

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS QUÍMICOS DO CAFÉ

Ana Amélia Paolucci Almeida* Daniela Álvares Machado Silva**Elzíria de Aguiar Nunan*** Maria Beatriz Abreu Glória ****

*Doutoranda em Ciências de Alimentos (Faculdade de Farmácia, UFMG) E-mail: argos.bhe@terra.com.br, ** Bolsista de Iniciação Científica, ***Professor Adjunto (Doutor, Departamento de Produtos Farmacêuticos – Faculdade de Farmácia, UFMG).**** Professor Adjunto (Ph.D Departamento de Alimentos – Faculdade de Farmácia, UFMG).

Resumo

A atividade antimicrobiana *in vitro* pelo método de difusão em ágar de compostos químicos presentes no café: alcalóides (cafeína), ácidos fenólicos (ácidos clorogênico, caféico e protocatéico) e trigonelina frente a nove enterobactérias foi investigada. Para investigar a relação concentração e atividade das substâncias testadas realizou-se um estudo cinético utilizando o método turbidimétrico e empregando como microrganismo teste a *Salmonella choleraesuis*. Os resultados encontrados sugerem que os compostos químicos testados podem atuar como agentes antimicrobianos naturais contra enterobactérias.

Palavras-chave: café, ácido caféico, ácido protocatéico, trigonelina, cafeína, antimicrobiano, enterobactérias.

In vitro antimicrobial activity of coffee chemical compounds

Abstract

The *in vitro* antimicrobial activity, using the diffusion in agar method, of coffee chemical compounds - chlorogenic acid, protocatechuic acid, caffeic acid and trigonelline - against enterobacteria was investigated. In order to investigate the dose/activity relationship, kinetic studies were performed using the turbidimetric method and *Salmonella choleraesuis*. These results suggest that the coffee and chemical compounds found in coffee can be used as antimicrobial agents against enterobacteria.

Key-words: coffee, caffeine, protocatechuic acid, caffeic acid, trigonelline, antimicrobial, enterobacteria.

Introdução

O termo café compreende não só a bebida obtida pela extração de café torrado empregando-se água quente, como também uma grande variedade de produtos intermediários que se iniciam com a colheita da cereja fresca (Clarke & Macrae, 1989). O café é uma mistura complexa de compostos químicos de ocorrência natural e substâncias formadas durante o processo de torrefação (Daglia et al., 1998). Polifenóis como ácidos clorogênico, caféico, férulico e p-coumárico são encontrados em cafés verdes e torrados (Richelle et al., 2001). Ácido clorogênico é o nome trivial empregado para descrever uma grande variedade de ácidos fenólicos encontrados em vegetais, incluindo o café (Trugo & Macrae, 1984; Moreira & Trugo, 2000). Cafeína e trigonelina são metabólitos secundários de plantas derivados dos nucleotídeos purina e pirimidina (Macrae, 1989; Zheng & Ashihara, 2004).

Alguns estudos têm sido realizados com o objetivo de pesquisar a presença e formação de compostos com atividade antimicrobiana no café. Daglia et al. (1994a) avaliaram a atividade antibacteriana do café frente a bactérias Gram-positivo (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*) e Gram-negativo (*Proteus vulgaris*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*). Estes autores investigaram a atividade antibacteriana considerando os procedimentos de preparo da bebida, variedades de café e grau de torra, e concluíram que o processo de preparo da bebida não influenciou a atividade antibacteriana e que a espécie de café, *Coffea robusta*, teve uma atividade antibacteriana maior do que o *Coffea arabica*. Observaram ainda que o café com maior grau de torra possuiu atividade superior aos de torra média e baixa, devido à formação de produtos da reação de Maillard. Daglia et al. (1994b) relacionaram a atividade antibacteriana a compostos químicos presentes no café torrado empregando como microrganismo teste a bactéria *Staphylococcus aureus*. Estes autores desenvolveram um modelo de regressão capaz de prever a atividade antibacteriana de diferentes cafés considerando os seguintes compostos: cafeína, 5-hidroximetilfurfuraldeído, ácidos caféico e nicotínico. Furuhashi et al. (2002) estudaram a atividade antibacteriana de 24 amostras de café frente a *Legionella pneumophila*, bactéria envolvida em infecções respiratórias, e observaram a inibição da referida bactéria. Dogazaki et al. (2002) isolaram diferentes estruturas químicas em extrato de café com efeito antibacteriano contra *L. pneumophila*, sendo estas identificadas como ácido caféico, ácido clorogênico e ácido protocatéico.

