

INIBIÇÃO DE *Salmonella* Typhimurium POR COMPOSTOS DO CAFÉ EM DIFERENTES VALORES DE pH E EFICIÊNCIA CONSERVANTE EM UM MODELO ALIMENTAR

Ana Amélia Paolucci Almeida¹, E-mail: argos.bhe@terra.com.br; Michele Cristina Vilaça¹; Elzília de Aguiar Nunan²; Maria Beatriz Abreu Glória¹

Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, ¹Departamento de Alimentos, ² Departamento de Ciências Farmacêuticas.

Resumo:

A influência do pH (4,5 a 7,5) na atividade antimicrobiana do ácido protocatéico e da cafeína contra *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium foi investigada *in vitro* empregando-se o método de microplacas e leitura da absorbância a 595 nm, após reação com o sal de tetrazólio. O pH de 4,5, seguido de 5,5, promoveu um maior efeito inibitório. O pH modulou a atividade antimicrobiana desses compostos *in vitro*. A eficiência conservante desses compostos em leite desnatado inoculado com *Salmonella* Typhimurium foi avaliada em pH 4,5 e 5,5, durante 28 dias a 25 °C. No pH 4,5, tanto o ácido protocatéico, quanto a cafeína foram eficientes no controle da bactéria teste, e esse efeito foi observado após 24 h de contato e permaneceu ao longo de 28 dias de estocagem. O ácido protocatéico foi capaz de reduzir o crescimento em três ciclos logarítmicos. O ácido protocatéico apresenta-se como um potencial agente conservante em alimentos ácidos.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, ácido protocatéico, cafeína, *Salmonella* Typhimurium.

INHIBITION OF *Salmonella* Typhimurium WITH COFFEE COMPOUNDS IN DIFFERENT pH VALUES AND PRESERVATIVE EFFICIENCY IN A FOOD MODEL

Abstract:

The influence of pH (4.5 to 7.5) on the antimicrobial activity of protocatechuic acid and caffeine against *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium was investigated *in vitro* using the microtiter plate method and absorbance readings at 595 nm, after reaction with tetrazolium salt. A higher inhibitory effect was observed at pH 4.5, followed by 5.5. Therefore, the pH modulated the antimicrobial effect of these compounds *in vitro*. The preservative efficiency of these compounds in nonfat milk inoculated with *Salmonella* Typhimurium was investigated at pH values of 4.5 and 5.5 at 25 °C. At pH 4.5, both protocatechuic acid and caffeine were effective against this bacterium. The effect was observed at 24 h contact and remained up to 28 days storage. This acid was capable of reducing *Salmonella* Typhimurium growth three log cycles. Therefore, it is a promising preservation agent for acid foods.

Key words: antibacterial activity, protocatechuic acid, caffeine, *Salmonella* Typhimurium

Introdução

A deterioração é o principal motivo de perdas dos alimentos e ocorre principalmente pela presença de bactérias e fungos. Assim sendo, existe uma tendência da indústria alimentícia em utilizar aditivos com potencial atividade antimicrobiana para aumentar a vida de prateleira dos alimentos (Nazer et al., 2005). A demanda por aditivos seguros e inócuos tem levado à pesquisa de novas substâncias, especialmente as naturais. Nesse sentido, perspectivas estão abertas para a investigação de novos conservantes para alimentos (Nychas, 1995; Negi et al., 2004). Dessa forma, o estudo de substâncias presentes em alimentos e plantas comestíveis com propriedades antimicrobianas e o seu uso como conservante natural é uma alternativa para prolongar a vida de prateleira de alimentos (Kobilinsky et al., 2007).

