



MARIA BEATRIZ PEREIRA ROSA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA E
ANTIFUNGICA DE EXTRATOS DE CAFÉ VERDE E
TORRADO**

LAVRAS- MG

2023

MARIA BEATRIZ PEREIRA ROSA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA E ANTIFUNGICA DE
EXTRATOS DE CAFÉ VERDE E TORRADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso

Orientadora

Prof. Dr. Luís Roberto Batista

Coorientador

LAVRAS- MG

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Rosa, Maria Beatriz Pereira.

Atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica de extratos
de café verde e torrado / Maria Beatriz Pereira Rosa. - 2023.

82 p. : il.

Orientadora: Maria das Graças Cardoso.

Coorientador: Luís Roberto Batista.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Coffea arabica L. 2. Atividades biológicas. 3. Listeria
monoytogenes. I. Cardoso, Maria das Graças. II. Batista, Luís
Roberto. III. Título.

MARIA BEATRIZ PEREIRA ROSA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA E ANTIFUNGICA DE
EXTRATOS DE CAFÉ VERDE E TORRADO**
**ANTIOXIDANT, ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGIC ACTIVITY OF GREEN
AND ROASTED COFFEE EXTRACTS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 19 de maio de 2023.

Dra. Maria das Graças Cardoso UFLA

Dr. Luís Roberto Batista UFLA

Dr. David Lee Nelson UFVJM

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso

Orientadora

Prof. Dr. Luís Roberto Batista

Coorientador

LAVRAS- MG

2023

À minha mãe e ao meu pai (in memoriam).

Dedico

AGRADECIMENTOS

Á priori, agradeço a Deus por toda a resiliência, oportunidade, fé e persistência. Por todas as pessoas que Ele colocou no meu caminho, e que vou levar para o resto da minha vida. Por todo o aprendizado que adquiri nessa trajetória, e que por mais dificuldades que apareciam, Ele sempre esteve comigo, não permitindo que eu desistisse.

À Universidade Federal de Lavras- UFLA e ao Departamento de Ciência dos Alimentos- DCA, que me permitiram desenvolver esta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo suporte financeiro. Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT Café), pela parceria neste projeto.

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, pela aprovação, suporte e parceria neste projeto.

À minha mãe, Neusina, e meus irmãos, Maria Laura, Mariana e Júlio, por estarem sempre comigo, sendo minha base, e apoiando-me em tudo de que preciso e nas minhas escolhas. Ao meu pai, Mário César (*in memoriam*), que sempre apoiou os meus sonhos, e que mesmo não estando mais presente fisicamente, continua vivo na minha memória e coração.

À professora Dra. Maria das Graças Cardoso, por ter aceito me orientar, pelos ensinamentos, pela paciência e pelas advertências, quando necessárias. Por contribuir não somente com minha vida profissional, mas também com meu crescimento pessoal.

Ao professor Dr. Luís Roberto Batista, pela disponibilidade de tempo e contribuição com a nossa pesquisa. Por ter aberto as portas do Laboratório de Micologia e cedido os fungos e as bactérias para a realização das análises.

À pós-doutoranda do Laboratório de Micologia Dra. Fabiana Passamani, por toda a ajuda e por sempre estar disposta a tirar minhas dúvidas, contribuindo com esta pesquisa.

Ao Laboratório de Fitopatologia, em especial ao professor Dr. Eduardo Alves, por abrir as portas do laboratório, por tirar dúvidas e permitir as análises em Microscópio Eletrônico de Varredura - MEV.

Às minhas amigas Stefany e Aline, por estarem presente desde a graduação, sempre me apoiando, me escutando e dando conselhos.

Ao meu namorado, Jorge Murad, pela paciência, apoio, amizade, compreensão e respeito.

À professora Dra. Liliana Avelar Pereira Pasin, por todos os ensinamentos, e por ter me apresentado ao meio acadêmico. Pela amizade e carinho que permaneceram.

A todos os amigos e familiares que, de alguma forma, estiveram presentes, por o todo apoio sempre.

Aos amigos do Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais e de Análise de Qualidade de Aguardente, Pâmela, Ana Paula, Maria Augusta, Gabriela Fontes, Vanuzia, Samuel, Gabriela Campolina, Carolina, Maria Luísa, Alex. Em especial, à Cassia, Antônia Isadora e ao pós- doutorando Marcus Vinícius, por todo o apoio, companheirismo, aprendizado, pelo auxílio antes, durante e após a execução dos experimentos, pela disponibilidade de tempo, e pela amizade.

À Aline, técnica do Laboratório de Fitopatologia, por toda a paciência, aprendizado e apoio durante a realização das análises no MEV.

Ao Laboratório de Processamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola da UFLA, por terem torrado os grãos de café.

Ao pessoal do laboratório de Micologia, em especial à Kátia, também colega de mestrado, por toda a ajuda sempre.

RESUMO

O café é uma das bebidas mais populares do mundo. Como *commoditie*, a presença de grãos defeituosos que compõem cerca de 20% da produção gera problemas econômicos, sociais e ambientais. Objetivou-se neste trabalho avaliar a atividade antioxidante, antifúngica e antibacteriana de extratos de café verde e torrado provenientes de grãos defeituosos. Foram preparados extratos a partir de grãos de café verde e torrado por meio da técnica de extração sólido-líquido por refluxo, utilizando o etanol como solvente. O potencial antioxidante foi avaliado pelo método de estabilização do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). A avaliação do potencial de inibição fúngica dos extratos foi feita pela análise do crescimento micelial e microscopia eletrônica de varredura (MEV) das espécies *Aspergillus westerdijkiae* e *Aspergillus carbonarius*. A atividade antibacteriana foi determinada pelo método de microdiluição, sendo avaliadas a CMI e CMB dos extratos sob as espécies *Salmonella enterica Choleraesuis* e *Listeria monocytogenes* e posteriormente, analisadas em MEV. O extrato de café verde foi o mais eficiente na inibição do radical DPPH, sendo que o extrato de café torrado não apresentou atividade antioxidante nas concentrações testadas. Os dados estatísticos diferiram para os extratos quanto ao potencial antifúngico; porém, o extrato de café verde foi mais eficiente na inibição do crescimento micelial. A espécie *A. carbonarius* foi mais sensível aos extratos do que *A. westerdijkiae*, sendo completamente inibido na concentração de 0,42 g mL⁻¹ pelo extrato de café verde. Ambos os extratos de café não apresentaram atividade bactericida, sendo que o extrato de café torrado também não apresentou efeito bacteriostático. A concentração mínima inibitória (CMI) do extrato de café verde para *L. monocytogenes* e *S. Choleraesuis* foi referente à concentração 0,21 g mL⁻¹. Conclui-se que o extrato etanólico de café verde foi o que apresentou maior atividade antioxidante, antifúngica e antibacteriana, apresentando alto potencial como subproduto para a indústria.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L. Atividades biológicas. *Listeria monocytogenes*.

ABSTRACT

Coffee is one of the most popular drinks in the world. As a commodity, the presence of defective grains, which make up about 20% of production, generates economic, social and environmental problems. The objectives of this work were to evaluate the antioxidant, antifungal and antibacterial activity of green and roasted coffee extracts. Extracts were prepared from green and roasted coffee beans using the solid-liquid reflux extraction technique, using ethanol as a solvent. The antioxidant potential was evaluated by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical stabilization method (DPPH). The evaluation of the fungal inhibition potential of the extracts was performed by analysis of mycelial growth and scanning electron microscopy (SEM) of *Aspergillus westerdijkiae* and *Aspergillus carbonarius* species. The antibacterial activity was determined by the microdilution method, evaluating the MIC and MIB of the extracts under the species *Salmonella enterica Choleraesuis* and *Listeria monocytogenes*, and subsequently analyzed by SEM. The green coffee extract was the most efficient in inhibiting the DPPH radical, and the roasted coffee extract did not show antioxidant activity at the tested concentrations. Statistical data differed for the extracts regarding the antifungal potential, but the green coffee extract was more efficient in inhibiting mycelial growth. The species *A. carbonarius* was more sensitive to the extracts than *A. westerdijkiae*, being completely inhibited at a concentration of 0.42 g mL^{-1} by the green coffee extract. Both coffee extracts did not show bactericidal activity, and the roasted coffee extract also did not show a bacteriostatic effect. The minimum inhibitory concentration (MIC) of green coffee extract for *L. monocytogenes* and *S. Choleraesuis* was related to the concentration 0.21 g mL^{-1} . It was concluded that the ethanolic extract of green coffee was the one that presented the highest antioxidant, antifungal and antibacterial activity, presenting high potential as a by-product for the industry.

Keywords: *Coffea arabica* L. Biological activities. *Listeria monocytogenes*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

PRIMEIRA PARTE- INTRODUÇÃO GERAL

Quadro 1- Classificação das micotoxinas.....	40
Quadro 2- Limite Máximo Tolerado (LMT) de Ocratoxina A em alimentos.....	41

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE- INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1- <i>Coffea arabica</i> e <i>Coffea canephora</i>	19
Figura 2- Estrutura do Cafeeiro.....	20
Figura 3- Fruto do Cafeeiro.....	21
Figura 4- Morfologia da semente do cafeeiro.....	21
Figura 5- Grãos P.V.A.....	23
Figura 6- Mecanismo antioxidante dos compostos fenólicos.....	29
Figura 7- Principais compostos bioativos presentes no café.....	31
Figura 8- Estrutura química dos principais isômeros de ácidos clorogênicos no café.....	31
Figura 9- Estrutura bacteriana.....	33
Figura 10- Estrutura fúngica do gênero <i>Aspergillus</i>	36
Figura 11- Estrutura química das micotoxinas.....	39

SEGUNDA PARTE- ARTIGO

Figura 1- Efeito inibitório do extrato de café verde no crescimento fúngico de <i>A. carbonarius</i> e <i>A. westerdijkiae</i>	67
Figura 2- Efeito inibitório do extrato de café torrado no crescimento fúngico de <i>A. carbonarius</i> e <i>A. westerdijkiae</i>	67
Figura 3- Eletromicrografia de varredura de <i>A. carbonarius</i> e <i>A. westerdijkiae</i>	70
Figura 4- Eletromicrografia de varredura de <i>S. Choleraesuis</i> e <i>L. monocytogenes</i>	73

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE- ARTIGO

Tabela 1- Atividade antioxidante (IC_{50}) dos extratos de café verde e torrado e do antioxidante sintético (BHT).....	64
Tabela 2- Efeito dos extratos de café verde e café torrado na inibição fúngica.....	66
Tabela 3- Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Mínima Bactericida (CMB) dos extratos de café verde, torrado e antibiótico.....	71

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE- INTRODUÇÃO GERAL	
1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Origem do Café.....	17
2.2 Chegada do café no Brasil	18
2.3 Classificação botânica do cafeeiro e características morfológicas	18
2.4 Agronegócio Café.....	21
2.5 Grãos defeituosos de café	22
2.6 Composição química dos grãos de café	23
2.7 Radicais Livres.....	26
2.8 Antioxidante	27
2.8.1 Antioxidantes naturais.....	29
2.8.2 Atividade antioxidante associada aos compostos bioativos dos grãos de café	30
2.9 Microrganismos em alimentos.....	32
2.9.1 Bactérias.....	33
2.9.1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	34
2.9.1.2 <i>Salmonella</i> spp.	35
2.9.2 Fungos	35
2.9.2.1 <i>Aspergillus carbonarius</i>	37
2.9.2.2 <i>Aspergillus westerdijkiae</i>	37
2.9.3 Micotoxinas.....	38
2.9.3.1 Ocratoxina A (OTA).....	40
2.9.4 Atividade antibacteriana e antifúngica associada aos compostos bioativos dos grãos de café	42
REFERÊNCIAS	43
SEGUNDA PARTE- ARTIGO	54
1 INTRODUÇÃO	56
2 MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1 Obtenção, preparo das amostras e processo de torrefação	58
2.2 Obtenção dos extratos etanólicos	58
2.3 Análise antioxidante	59
2.3.1 Diluição das amostras de café.....	59
2.3.2 Avaliação do método de estabilização do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).....	59

