 a 5,06 (KOBAYASHI; BENASSI, 2012).

5.2 AÇÃO INIBITÓRIA DOS EXTRATOS DE CAFÉ

5.2.1 Determinação da sensibilidade microbiana aos extratos de café

A determinação da sensibilidade microbiana aos extratos de café foi utilizada para uma triagem inicial simplificada qualitativa, no intuito de verificar de forma rápida a capacidade inibitória dos extratos de café frente ao crescimento das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas. Na Tabela 2 são mostrados os resultados da

inibição dos microrganismos avaliados frente a ação dos extratos de café nas concentrações testadas, no tempo zero e vinte dias após o preparo dos discos contendo os extratos. A formação dos halos de inibição foi observada pela formação de uma zona sem crescimento microbiano circundada nos discos impregnados com os extratos de café (Figura 4), observando-se uma zona transparente, contrastando com regiões opacas causadas pelo crescimento microbiológico.



Figura 4- Halos de inibição.
Fonte: Autoria própria.

Para a *Salmonella* Typhimurium, no tempo zero, os extratos CT e CV demonstraram ser efetivos na inibição do microrganismo mesmo na concentração de 0,5%. O extrato AT também se mostrou efetivo na inibição, mas halos similares aos obtidos com o CT e CV 0,5% foram obtidos em concentrações de AT 1,5% ou maior ($p \leq 0,05$). Após vinte dias de armazenamento dos discos impregnados com extratos de café, observou-se uma redução no poder de inibição da *Salmonella* Typhimurium para todos os extratos avaliados. Destaca-se que os três extratos de café avaliados demonstraram potencial antimicrobiano frente a *Salmonella* Typhimurium evidenciado pela presença de halos de inibição ao redor dos discos depositados nas placas de Petri com meios de cultura.

Na avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos de café frente a *Escherichia coli* no tempo zero, observou-se que em concentrações de 1,5% ou maiores para o AT e CV, e de 0,5% ou maior para o CT foram obtidos os maiores halos de inibição ($p \leq 0,05$). Após vinte dias de armazenamento, os discos contendo os extratos tiveram uma redução no poder de inibição da *Escherichia coli* para todos os extratos de café. Os três extratos de café demonstraram potencial antimicrobiano

evidenciado pela presença de halos de inibição ao redor dos discos depositados nas placas contendo *Escherichia coli*.

Para *Staphylococcus aureus*, no tempo zero, os extratos de café torrado (AT e CT) geraram halos de inibição em concentrações de 1,5% a 5,0%, enquanto que o CV demonstrou ser efetivo na inibição do microrganismo mesmo na concentração de 0,5%. Após vinte dias de armazenamento dos discos previamente preparados, observou-se uma redução parcial no poder de inibição do *Staphylococcus aureus*, uma vez que nem todos os extratos tiveram halos significativamente menores quando comparados no tempo zero e vinte dias. Nas concentrações dos extratos de 2,0% e 5,0%, verificou-se que os cafés torrados (AT e CT) tiveram maiores halos de inibição no tempo zero em comparação com o CV.

De maneira geral, observou-se que, após vinte dias de armazenamento dos discos impregnados com os extratos de café, houve uma redução na atividade inibitória frente aos microrganismos testados, justificada por alterações que ocorrem no café durante o armazenamento (RENDÓN et al. 2014). As principais alterações ocorridas no café podem estar associadas a redução de compostos como o ácido 5-cafeoilquínico.

Tabela 2- Diâmetro dos halos de inibição (em mm) para *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* frente a ação dos extratos de café como agente inibidor no tempo zero (T0) e vinte dias (T20) de armazenamento

Tipo de extrato/ Concentração (m/v)		0,5%	1,5%	2,0%	2,5%	5,0%
<i>Salmonella</i> Typhimurium						
AT	T0	8,9 ± 0,5 ^{b,B}	10,0 ± 0,7 ^{a,b,B}	10,4 ± 0,1 ^{a,b,A}	11,2 ± 0,4 ^{a,A}	10,5 ± 0,7 ^{a,A}
	T20	6,7 ± 0,1 ^{c,C}	7,2 ± 0,4 ^{a,b,c,C}	8,2 ± 0,4 ^{a,b,C}	8,3 ± 0,8 ^{a,C}	7,2 ± 0,4 ^{b,c,C}
CT	T0	10,6 ± 0,6 ^{a,b,A}	11,7 ± 0,2 ^{a,A}	9,0 ± 0,0 ^{b,B,C}	11,0 ± 0,0 ^{a,A}	12,0 ± 1,3 ^{a,A}
	T20	7,6 ± 0,3 ^{a,b,C}	7,4 ± 0,2 ^{b,C}	8,6 ± 0,1 ^{a,b,C}	9,0 ± 0,8 ^{a,B,C}	8,03 ± 0,2 ^{a,b,B,C}
CV	T0	11,2 ± 0,9 ^{a,A,B}	10,5 ± 0,7 ^{a,B}	9,9 ± 0,1 ^{a,A,B}	10,3 ± 0,1 ^{a,A,B}	10,7 ± 0,5 ^{a,A,B}
	T20	7,1 ± 0,4 ^{c,C}	8,0 ± 0,1 ^{b,C}	9,3 ± 0,7 ^{a,B,C}	7,2 ± 0,1 ^{b,c,C}	8,4 ± 0,2 ^{a,b,B,C}
<i>Escherichia coli</i>						
AT	T0	9,1 ± 0,2 ^{b,B}	11,4 ± 0,9 ^{a,A,B}	11,6 ± 0,6 ^{a,A,B}	10,2 ± 0,3 ^{a,b,B}	10,8 ± 0,3 ^{a,A,B}
	T20	7,6 ± 0,2 ^{a,B}	9,5 ± 0,7 ^{a,B,C}	9,5 ± 0,3 ^{a,C,D}	9,4 ± 0,5 ^{a,B,C}	9,5 ± 0,3 ^{a,B,C}
CT	T0	10,9 ± 0,4 ^{a,A}	11,5 ± 0,7 ^{a,A}	12,1 ± 0,6 ^{a,A}	12,5 ± 0,6 ^{a,A}	12,5 ± 0,0 ^{a,A}
	T20	8,5 ± 0,7 ^{a,B}	9,2 ± 0,5 ^{a,C}	8,8 ± 0,5 ^{a,C,D}	8,0 ± 0,2 ^{a,C}	9,0 ± 0,3 ^{a,C}
CV	T0	7,71 ± 0,0 ^{c, B}	11,8 ± 0,3 ^{a,A}	10,5 ± 0,7 ^{b,B,C}	10,4 ± 0,3 ^{b,B}	11,4 ± 0,8 ^{a,b,A,B,C}
	T20	8,57 ± 0,8 ^{a,B}	9,4 ± 0,0 ^{a,B,C}	8,4 ± 0,5 ^{a,D}	9,3 ± 0,1 ^{a,B,C}	9,9 ± 0,1 ^{a,B,C}
<i>Staphylococcus aureus</i>						
AT	T0	8,2 ± 0,4 ^{c, B}	8,7 ± 0,4 ^{c,B}	9,6 ± 0,2 ^{b, A,B}	10,2 ± 0,2 ^{b,B}	11,6 ± 0,3 ^{a,A,B}
	T20	7,5 ± 0,2 ^{b,B}	8,2 ± 0,3 ^{a,b,B}	8,5 ± 0,7 ^{a,B}	8,8 ± 0,6 ^{a,B}	8,4 ± 0,7 ^{a,b,C}
CT	T0	9,5 ± 0,7 ^{c,A}	10,5 ± 0,1 ^{c,A}	11,0 ± 0,3 ^{b,c,A}	12,1 ± 0,1 ^{a,b,A}	12,5 ± 0,7 ^{a,A}
	T20	6,9 ± 0,4 ^{c,B}	8,9 ± 0,6 ^{b,B}	9,5 ± 0,5 ^{a,b,A, B}	9,3 ± 0,6 ^{a,b,B}	9,9 ± 0,7 ^{a,B,C}
CV	T0	10,5 ± 0,6 ^{a,A}	8,5 ± 0,7 ^{b,B}	8,3 ± 0,2 ^{b, B}	9,7 ± 0,9 ^{a,B}	9,4 ± 0,5 ^{a,C}
	T20	7,4 ± 0,2 ^{b,B}	9,1 ± 0,0 ^{a,b,B}	10,3 ± 0,6 ^{a,A}	9,6 ± 0,6 ^{a,b,B}	10,0 ± 0,6 ^{a,B, C}