A família *Enterobacteriaceae* compreende bactérias de grande interesse na área médica e na indústria de alimentos. Não foram encontrados na literatura, até o momento, trabalhos de atividade de café com várias bactérias desta família.

O estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana do café permitirá a seleção de frações com potencial emprego na conservação de alimentos, considerando-se a demanda por conservantes não tóxicos e naturais para alimentos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar a atividade antimicrobiana de substâncias químicas presentes no café, frente a enterobactérias. Foram também realizados estudos cinéticos avaliando-se a influência da concentração das substâncias.

Material e Métodos

Preparo das soluções. As soluções de ácido clorogênico (Aldrich C44206), ácido protocatéico (Sigma P5630), ácido caféico (Sigma C0625-26), trigonelina (Sigma T5509) e cafeína (Reagen) foram preparadas em concentrações que variaram de 0,5 a 12 mg/mL. Os ácidos protocatéico e clorogênico foram diluídos em água destilada estéril, colocados em aparelho de ultrassom por 30 s e em banho maria fervente por 30 s. O ácido caféico foi diluído em tween 80 a 0,5% e em seguida colocado em ultrassom durante 1 min. As demais substâncias foram diluídas em água destilada estéril.

Meios de cultura. Todos os meios de cultura foram fornecidos pela Dialab diagnósticos (Montes Claros, MG, Brasil).

Microrganismos. Os microrganismos empregados foram bactérias da American Type Culture Collection (ATCC): *Citrobacter freundii* (ATCC 8090), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Enterobacter cloacae* (ATCC 23355), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella oxytoca* (ATCC 49131), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Proteus hauseri* (ATCC 13315), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 14028) e *Serratia marcescens* (ATCC 8100).

Atividade antimicrobiana de trigonelina, ácido clorogênico, ácido caféico e ácido protocatéico frente a enterobactérias. Foram avaliadas as atividades antimicrobianas da trigonelina, ácidos clorogênico, caféico e protocatéico na concentração de 2 mg/mL frente às bactérias citadas. Para tal foi usado o método de difusão em ágar (Nunan et al., 1985; NCCLS, 1993; Collins et al., 1995), utilizando-se discos estéreis (Sensibiodisc, Cecon, SP) de 6 mm de diâmetro. Culturas de cada bactéria foram plaqueadas em ágar nutriente e incubadas a $36,5 \pm 1$ °C (Forma Scientific, Marietta, OH, EUA)/24 horas. O inóculo foi padronizado transferindo-se colônias do ágar nutriente para um tubo de solução salina estéril, em que foi medida a turbidez a 45% de transmitância em espectrofotômetro (Coleman, modelo 6120, Maywood, IL, EUA) a 580 nm, o que após plaqueamento correspondeu a 10^8 UFC/mL. Desta suspensão foram retirados 200 µL e semeados em superfície de placas de Petri de 150 mm contendo ágar Mueller Hinton. Os discos foram impregnados com 20 µL dos compostos e colocados na superfície do ágar semeado com cada uma das bactérias. As placas foram incubadas a $36,5 \pm 1$ °C/48 horas. Os halos de inibição foram medidos com paquímetro e considerou-se o diâmetro total, incluindo o do disco. Discos contendo o antibiótico cloranfenicol (30 µg) (Cecon, SP, Brasil), foram usados como controle positivo. As análises foram efetuadas com três repetições. Os resultados foram expressos em mm pela média do diâmetro dos halos de inibição. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Influência da concentração na atividade antimicrobiana. Para o estudo cinético foi empregado o método turbidimétrico (United, 1995; NCCLS, 2000) e diferentes concentrações do ácido protocatéico, cafeína e trigonelina, com a leitura de transmitância a 530 nm e posterior transformação em absorbância ($A = 2 - \log T$). Selecionou-se a *Salmonella choleraesuis* como microrganismo teste para estudos pelo método turbidimétrico. Aos tubos contendo 9 mL de caldo infuso de cérebro e coração (BHI) adicionou-se 1 mL de cada substância (0,5; 1; 2; 4; e 8 mg/mL) e 0,1 mL de inóculo (25% de transmitância a 580 nm, o que após inoculação correspondeu a 10^6 UFC/mL). Estes foram incubados a $36,5 \pm 1$ °C e a transmitância foi lida por 24 h. Foram empregados como controles BHI com as mesmas concentrações das substâncias usadas no estudo e com o inóculo (branco). As análises foram efetuadas com três repetições. Os resultados foram expressos em % de absorbância.