2.4 Análises Microbiológicas.....	60
2.4.1 Atividade Antifúngica	60
2.4.1.1 Microrganismos e condições de cultivo	60
2.4.1.2 Efeito dos extratos sobre o crescimento micelial	60
2.4.2 Atividade Antibacteriana.....	61
2.4.2.1 Microrganismos, manutenção, padronização e obtenção do inóculo	61
2.4.2.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB).....	61
2.4.3 Análise Estatística.....	62
2.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	62
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
3.1 Atividade Antioxidante.....	64
3.2 Atividade Antifúngica.....	65
3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos fungos.....	69
3.3 Atividade antibacteriana	70
3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das bactérias	73
4 CONCLUSÃO.....	74
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
REFERÊNCIAS	76

PRIMEIRA PARTE- INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

Devido ao aroma e ao sabor, o café é amplamente comercializado e consumido, tornando-se uma das bebidas mais presentes no dia a dia das pessoas. As espécies *Coffea arabica* (arábica) e *Coffea canephora* (robusta) são as mais cultivadas, além de serem consideradas importantes *commodities*, apresentando importante papel na economia mundial.

A década de 1960 foi marcada pela popularização do consumo de café e o seu crescimento exponencial, passando de uma simples mercadoria para um produto especial. O consumo do café se deve principalmente a seu efeito estimulante, relacionado à cafeína; porém, a presença de diversos outros componentes químicos tanto no grão cru quanto no torrado torna o café uma das bebidas mais complexas, apresentando outros efeitos benéficos.

Devido à sua popularidade, estudos sobre as atividades antioxidantes do café têm aumentado, juntamente com o interesse do consumidor pelo aspecto funcional da bebida, proporcionando vários estudos sobre sua bioatividade. A atividade antioxidante proporcionada pelo café advém dos compostos fenólicos, principalmente do ácido clorogênico e derivados, além da reação de *Maillard* durante o processo de torra, que pode originar novas substâncias com efeitos antioxidantes.

Os compostos antioxidantes são substâncias capazes de retardar ou prevenir consideravelmente o início ou a propagação do processo de oxidação, podendo evitar a peroxidação dos lipídios, oxidação de proteínas, DNA, etc. Comumente, na indústria de alimentos são empregados antioxidantes sintéticos, sendo os mais comuns BHA (butil hidroxianisol), BHT (butil hidroxitolueno), GP (galato de propila) e TBHQ (terc-butil hidroquinona). Entretanto, a utilização de antioxidantes sintéticos tem gerado dúvidas quanto ao seu emprego, proporcionando interesse por antioxidantes de origem natural que tenham a mesma aplicação, e que possam ser utilizados em substituição aos sintéticos.

Ademais, vários compostos químicos naturalmente presentes no café já foram associados a um potencial antimicrobiano. O controle microbiológico é uma das maiores dificuldades na indústria de alimentos, podendo diversos microrganismos, incluindo bactérias, fungos, leveduras, protozoários e até vírus, causarem contaminação alimentar. Microrganismos patogênicos podem estar presentes e iniciar seu crescimento nos equipamentos que são utilizados na indústria alimentícia, resultando no contato de patógenos com os alimentos, podendo também estar presente nas etapas de processamento, comprometendo o produto final.

A utilização de agentes antimicrobianos é eficaz para o controle da contaminação microbiana; todavia, a utilização indiscriminada de produtos químicos pode acarretar uma série de problemas ecológicos e de saúde devido à toxicidade residual, carcinogenicidade, teratogenicidade, desequilíbrio hormonal, entre outros efeitos. Portanto, há um crescente interesse no uso de compostos antimicrobianos naturais para o controle de patógenos e/ou toxinas produzidas por esses patógenos.

O Brasil se destaca na produção e exportação dos grãos de café; porém, a geração de resíduos e produção de grãos defeituosos ocasionam problemas econômicos, sociais e ambientais. Os grãos defeituosos compreendem parte da colheita, e são representados por grãos imaturos e/ou fermentados, os quais não são descartados, e sim misturados aos grãos sadios; todavia, acabam resultando em uma bebida de má qualidade. Logo, propostas para a utilização dos grãos defeituosos são essenciais, podendo inclusive ser transformados em produtos de valor econômico significativo.

Objetivou-se neste trabalho avaliar o potencial antioxidante, antibacteriano e antifúngico dos extratos de café verde e torrado provenientes de grãos de qualidade inferior.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Origem do Café

Dados históricos relatam que a primeira alusão à descoberta do café foi no ano de 575, registrada em manuscritos do Iêmen. A lenda conhecida como Lenda de Kaldi retrata que um pastor de cabras da Etiópia (nordeste da África), chamado Kaldi, observou que suas cabras ficavam agitadas e “dançantes” ao consumirem as folhas e frutos de determinado arbusto; além de mais ágeis e resistentes, subindo as montanhas com rapidez, percorrendo quilômetros em estradas íngremes. Ao provar as folhas e frutos do arbusto, Kaldi confirmou o efeito estimulante da planta; a notícia logo se difundiu e o café se tornou parte da cultura etíope (MARTINS, 2012).

Uma vez descoberto, em pouco tempo o consumo de café se expandiu. Cabe à África a descoberta do café, mas o domínio das técnicas de plantio e cultivo foi feita pelos árabes, os quais foram responsáveis pelo comércio do café através do Mar Vermelho, sendo levado à península arábica (MARTINS, 2012). A princípio, recebia o nome de *qahwa* palavra árabe para vinho da qual deriva o nome café, porém, também acreditavam que o nome “café” provavelmente poderia ser devido à região de Kaffa na Etiópia, da palavra árabe *quwwa* (poder) ou ainda de *kafta*, uma bebida feita da planta *khat* (PENDERGRAST, 2019).

Com a popularização do consumo de café, as pessoas passaram a consumi-lo não só em casa, mas em cafés públicos, que começaram a surgir em cidades do Oriente Próximo. No século XVII, o café chegou à Europa e logo seu consumo se destacou em todo o continente, surgindo diversos ambientes especializados na bebida. Porém, à medida que a bebida café se dispersava, mais acirrada era a concorrência para o cultivo da planta além da Arábia (NATIONAL COFFEE ASSOCIATION- NCA, 2022).

Na segunda metade do século XVII, os holandeses obtiveram mudas de café, tendo seu cultivo bem-sucedido em Batávia, na Ilha de Java, atual Indonésia. Devido ao sucesso obtido pela cafeicultura, os holandeses expandiram o cultivo para as ilhas de Sumatra e Celebes (NCA, 2022). A princípio, o cultivo sistemático do café foi dominado pelos holandeses, e Amsterdã era o centro propagador do produto (MARTINS, 2012).

Posteriormente, em 1714, o governo francês foi presenteado com uma muda de café, em que, anos depois, Gabriel Mathieu de Clieu, um jovem oficial da marinha, foi responsável por introduzir o cultivo na colônia francesa da Martinica. O cultivo de café propagou-se, gerando

mais de 18 milhões de pés de café na Ilha da Martinica nos 50 anos seguintes. Acredita-se que essa muda derivou todos os cafezais cultivados por todo o Caribe, América do Sul e Central (NCA, 2022; PERDERGRAST, 2019).

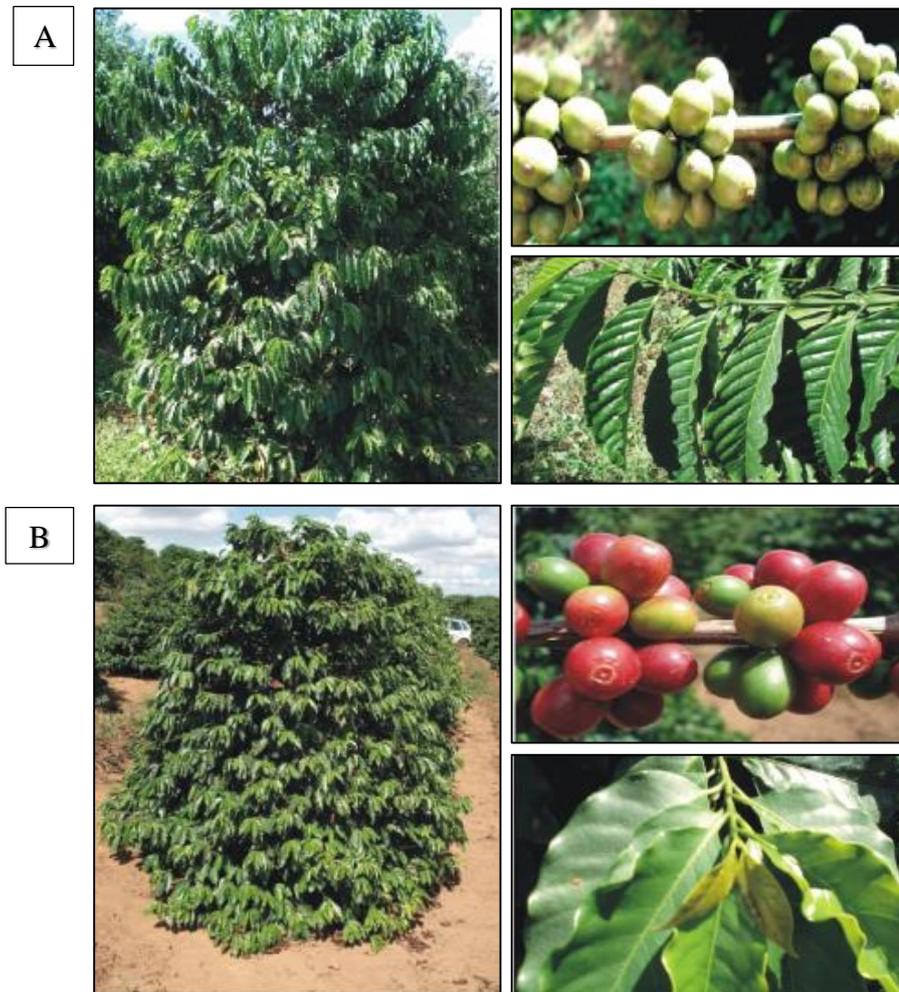
2.2 Chegada do café no Brasil

Entre 1723 e 1728, o Brasil enfrentava dificuldades relacionadas à divisa entre o norte do país (Capitania do Maranhão e Grão do Pará) e a Guiana Francesa. Portanto, foram ordenadas expedições brasileiras ao país, com o objetivo de estabelecer respeito quanto à divisa que se dava nas imediações do rio Oiapoque, definido pelo Tratado de Utrecht, de 11 de abril de 1713, entre Portugal e França. Uma dessas expedições foi incumbida ao oficial português Sargento-Mor Francisco de Melo Palheta, que também era responsável pela missão de contrabandear sementes de café, visto que o governo francês não permitiria a exportação dos grãos (MARTINS, 2012; PENDERGRAST, 2019).