<i>Lactobacillus plantarum</i> *						
AT	T0	SI	SI	SI	SI	SI
	T20	SI	SI	SI	SI	SI
CT	T0	SI	SI	SI	SI	SI
	T20	SI	SI	SI	SI	SI
CV	T0	SI	SI	SI	SI	SI
	T20	SI	SI	SI	SI	SI
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> *						
AT	T0	SI	SI	SI	SI	SI
	T20	SI	SI	SI	SI	SI
CT	T0	SI	SI	SI	SI	SI
	T20	SI	SI	SI	SI	SI
CV	T0	SI	SI	SI	SI	SI
	T20	SI	SI	SI	SI	SI

AT: *Coffea arabica* torrado; CT: *Coffea canephora* torrado; CV: *Coffea canephora* verde; SI: sem inibição; 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 ($p \leq 0,05$); * resultados observados tanto no meio sólido Muller-Hinton como no MRS.

Fonte: Autoria própria.

Para *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* não foram observados halos de inibição promovidos pela ação dos extratos de café, mesmo quando avaliados em dois meios de cultivo sólidos diferentes (Muller-Hinton e MRS). A confirmação do crescimento foi evidenciada pela coloração opaca nas placas, ausência da região transparente dos halos e pela contagem do inóculo aplicado, que foi igual a $8,74 \pm 0,04$ e $8,52 \pm 0,18$ log UFC mL⁻¹, respectivamente para *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus*. Logo, os extratos mostraram atividade antimicrobiana, no intervalo de concentrações estudadas, somente para *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Como controle positivo, foi verificada a susceptibilidade microbiana a antibióticos de uso comercial, importantes em estudos de epidemiologia devido a resistência das cepas à agentes antimicrobianos, e em estudos de novos antibióticos. Experimentalmente, *Salmonella* Typhimurium foi sensível a utilização da Ampicilina ($18,14 \pm 1,06$ mm), Trimetoprim ($20,89 \pm 1,82$ mm) e Amoxicilina ácido clavulânico ($23,89 \pm 1,18$ mm). *Escherichia coli* também se mostrou sensível aos três antibióticos, Ampicilina ($16,64 \pm 3,01$ mm), Trimetoprim ($26,83 \pm 2,60$ mm) e Amoxicilina ácido clavulânico ($24,11 \pm 3,36$ mm). *Staphylococcus aureus* foi sensível a Ampicilina ($19,37 \pm 1,15$ mm) e Trimetoprim ($14,91 \pm 2,06$ mm), e não se mostrou sensível ao Amoxicilina ácido clavulânico. De forma similar, Arora, Kaur e Kaur (2009) também evidenciaram halos de inibição maiores para *Staphylococcus aureus* e *Salmonella thypi* frente a ação de antibióticos (ampicilina, cloranfenicol, cotrimoxazol e tobramicina) em comparação ao extrato de café (5,0%) adicionado ou não de açúcar (4,0%) e leite (20%). Entretanto, sabe-se que o diâmetro dos halos de inibição está relacionado a alguns fatores como a difusão dos antimicrobianos, que pode ter gerado halos de menor diâmetro para os extratos de café. Mais importante que o diâmetro dos halos de inibição, é a sensibilidade dos microrganismos a substância testada, e comparando-se os extratos de cafés estudados com os antibióticos, *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli* foram sensíveis tanto aos antibióticos Ampicilina, Trimetoprim e Amoxicilina ácido clavulânico como aos extratos de café AT, CT e CV. Já *Staphylococcus aureus* foi sensível somente ao antibiótico Ampicilina e Trimetoprim, e foi sensível aos três extratos de café estudados.

Com base nos testes de sensibilidade aos extratos de café não foi possível identificar um maior potencial entre as duas espécies de café avaliadas ou entre os extratos torrados e verde, nem uma diferenciação da sensibilidade por

microrganismos Gram-positivos ou Gram-negativos. Dentro do grupo de microrganismos Gram-positivos, observou-se que somente *Staphylococcus aureus* foi inibido pelos extratos de café, enquanto que Lactobacilos cresceram e não mostraram halos de inibição nas concentrações avaliadas. De forma similar, Wijaya, Ridwan e Budi (2016) observaram que *Lactobacillus* não demonstram inibição em baixas concentrações de extratos de café, e para a sua inibição são requeridas altas concentrações de extratos, de 25% a 100%, tanto para o café arábica como para o canéfora. De forma adicional, uma diferença significativa na sensibilidade aos extratos de café entre as espécies de café foi percebida apenas em concentrações de extratos entre 75% a 100%.

Para os microrganismos sensíveis, o efeito antimicrobiano dos extratos de café provavelmente está atrelado as melanoidinas e ácidos clorogênicos, responsáveis pela atividade antioxidante nos cafés (VIGNOLI et al., 2014). 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 *Escherichia coli* está ligada a capacidade de quelar os íons Mg^{2+} da membrana externa da célula, causando a desestabilização da membrana interna (RUFÍÁN-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, o que aumenta a permeabilidade e resulta no rompimento celular (DUANGJAI et al., 2016; LOU et al., 2011).

De forma adicional, Mueller et al (2011) relataram que, apesar dos componentes químicos naturais do café, quando testados individualmente ou misturados não terem demonstrado atividade antimicrobiana significativa comparada a uma solução da bebida, a utilização da bebida de café torrado demonstrou atividade inibitória frente a *Escherichia coli* e *Listeria innocua*, pela produção do H_2O_2 derivado da fermentação natural da solução de café torrado, incubada por 16 horas a 37°C.

No caso dos Lactobacilos, há poucos trabalhos que avaliaram o efeito de extratos de café frente a sua inibição. Wijaya, Ridwan e Budi (2016), avaliaram o efeito inibitório dos extratos de café robusta e arábica para o *Lactobacillus acidophilus*, demonstrando efeito inibitório quando aplicado em altas concentrações (75% e 100%),

com melhor inibição para o café robusta. Entretanto, a não inibição dos Lactobacilos pelos extratos nas concentrações avaliadas indica um efeito seletivo dos extratos de café como agentes antimicrobianos, que pode ser de grande interesse na indústria de alimentos. A aplicação dos extratos de café poderia ser realizada em produtos funcionais que regularmente usam os *Lactobacillus plantarum* e o *Lactobacillus rhamnosus* como probióticos, inibindo microrganismos patogênicos como a *Salmonella Thypimurium*, a *Escherichia coli* e o *Staphylococcus aureus* ao mesmo tempo que permitiriam o crescimento dos probióticos.

Com o objetivo de estudar de forma mais direcionada o efeito antimicrobiano dos extratos de café, as concentrações de 0,5%, 2,5% e 5,0% foram selecionadas para a realização dos ensaios da cinética de crescimento em meio líquido. As concentrações foram justificadas uma vez que na concentração de 0,5% já foram evidenciados halos de inibição para os três microrganismos sensíveis. A partir das concentrações de 2,5%, evidenciaram-se, de maneira geral, halos com maior diâmetro, justificando também o estudo da proporção de 2,5% e 5,0%.