Alguns estudos têm descrito a atividade antimicrobiana de extratos e de compostos químicos presentes no café (Daglia et al., 1994; Furuhashi et al., 2002; Ibrahim et al., 2006). Entre os compostos presentes no café com atividade antimicrobiana, a cafeína e o ácido protocatéico mostraram promissoras propriedades contra enterobactérias (Almeida et al., 2006). Entretanto, estudos sobre a eficiência conservante dessas substâncias em modelos alimentares não foram encontrados na literatura. Dois aspectos são cruciais quando se trata da aplicação prática de compostos químicos na conservação de alimentos. O primeiro relaciona-se às alterações, após a sua adição, nas propriedades sensoriais e na textura dos alimentos. O segundo está relacionado às interações desses compostos com ingredientes do alimento e a influência dessa interação na atividade antimicrobiana (Devlieghere et al., 2004). Muitos estudos foram conduzidos *in vitro*, empregando-se extratos ou compostos químicos de café contra microrganismos em meios de cultura. Entretanto, não foram encontrados na literatura estudos em modelos alimentares considerando fatores tais como pH, tempo, dentre outros, o que foi realizado no presente trabalho.

O presente trabalho teve como objetivo investigar a influência de diferentes valores de pH na atividade antimicrobiana do ácido protocatéico e da cafeína sobre *Salmonella* Typhimurium e estudar a eficiência desses compostos como agentes conservantes em um modelo alimentar.

Material e Métodos

Material

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

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

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

Métodos

Estudo da influência do pH. O método de microplacas (Vanden Berghe & Vlietinck, 1991) foi usado para investigar a atividade antimicrobiana das substâncias nos diferentes valores de pH. O ácido protocatéico e a cafeína foram usados nas concentrações de 2,45 e 2,58 mg/mL, respectivamente, o que equivale às concentrações inibitórias de 50% dessas substâncias (Almeida et al., 2006). Aliquotas (195 μL) de BHI, com o pH ajustado, e com as substâncias foram adicionadas a poços das placas de microtitulação que, em seguida, foram inoculadas com 5 μL da bactéria teste a 10^8 UFC/mL. As placas foram agitadas em mesa agitadora (Tecnal, modelo TE 140, SP, Brasil) por 1 min a 150 rpm, e incubadas a $36,5 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após 18 h, foram adicionados em cada poço 20 μL de solução (5 mg/mL) de sal de tetrazólio [brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazol – MTT, Sigma, St. Louis, EUA] filtrado em unidade filtrante esterilizada (poro 0,22 μm , Millipore, São Paulo, SP, Brasil). A leitura da absorbância a 595 nm foi realizada em espectrofotômetro leitor de microplaca (Bio-Rad, modelo 550, EUA). Os resultados foram expressos em percentagem de inibição em relação ao controle (BHI inoculado com a bactéria). Essa percentagem foi calculada de acordo com a equação $\% \text{ inibição} = 100(\text{Ac}-\text{As})/\text{Ac}$ (The United..., 2006), sendo A a absorbância para o controle (Ac) e para a amostra (As). O controle foi preparado inoculando-se o BHI (195 μL) com 5 μL do inóculo. Foram também preparados controles (BHI + inóculo) com pH ajustado para 4,5; 5,5; 6,5 e 7,5. O controle negativo foi preparado inoculando-se o BHI (195 μL) com 5 μL do inóculo e cloranfenicol (30 μg /poço).

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

Estudo da eficiência do ácido protocatéico e da cafeína como conservante em modelo alimentar. Foram empregadas as concentrações inibitórias de 90% (Almeida et al., 2006), para o ácido protocatéico e para a cafeína, utilizando-se *Salmonella* Typhimurium e um protocolo para avaliação da eficiência das substâncias selecionadas como conservantes para leite como modelo alimentar, adicionou-se ácido protocatéico (4,14 mg/mL) e cafeína (4,96 mg/mL) individualmente a tubos, contendo 18 mL de leite em pó desnatado reconstituído, esterilizado, e com pH posteriormente ajustado para 4,5 e 5,5 com hidróxido de potássio. Os tubos foram inoculados a bactéria (10^6 UFC/mL) e incubados a $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 28 dias. Após tempos de contato específicos (0, 1, 7, 14, 21 e 28 dias), foram retiradas amostras para a contagem das células viáveis de diluições apropriadas das amostras por semeadura “pour-plate” em ágar nutriente e incubação a $36,5 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. O controle foi preparado, inoculando-se o leite com a bactéria teste, incubando e realizando as contagens de células viáveis nos mesmos intervalos das amostras. Foram ainda preparados um controle (leite) com pH ajustado para 4,5 e outro para 5,5. Cada experimento foi realizado três vezes, com duas réplicas cada.