Resultados e Discussão

Atividade antimicrobiana de substâncias químicas presentes no café pelo método de difusão em ágar Na tabela 1 são apresentados os resultados da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar. Não foi observada diferença estatística entre os halos de inibição formados pelos ácidos clorogênico e protocatéico em todas as enterobactérias investigadas, e estes superaram os halos obtidos para o *C. freundii* (tabela 1). O tamanho dos halos de inibição formados pelo ácido caféico e pela trigonelina não diferiu estatisticamente entre as bactérias investigadas.

Tabela 1. Diâmetro dos halos de inibição para ácido clorogênico, ácido caféico, ácido protocatéico, trigonelina frente a enterobactérias

Microrganismos	Halos de Inibição (mm)/ Substância			
	Ácido clorogênico	Ácido protocatéico	Ácido caféico	Trigonelina
<i>S. marcescens</i>	9,73 ± 0,87 ^a	10,00 ± 2,18 ^a	9,17 ± 0,76 ^a	9,58 ± 1,88 ^a
<i>P. hauseri</i>	9,08 ± 1,13 ^a	9,30 ± 0,75 ^a	8,67 ± 0,76 ^a	8,58 ± 0,80 ^a
<i>E. cloacae</i>	9,58 ± 1,18 ^a	10,00 ± 0,90 ^a	10,00 ± 1,32 ^a	9,08 ± 0,80 ^a
<i>P. mirabilis</i>	8,92 ± 0,38 ^a	8,00 ± 0,50 ^a	8,25 ± 0,25 ^a	8,92 ± 0,76 ^a
<i>K. oxytoca</i>	7,83 ± 1,04 ^a	7,58 ± 0,52 ^a	7,50 ± 0,50 ^a	7,42 ± 0,52 ^a
<i>E. aerogenes</i>	8,60 ± 0,36 ^a	8,43 ± 0,12 ^a	8,43 ± 0,78 ^a	8,58 ± 1,18 ^a
<i>E. coli</i>	8,00 ± 0,50 ^a	8,00 ± 0,50 ^a	8,00 ± 0,43 ^a	8,08 ± 0,52 ^a
<i>S. choleraesuis</i>	7,92 ± 1,18 ^a	8,42 ± 1,42 ^a	8,25 ± 1,80 ^a	8,75 ± 1,22 ^a
<i>C. freundii</i>	6,83 ± 0,38 ^b	7,00 ± 0,50 ^b	7,17 ± 0,76 ^a	7,00 ± 0,50 ^a

n=3 Valores médios (x ± desvio padrão) com letras diferentes (a,b) nas colunas são significativamente diferentes (Teste de Tukey, p < 0,05)