5.2.2 Potencial de inibição dos extratos de café nos cultivos em meios líquidos

A cinética do crescimento microbiano frente a ação dos extratos de café foi avaliada somente para os microrganismos que demonstraram serem sensíveis aos extratos de café no teste de sensibilidade com discos impregnados com os extratos de café. Logo, considerando que os testes com Lactobacilos não demonstraram halos de inibição, esses microrganismos não foram avaliados nesta etapa.

Na Tabela 3 podem ser visualizados os parâmetros das curvas de crescimento obtidos para os microrganismos estudados frente a ação dos extratos de café nas concentrações de 0,5%, 2,5% e 5,0%.

Tabela 3- Parâmetros de crescimento A , μ e λ para *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* obtidos pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo de Gompertz modificado e índices estatísticos para avaliação do ajuste do modelo aos dados experimentais

	% (m/v)	A	μ	λ	R^2	MSE	Fator de viés	Fator de exatidão
<i>Salmonella</i> Typhimurium								
AT	0,5	0,567	0,207	0,974	0,996	0,000	1,059	1,106
	2,5	0,162	0,032	1,271	0,994	0,000	0,992	1,063
	5,0	0,097	0,015	7,962	0,992	0,000	1,056	1,128
CT	0,5	0,512	0,234	1,606	0,998	0,000	0,998	1,017
	2,5	0,215	0,051	1,884	0,997	0,001	0,967	1,117
	5,0	0,146	0,071	8,132	0,999	0,000	1,018	1,023
CV	0,5	0,916	0,522	1,455	0,998	0,000	0,998	1,015
	2,5	0,528	0,228	1,723	0,997	0,000	1,015	1,049
	5,0	0,373	0,086	1,983	0,999	0,000	1,002	1,019
Controle (sem extrato)	-	1,477	0,520	0,974	0,996	0,003	1,007	1,042
<i>Escherichia coli</i>								
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 (sem extrato)	-	1,429	0,370	1,326	0,994	0,004	1,008	1,092
<i>Staphylococcus aureus</i>								
AT	0,5	0,735	0,078	10,173	0,996	0,000	0,995	1,018
	2,5	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-
	5,0	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-
CT	0,5	0,665	0,083	7,146	0,999	0,000	1,009	1,022
	2,5	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-
	5,0	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-
CV	0,5	1,089	0,265	2,804	0,999	0,000	0,944	1,069
	2,5	0,803	0,104	7,131	0,998	0,000	1,049	1,078
	5,0	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-
Controle (sem extrato)	-	1,496	0,279	1,363	0,998	0,000	0,999	1,002

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

Na inibição de *Salmonella* Typhimurium os extratos de café torrado (AT e CT) tiveram efeitos similares com inibição parcial, sendo que a concentração de 5,0% foi a mais eficiente. Essa condição permitiu estender a fase *lag* por aproximadamente 8 h, comparado com menos de 2 h para todos os demais ensaios com extratos e menos de 1 h quando comparados ao ensaio controle. De forma adicional, dentro das concentrações estudadas para cada extrato de café, a menor população máxima atingida e a menor velocidade específica máxima de crescimento foram obtidas na concentração de 5,0%. Para o café verde, em todas as concentrações o efeito inibitório foi inferior ao observado para os cafés torrados (AT e CT). Entretanto, se comparado ao controle (sem extrato), os três extratos de café mostraram atividade antimicrobiana para *Salmonella* Typhimurium.

Para *Escherichia coli*, verificou-se que na concentração de 5,0% para o AT e de 2,5% e 5,0% para o CT, houve a completa inibição do microrganismo. Assim como para *Salmonella* Typhimurium, o CV teve uma menor atividade inibitória para *Escherichia coli* se comparada com os cafés torrados (AT e CT). Por outro lado, se comparado ao controle, os três extratos de café mostraram atividade antimicrobiana para *Escherichia coli*.

Na inibição de *Staphylococcus aureus* os extratos de café torrado (AT e CT) nas concentrações de 2,5% e 5,0% inibiram completamente o desenvolvimento do microrganismo. O extrato de café verde na concentração de 5,0% também inibiu completamente o *Staphylococcus aureus*; entretanto, na concentração de 2,5%, a inibição foi parcial. Os três extratos de café avaliados mostraram atividade antimicrobiana se comparado ao controle, inibindo o desenvolvimento do *Staphylococcus aureus*.

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 de viés entre 0,944 e 1,059 e fator de exatidão entre 1,002 e 1,128. As curvas de crescimento preditas dos ensaios para os microrganismos avaliados estão demonstradas na Figura 5.

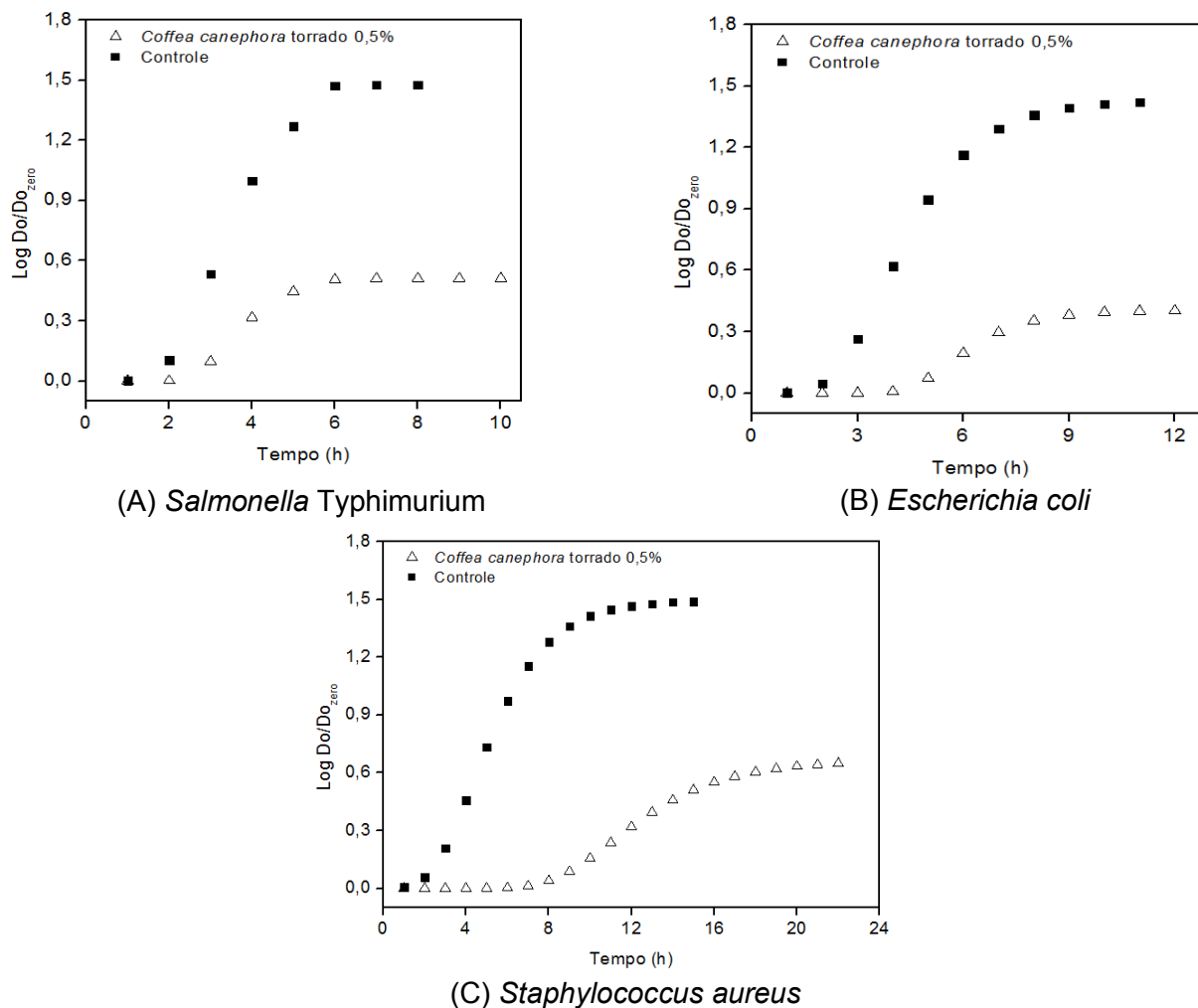


Figura 5- Curva de crescimento do ensaio adicionado de *Coffea canephora* torrado 0,5% e ensaio controle para (A) *Salmonella Typhimurium*, (B) *Escherichia coli* e (C) *Staphylococcus aureus*.
Fonte: Autoria própria.