Em 1727 chegaram ao Brasil as primeiras sementes de café. Conta-se que Francisco de Melo Palheta, em sua partida da Guiana Francesa, recebeu um buquê de flores da esposa do governador de Caiena, Madame D'Orvilliers, contendo sementes de café suficientes para dar início à indústria que hoje gera milhões de empregos diretos e indiretos (MARTINS, 2012; PENDERGRAST, 2019). Palheta iniciou o cultivo das sementes de café em seu território natal, o Pará, difundindo seu cultivo pelo país (NCA, 2022).

2.3 Classificação botânica do cafeeiro e características morfológicas

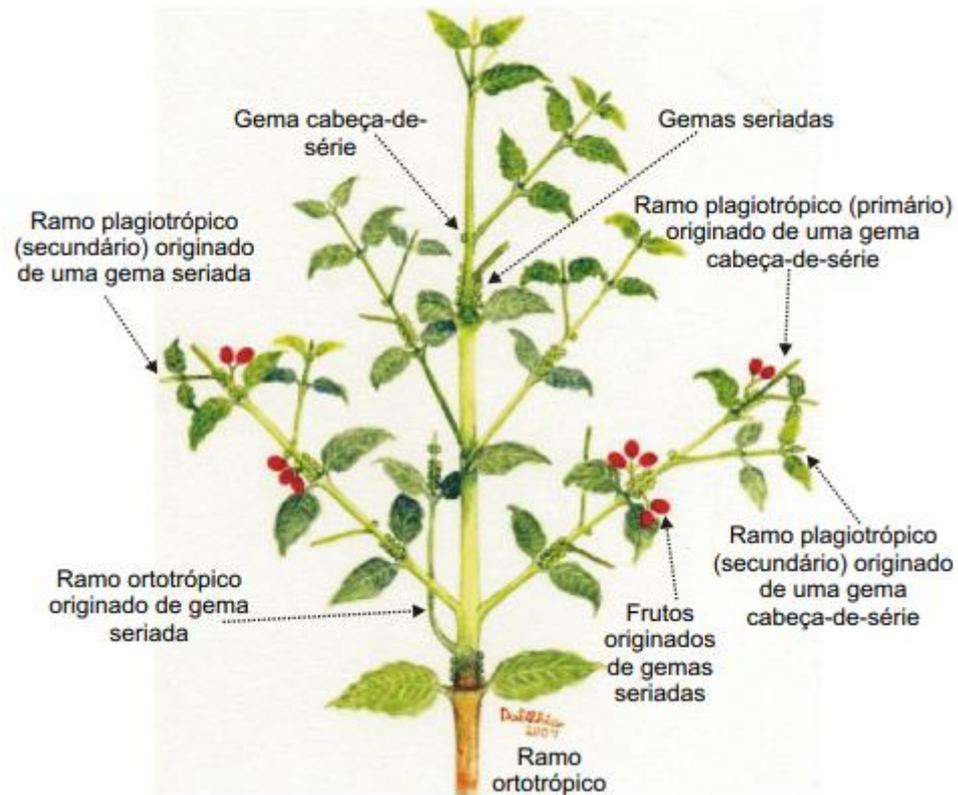
O cafeeiro é uma planta Eudicotilédonea pertencente à classe das Angiospermas, ordem Rubiales e família *Rubiaceae*, esta última compreende cerca de 500 gêneros e mais de 6.000 espécies. O café pertence ao gênero e subgênero *Coffea*, que engloba aproximadamente 124 espécies, sendo economicamente o mais importante da família *Rubiaceae* devido às espécies *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre A. Froehner (SOCALA et al., 2021) (FIGURA 1).

Figura 1- *Coffea arabica* e *Coffea canephora*

Legenda: (A) *Coffea arabica* cultivar Rubi MG 1192, (B) *Coffea canephora* cultivar Apatã IAC 2258.
Fonte: CARVALHO (2007).

As espécies do gênero *Coffea* constituem árvores e arbustos perenes que podem variar de 2 a 6 metros de altura; apresentam dimorfismo de ramos (plagiotrópicos e ortotrópicos) (Figura 2); as inflorescências são axilares pareadas; cáliculo presente; cálice truncado a ondulado, ou levemente lobado; as flores são hermafroditas e corolas normalmente brancas. As folhas primárias são opostas e decussadas, e o fruto é do tipo drupáceo, apresentando duas sementes plano-convexas, sulcadas longitudinalmente em sua face plana, sendo essas sementes os grãos que irão originar a bebida café (CARVALHO, 2007; FARAH; FERREIRA DOS SANTOS, 2015).

Figura 2- Estrutura do Cafeeiro



Fonte: CARVALHO (2007).

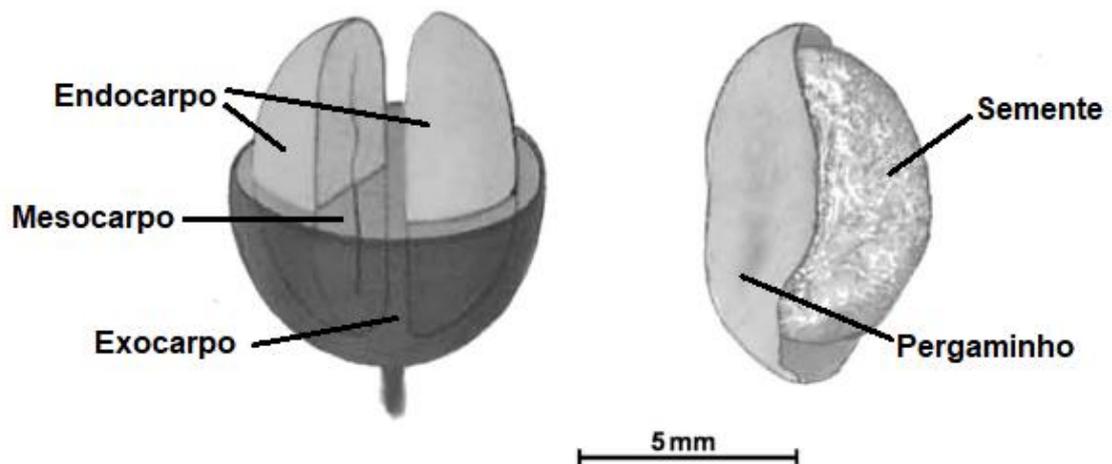
O café arábica é uma espécie tetraploide, suas flores são hermafroditas e apresenta pouca variabilidade genética. Estima-se que 90% da fertilização de suas flores ocorra por polens e óvulos advindos de uma mesma planta (MARCOLAN; ESPINDULA, 2015). De acordo com a descrição de Coste (1955), a espécie *C. arabica* L. constitui um arbusto monocaule, podendo alcançar até 6 metros de altura. As folhas apresentam coloração verde-escura, com brilho acentuado na face adaxial, sendo ovaladas ou sublanceoladas, com margens onduladas. O fruto (Figura 3) é uma drupa ovoide bilocular, que quando atinge o estágio de maturação, pode apresentar coloração amarela ou vermelha. As sementes são envoltas pelo endocarpo, conhecido como pergaminho e recobertas por uma película prateada (Figura 4). O grão ou endosperma é rico em polissacarídeos (40% a 65,5%), lipídeos (7,7% - 16%) e proteínas (11% - 13%) (DÚRAN et al., 2017). Em razão das variações externas, desde o cultivo até o processamento final dos grãos, a sua composição pode apresentar variações, o que irá impactar no aroma e sabor do produto final (DEBONA et al., 2020).

Figura 3- Fruto do Cafeeiro.



Fonte: FLORES (2023).

Figura 4- Morfologia da semente do cafeeiro.



Fonte: Kleinwächter e Selmar (2015) com modificações.

2.4 Agronegócio Café

A cafeicultura representa uma das maiores fontes da economia do país e, conseqüentemente, uma das principais atividades geradoras de emprego, desde sua chegada ao Brasil em 1727 (BRAINER, 2020). Cultivado em mais de 70 países, o Brasil ocupa o lugar de maior produtor e exportador dos grãos, com 35% da participação no mercado mundial, gerando mais de 8 milhões de empregos (DÚRAN et al., 2017).

O gênero *Coffea* engloba cerca de 125 espécies, mas apenas duas são economicamente importantes: *Coffea arabica* L. (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre A. Froehner (café robusta) (KRISHNAN, 2017). A área destinada para a cultura de café no Brasil é de 2.216,9 mil hectares, com destaque para a produção do café arábica, que detém 81% da área total de produção (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- Conab, 2021). Segundo dados publicados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa, 2019), o café arábica representou 70% da safra de 2019.

De acordo com a Conab (2022), estima-se que a produção de café foi de 53.528,3 milhões de sacas beneficiadas até maio de 2022, observando-se um crescimento de 12%, quando comparado com a safra anterior. A produção de café arábica foi estimada em 37.711,9 milhões de sacas, com aumento de 13,6%. O estado de Minas Gerais apresenta a maior área de produção dos grãos arábica, detendo 71,7% da área total de produção do país (Conab, 2021).

O aumento do consumo mundial de café para os anos 2021/2022 é estimado em 3,3%, resultando em um volume de 170,3 milhões de sacas de 60kg, em comparação com 164,9 milhões na safra 2020/2021 (INTERNATION COFFEE ORGANIZATION- ICO, 2022). Segundo a Associação Brasileira da Indústria do Café (ABIC, 2021), o Brasil é o segundo maior consumidor de café no mundo, ficando atrás somente dos Estados Unidos. Em 2021, foi registrado o consumo *per capita* de 6,06 kg por ano de café cru e 4,84 kg por ano de café torrado, observado em ambos o crescimento de 1,06%.

De janeiro a julho de 2022, o Brasil exportou café para 113 países, ocupando a posição de maior exportador de café no mundo. Dos produtos nacionais exportados, o café registrou uma receita cambial de US\$ 5,231 bilhões, com os embarques realizados no período de 2022, equivalente a um aumento de 62,4%, em comparação ao valor registrado no mesmo período do ano anterior (CONSELHO DOS EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL- Cecafé, 2022).

2.5 Grãos defeituosos de café

Dentre os fatores imprescindíveis na determinação do preço e aceitação para exportação do café, está a qualidade dos grãos produzidos. A presença de grãos defeituosos está entre as causas mais comuns na redução da qualidade da bebida (DINIZ DOS REIS et al., 2019).

Os defeitos presentes no café podem ser de natureza intrínseca e extrínseca. Os intrínsecos são ocasionados devido ao manejo incorreto dos processos agrícolas e industriais ou modificações de ordem fisiológica ou genética (grãos pretos, verdes, ardidos, chochos,

quebrados e brocados); os extrínsecos estão relacionados à presença de elementos estranhos ao café beneficiado (coco, marinho, cascas, paus e pedras) (BRIGHENTI; CIRILLO, 2018).

Os grãos defeituosos correspondem a 20% da produção total de café, sendo separados antes da comercialização. Os grãos ditos pretos, verdes e ardidos (PVA) são considerados os mais relevantes (Figura 5) (DINIZ DOS REIS et al., 2019). Os pretos são resultantes da fermentação, quando os frutos maduros caem e permanecem no solo, os ardidos ocorrem devido à falta de água durante o desenvolvimento dos frutos ou à fermentação anormal dos grãos de café, e os grãos verdes são provenientes de frutas imaturas, o que pode resultar em adstringência e sabor amargo da bebida (DINIZ DOS REIS et al., 2019; SANTOS; RODRIGUES, 2020).