Resultados e Discussão

Influência do pH sobre a atividade antimicrobiana

Na Tabela 1 estão apresentados os percentuais de inibição das substâncias nos valores de pH investigados. Foi evidenciado que o pH interferiu na atividade antimicrobiana das substâncias avaliadas sobre *Salmonella* Typhimurium. Observou-se que, em pH 4,5, tanto a cafeína, quanto o ácido protocatéico, causaram inibições $\geq 96\%$. Esses percentuais de inibição foram maiores do que aqueles observados com pH 5,5, que foram diferentes dos percentuais observados com pH 6,5 e 7,5. Para a cafeína, a percentagem de inibição se manteve elevada na faixa de 4,5 a 5,5 (96% a 77%). Em pH 7,5, a percentagem de inibição encontrada para a cafeína foi menor (10,3%), mas não diferiu da inibição encontrada para o ácido protocatéico (12,0%).

Para o controle com ajuste de pH, observou-se que a 4,5 a inibição foi de 80,5% e a 5,5 foi de 32,4%, enquanto que, para os valores de 6,5 e 7,5, não foi observada inibição. Verificou-se que o pH na faixa ácida foi capaz de inibir a bactéria teste, mesmo sem a presença de substâncias inibidoras.

A influência do pH na atividade antimicrobiana das substâncias do café investigadas assemelha-se à relatada na literatura, para substâncias do tipo ácido fraco e para os óleos essenciais. Nychas (1995) e Burt (2004), ao investigarem as propriedades antibacterianas de óleos essenciais, destacaram o fato de que determinadas condições físicas, tais como baixo pH, baixas temperaturas e baixos níveis de oxigênio causavam um aumento da atividade antimicrobiana. Wen et al. (2003) ao avaliarem atividade anti-*Listeria* de ácidos fenólicos em valores de pH entre 4,5 e 6,5, observaram uma significativa correlação entre pH e atividade antimicrobiana. Esses autores observaram que para os ácidos *p*-coumárico, ferúlico e caféico a inibição aumentava, à medida que o pH diminuía, e que, para o ácido clorogênico, a inibição de *Listeria* foi maior

em pH ajustado para 6,5, fato esse, não observado no presente trabalho para o ácido protocatéico, em relação aos percentuais de inibição sobre a cepa de *Salmonella* investigada. Para ácidos fracos a atividade antimicrobiana é dependente do pH, devido a influência desse parâmetro na proporção de moléculas não-dissociadas na solução (Marquis et al., 2003; Wen et al., 2003).

As constantes de dissociação (pKa) foram apresentadas por Ramos-Nino (1996) para alguns ácidos fenólicos, como, o ácido caféico com pKa de 4,45. No presente trabalho, o composto fenólico empregado - ácido protocatéico, provavelmente, apresentou uma maior proporção de moléculas não-dissociadas, nos valores de pH inferiores. Esse resultado está de acordo com o trabalho realizado por Wen et al. (2003), que verificaram que a atividade dos ácidos hidroxicinâmicos investigados foi acentuada com o aumento concomitante na proporção dos ácidos não-dissociados, quando o pH do meio foi reduzido de 6,5 para 4,5.

Tabela 1. Influência do pH na inibição de *Salmonella* Typhimurium por ácido protocatéico e cafeína em caldo BHI, após 18 h de contato

Substância	Percentual de inibição /pH			
	4,5	5,5	6,5	7,5
Ácido protocatéico	96,7 ± 0,3 ^a	37,5 ± 4,1 ^b	21,0 ± 4,2 ^c	12,0 ± 0,2 ^d
Cafeína	96,0 ± 0,9 ^a	77,3 ± 3,4 ^b	42,9 ± 3,3 ^c	10,3 ± 1,0 ^d
Controle	80,5 ± 0,2 ^a	32,4 ± 0,9 ^b	0,0 ± 0,0 ^c	0,0 ± 0,0 ^d

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

Avaliação da eficiência conservante da cafeína e do ácido protocatéico em um modelo alimentar

As contagens obtidas a partir do leite desnatado inoculado com 10^6 UFC/mL de *Salmonella* Typhimurium, mantido a 25 ± 1 °C, durante 28 dias, com valores de pH ajustados para 4,5 e 5,5, na presença ou não da cafeína e do ácido protocatéico estão apresentadas na Figura 1.