Para *Salmonella Typhimurium*, parcialmente inibida pela aplicação dos extratos de café, verificou-se que o teor de ácido 5-cafeioilquínico teve correlação positiva com o parâmetro de crescimento A e negativa com λ , logo um maior teor do bioativo aumentou a população máxima atingida e reduziu o tempo de fase *lag* (Tabela 4). Logo, o teor de ácido 5-cafeioilquínico não teve efeito na inibição da *Salmonella Typhimurium*. Em contrapartida, o teor de melanoidinas teve efeito negativo sobre A e μ , e efeito positivo sobre λ , mostrando que maiores teores de melanoidinas interferem reduzindo a população máxima atingida e a velocidade específica de crescimento, e aumentando o tempo de fase *lag*.

Adicionalmente, os valores da luminosidade e tonalidade cromática tiveram correlação positiva com A e negativa com λ , indicando que amostras de café torrado (com menor valor de L^* e h°) diminuíram a população máxima atingida, ao mesmo tempo que aumentaram o tempo de fase *lag*, corroborando que amostras de café torrado (AT e CT) são mais eficientes na inibição da *Salmonella* Typhimurium. A correlação negativa entre o ácido 5-cafeioilquínico e as melanoidinas evidencia a degradação dos ácidos clorogênicos e a formação de melanoidinas (PERRONE; FARAH; DONANGELO, 2012), enquanto que a correlação positiva do ácido 5-cafeioilquínico com a luminosidade e a tonalidade cromática demonstram a redução no valor dos três parâmetros, efeitos promovidos pela ocorrência da Reação de Maillard no processo de torra do café. Adicionalmente, para *Salmonella* Typhimurium observou-se uma correlação positiva do pH do extrato de café com o parâmetro A , logo um pH menor (mais ácido) reduziu a população máxima desse microrganismo, reforçando o comportamento normalmente observado de que a maioria das bactérias crescem em uma faixa estreita de pH, mais próximo da neutralidade em torno de 6,5 a 7,5 (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Para os microrganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, ambos totalmente inibidos com aplicação dos extratos de café na concentração de 5,0% para o AT e CT, observou-se uma correlação negativa entre o teor de melanoidinas, a luminosidade e a tonalidade cromática, com A e μ , indicando uma tendência de redução da população máxima atingida e da velocidade específica máxima de crescimento conforme aumentam os valores dos parâmetros supracitados, reforçando que os cafés torrados tem efeito mais pronunciado na inibição microbiana (Tabela 4). A correlação negativa evidenciada entre o teor de melanoidinas e o parâmetro de cor luminosidade e tonalidade cromática demonstram os efeitos da Reação de Maillard, uma vez que conforme a reação se desenvolve, as melanoidinas são formadas, causando uma queda da luminosidade e da tonalidade cromática, devido a formação da cor marrom. Em contrapartida, uma correlação positiva foi observada entre o teor de ácido 5-cafeioilquínico e os valores de A e μ , logo o aumento na concentração desse bioativo não traz uma redução nos parâmetros de crescimento em questão.

Tabela 4- Correlação de Pearson entre os parâmetros de caracterização dos extratos de café e parâmetros de crescimentos dos microrganismos estudados

Parâmetros	Cafeína	5-ACQ	Melanoidinas	L*	h°	pH	A <i>Salmonella</i>	μ <i>Salmonella</i>	λ <i>Salmonella</i>	A <i>E. coli</i>	μ <i>E. coli</i>	λ <i>E. coli</i>	A <i>Staphylococcus</i>	μ <i>Staphylococcus</i>	λ <i>Staphylococcus</i>
Cafeína	-	0,61	-0,60	0,61	0,73	0,36	0,80	0,99*	-0,67	0,41	0,57	-0,67	0,68	0,68	0,68
5-ACQ	0,61	-	-0,99*	1,00*	0,99**	0,96	0,96	0,58	-0,99*	0,97	0,99*	0,18	0,99**	0,99**	0,99**
Melanoidinas	-0,60	-0,99*	-	-0,99*	-0,98	-0,97	-0,96	-0,57	0,99*	-0,98	-0,99*	-0,19	-0,99**	-0,99**	-0,99**
L*	0,61	1,0*	-0,99*	-	0,99**	0,96	0,96	0,59	-0,99*	0,97	0,99*	0,18	0,99**	0,99**	0,99**
h°	0,73	0,99**	-0,98	0,99**	-	0,90	0,99**	0,71	-0,99*	0,92	0,98	0,01	0,99*	0,99*	0,99*
pH	0,36	0,96	-0,97	0,96	0,90	-	0,85	0,34	-0,94	0,99*	0,97	0,44	0,93	0,93	0,93
A- <i>Salmonella</i>	0,80	0,96	-0,96	0,96	0,99**	0,85	-	0,78	-0,98	0,88	0,95	-0,09	0,99**	0,99**	0,99**
μ- <i>Salmonella</i>	0,99*	0,58	-0,57	0,59	0,71	0,34	0,78	-	-0,65	0,38	0,54	-0,69	0,66	0,66	0,66
λ- <i>Salmonella</i>	-0,67	-0,99*	0,99*	-0,99*	-0,99*	-0,94	-0,98	-0,65	-	-0,95	-0,99**	-0,10	-0,99*	-0,99*	-0,99*
A- <i>E. coli</i>	0,41	0,97	-0,98	0,97	0,92	0,99*	0,88	-0,38	-0,95	-	0,98	0,40	0,95	0,95	0,95
μ- <i>E. coli</i>	0,57	0,99*	-0,99*	0,99*	0,98	0,97	0,95	0,54	-0,99**	0,98	-	0,23	0,99**	0,99**	0,99**
λ- <i>E. coli</i>	-0,67	0,18	-0,19	0,18	0,01	0,44	-0,09	-0,69	-0,10	0,40	0,23	-	0,08	0,08	0,08
A- <i>Staphylococcus</i>	0,68	0,99**	-0,99**	0,99**	0,99*	0,93	0,99**	0,66	-0,99*	0,95	0,99**	0,08	-	1,00	1,00
μ- <i>Staphylococcus</i>	0,68	0,99**	-0,99**	0,99**	0,99*	0,93	0,99**	0,66	-0,99*	0,95	0,99**	0,08	1,00	-	1,00
λ- <i>Staphylococcus</i>	0,68	0,99**	-0,99**	0,99**	0,99*	0,93	0,99**	0,66	-0,99*	0,95	0,99**	0,08	1,00	1,00	-

Concentração do extrato: *Salmonella* Thyphimurium (5,0%), *Escherichia coli* (2,5%) e *Staphylococcus aureus* (2,5%); * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,10.
Fonte: Autoria própria.

Com base na cinética de crescimento dos microrganismos estudados, observou-se que as melanoidinas parecem ser o composto majoritário associado com o efeito antimicrobiano do café. Segundo Rufián-Henares; De La Cueva (2009), o potencial efeito das melanoidinas do café na inibição do crescimento microbiano parece estar associado com a remoção dos cátions Mg^{2+} da membrana celular externa dos microrganismos, causando um possível rompimento da membrana celular, permitindo a liberação de moléculas intracelulares seguido da morte celular.