Figura 5- Grãos P.V.A.



Fonte: EMBRAPA (2022).

Para reduzir os prejuízos devido à presença dos defeitos nos grãos, muitas vezes eles são empregados aos cafés de melhor qualidade, o que irá resultar na perda de qualidade do produto final. Portanto, o desenvolvimento de novos produtos com valor agregado a partir do defeito PVA constitui uma maneira de aproveitar os rejeitos provenientes da produção de café (DINIZ DOS REIS et al., 2019).

2.6 Composição química dos grãos de café

A qualidade e os aspectos funcionais do café são algumas das características mais procuradas, colocando-o como uma das bebidas mais consumidas no mundo. Esses aspectos estão diretamente relacionados com a composição química dos grãos, associados à presença de

compostos químicos, como cafeína, minerais, aminoácido, lipídios, compostos fenólicos, melanoidinas e açúcares (KITZBERGER et al., 2013).

A obtenção de uma bebida de qualidade está associada a diversos processos pelo qual o grão verde irá ser submetido. Segundo Barbosa et al. (2019), a genética e as condições adotadas em campo durante o cultivo irão determinar a composição química dos grãos crus de café. Ainda, ao longo das etapas de beneficiamento, as condições de colheita, pós-colheita, torrefação e posterior armazenamento desses grãos torrados irão contribuir para a degradação e formação de novos compostos, como carboidratos, ácidos, cafeína e lipídeos, o que irá influenciar na qualidade e aspectos sensoriais da bebida. Dentre os fatores mais importantes na determinação da composição química dos grãos verdes de café está a genética *versus* meio ambiente, considerando também todas as condições de pré e pós-colheita (HALL; TREVISAN; de VOS, 2022).

Estudos anteriores constataram que os grãos de café arábica verde são compostos principalmente de carboidratos (59–61%), lipídios (11–17%), proteínas (10–16%), fenóis (6–10%), minerais (4%), ácidos graxos (2 %), cafeína (1–2%), trigonelina (1%) e aminoácidos livres (<1%) (MENDES et al., 2022). De acordo com Yisak, Redi-abshiro e Chandravanshi (2018), os grãos crus de café são ricos em compostos bioativos, representados principalmente por alcaloides derivados das xantinas, como a cafeína (1,3,7-trimetilxantina) e a teobromina (3,7-dimetilxantina), e o alcaloide trigonelina (*N*-metilpiridínio-3-carboxilato). Dentre esses, a cafeína é o alcaloide mais abundante no café, seguido da trigonelina (MEHARI et al., 2016).

A 1,3,7-trimetilxantina (cafeína) é um alcaloide purínico presente em vários alimentos, como chás, cacau, cola e mate; e apesar das distintas fontes possíveis, é conhecida por ser mais abundante no café (MEHARI et al., 2016; YISAK, REDI-ABSHIRO; CHANDRAVANSI, 2018). Para a espécie *C. arabica*, o teor de cafeína encontra-se na faixa 0.8 a 1.4 % (w/w), enquanto no *C. canephora*, a faixa é de 1,7 a 4% (w/w) (MEHARI et al., 2016). De acordo com Mehari et al. (2016), a cafeína presente nos grãos verdes de café depende basicamente da variedade de café e da localização geográfica de origem da planta.

Além da cafeína, outros componentes estão presentes nos grãos de café verde, como os compostos fenólicos. Chou e Waller (1980) foram os primeiros a identificar a presença de ácidos cafeico, clorogênico, vanílico, ferúlico, *p*-cumárico e *p*-hidroxibenzoico em grãos de café arábica. Desde então, aproximadamente 40 compostos fenólicos foram encontrados em *C. arabica* (HALL; TREVISAN; de VOS, 2022). Os ácidos clorogênicos (CGAs) são a classe de

fenólicos mais abundantes no café (GETACHEW; CHUN, 2016). Segundo Getachew e Chun (2016), a formação dos CGAs ocorre dentro do cafeeiro por meio da esterificação dos ácidos trans-cinâmicos: ácidos cafeico, ferúlico e *p*-cumárico, com o ácido quínico, correspondendo de 6 a 10% da matéria seca dos grãos de café verde. Outros compostos fenólicos também são identificados no café verde, como lignanas, antocianinas e taninos; porém, em menores proporções (FARAH; DONANGELO, 2006).

De acordo com Pimpley et al. (2020), o café não torrado apresenta quantidades maiores de ácidos clorogênicos. Os CGAs encontrados em grãos de café verde e torrado consistem principalmente de três isômeros de ácidos cafeoilquínicos (3-, 4- e 5-CQAs), ácidos feruloilquínicos (3-, 4- e 5-FQAs) e ácidos dicafeoilquínicos (3, 4-, 4,5- e 3,5-diCQAs) (MOLSKA et al., 2021). Juntos, esses isômeros correspondem a aproximadamente 80% do total de CGAs presentes no café verde (PIMPLEY et al. 2020).

Os terpenos kahweol e cafestol são os principais terpenos presentes no café verde. A presença desses diterpenos no cafeeiro irá depender da espécie em estudo, identificados apenas em plantas do gênero *Coffea*. O cafestol é encontrado tanto em *C. arabica* quanto em *C. canephora*, porém o kahweol é mais específico para *C. arabica* (OLIVEIRA et al., 2014).

O processo de torra é essencial para se obter o aroma característico do café. Diversos compostos químicos são modificados, contribuindo para o resultado final da bebida (GETACHEW; CHUN, 2016). A torra dos grãos de café constitui um processo térmico que irá modificar os componentes químicos e físicos do café verde (cru). Ao longo do processo de torrefação, fatores como a temperatura e o tempo são os mais relevantes (MEHAYA; MOHAMMAD, 2020).

Segundo Santos et al. (2018), os CGAs são acumulados durante a maturação dos grãos de café, e durante a torra, sofrem alterações. Em média, 86% dos CGAs são perdidos durante a torrefação, originando vários compostos químicos voláteis de baixo peso molecular, e eles irão contribuir para o aroma e palatabilidade do café. Mehaya e Mohammad (2020), avaliando a estabilidade dos compostos bioativos ao longo da torrefação, observou que os CGAs reduziram (34,181 mg/g de amostra de café verde para 2,584 mg/g de amostra torrada), drasticamente durante a torra a 220 °C por 40 min. Os ácidos gálico e cafeico aumentaram no início da torra e, em seguida, reduziram. A redução dos CGAs é resultado da sua degradação para a formação de outros compostos, como os ácidos cafeico e quínico. Além disso, o aumento do ácido gálico pode ser devido à quebra de taninos hidrolisáveis.

Diversos autores relatam a redução do teor de cafestol e kahweol com o aumento do nível da torra, resultando em até 70% de perdas da torra clara para a escura (SRIDEVI; GIRIDHAR; RAVISHANKAR, 2011; ZHANG; LINFORTH; FISK, 2012). Durante o processo de torra, os diterpenos cafestol e kawool formam produtos de degradação, como compostos da desidratação e reações de oxidação (cafestal e kahweal). A torra também pode catalisar reações de esterificação desses diterpenos, sendo observado 16-*O*-metilcafestol em grãos de arábica torrados (NOVAES et al., 2019). Yaçinkaya, Abdalla e Bakkalbaşı (2022) constataram que, com o aumento da temperatura, ocorre a formação de pigmentos marrons (melanoidinas) por meio da reação de *Maillard*, sendo esses contribuintes da atividade antioxidante associada ao café.

2.7 Radicais Livres

Segundo a descrição de Ahmad (2018), radicais livres (RL) são “intermediários ou fragmentos moleculares contendo um ou mais elétrons desemparelhados em orbitais atômicos ou moleculares”. Os RL compreendem moléculas curtas, sem carga e que apresentam vida curta (AHMAD, 2018) e atuam como oxidantes ou redutores, doando ou recebendo elétrons de outras moléculas reativas (GUPTA et al., 2020).

Com o propósito de manter o equilíbrio metabólico, os processos de oxidação e redução estão comumente presentes no metabolismo humano (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Portanto, muitos desses RL livres são benéficos, agindo em células do sistema imune combatendo agentes bacterianos, tonificando os músculos lisos que, por sua vez, regulam o funcionamento normal dos vasos sanguíneos e órgãos internos (AHMAD, 2018). Além disso, os RL são subprodutos da formação de ATP e de atividades funcionais, conferindo um relevante papel na sinalização celular, apoptose, expressão gênica e transporte de íons (LOURENÇO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019).

Com o aumento descontrolado na formação de RL, ocorre dano em moléculas, como proteínas, lipídeos, RNA e DNA (LOURENÇO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019). Segundo Manssouri, Znini e Majidi (2020), os RL estão associados a danos na saúde humana, causando várias doenças, como as neurodegenerativas, envelhecimento e morte celular. Quando esse aumento resulta em um desbalanço na produção RL em relação à sua remoção por sistemas biológicos, ocorre estresse oxidativo, que está sendo associado a doenças, como câncer, diabetes, aterosclerose, artrite, etc. (LOURENÇO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019).

Os RL são geralmente espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), podendo ser subdivididos em dois grupos: os radicais e os compostos não radicalares. O grupo dos radicais compreende espécies como superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical de oxigênio ($O_2^{\cdot\cdot}$), hidroxila (OH^{\cdot}), radical alcóxi (RO^{\cdot}), radical peroxila ($ROO^{\cdot\cdot}$), óxido nítrico (NO^{\cdot}) e dióxido de nitrogênio (NO_2^{\cdot}). Já os compostos não radicalares são compostos por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), ácido hipobromoso ($HOBr$), ozônio (O_3), oxigênio singlete (1O_2), ácido nitroso (HNO_2), cátion nitrosil (NO^+), nitroxil ânion (NO^-), trióxido de dinitrogênio (N_2O_3), tetraóxido de dinitrogênio (N_2O_4), cátion nitrônio (NO_2^+), peróxidos orgânicos ($ROOH$), aldeídos ($HCOR$) e peroxinitrito ($ONOOH$). As espécies radicais são reativas e apresentam um alto grau de eletrofilicidade (GUPTA et al., 2020).

Além da formação natural de RL devido a reações químicas do metabolismo, o aumento da exposição ao ambiente e a presença de xenobióticos na dieta resultam em geração de ROS e RNS (NIMSE; PAL, 2015). Segundo Sharma, Gupta e Sharma (2018), os RL também podem ser formados por meio da poluição, gases emitidos por escapamento de automóveis, pesticidas, fumaça de cigarro, radiação, etc., e que estão comumente presentes no dia a dia das pessoas. Além disso, o estilo de vida moderno associado a uma alimentação pouco saudável e sedentarismo podem acarretar ao aparecimento do estresse oxidativo, resultando no aumento da ocorrência de doenças crônicas, como já relatado em estudos experimentais humanos (SHARIFI-RAD et al., 2020).

No entanto, não é apenas no corpo humano que podem ocorrer danos por oxidação (LOURENÇO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019). Na indústria de alimentos, a produção de espécies reativas é uma das maiores preocupações, por resultar na oxidação lipídica. Os lipídeos são os principais alvos das ERO, acarretando perdas econômicas devido à alteração do sabor e textura do alimento, reduzindo a segurança e a qualidade nutricional, devido à produção de compostos tóxicos. Dessa forma, a implementação de antioxidantes é uma alternativa viável para combater a deterioração de alimentos e reduzir os efeitos deletérios nos seres vivos (FERREIRA et al., 2019).