Verificou-se, ao final de 28 dias, um aumento de três ciclos logarítmicos na contagem microbiana do controle. Tanto o ácido protocatéico, quanto a cafeína, inibiram o crescimento da bactéria, durante todo o período de incubação. Entretanto, o efeito mais pronunciado foi observado com o ácido protocatéico em pH 4,5, que foi capaz de reduzir o crescimento em até três ciclos logarítmicos, após 28 dias de contato, comparado com o controle. No controle, com ajuste de pH, houve um crescimento menor do que no controle, sem ajuste. Entretanto, no crescimento de *Salmonella* Typhimurium no leite adicionado de ácido protocatéico, ajustado para os valores de pH 4,5 e 5,5, a inibição foi maior do que no leite adicionado de cafeína. O percentual de inibição após 28 dias, considerando-se o controle (100% de crescimento), foi calculado para o leite com a cafeína. Para essa substância o percentual de inibição da bactéria testada, em ambos os valores de pH (4,5 e 5,5), foi de 14%. Essa inibição observada no modelo alimentar, quando comparada com 96% e 77%, em meio de cultura com pH 4,5 e 5,5 (Tabela 1), respectivamente, foi menor. A mesma comparação pode ser feita para o ácido protocatéico, que contribuiu com 96% (pH=4,5) e 37% (pH=5,5) de inibição da bactéria teste no experimento em meio de cultura, e 32% (pH=4,5) e 21% (pH=5,5) no modelo alimentar, mostrando-se menos eficiente no último. No entanto, quando comparado com a cafeína, o ácido protocatéico apresentou uma maior atividade no modelo alimentar. Holley & Patel (2005) relataram o efeito da presença de gorduras, carboidratos, proteínas e sais diminuindo a efetividade de agentes antimicrobianos em alimentos.

Conclusões

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

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

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

O ácido protocatéico e a cafeína apresentam-se como potenciais agentes conservantes para alimentos ácidos.