Os ácidos clorogênicos, dado o seu potencial antioxidante, foram também associados com a inibição microbiana. A forma de ação desse bioativo sobre a membrana plasmática, ocorre possivelmente pela formação de poros na membrana, aumentando a permeabilidade, o que resultará na perda da sua função, devido a liberação de compostos celulares, causando o rompimento celular da bactéria. (DUANGJAI et al., 2016; LOU et al., 2011). Entretanto no presente estudo evidenciou-se que, apesar de haver uma possibilidade de inibição devido a presença do ácido 5-cafeiolquínico – o ácido clorogênico majoritário no café (PERRONE et al., 2008), as melanoidinas demonstraram um maior efeito antimicrobiano. Isso ficou evidente ao analisar o efeito menos pronunciado que o café verde teve sobre os microrganismos estudados em comparação aos cafés torrados (AT e CT).

O bioativo cafeína mostrou não ter influência na redução do crescimento microbiano neste estudo. Os resultados obtidos corroboram com os resultados de Runti et al. (2014); os autores citados avaliaram o efeito do café regular e descafeinado na inibição dos microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Escherichia coli* ATCC25922 e *Salmonella entérica* ATCC14028 e observaram que não houve acréscimo de inibição com o maior teor de cafeína presente no café regular. De forma contrária, Almeida et al. (2006) demonstraram que a cafeína teve efeito biológico contra *Serratia marcescens* e *Enterobacter cloacae*, e com potencial atividade antimicrobiana para *Salmonella* entérica na proporção existente naturalmente nos extratos de café. Ibrahim et al. (2006) também reportaram um efeito antimicrobiano quando da aplicação *in vitro* da cafeína frente a *E. coli* O157H:7, com o estendimento da fase *lag* por até 8 h. Os autores citados mencionam que a atividade antimicrobiana pode não estar vinculada unicamente as características físico químicas dos extratos, mas as peculiaridades de diferentes linhagens bacterianas; logo, um

mesmo composto pode exibir atividade antimicrobiana a um gênero bacteriano, mas não a todas as espécies deste gênero.

Comparando-se os microrganismos patogênicos avaliados, observou-se que *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo) se mostrou mais sensível aos extratos de café nas 3 concentrações estudadas em comparação com as bactérias Gram-negativas. Outras pesquisas com diferentes microrganismos evidenciaram que bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*) parecem ser mais susceptíveis aos efeitos antimicrobianos dos extratos de café se comparadas as bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella entérica* e *Pseudomonas aeruginosa*) (DUANGJAI et al., 2016; RUNTI et al., 2014). Ressalta-se, porém, que nestes trabalhos não foi avaliado o crescimento de lactobacilos. Considerando que o mecanismo de ação dos ácidos clorogênicos e das melanoidinas tem sido associado com o rompimento da membrana celular, as bactérias patogênicas Gram-positivas parecem apresentar uma maior predisposição para sofrerem ação antimicrobiana.

A forma com que os extratos de café atuam frente aos microrganismos ainda é pouco conhecida. O efeito inibitório, pode estar relacionado as diferenças na constituição da parede celular dos microrganismos, ou ainda a capacidade sequestrante de radicais livres (OESTREICH-JANZEN, 2013; ALVAREZ; MOREIRA; PONCE, 2012; ABRAHÃO et al., 2010; RUFÍAN-HENARES; DE LA CUEVA, 2009).

A estrutura da parede celular difere entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Nas bactérias Gram-positivas, consiste de uma camada de peptidoglicano formando uma estrutura espessa e rígida com a presença de ácido lipoteicoico, ácido teicoico e fosfato. Devido a presença do grupo fosfato, com carga negativa, os ácidos podem regular a entrada e saída de cátions, atuando no crescimento celular, impedindo a ruptura da parede e a possível lise celular. Em contraste, as Gram-negativas possuem uma camada mais fina de peptidoglicano, e a membrana externa consiste em lipopolissacarídeos, lipoproteínas e fosfolipídeos, com funções específicas. No entanto a membrana externa não fornece uma barreira a todas as substâncias, permitindo - parcialmente pelas proteínas da membrana (porinas) - a formação de canais que por sua vez permitem a passagem de algumas moléculas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

5.2.3 Potencial de inibição dos extratos de café nos cultivos em leite em pó reconstituído

Os resultados da atividade antimicrobiana dos extratos de café na inibição de *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, na matriz alimentar leite em pó desnatado reconstituído, estão apresentados na Tabela 5. Para os três microrganismos patogênicos observou-se efeito do extrato de café (CT 5,0%) na redução da população máxima atingida (A) e velocidade específica máxima de crescimento (μ) se comparado ao controle, dentro da mesma temperatura. De forma adicional, observou-se que os microrganismos não apresentaram fase *lag*, indicada como nula devido a condição do inóculo já adaptar-se rapidamente ao meio (leite).

Para *Salmonella* Typhimurium o efeito antimicrobiano do CT foi mais expressivo na temperatura de refrigeração, observando-se a redução de 1,12 ciclos log quando comparado o ensaio com 5,0% de CT e o controle na mesma temperatura. A 35 °C também foi observada uma redução da população máxima em 0,29 ciclos log. Em ambas as temperaturas a velocidade de crescimento reduziu consideravelmente, representando uma redução de 74% a 5 °C, e 57% a 35 °C.

Assim como observado para *Salmonella* Typhimurium, a *Escherichia coli* teve uma redução mais expressiva na população máxima atingida na temperatura de 5 °C devido a ação do extrato de café CT 5,0%. A redução em ciclos log foi de 1,58 e 0,62, respectivamente a 5 °C e 35 °C. Em ambas temperaturas a velocidade de crescimento reduziu, representando uma redução de 73% a 5 °C, e 36% a 35 °C. Assim como observado nos testes realizados para a cinética de crescimento em caldo BHI, no estudo realizado na matriz alimentar o extrato de CT mostrou uma inibição mais significativa frente a *Escherichia coli* se comparado com a *Salmonella* Typhimurium, especialmente se comparado o parâmetro população máxima atingida. Entretanto, ressalta-se que a possibilidade de redução de ambos microrganismos Gram-negativos pertencentes a família das Enterobactérias, conforme obtido no presente estudo, é de extrema importância para a indústria alimentícia.

Uma redução significativa no crescimento microbiano foi observada para o *Staphylococcus aureus* adicionado de extrato CT. Nas temperaturas de 5 °C e 35 °C uma redução na população máxima atingida de 1,72 e 2,83 ciclos log, respectivamente, foram obtidas quando comparadas ao controle. Também foi

observada uma redução na velocidade específica máxima de crescimento, de 67% e 86% a 5 °C e 35 °C, respectivamente. Em comparação com os patogênicos Gram-negativos *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli*, o *Staphylococcus aureus* mostrou uma maior susceptibilidade a atividade antimicrobiana aos extratos de café, principalmente na obtenção de menores populações máximas atingidas. De forma similar, Arora, Kaur e Kaur (2009) também evidenciaram uma maior atividade antimicrobiana aos extratos de café (5,0%) adicionados ou não de açúcar (4,0%) e leite (20%) na inibição do *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* em comparação a *Salmonella typhi*, que não mostrou sensibilidade nas condições testadas.

Em contrapartida, ao mesmo tempo que houve uma redução do crescimento dos patógenos pela ação do extrato CT na matriz leite, observou-se que o crescimento do *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* ficou praticamente inalterado a 35 °C. A adição do extrato reduziu a população máxima atingida do *Lactobacillus plantarum* em 0,25 ciclos log, e do *Lactobacillus rhamnosus* em 0,10 ciclos log. A velocidade específica máxima de crescimento reduziu 7,0% e 0% na temperatura de 35 °C para o *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus*, respectivamente.

Na temperatura de 5 °C não foi evidenciado o crescimento de ambos lactobacilos, tanto no ensaio contendo o extrato de café como no controle. Isso possivelmente se deve a temperatura ótima de crescimento das bactérias lácticas que fica na faixa de 30 a 35 °C, sem crescimento para algumas espécies de Lactobacilos abaixo de 10 °C (KALSCHNE et al., 2015).