2.8 Antioxidante

Os compostos com ação antioxidante podem estar naturalmente presentes nos alimentos ou ser adicionados com o propósito de prevenir a oxidação lipídica, preservando a qualidade do alimento (SHAHIDI, 2000). Ferreira et al. (2019) definem os antioxidantes como moléculas

que agem inibindo ou extinguindo as reações dos RL, retardando ou impedindo os danos celulares.

Os antioxidantes podem agir de diversas formas nas células, atuando em vários mecanismos de defesa, como a conversão de ROS em espécies não radicais, impedindo a reação em cadeia auto-oxidativa e reduzindo as concentrações localizadas de oxigênio (LOURENÇO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019). Podem, ainda, reparar lesões, removendo danos no DNA e recuperar membranas (FERREIRA et al., 2019).

Devido à formação contínua de RL ao longo da vida durante os processos metabólicos, as células desenvolveram várias formas de defesa antioxidante, com o propósito de neutralizar os níveis intracelulares ou reduzir os danos recorrentes da produção de RL nas células (PRIORI et al., 2017). Segundo Pereira e Cardoso (2012), os antioxidantes podem ser classificados em endógenos e exógenos, sendo o primeiro constituído por substâncias produzidas pelo próprio metabolismo, e os exógenos ingeridos por meio da alimentação. O sistema endógeno pode ser categorizado em enzimático e não enzimático. Os antioxidantes enzimáticos irão atuar quebrando e removendo os RL. Dessa forma, irão converter produtos oxidativos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, posteriormente, em água, como superóxido dismutase, catalase, NADPH-quinona oxirredutase, glutadiona peroxidase e enzimas de reparo (VASCONCELOS, 2014). Já os antioxidantes não enzimáticos atuam interrompendo as reações em cadeia dos RL. Alguns exemplos desses antioxidantes são a vitamina C, vitamina E, polifenol vegetal, carotenoides e glutatona (NIMSE; PAL, 2015; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Além dos antioxidantes naturais, existem os sintéticos. Segundo Petrescu, Petrescu e Buzea (2020), os antioxidantes são importantes na conservação de produtos, sendo comumente utilizados pela indústria alimentícia e cosmética. Os antioxidantes sintéticos comumente utilizados são butil hidroxianisol (BHA), 2,6-dit-butil-4-hidroxitolueno (BHT), galato de propila (PG), ácido ascórbico e alfa-tocoferol (FERREIRA et al., 2019). Além deles, 2-naftol (2NL), 4-fenilfenol (OPP) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-DA) são frequentemente empregados em frutas e vegetais. Porém, sua utilização tem gerado dúvidas quanto à sua aplicabilidade (LOURENÇO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019).

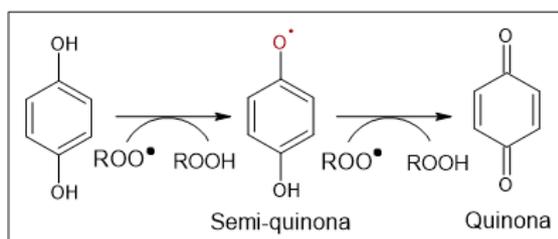
Kornienko et al. (2019) relatam que elevadas doses de antioxidantes sintéticos podem acarretar danos ao DNA e induzir a senescência prematura. Além disso, diversos estudos já publicados têm referido a causa de algumas doenças à ingestão a longo prazo de antioxidantes sintéticos, como alergias de pele, danos ao trato gastrointestinal e, inclusive aumento do risco

de câncer (LOURENÇO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019). Segundo Botterweck et al. (2000), em estudos com animais, foi relatado que os antioxidantes BHA e BHT causaram efeitos adversos no fígado e carcinogênese. Ademais, pouco se é relatado sobre danos ambientais e o destino desses compostos (WANG et al., 2016). Portanto, ao longo dos anos, a tendência em substituir esses antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais vem aumentando (LOURENÇO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019).

2.8.1 Antioxidantes naturais

A utilização de antioxidantes naturais vem se destacando em relação a seu potencial contra os efeitos maléficos, em decorrência do excesso de RL e das doenças associadas a eles (PÉREZ-TORRES et al., 2021). De acordo com Ramana et al. (2018), os antioxidantes naturais são componentes obtidos a partir de plantas ou outros organismos vivos, que apresentam capacidade de inibir o estresse oxidativo, e dessa forma, restaurar a homeostase celular (FIGURA 6).

Figura 6- Mecanismo antioxidante dos compostos fenólicos.



Fonte: TADAPANENI, 2010.

Segundo Zhao et al. (2021), as plantas apresentam alta composição de compostos bioativos, que inclusive podem ser utilizadas no desenvolvimento de alimentos funcionais, devido à capacidade antioxidante dos componentes fitoquímicos. Twajj e Hasan (2022) descrevem os compostos fitoquímicos como moléculas derivadas do metabolismo secundário das plantas, sendo produzidos devido a estresses ambientais, como infecções microbianas, poluição, mudanças de temperatura e seca. Diversos fitoquímicos têm sido associados à neutralização de condições patológicas ocasionadas pelo estresse oxidativo, como resveratrol, curcumina, catequinas, genisteína e quercetina (CORRÊA et al., 2018; MARTEL et al., 2019). Esses últimos, além da utilização de antioxidantes naturais, como polifenóis e carotenoides, têm sido propostos como alternativa à ingestão de antioxidantes sintéticos (NEHA et al., 2019).

Pesquisando extrato de caroço de manga (*Mangifera indica* L., Anacardiaceae), Abdel-Aty et al. (2018) constataram que a semente continha uma quantidade considerável de fenólicos

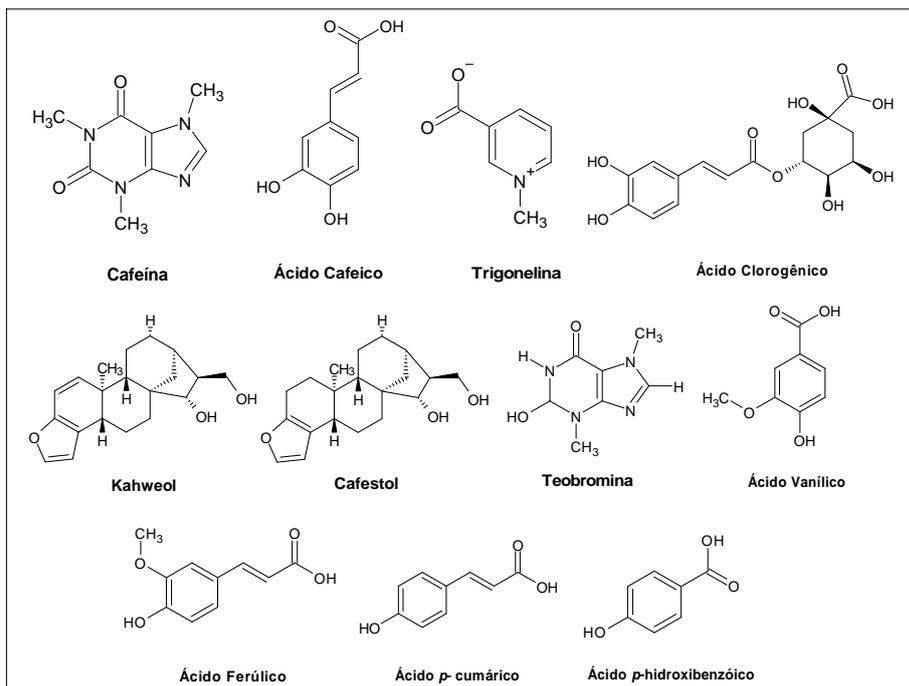
e flavonoides (17.400 e 3325 mg/100 g de semente, respectivamente), sendo esses eficientes na eliminação de RL pelas técnicas de DPPH e ABTS, com valores de IC50 de 47,3 e 7,9 µg/ml, respectivamente. Os compostos fenólicos podem apresentar grande diversidade de estruturas químicas, desde estruturas simples, como ácido ferúlico, vanilina, ácido gálico e ácido cafeico; a estruturas mais complexas como taninos e flavonoides (ABBAS et al., 2019). Lourenço, Moldão-Martins e Alves (2019) relataram que os compostos fenólicos, além de antioxidantes, agem como antimicrobianos e antifúngicos, além de contribuir com efeitos positivos sobre os sabores e texturas em alimentos.

Devido ao clima tropical, a alimentação típica brasileira pode ser considerada fonte de compostos antioxidantes pela variedade de vegetais e frutos, sendo ricos em vitaminas, compostos fenólicos e outras substâncias que garantem melhores condições de saúde, o que resulta em um menor desenvolvimento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (DEL RÉ; JORGE, 2012). Dentre os alimentos, o café tem se destacado, sendo seus efeitos na saúde alvo de diversas pesquisas. O café apresenta atividade antioxidante, auxiliando na prevenção de diversas doenças, como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, inclusive o câncer (SOCALA et al., 2021).

2.8.2 Atividade antioxidante associada aos compostos bioativos dos grãos de café

O café apresenta diversos componentes que afetam o corpo humano, incluindo cafeína, ácido cafeico, trigonelina, ácido clorogênico e diterpenos, como cafestol e kahweol (Figura 7) (BULDAK et al., 2018). O impacto do consumo de café na saúde é alvo de diversas pesquisas (SOCALA et al., 2021).

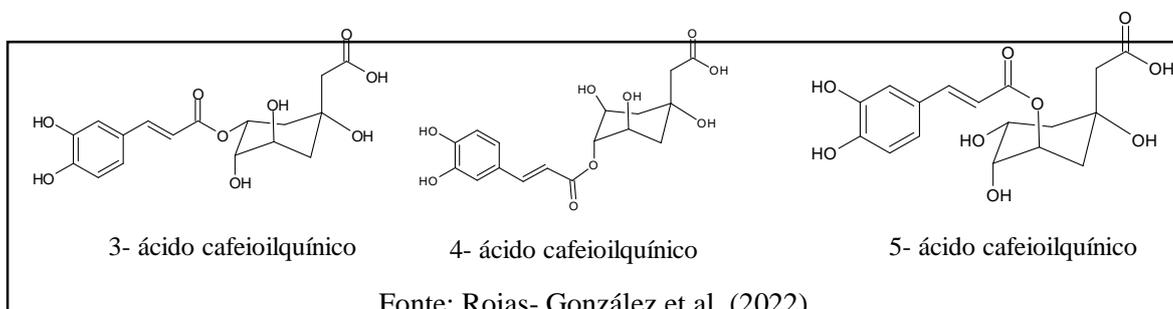
Figura 7- Principais compostos bioativos presentes no café.



Fonte: Jeszka-Skowron, Zgoła-Grześkowiak e Grześkowiak (2015).

De acordo com Buldak et al. (2018), diversos componentes presentes nos grãos de café verde apresentam atividade antioxidante, como os ácidos clorogênicos (CGAs), cafeico, ferúlico e cumárico (Figura 7). Os ácidos clorogênicos são os mais abundantes dos compostos fenólicos, sendo que o ácido 5-O- cafeoilquínico é a forma mais encontrada (Figura 8). Os CGAs apresentam uma alta variedade de efeitos biológicos, como antimutagênico, antiviral, anticarcinogênico, inclusive o aumento da defesa celular (XU; HU; LIU, 2012). Ademais, segundo Fernandes da Silva et al. (2022), os compostos fenólicos têm sido indicados como potenciais inibidores da protease SARS-CoV-2, vírus responsável pela causa da COVID-19.