Influência da concentração de algumas substâncias do café no crescimento de *S. choleraesuis* durante 24 h. Na tabela 2 são apresentados os valores da razão (A/A_0), sendo A_0 a absorvância da *S. choleraesuis* sem substância antimicrobiana. Observou-se um maior efeito inibidor do ácido protocatéico e da cafeína para a *S. choleraesuis* na concentração de 8 mg/mL. Buchanan & Fletcher (1978) observaram que a cafeína (2 mg/g) inibiu a produção de aflatoxina por *Aspergillus parasiticus* em meio líquido. Resultados similares foram relatados por Nartowicz et al. (1979) após avaliarem grãos de café com cafeína e descafeinados. Entretanto, Daglia et al. (2002) sugeriram que a cafeína não possuía atividade antimicrobiana, pois não observaram diferença ao compararem café com cafeína e descafeinado.

Tabela 2 Absorvância (A/A_0) em função da concentração de substâncias químicas frente a *S. choleraesuis* pelo método turbidimétrico após 24 horas de incubação

Concentração mg/mL	Absorvância (A/A_0) \pm Desvio Padrão/Substância		
	Ácido protocatéico	Cafeína	Trigonelina
8	0,03 \pm 0,03	0,05 \pm 0,01	0,13 \pm 0,06
4	0,41 \pm 0,16	0,30 \pm 0,03	0,50 \pm 0,03
2	0,71 \pm 0,08	0,57 \pm 0,06	0,61 \pm 0,08
1	0,79 \pm 0,12	0,79 \pm 0,01	0,61 \pm 0,05
0,5	0,86 \pm 0,05	0,72 \pm 0,05	0,67 \pm 0,07

Na figura 1 estão apresentadas as razões de absorvância (A/A_0) em relação à concentração de cada substância frente a *S. choleraesuis* após 24 horas de incubação, a equação da reta de regressão e o coeficiente de correlação. Verificou-se que quanto maior a inclinação da reta maior é o efeito antimicrobiano da substância. De acordo com as inclinações (b) das retas, o maior efeito antimicrobiano foi atribuído ao ácido protocatéico.