A não inibição dos *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* na matriz leite em pó com o uso dos extratos de café (CT), demonstra novas possibilidades de aplicação destes extratos em associação com bactérias lácticas. Bactérias lácticas apresentam potencial de inibição microbiana comprovado na inibição de microrganismos deteriorantes, por serem capazes de produzir substâncias como a nisina e ácido láctico (KALSCHNE et al., 2014; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012), apresentando também potencial de inibição de alguns patógenos (SINGH, VEER PAL, 2018).

Considerando todos os ensaios com crescimento realizados na matriz leite em pó, observou-se um ajuste satisfatório das curvas de crescimento obtidas e preditas, com valores de R^2 maiores que 0,976, erro médio quadrático entre 0,000 e 0,086, fator de viés entre 0,999 e 1,000 e fator de exatidão entre 1,004 e 1,029. As

curvas de crescimento previstas dos ensaios para os microrganismos avaliados estão demonstradas na Figura 6.

Tabela 5- Parâmetros de crescimento A , μ e λ obtidos para a *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* pelo ajuste dos dados experimentais do crescimento em leite em pó reconstituído ao modelo de Gompertz modificado e índices estatísticos para avaliação do ajuste do modelo aos dados experimentais

Microrganismo	Ensaio	Temperatura	A	μ	λ	R^2	MSE	Fator de viés	Fator de exatidão
<i>Salmonella</i> Typhimurium	CT 5,0% (m v ⁻¹)	5 °C	6,31	0,09	0,00	0,990	0,001	1,000	1,006
	CT 5,0% (m v ⁻¹)	35 °C	8,66	0,98	0,00	>0,999	0,002	1,000	1,005
	Controle	5 °C	7,43	0,35	0,00	0,997	0,003	1,000	1,006
	Controle	35 °C	8,95	2,38	0,00	0,990	0,029	1,000	1,018
<i>Escherichia coli</i>	CT 5,0% (m v ⁻¹)	5 °C	5,82	0,09	0,00	0,982	0,000	1,000	1,003
	CT 5,0% (m v ⁻¹)	35 °C	8,26	0,13	0,00	0,997	0,006	1,000	1,010
	Controle	5 °C	7,40	0,14	0,00	0,992	0,012	1,000	1,015
	Controle	35 °C	8,88	0,49	0,00	0,998	0,006	1,000	1,008
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	CT 5,0% (m v ⁻¹)	5 °C	5,62	0,05	0,00	0,994	0,000	1,000	1,004
	CT 5,0% (m v ⁻¹)	35 °C	5,64	0,06	0,00	0,980	0,001	1,000	1,006
	Controle	5 °C	7,34	0,15	0,00	0,990	0,017	1,000	1,019
	Controle	35 °C	8,47	0,43	0,00	0,999	0,004	1,000	1,006
<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i>	CT 5,0% (m v ⁻¹)	5 °C	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-
	CT 5,0% (m v ⁻¹)	35 °C	8,70	0,13	0,00	0,982	0,052	1,000	1,029
	Controle	5 °C	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-
	Controle	35 °C	9,05	0,14	0,00	0,976	0,086	1,000	1,045
<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i>	CT 5,0% (m v ⁻¹)	5 °C	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-
	CT 5,0% (m v ⁻¹)	35 °C	8,59	0,16	0,00	0,991	0,027	1,000	1,017
	Controle	5 °C	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-
	Controle	35 °C	8,69	0,16	0,00	0,982	0,042	0,999	1,026

CT: *Coffea canephora* torrado (leite + *Coffea canephora* 5,0% m v⁻¹ + microrganismo); Controle: sem adição de café (leite + microrganismo); A : aumento logarítmico da população (log UFC mL⁻¹); μ : velocidade específica máxima de crescimento (h⁻¹); λ : duração da fase *lag* (h); R^2 : coeficiente de determinação; MSE: erro médio quadrático. Fonte: Autoria própria.

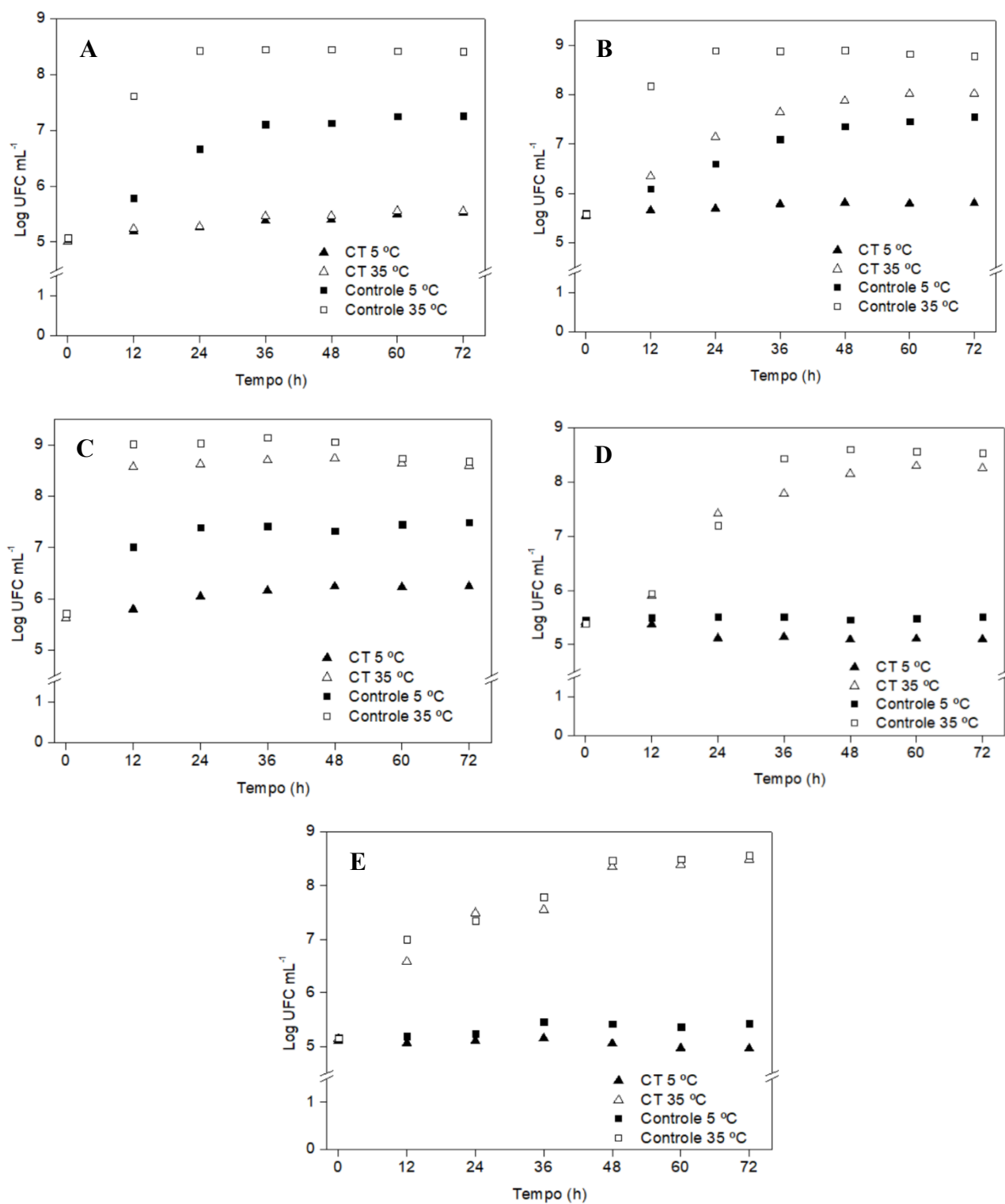


Figura 6- Curvas de crescimento dos ensaios na matriz leite em pó reconstituído adicionada de *Coffea canephora* torrado 5,0% e ensaios controle para (A) *Salmonella Typhimurium*, (B) *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (C), *Lactobacillus plantarum* (D), *Lactobacillus rhamnosus* (E).
Fonte: Autoria própria.