Figura 8- Estrutura química dos principais isômeros de ácidos clorogênicos no café.



Fonte: Rojas- González et al. (2022)

A cafeína também é relatada como um composto que apresenta atividade antioxidante (ÇELIK; GÖKMEN, 2018; PINHEIRO et al., 2021; SANTOS et al., 2019). Vieira, Gaspar e Santos (2020), estudando a cafeína, observaram um efeito protetor desse composto sobre a

degradação oxidativa da adenina, constatando que alguns produtos, resultantes da hidroxilação e/ou desmetilação da cafeína, são bons antioxidantes, capazes de regenerar produtos oxidados da adenina por efeito de reparo.

Os produtos da reação de *Maillard* são um dos principais contribuintes da ação antioxidante presente nos grãos torrados. Por meio do processo de torra, produtos são formados a partir da degradação dos CGAs, resultando em pigmentos (melanoidinas) e componentes voláteis (YALÇINKAYA; ABDALLA; BAKKALBAŞI, 2022). Segundo Delgado- Andrade e Morales (2005), a atividade antioxidante associada às melanoidinas é devido à capacidade de doação de um hidrogênio, resultando na quebra da cadeia radical, além de ser eficaz como agente quelante de metais e de reduzir hidróperóxido a produtos não radicais.

Os benefícios do café para a saúde estão diretamente relacionados com sua propriedade antioxidante. A maior parte dos compostos bioativos com essa ação funcionam por meio da eliminação de RL, contribuindo com a redução de muitas doenças e prejuízos celulares (BAJAJ; BALLAL, 2021).

2.9 Microrganismos em alimentos

Uma alta gama de microrganismos podem ser detectados em alimentos, como bactérias, leveduras, fungos e alguns protozoários (CAMPBELL-PLATT, 2015). Em determinadas situações, como na produção de alguns alimentos, a presença de microrganismos é desejada, como exemplo, em um processo de fermentação. Porém, em outros casos, a presença de microrganismos não é almejável, podendo afetar negativamente a qualidade e segurança dos alimentos (MØRETRØ; LANGSRUD, 2017).

A conservação de alimentos é um tema relevante, e que comumente gera preocupação mundial. Segundo Holban e Grumezescu (2018), as infecções de fonte alimentar constituem qualquer doença gastrointestinal ocasionada pela ingestão de alimentos contaminados por algum organismo patogênico, como bactérias, fungos, vírus, protozoários ou parasitas. São mais de 250 tipos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) (SIRTOLI; COMARELLA, 2018), estimando-se que ocorra cerca de 48 milhões de casos de DTAs anualmente, dentre as quais 128.000 casos levam à hospitalização, resultando em 3.000 mortes (HOLBAN; GRUMEZESCU, 2018). A maior parte das DTAs são causadas por bactérias e suas toxinas, vírus e parasitas (SIRTOLI; COMARELLA, 2018). Portanto, o conhecimento acerca dos microrganismos que afetam os alimentos é importante para o entendimento da patogênese e,

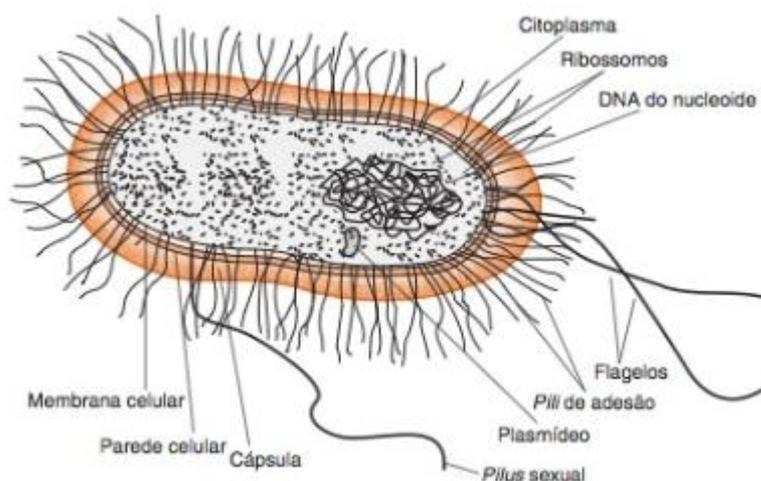
dessa forma, promover estratégias de controle e prevenção de DTAs (HOLBAN; GRUMEZESCU, 2018).

2.9.1 Bactérias

As bactérias compreendem um grupo de microrganismos unicelulares, em que suas células podem variar de 0,5 a 1,0 μm de diâmetro, sendo um dos menores organismos de vida livre existentes. Apresentam núcleo procariótico, podendo ser classificadas de acordo com seu formato, em três classes: cocos, bacilos e espiroquetas (LEVINSON, 2016).

A morfologia das bactérias consiste na presença de parede celular, membrana e citoplasma, com ausência de organelas no citoplasma (CAMPBELL-PLATT, 2015). O envelope ou parede celular é um elemento importante na identificação da espécie bacteriana; por meio dela, é possível identificar várias propriedades celulares (MAI-PROCHNOW et al., 2016) (FIGURA 9).

Figura 9- Estrutura bacteriana.



Fonte: Levinson (2016).

A coloração de Gram oferece um relevante método de classificação bacteriana. As bactérias Gram-positivas possuem parede celular espessa (20-80 nm); em contrapartida, as Gram-negativas têm uma parede celular relativamente fina (>10 nm). Essa distinção na parede celular concede especialidades diferentes à célula, como respostas a estresses externos, incluindo calor, radiação UV e antibióticos (MAI-PROCHNOW et al., 2016).

Distintas espécies bacterianas podem ser encontradas em vários ambientes naturais e também podem ser produzidas pelo homem. Muitos desses organismos podem suportar

ambientes extremos, como baixas temperaturas (1-5 °C), fontes de água em ponto de ebulição (100 °C), fendas hidrotérmicas, nas quais a temperatura pode chegar a 160 °C, e até temperaturas mais elevadas, como no interior do solo oceânico (CAMPBELL-PLATT, 2015).

Microrganismos como as bactérias podem formar estruturas de resistência, como os endósporos, e muitas espécies estão relacionadas com a produção de toxinas, podendo inclusive causar doenças quando ingerida; dessa forma, sua presença em alimentos é um problema alarmante (CAMPBELL-PLATT, 2015). Segundo Campbell-Platt (2015), as bactérias podem causar duas formas de DTAs. A primeira está relacionada com a ingestão de toxinas previamente formadas, como no caso das espécies *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. A segunda forma é aquela que produz infecção, como *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.

2.9.1.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é um relevante patógeno de origem alimentar, sendo descrita pela primeira vez em 1926 na Inglaterra, mas somente chamou a atenção como importante patógeno humano após causar epidemias na década de 70 (ROBERTS et al., 2020). É uma bactéria conhecida por ser resistente a uma alta gama de condições adversas, o que dificulta seu controle ao longo da cadeia alimentar, desde a produção até o armazenamento (BUCUR et al., 2018).

A espécie *L. monocytogenes* é um organismo intracelular anaeróbio facultativo Gram-positivo (MAGIAR et al., 2022), apresenta formato de bacilo cocoide, podendo chegar até a 2 µm de comprimento. Pode apresentar flagelos peritricos quando cresce em temperatura de até 20 °C; porém, quando cresce a 37 °C, a estrutura locomotora é ausente (CAMPBELL-PLATT, 2015). É uma espécie saprófita que pode ser encontrada em diversos ambientes, como na água, solo e vegetação. Sua principal forma de transmissão é por meio de alimentos contaminados, como os prontos para consumo, queijos macios e frios (MAGIAR et al., 2022; SIBANDA; BUYS, 2022).

Na maior parte dos acometidos por *L. monocytogenes*, os sintomas da infecção resultam em gastroenterite febril leve e autolimitada (SIBANDA; BUYS, 2022). Porém, em crianças, gestantes, idosos e pessoas com sistema imunológico comprometido, pode resultar em meningite (CAMPBELL-PLATT, 2015), com alta taxa de letalidade de 20 a 30%. Em mulheres grávidas pode ocorrer aborto, parto prematuro ou natimorto (SIBANDA; BUYS, 2022). Segundo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2022), estima-se que 1.600

pessoas contraem listeriose a cada ano e cerca de 260 morrem. O período de incubação até o aparecimento dos primeiros sintomas pode ser de até 90 dias (CAMPBELL-PLATT, 2015).

2.9.1.2 *Salmonella* spp.

A *Salmonella* spp. (Enterobacteriaceae) é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo (CAMPBELL-PLATT, 2015), que está associado a gastroenterites transmitidas por alimentos e água e febre tifoide em humanos (ULHAQ et al., 2020). O modo mais comum de transmissão é por meio de alimentos, normalmente de origem animal, como ovos e aves, mas também pode ocorrer por consumo de carne malcozida, manuseio impróprio da carne, produtos lácteos não pasteurizados, frutos do mar, produtos frescos e frutas (GRUDLEWSKA-BUDA et al., 2022).

O gênero *Salmonella* foi classificado pela primeira vez em 1900, por Lignières (SEGUNDO; MESSIAS, 2020). Segundo World Health Organization (WHO, 2018), a salmonela é uma das quatro principais causas de doenças diarreicas no mundo. As espécies relacionadas à causa de febre tifoide resultam em uma infecção sistêmica, com estimativa de 223.000 mortes anualmente. Em contrapartida, as não tifoïdes manifestam-se como uma doença gastrointestinal em indivíduos saudáveis, ocasionando anualmente cerca de 93,8 milhões de casos e 155.000 mortes (PULFORD et al., 2019).

As espécies do gênero *Salmonella* são definidos com base em sorotipos por meio do esquema de classificação *Kauffman-White* de acordo com os antígenos, O de parede celular, H flagelar e Vi capsular. Foram identificados mais de 2.500 sorovares, sendo que a maioria das salmonelas que causam DTAs é sorovar da espécie *S. enterica* (CAMPBELL-PLATT, 2015; FERNANDES et al., 2022). Contudo, para fins médicos, as espécies de *Samonella* são definidas em dois tipos: as espécies tifoïdes (que causam febre tifoïde) e as não tifoïdes (causam enterocolite e infecções metastáticas). As espécies tifoïdes são *T. typhi* e *S. paratyphi*. Já as não tifoïdes irão incluir vários sorotipos de *S. enterica*, dentre esses a *S. enterica* sorotipo *Choleraesuis* é mais comumente relacionada com infecções metastáticas (LEVINSON, 2016).

2.9.2 Fungos

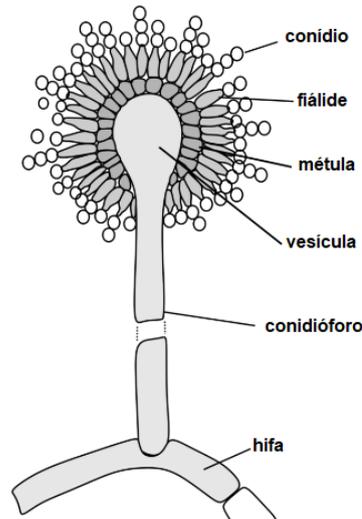
Os fungos são organismos eucarióticos, uni ou multicelulares, heterótrofos, sendo seres importantes na cadeia alimentar, capazes de degradar uma alta gama de substratos. Conhecidos popularmente como bolores ou mofos, os fungos podem apresentar-se sob a forma de leveduras (unicelular), formar um pseudomicélio ou hifas (multicelulares). Ainda que algumas espécies

sejam prejudiciais, a maior parte dos fungos são vitais para a manutenção da vida na Terra (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010; TORTORA; BERDELL, CASE, 2017).