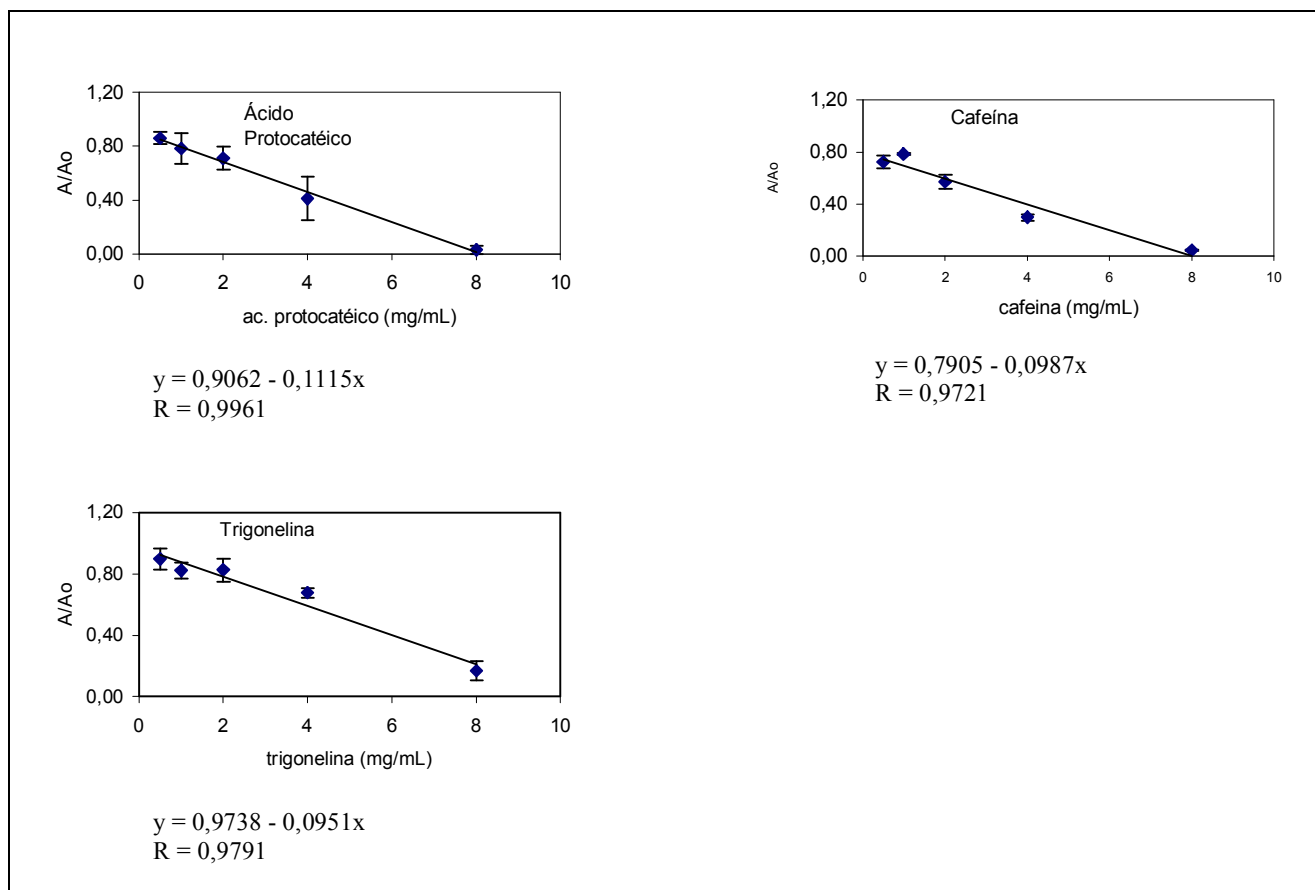


Figura 1 Razão A/A_0 de diferentes concentrações de substâncias do café frente a *S. choleraesuis* após 24 horas de incubação (representação da equação da reta de regressão e coeficiente de correlação R).

Na figura 2 tem-se o estudo cinético de substâncias químicas do café em relação a diferentes concentrações. Em relação ao ácido protocatéico e à cafeína foi observado que na concentração de 8 mg/mL, ambas as substâncias inibiram a bactéria estudada. Na concentração de 4 mg/mL de 0 a 5 horas de contato do microrganismo com o ácido protocatéico e com a cafeína observou-se crescimento pouco acentuado da bactéria. Uma menor inibição (menor atividade) foi observada após 5 horas. Em todos os tempos estudados as concentrações de 2, 1 e 0,5 mg/mL das substâncias acarretaram menor inibição da

bactéria, embora ainda com inibição em relação ao crescimento observado no branco. Isto indicou que mesmo as menores concentrações avaliadas inibiram o crescimento da *S. choleraesuis*.