Estudos *in vitro* tem demonstrado a utilização de extratos de plantas com atividade biológica, inibindo ou retardando as alterações em alimentos (BURT, 2004), incluindo aplicações de extratos isolados ou combinação de extratos com atividade biológica (FRIEDMAN, 2015). O uso de óleos essenciais na proporção de 0,00065% a 0,67% em suco de frutas demonstrou a redução de patógenos como a *Escherichia coli* O157: H7 e *Salmonella entérica* em até 50% (FRIEDMAN et al., 2004). Apesar dos estudos *in vitro* demonstrarem o potencial antimicrobiano de diversos extratos de plantas, há questionamentos quanto a concentração adequada para obter o mesmo efeito em matrizes alimentares. BURT (2004) verificou o potencial de inibição de óleos essenciais *in vitro* e verificou que para garantir a inibição de Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é necessária uma concentração de 0,2 a 10 $\mu\text{l mL}^{-1}$. No entanto, para surtir o mesmo efeito inibitório em carne, lácteos, frutas e vegetais, foi necessária uma concentração superior, de 0,5 a 20 $\mu\text{l g}^{-1}$.

Nesse sentido, o presente estudo além dos estudos da sensibilidade dos extratos de café e cinética de crescimento em caldo BHI, aplicou os melhores resultados na matriz leite em pó reconstituído, obtendo-se resultados compatíveis com os observados nos meios de cultivo laboratoriais. Arora, Kaur e Kaur (2009) avaliaram soluções de café em concentrações de 5,0% suplementadas com 4,0% de açúcar e 20% de leite. Os autores citados observaram que o café conseguiu inibir principalmente o *Enterococcus faecalis* em 94% (somente 5,0% de café) e 92% (preparação de café com açúcar e leite). De forma adicional, os autores observaram que o efeito antimicrobiano observado para o extrato de café permaneceu mesmo com a adição de açúcar e leite.

De uma maneira geral, os estudos conduzidos na matriz alimentar leite em pó adicionado de extrato de café CT 5,0% indicaram atividade antimicrobiana com seletividade para as cepas probióticas testadas, as quais não foram inibidas. O fato do extrato avaliado inibir o crescimento de microrganismos patogênicos Gram-positivos e Gram-negativos é muito interessante a nível de aplicação industrial em alimentos, e o fato de não inibir os lactobacilos mostra um potencial para aplicação em alimentos funcionais probióticos. Ainda, considerando os testes realizados no leite em pó, comprovou-se que o extrato de café pode ser usado na matriz alimentar, obtendo-se resultados coerentes com os ensaios previamente realizados em caldo BHI. De forma adicional, a inibição dos patogênicos no leite, com o crescimento dos lactobacilos abre novas possibilidades para a indústria de alimentos probióticos,

considerando que os produtos lácteos são os carreadores universais de bactérias probióticas.

6 CONCLUSÕES

Foi possível observar que os extratos de café demonstraram inibição da atividade biológica *in vitro* frente as bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas testadas, quando contrastado o crescimento na ausência dos extratos.

Do grupo das bactérias Gram-positivas, os extratos de café torrado a 5,0% apresentaram maior potencial de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* (crescimento em meio líquido e desempenho em matriz alimentar), sendo possível observar o impacto no desenvolvimento bacteriano com o acréscimo da fase *lag* e inibição do crescimento.

Ainda no grupo das Gram-positivas, para os *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* não houve formação de halos de inibição, mesmo em concentrações de 5,0% de café torrado ou verde, mostrando-se insensíveis aos extratos de café nestas concentrações, assim como na matriz alimentar. Este resultado merece ser destacado sob o ponto de vista tecnológico, pois pode possibilitar o uso combinado dos extratos de café como agentes microbianos no controle de patógenos, associado a adição de probióticos em alimentos.

Do grupo das bactérias Gram-negativas, representadas pela *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli*, os extratos de café torrado mostraram-se mais eficientes na inibição, quando comparados aos extratos de café verde. Na aplicação do extrato de café CT a 5,0% em matriz alimentar, foi possível observar que o mesmo se tornou mais efetivo na inibição do crescimento das bactérias Gram-negativas quando associado a temperaturas de refrigeração, em comparação a temperatura de 35°C. Os extratos de café arábica e canéfora torrado, que continham maior teor de melanoidinas, demonstraram maior atividade biológica, quando comparado ao extrato com maior teor de ácido 5-cafeoilquínico e cafeína associados (extrato do café canéfora verde). Devido à complexidade dos compostos encontrados nos extratos de café, tornam-se necessário estudos mais abrangentes para a confirmação de quais compostos exercem a atividade biológica na inibição bacteriana.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, S. A. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p.414-420, 2010.

ALVAREZ, Maria V.; MOREIRA, Maria R.; PONCE, Alejandra. Antiquorum sensing and antimicrobial activity of natural agents with potential use in food. **Journal of Food Safety**, Mar del Plata, v. 32, n. 3, p. 379-387, 2012.

ALMEIDA, A. A. et al. Antibacterial Activity of Coffee Extracts and Selected Coffee Chemical Compounds against Enterobacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Ilha do Fundão, v. 54, n. 23, p. 8738-8743, 2006.

ARORA, Daljit Singh; KAUR, Gurinder Jeet; KAUR, Hardeep. Antibacterial Activity of Tea and Coffee Their Extracts and Preparations. **International Journal of Food Properties**, Amritsar, v. 12, n. 2, p. 286–294, 2009.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Coffee, Tea, Cocoa**. Springer: Berlin, 1114 p. 1114, 2009.

BURT, S. A. et al. The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. **Plos One**, The Netherlands, v. 9, n. 4, p. 1-6, 2014.

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. **International Journal of Food Microbiology**, The Netherlands, v. 94, n. 3, p. 223– 253, 2004.

CAROCHO, Marcio; MORALES, Patricia; FERREIRA, Isabel C.F.R. Natural food additives: Quo vadis? **Trends in Food Science e Technology**, Madrid, v. 45, n. 2, p. 284-295, 2015.

COCKERILL, R, F. et al. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard: M07-A9. **Clinical And Laboratory Standards Institute**, Wayne, v. 32, n. 5, p.1-88, 2015.

CONTRERAS-CALDERÓN, J. et al. Evaluation of antioxidant capacity in coffees marketed in Colombia : Relationship with the extent of non-enzymatic browning. **Food Chemistry**, Medellin, v. 209, p. 162–170, 2016.

CORSO, Marinês Paula; VIGNOLI, Josiane Alessandra; BENASSI, Marta de Toledo. Development of an instant coffee enriched with chlorogenic acids. **Journal of Food Science and Technology**, Medianeira, v. 53, n. 3, p. 1380–1388, 2016.

DUANGJAI, A. et al. Comparison of antioxidant , antimicrobial activities and chemical profiles of three coffee (*Coffea arabica* L .) pulp aqueous extracts. **Integrative Medicine Research**, Phayao, v. 5, n. 4, p. 324–331, 2016.

FARAH, Adriana; DONANGELO, Carmen Marino. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Ilha do Fundão, v. 18, n. 1, p. 23-36, 2006.

FARAKOS, S. M. S.; FRANK, J.F.; SCHAFFNER, D.W. Modeling the influence of temperature, water activity and water mobility on the persistence of Salmonella in low-moisture foods. **International Journal of Food Microbiology**, Athens, v. 166, n. 2, p. 280-293, 2013.

FRIEDMAN, M. et al. Antibacterial Activities of Plant Essential Oils and Their Components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* enterica in Apple Juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Albany, v. 52, n. 19, p. 6042- 6048, 2004.