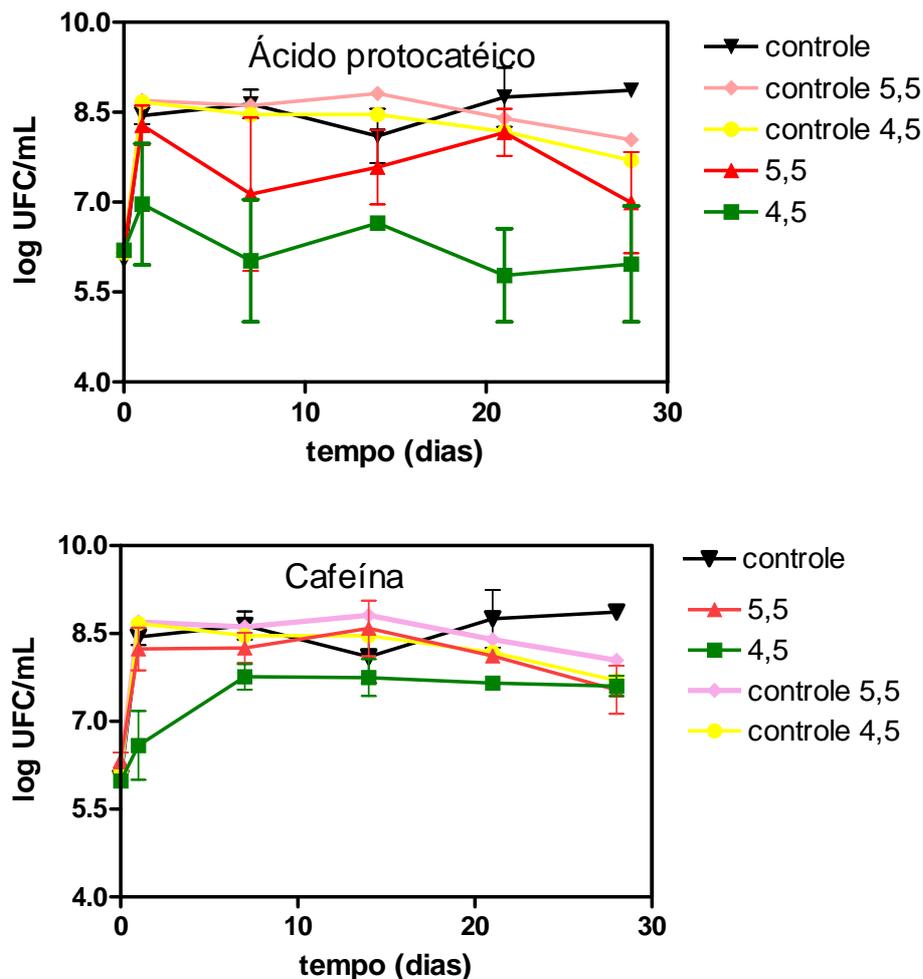


Figura 1. Contagem de células viáveis de *Salmonella* Typhimurium em leite desnatado (pH 4,5 e 5,5) na presença de ácido protocatéico (4,14 mg/mL) e de cafeína (4,96 mg/mL), durante 28 dias de contato, a 25 °C. Controle: meio de cultura inoculado com a *Salmonella* Typhimurium em pH sem ajuste e com ajuste para 5,5 e 4,5.

Referências Bibliográficas

- Almeida, A.A.P.; Farah, A.; Silva, D.A.M.; Nunan, E.A.; Gloria, B.A. (2006) Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. *J. Agric. Food Chem.*, 54:8738-8743.
- Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94:223-253.
- Daglia, M.; Cuzzoni, M.T.; Dacarro, C. (1994) Antibacterial activity of coffee. *J. Agric. Food Chem.* 42:2270-2272.
- Devlieghere, F.; Vermeiren, L.; Debevere, J. (2004) New preservation technologies possibilities and limitations. *Int. Dairy J.*, 14:273-285.
- Furuhata, K.; Dogasaki, C.; Hara, M.; Furuyama, M. (2002) Inactivation of *Legionella pneumophila* by phenol compounds contained in coffee. *J. Antibact. Antifung. Agents*, 30:291-297.
- Holley, R.A.; Patel, D. (2005) Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobial. *Food Microbiol.*, 22:273-292.
- Ibrahim, S.A.; Salameh, M.M.; Phetsomphou, S.; Yang, H.; Seo, C.W. (2006) Application of caffeine, 1,3,7-trimethylxanthine to control *Escherichia coli* O157:H7. *Food Chem.*, 99:645-650.
- Kobilnisky, A.; Nazer, A.I.; Dubois, F. (2007) Modeling the inhibition of *Salmonella typhimurium* growth by combination of food antimicrobials. *Int. J. Food Microbiol.*, 115:95-109.
- Marquis, R.E.; Clock, S.A.; Mota-Meira, M. (2003) Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology. *Microb. Rev.*, 26:493-510.
- Nazer, A.I.; Kobilnisky, A.; Tholozan, J.L.; Dubois-Brissonet, F. (2005) Combinations of foods antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? *Food Microbiol.*, 22: 391-398.
- Negi, P.S.; Chauhan, A.S.; Sadia, G.A.; Rohinshere, Y.S.; Ramteke, R.S. (2004) Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed extracts. *Food Chem.*, 4:234-242.

Nychas, G.J.E. Natural antimicrobials from plants. In: Gould, G.W. (ed.). (1995) *New methods of food preservation*. Londres: Blackie Academic & Professional, pp.59-87.

Ramos-Nino, M.E.; Clifford, M.N.; Adams, M.R. (1996) Quantitative structure activity relationship for the effect of benzoic acids, cinnamic acids and benzaldehydes on *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.*, 80: 303-310.

The United States Pharmacopeia, USP 29, NF 24, 2006. 3539p.

Vander Berghe, D.A.; Vlietinck, A.J. (1991) Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: Hostettmann, K. (ed.) *Methods in plant biochemistry, assays for bioactivity*. London: Academic Press, pp.47-69.

Wen, A.; Delaquis, P.; Stanich, K.; Toivonen, P. (2003) Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiol.*, 20: 305-311.