Atualmente, o Reino Fungi engloba mais de 148.000 espécies, com mais de 200 ordens de fungos classificadas em 12 filos (LI et al., 2021). O filo Ascomycota compreende cerca de 32.200 espécies, compondo o maior número de indivíduos já descritos no Reino (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). Os fungos pertencentes à divisão Ascomycota possuem reprodução assexuada e sexuada, apresentando esporos que são dispersos pelo vento, água, solo ou insetos; compõem espécies saprofíticas, parasitas e mutualistas (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2021).

O gênero *Aspergillus* (Figura 10) (Filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales, família *Aspergillaceae*) compreende aproximadamente 339 espécies, sendo uma das mais numerosas da família *Aspergillaceae*. Diversas espécies de *Aspergillus* são exploradas pelos humanos; porém, várias outras são prejudiciais (STEENWYK et al., 2019; TINI; BECCARI; COVARELLI, 2020).

Figura 10- Estrutura fúngica do gênero *Aspergillus*.



Legenda: Estrutura de *Aspergillus niger*.

Fonte: Mokobi (2021) com modificações.

A presença de fungos em alimentos resulta em perdas econômicas significativas, além de estar relacionados com a causa de doenças, como aspergilose broncopulmonar alérgica ou sinusite fúngica alérgica (JUBAYER et al., 2021). Segundo Steenwyk et al. (2019), a presença ubíqua, diversidade ecológica e alto impacto nas questões humanas que os fungos da família *Aspergillaceae* apresentam se devem à sua diversidade fenotípica, como a extrema tolerância a

estresse osmótico e variação de temperatura, e à sua capacidade de crescer em uma alta variedade de substratos.

2.9.2.1 *Aspergillus carbonarius*

A espécie *Aspergillus carbonarius* (*Aspergillaceae*) pertencente à seção *Nigri*, apresenta colônias escuras e conídeos uni ou bisseriados; e compreende uma das espécies mais importantes da família devido ao potencial toxigênico (TINI; BECCARI; COVARELLI, 2020). O crescimento dessa espécie pode ocorrer em uma ampla faixa de temperatura (10-42 °C), porém, a temperatura ótima de crescimento é entre 30-35 °C. Ademais, dependendo da estirpe, a atividade de água (aw) ideal para o crescimento é de 0,93-0,98 (PITT; HOCKING, 2009).

Recentemente, os relatos mais comuns de *A. carbonarius* é da sua presença em uvas e do seu potencial produtor de ocratoxina A (OTA) (PITT; HOCKING, 2009). Segundo Batt e Tortorello (2014), a espécie está relacionada com a causa de podridão em cachos de uva, principalmente em temperaturas mais elevadas, e diversas vezes produzindo OTA, períodos antes da colheita. Também já foi relatada a presença de *A. carbonarius* em grãos de café (OLIVEIRA et al., 2019).

2.9.2.2 *Aspergillus westerdijkiae*

Aspergillus westerdijkiae (*Aspergillaceae*) é uma espécie fúngica da seção *Circumdati*, descrito como contaminante de diversos alimentos como café, uva, páprica, cevada, cerveja, vinho, leite, laranjas e sucos (GIL-SERNA et al., 2015; HAN et al., 2016). Apresenta distribuição mundial, sendo encontrado inclusive em poeira doméstica e nas profundezas do oceano (HAN et al., 2016). Estudos realizados por Abdel- Hadi et al. (2021), avaliando o efeito da temperatura e aw no crescimento de *A. westerdijkiae*, constataram que o crescimento ótimo, ou seja, a temperatura e a atividade de água na qual a espécie em estudo melhor cresceu ocorre a 25 °C e 0,90 aw.

Diversos membros da seção *Circumdati* são conhecidos como patógenos humanos e animais, e estão relacionados com a produção de micotoxinas (RODRIGUES et al., 2022). Segundo Schlösser e Prange (2018), *A. westerdijkiae* tem demonstrado ser mais relevante na produção de ocratoxina A (OTA) em alimentos, quando comparado com *A. ochraceus*. Aproximadamente 70% das cepas de *A. westerdijkiae* são capazes de produzir OTA (HAN et al., 2016). Gil-Serna et al. (2011) mostraram que os isolados de *A. westerdijkiae* contiveram níveis de produção de OTA cem vezes maiores do que *A. ochraceus*.

2.9.3 Micotoxinas

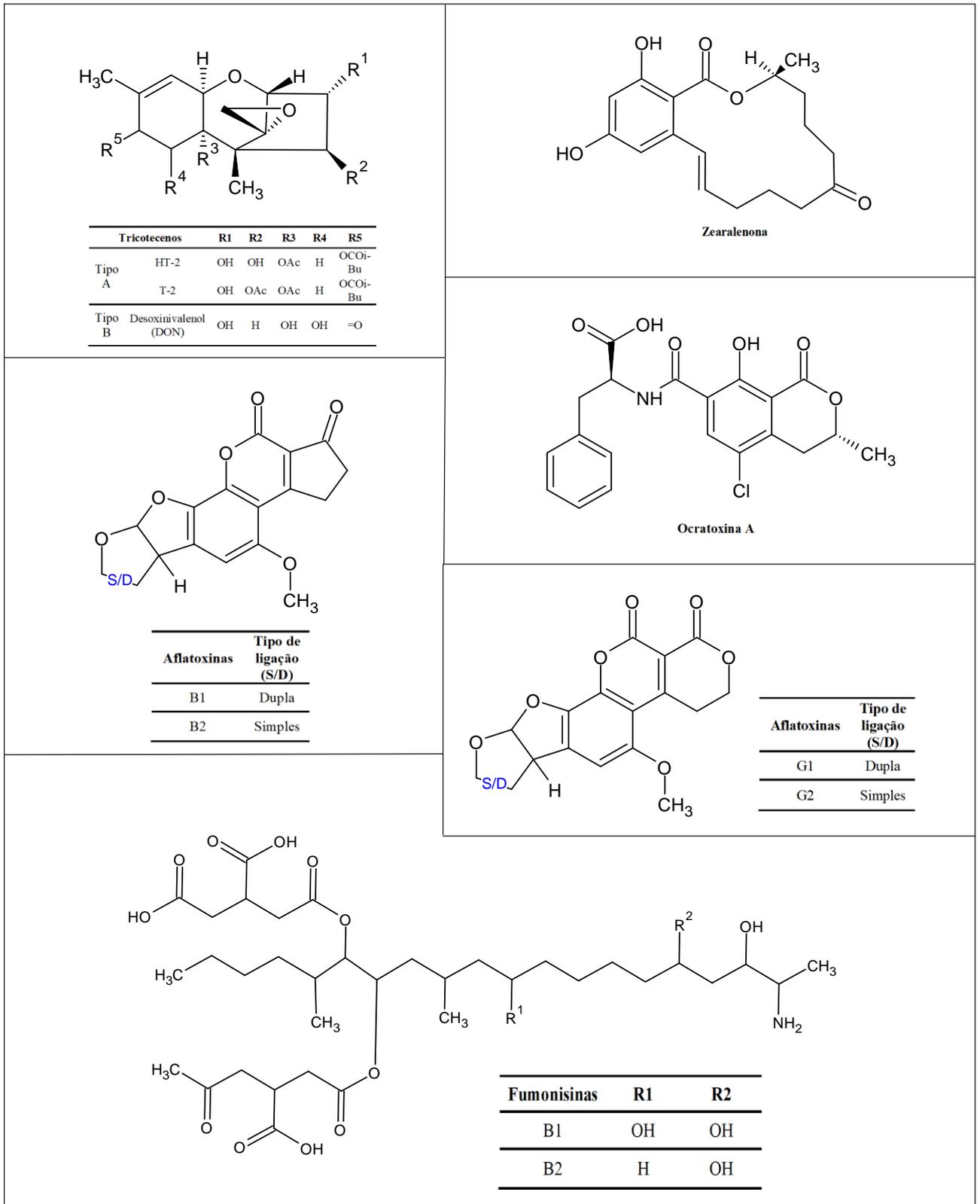
As micotoxinas constituem um dos problemas mais relevantes na segurança alimentar. São definidas como compostos de baixo peso molecular produzidos por fungos filamentosos (MARREZ; AYESH, 2022). A presença de fungos em alimentos pode acarretar podridão e contaminação por micotoxinas (MUTIGA et al., 2021), além dos riscos à saúde dos consumidores; a deterioração causada pelos fungos resulta em perdas econômicas consideráveis para a indústria de alimentos (SCHLÖSSER; PRANGE, 2018).

O ser humano está frequentemente exposto à contaminação por toxinas fúngicas; além da ingestão de alimentos contaminados, pode ocorrer contágio por inalação ou exposição dérmica (BRANDÃO et al., 2021). Segundo Gruber-Dorninger, Jenkins e Schatzmayr (2019), algumas micotoxinas podem ser transferidas por alimentos de origem animal como ovos, carne e leite. Atualmente, existem cerca de 70.000 espécies de fungos produtores e 500 micotoxinas conhecidas, sendo que os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Claviceps* são os mais associados à produção de metabólitos secundários tóxicos (MARREZ; AYESH, 2022).

Os fungos podem contaminar as culturas antes, durante ou após a colheita. A colonização da planta pelo fungo irá depender da virulência da cepa e de condições que agravam a susceptibilidade da planta. Já para fungos de armazenamento, a habilidade de colonizar é dependente de fatores como temperatura e aw (MUTIGA et al., 2021). De acordo com Brandão et al. (2021), as micotoxinas são produzidas durante o crescimento dos fungos, contaminando praticamente todas as *commodities* agrícolas no mundo, como café, uvas, amendoim, milho e produtos com elevado teor de amido.

Dentre as micotoxinas mais comuns, estão: aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), ocratoxina A (OTA), tricotecenos [tipo A (toxinas HT-2 e T-2) e tipo B (desoxinivalenol (DON)], zearalenona (ZEN), e fumonisinas B1 e B2 (FB1 e FB2) (ZHANG et al., 2022) (Figura 11). Uma cepa de fungo pode estar associada à produção de mais de uma micotoxina (HUDZ et al., 2021).

Figura 11- Estrutura química das micotoxinas.



Fonte: Steyn (1995).

Os efeitos na saúde associados ao consumo de alimentos contaminados com micotoxinas, podem ser agudos ou crônicos. O gênero *Aspergillus* tem capacidade de produzir

tanto nefrotoxinas quanto carcinógenos (AFSAH-HEJRI; HAJEB; EHSANI, 2020). As mais relevantes e conhecidas micotoxinas produzidas por espécies de *Aspergillus* são a OTA e as AFs (PFLIEGLER et al., 2020). Segundo *International Agency for Research on Cancer* (IARC), as aflatoxinas e ocratoxina A podem ser enquadradas nos carcinógenos tipo 1 e 2B, respectivamente (QUADRO 1).