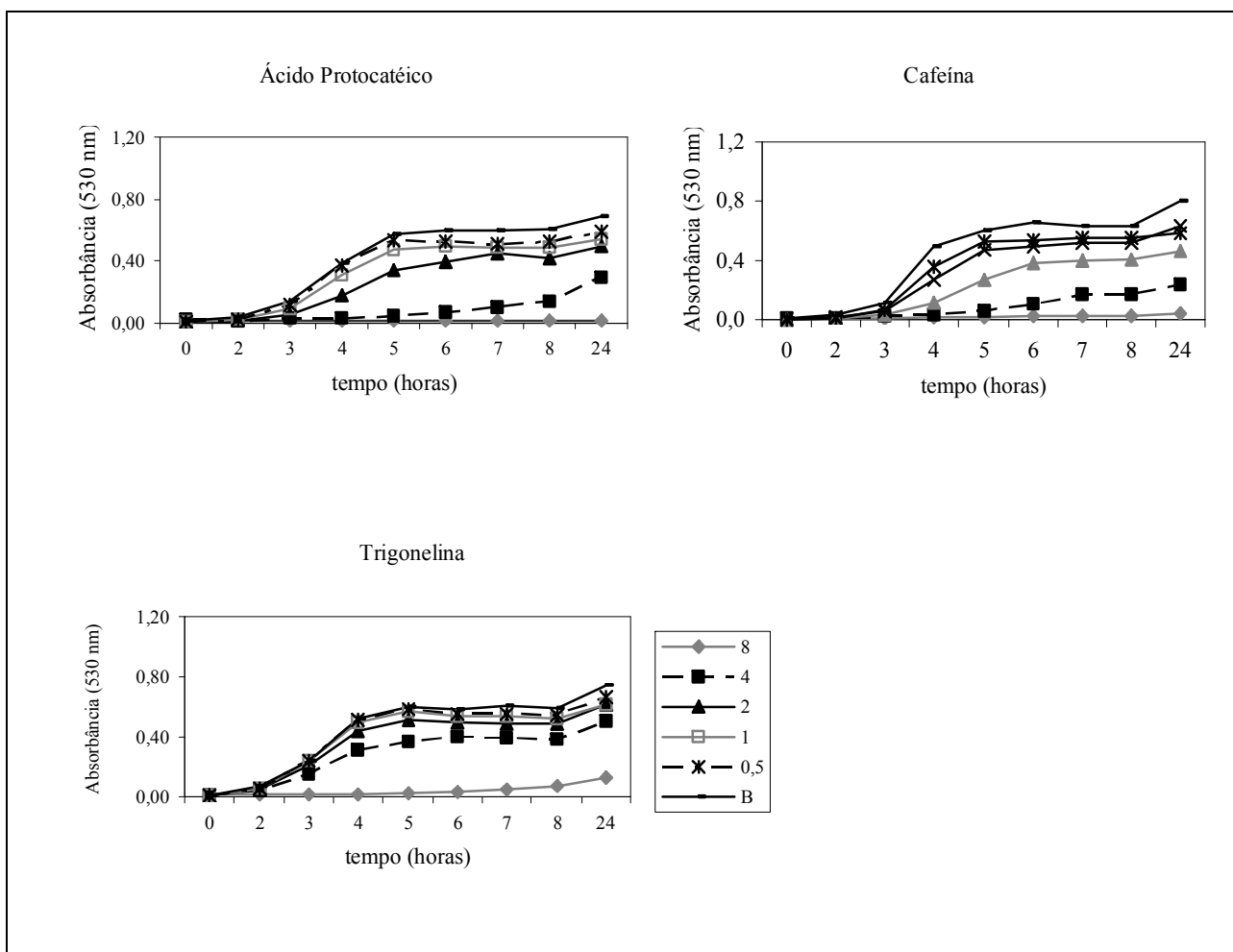


Figura 2 Influência da concentração de ácido protocatéico, cafeína e trigonelina no crescimento de *S. choleraesuis* determinado pela absorbância a 530 nm a 36,5 °C durante 24 h.

Conclusões

Não houve diferença significativa na atividade antimicrobiana do ácido caféico e da trigonelina para as enterobactérias investigadas pelo método de difusão em ágar. Entretanto, os ácidos clorogênico e protocatéico apresentaram efeito antibacteriano frente a todas as enterobactérias investigadas, exceto o *C. freundii*.

Observou-se um maior efeito inibidor do ácido protocatéico e da cafeína para a *S. choleraesuis* na concentração de 8 mg/mL. Todas as substâncias estudadas apresentaram baixa atividade antibacteriana nas concentrações de 2, 1 e 0,5 mg/mL. Os resultados obtidos mostraram que os ácidos clorogênico, protocatéico, caféico, trigonelina e cafeína são potenciais agentes antimicrobianos naturais contra enterobactérias.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Dialab diagnósticos pela doação dos meios de cultura e ao CNPQ pela concessão das bolsas.