FRIEDMAN, Mendel. Antibiotic-Resistant Bacteria: Prevalence in Food and Inactivation by Food-Compatible Compounds and Plant Extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Albany, v. 63, n. 15, p. 3805-3822, 2015.

GEITENES, S. et al. Growth modeling of lactic acid bacteria and microbiological analysis in two types of sliced vacuum package cooked ham. **Ciências Exatas e Naturais**, Curitiba, v. 15, n. 1, p.113-133, 2013.

GEORGE, Sunitha Elizabeth; RAMALAKSHMI, Kulathooran; RAO, Lingamallu Jagan Mohan. A perception on health benefits of coffee. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Mysore, v. 48, n. 5, p. 464–486, 2008.

IBRAHIM, S. A. et al. Application of caffeine, 1, 3, 7-trimethylxanthine, to control *Escherichia coli* O157:H7. **Food Chemistry**, United States, v. 99, n.4, p. 645–650, 2006.

JUNG, S. et al. Cellular Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Coffee Extracts with Different Roasting Levels. **Journal of Medicinal Food**, Cheonan, v. 20, n. 6, p.626-635, 2017.

JUNSATHIANA, P. et al. Biological and neuroprotective activity of Thai edible plant extracts. **Industrial Crops & Products**, Chiang Rai, 124, 548-554, 2018.

KALSCHNE, D. L. et al. Growth inhibition of lactic acid bacteria in ham by nisin: A model approach. **Meat Science**, Medianeira, v. 98, n. 4, p. 744-752, 2014.

KALSCHNE, et al. Characterization of the spoilage lactic acid bacteria in “sliced vacuum-packed cooked ham”. **Brazilian Journal of Microbiology**, Medianeira, v. 46, n.1, 173-181, 2015.

KALSCHNE, D. L. et al. Sensory characterization and acceptance of coffee brews of *C. arabica* and *C. canephora* blended with steamed defective coffee. **Food Research International**, Londrina, v. 124, p. 234-238, 2018.

KALSCHNE, D. L. et al. Effect of steam treatment on the profile of bioactive compounds and antioxidant activity of defective roasted coffee (*Coffea canephora*). **LWT - Food Science and Technology**, Londrina, v. 99, p. 364–370, 2019.

KORNACKI, J. L.; GURTLER, J. B.; STAWICK, B. Enterobacteriaceae, Coliforms and *Escherichia coli* as indicators of quality and safety *In*: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: American Public Health Association, Washington, ed. 5, cap. 9, p. 103-120, 2015.

KOBAYASHI, Marcela Lika; BENASSI, Marta de Toledo. Sensory characterization of commercial soluble coffees by Flash Profile. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 3081–3092, 2012.

LANGNER, Ewa; RZESKI, Wojciech. Biological properties of melanoidins: a review. **International Journal of Food Properties**, Lublin, v. 17, n. 2, p. 344-553, 2013.

LOU, Z. et al. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Chlorogenic Acid. *M: Food Microbiology & Safety: Journal of Food Science*, Jiangnan, v. 5, n. 6, p. 398-403, 2011.

MANCINI, Ross S.; WANG, Yanfei; WEAVER, Donald F. Phenylindanes in Brewed Coffee Inhibit Amyloid-Beta and Tau Aggregation. **Frontiers in Neuroscience**, v Toronto, 12, n. 735, p.1-14, 2018.

MISRA, N. N. et al. Landmarks in the historical development of twenty first century food processing technologies. **Food Research International**, Mumbai, v. 97, p. 318-339. 2017.

MONENTE, Carmen et al. Coffee and spent coffee extracts protect against cell mutagens and inhibit growth of food-borne pathogen microorganisms. **Journal of Functional Foods**, Pamplona, v.12, p. 365-374, 2014.

MOREIRA, Ricardo Felipe Alves; TRUGO, Luiz Carlos; DE MARIA, Carlos Alberto Bastos. Volatile components in roasted coffee. Part II. Aliphatic, alicyclic and aromatic compounds. **Quimica Nova**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 2, 2000.

MUELLER, U. et al. Identification of H₂O₂ as a major antimicrobial component in coffee. **Food & Function**, Erlangen-Nuremberg, v. 2, n. 5, 265–272, 2011.

OESTREICH-JANZEN, Sigrid. **Chemistry of Coffee**. Elsevier, Hamburg, p.1-28, mar. 2013.

PASTORIZA, Silvia; RUFÍAN-HENARES, José Angel. Contribution of melanoidins to the antioxidant capacity of the Spanish diet. **Food Chemistry**, Armilla, v. 164, n. p. 438–445, 2014.

PERRONE, D. et al. Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. **Food Chemistry**, Ilha do Fundão, v. 106, n. 2, p. 859–867, 2008.

PERRONE, Daniel; FARAH, Adriana; DONANGELO, Carmem Marino. Influence of coffee roasting on the incorporation of phenolic compounds into melanoidins and their relationship with antioxidant activity of the brew. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Ilha do Fundão, v. 60, n. 17, p. 4265–4275, 2012.

RENDÓN, Mery Yovana; SALVA, Terezinha de Jesus Garcia; BRAGAGNOLO, Neura. Impact of chemical changes on the sensory characteristics of coffee beans during storage. **Food Chemistry**, Campinas, v. 147, 279–286, 2014.

RUNTI, G. et al. LWT - Food Science and Technology 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**, Trieste, v. 6, n.1, p. 1–7, 2014.

RUFÍAN-HENARES, J. A.; CUEVA, S. P. Antimicrobial Activity of Coffee Melanoidins- A Study of Their Metal-Chelating Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Granada, v. 57, n. 2, p. 432–438, 2009.

SHI, X.; DALAL, N. S.; JAIN, A. C. Antioxidant behaviour of caffeine: Efficient scavenging of hydroxyl radicals. **Food and Chemical Toxicology**, Morgantown, v. 29, n. 1, p. 1–6, 1991.

SILVA, N. et al. Manual de Métodos de Análises Microbiológica de Alimentos e água. 5. ed. São Paulo: **Varela**, 2010. 611 p.

SILVA, L. N. et al. Plant natural products targeting bacterial virulence factors. **American Chemical Society**, Porto Alegre, v. 116, n. 16, p. 9162-9236, 2016.

SINGH, Veer Pal. Recent approaches in food bio-preservation - a review. **Open Veterinary Journal**, Mathura, v. 8, n. 1, 104-111, 2018.

SIWE-NOUNDOU, X. et al. Biological activity of plant extracts and isolated compounds from *Alchornea laxiflora*: Anti-HIV, antibacterial and cytotoxicity evaluation. **South African Journal of Botany**, Grahamstown, v. 122, 498- 503, 2019.

STAUDER, M. et al. Antiadhesion and Antibiofilm Activities of High Molecular Weight Coffee Components against *Streptococcus mutans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Ancona, v. 58, n. 22, p.11662–11666, 2010.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C. L. Microbiologia: Anatomia Funcional de células Procarióticas e Eucarióticas. 10. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2012. 934p.

VIGNOLI, J. A. et al. Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. **Food Research International**, Londrina, v. 61, p. 279-285, 2014.

VIGNOLI, Josiane Alessandra; BASSOLLI, Denisley J.; BENASSI, Marta T. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. **Food Chemistry**, Londrina, v. 124, n. 2, p. 863–868, 2011.

WIJAYA, Willy; RIDWAN, Rini; BUDI, Hendrik Setia. Antibacterial ability of arabica (*Coffea arabica*) and robusta (*Coffea canephora*) coffee extract on *Lactobacillus acidophilus*. **Dental Journal**, Surabaya, v. 49, n. 2, p. 99–103, junho 2016.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico Para Café, Cevada, Chá, Erva Mate e Produtos Solúveis. **RDC N° 277**, 22 setembro de 2005.

BRASIL, Secretária de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Café Solúvel. **PORTARIA N° 130**, 19 fevereiro de 1999.