Referências Bibliográficas

- BUCHANAN, R.L.; FLETCHER, A.M. Methylxanthine inhibition of aflatoxin production. *J. Food Sci.*, v. 43, p. 654-655, 1978.
- CLARKE, R.J.; MACRAE, R. *Coffee: Chemistry*, 2 ed., Elsevier Applied Science, London, 1989, 306 p.
- COLLINS, C.H.; LYNE, P.M.; GRANJE, J.M. *Collins and Lyne's microbiological methods*. 7 ed., Butterworth-Heinemann, Londres, p. 178-205, 1995.
- DAGLIA, M.; CUZZONI, M.T.; DACARRO, C. Antibacterial activity of coffee. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, p. 2270-2272, 1994a.

- DAGLIA, M.; CUZZONI, M.T.; DACARRO, C. Antibacterial activity of coffee relationship between biological activity and chemical markers. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, p. 2273-2277, 1994b.
- DAGLIA, M.; PAPETTI, A.; DACARRO, C.; GAZZANI, G. Isolation of an antibacterial component from roasted coffee. *J. Pharmac. Biomed. Analysis*, v. 18, p. 219-225, 1998.
- DAGLIA, M.; TARSI, R.; PAPETTI, A.; GRISOLI, P.; DACARRO, C.; PRUZZO, C.; GAZZANI, G. Antiadhesive effect of green and roasted coffee on *Streptococcus mutans* adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 1225-1229, 2002.
- DOGASAKI, C.; SHINDO, T.; FURUHATA, K.; FUKUYAMA, M. Identification of chemical antibacterial components against *Legionella pneumophila* in a coffee beverage. *J. Pharm. Soc. Japan*, v. 122, n. 7, p.487-494, 2002.
- FURUHATA, K.; DOGASAKI, C.; HARA, M.; FURUYAMA, M. Inactivation of *Legionella pneumophila* by phenol compounds contained in coffee. *J. Antibact. Antifung. Agents*, v. 30, p. 291-297, 2002.
- MACRAE, R. Nitrogenous components. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Ed.) *Coffee: chemistry*. London: Elsevier Applied Science, 1989. p. 115 - 152.
- MOREIRA, R.F.A.; TRUGO, L.C. Componentes voláteis do café torrado, parte II compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. *Química Nova*, v. 23, n. 2, p. 195-203, 2000.
- NARTOWICZ, V.B.; BUCHANAN, R.L.; SEGALL, S. Aflatoxin production in regular and decaffeinated coffee beans. *J. Food Sci.*, v. 44, p. 446-448, 1979.
- NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved standard- 15 ed, v. 20, n. 2, M7-A5, 33p, 2000.
- NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test, approved standard – M2-A5, 1993.
- NUNAN, E.A.; CAMPOS, L.M.M.; PAIVA, R.L.R.; OLIVEIRA, S.T.; DAUDOUN, H.A.; OLIVEIRA, A.B. Estudo da atividade antimicrobiana de extrato de folha de *Aristolochia gigantea* Mart. e Zucc. *Rev. Farm. Bioq.*, v.6, p. 33-40, 1985.
- RICHELLE, M.; TAVAZZI, I.; OFFORD, E. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (Coffee, Cocoa, and Tea) prepared per cup serving. *J. Agric. Food Chem.*, v. 49, p. 3438-3442, 2001.
- TRUGO, L.C.; MACRAE, R.A. Study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chem.*, v. 15, p. 219-228, 1984.
- UNITED States Pharmacopeia, 23 ed., Rockville, United States Pharmacopeial Convention, NF 18, 1995, 2391p.
- ZHENG, X.; ASHIHARA, H. Distribution, biosynthesis and function of purine and pyridine alkaloids in *Coffea arabica* seedlings. *Plant Science*, v. 166, p. 807–813, 2004.