Quadro 1- Classificação das micotoxinas.

Classificação	Micotoxina
Grupo 1	Aflatoxinas (IARC, 2019)
Grupo 2B	Ocratoxina (IARC, 1993b) Fumonisina (IARC, 2019)
Grupo 3	Desoxinivalenol (IARC, 1993a) Zearalenona (IARC, 1993a) Patulina (IARC, 1987)

Legenda: Grupo 1: O agente é um carcinógeno humano; Grupo 2: O agente é possivelmente cancerígeno para humanos; Grupo 3: O agente não é classificável quanto à sua carcinogenicidade para humanos (IARC, 2006).

Fonte: Claeys et al. (2020).

Não existem técnicas que possam retirar completamente micotoxinas dos alimentos (AFSAH-HEJRI; HAJEB; EHSANI, 2020). Além disso, com a presença desses compostos em uma alta variedade de alimentos e sua estabilidade ao longo do processamento, as micotoxinas devem ser consideradas um problema de saúde pública relevante (CAMPBELL-PLATT, 2015). Portanto, no Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), segundo a resolução n° 7, de 18 de fevereiro de 2011, estabelece limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos.

2.9.3.1 Ocratoxina A (OTA)

Identificada pela primeira vez em 1965 como um metabólito secundário associado à espécie *A. ochraceus*, a OTA é a micotoxina mais recorrente do grupo das ocratoxinas (PAYROS et al., 2021). É comumente encontrada em nozes, frutas secas, uvas e bebidas derivadas de uvas (SILVA; OLIVEIRA; RAMALHO, 2022) e café (MUTIGA et al., 2021). Outros alimentos também podem ser contaminados, como leite, tecidos animais, ovos e cerveja (ALMEIDA et al., 2019).

A ocratoxina A ou 7-(L-β-fenilalanilcarbonil)-carboxil-5-cloro-8-hidroxi-3,4- dihidro-3R-metilisocumarina é derivada da família das dihidrocumarinas acopladas com β- fenilalanina

(Figura 10) (KHOURY; ATOUI, 2010). Quimicamente, a OTA constitui uma substância cristalina branca, termicamente estável, com temperatura de fusão de 168-173 °C (ZAPÁSNIK et al., 2022). Seu consumo está associado a efeitos nefrotóxicos, hepatotóxicos, genotóxicos, teratogênicos, imunotóxicos e carcinogênicos (KUPSKI et al., 2022).

É produzida por *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. A produção de OTA por espécies de *Aspergillus* é mais proeminente em regiões tropicais e subtropicais, sendo que diversas espécies já foram relatadas como produtoras de OTA, como *A. steynii*, *A. ochraceus* e *A. westerdjkiae* (Seção *Circumdati*); e *A. carbonarius* (Seção *Nigri*) (ALMEIDA et al., 2019).

A presença de OTA em cafés brasileiros já foi relatada anteriormente (ALMEIDA et al., 2019). Pesquisas realizadas por Batista et al. (2009) avaliando a presença de OTA em diferentes estágios de maturação do café e processamento, constatou-se que das 289 amostras analisadas, 56% estavam contaminadas com OTA; e das 82 amostras de café varridas do solo, detectaram-se níveis de OTA acima de 100 µg/kg. Segundo a Anvisa (2011), o Limite Máximo Tolerado (LMT) para café torrado (moído ou em grão) e café solúvel é de 10µg/kg (QUADRO 2).

Quadro 2- Limite Máximo Tolerado (LMT) de Ocratoxina A em alimentos.

Alimento	LMT (µg/kg)
Cereais e produtos de cereais, incluindo cevada malteada	10
Feijão	10
Café torrado (moído ou em grão) e café solúvel	10
Vinho e seus derivados	2
Suco de uva e polpa de uva	2
Especiarias: <i>Capsicum</i> spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta decaiena e pimentão-doce), <i>Piper</i> spp. (o fruto, incluindo a pimenta-branca e a pimenta-preta), <i>Myristica fragrans</i> (noz-moscada) <i>Zingiber officinale</i> (gengibre), <i>Curcuma longa</i> (curcuma); Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas.	30
Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	2
Produtos de cacau e chocolate	5
Amêndoa de cacau	10

Frutas secas e desidratadas	10
Cereais para posterior processamento, incluindo grão de cevada	20

Fonte: ANVISA (2011)

2.9.4 Atividade antibacteriana e antifúngica associada aos compostos bioativos dos grãos de café

Em decorrência da crescente demanda dos consumidores por alimentos mais saudáveis, com redução ou ausência de aditivos químicos, a procura por alternativas de conservantes seguros e biodegradáveis têm aumentado. Atualmente, a utilização de conservantes é o modo mais comum de prevenir a decomposição causada por microrganismos e, desde os tempos antigos, já são conhecidos extratos vegetais e óleos essenciais com atividade antimicrobiana (SCHLÖSSER; PRANGE, 2018).

Devido à presença de compostos bioativos, o café é reconhecido por apresentar atividade antioxidante e antimicrobiana (CANCI et al., 2022). Runti et al. (2015) avaliaram o potencial antimicrobiano de extratos de café arábica descafeinado no crescimento de *Staphylococcus aureus*, constatando concentração mínima inibitória (CMI) de 2 mg/ml⁻¹. Paralelamente, Canci et al. (2022) relataram alto potencial antimicrobiano de extratos de café torrado, inibindo completamente o crescimento de *Escherichia coli* em meio de cultura. Anteriormente, Almeida et al. (2021) descreveram que os compostos bioativos trigonelina, ácido clorogênico e ácido nicotínico, presentes no café, foram eficientes contra *Streptococcus mutans*, inibindo seu crescimento, e, assim, podendo reduzir o acometimento de cárie.

Segundo Mathur et al. (2021), o café verde apresenta propriedades antifúngicas que estão associadas aos compostos cafeína, fenol, alcaloides, flavonoides e saponinas. Pesquisas realizadas por Arora e Ohlan (1997) mostraram que a cafeína inibiu o crescimento total de fungos na concentração de 0,3%. Mathur et al. (2021), analisando o potencial antifúngico do café verde e chá verde, constataram que o efeito inibidor do café foi maior que o do chá. Segundo os autores, o elevado teor de cafeína presente no café, quando comparado com o chá verde, pode ser um dos principais motivos pelos quais o café verde foi mais eficaz na atividade antifúngica. Sangta et al. (2021), avaliando a atividade antifúngica dos polifenóis extraídos da polpa do café arábica, constataram que o extrato apresentou alta atividade contra os fungos *Alternaria brassicicola*, *Pestalotiopsis* sp. e *Paramyrothecium breviseta*.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M., et al. Natural polyphenols: An overview. **Internation Journal of Food Properties**, v. 20, p. 1689–1699, 2017.
- ABDEL-ATY, A. M. et al. Phenolic-antioxidant capacity of mango seed kernels: therapeutic effect against viper venoms. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 5, p. 594-601, set. /out. 2018.
- ABDEL-HADI, A. et al. Predictive modeling and validation on growth, production of asexual spores and Ochratoxin A of *Aspergillus ochraceus* group under abiotic climatic variables. **Microorganisms**, v. 9, n. 6, p. 1321, jun., 2021.
- AFSAH-HEJRI, L.; HAJEB, P.; EHSANI, R. J. Application of ozone for degradation of mycotoxins in food: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 1777-1808, jul., 2020.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Diário oficial da união. **Resolução - RDC N° 7**, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, 2011.
- AHMAD R. **Introductory chapter**: basics of free radicals and antioxidants. Free Radicals, Antioxidants and Diseases, IntechOpen, 2018.
- ALMEIDA, A. B. de. et al. Inhibition of growth and ochratoxin A production in *Aspergillus* species by fungi isolated from coffee beans. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1091-1098, oct., 2019.
- ALMEIDA, S. A. de. et al. Antimicrobial potential of resin matrices loaded with coffee compounds. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 109, n. 3, p. 428-435, mar., 2021.
- ARORA, D. S., OHLAN, D. In vitro studies on antifungal activity of tea (*Camellia sinensis*) and coffee (*Coffea arabica*) against wood-rotting fungi. **Journal of Basic Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 159-165, 1997.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ (ABIC). **Indicadores da Indústria do Café 2021**. Disponível em: <<https://estatisticas.abic.com.br/estatisticas/indicadores-da-industria/indicadores-da-industria-de-cafe-2021/>>. Acesso em: 13 set. 2022.
- BAJAJ, D.; BALLAL, S. A review on antioxidant activity of coffee and its additives. **Journal of Pharmaceutical Research International**, n. 33, v. 25b, p. 77-85, 2021.
- BARBOSA, M. S. G. et al. Correlation between the composition of green Arabica coffee beans and the sensory quality of coffee brews. **Food Chemistry**, v. 292, n. 15, sep., p. 275-280, 2019.

BATISTA, L.R., et al. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, v. 20, n. 9, p. 784-790, 2009.

BATT, C. A.; TORTORELLO, M. (ed). **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2nd ed. Academic Press, 2014.

BOTTERWECK, A., et al. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 7, p. 599-605, jul., 2000.

BRAINER, M. S. C. P. **Produção de café**. Caderno Setorial ETENE, v. 5, n.138, 2020, 12p.

BRANDÃO, R. Antifungal activity and the effect of the essential oil of *Lippia origanoides* Kunth on *Aspergillus* mycotoxins production. **Australian Journal of Crop Science**, v. 15, n. 7, p. 1005-1012, 2021.

BRIGHENTI, C. R. G.; CIRILLO, M. A. Analysis of defects in coffee beans compared to biplots for simultaneous tables. **Revista Ciência Agronômica**, v. 49, n. 1, p. 62-69, jan./mar., 2018.

BUCUR, F. I. et al. Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and food processing environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 2700, nov., 2018.

BULDAK, R. J. et al. The impact of coffee and its selected bioactive compounds on the development and progression of colorectal cancer in vivo and in vitro. **Molecules**, v. 23, n. 12, 3309, dec., 2018.

CAMPBELL-PLATT, G. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Manole, 2015. 536 p.

CANCI, L. A. et al. Antimicrobial potential of aqueous coffee extracts against pathogens and *Lactobacillus* species: A food matrix application. **Food Bioscience**, v. 47, 101756, 2022.

CARVALHO, C. H. S. de. **Cultivares de café**. Ed. Brasília: EMBRAPA, 2007. 247 p.

ÇELIK, E. E.; GÖKMEN, V. A study on interactions between the insoluble fractions of different coffee infusions and major cocoa free antioxidants and different coffee infusions and dark chocolate. **Food Chemistry**, v. 255, p. 8-14, 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Listeria (listeriosis)**. 2022. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/listeria/>>. Acesso: 23 out. 2022.

CHOU, C.H.; WALLER, G.R. Possible allelopathic constituents of *Coffea arabica*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 6, n. 2, p. 643-654, 1980.

CLAEYS, L. et al. Mycotoxin exposure and human cancer risk: A systematic review of epidemiological studies. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, p. 1-6, 2020.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de café**, Brasília, DF, v. 8, safra 2020/21, n. 2, maio. 2021.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de café, safra 2021/2022**. Disponível em: < https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe/boletim-da-safra-de-cafe/item/download/43031_158073aea1af4048cddb8e12898d3eb8>. Acesso em: 13 set. 2022.

CONSELHO DOS EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL (CECAFÉ). **Relatório Mensal- Julho 2022**. Disponível em: < <https://www.cecafe.com.br/site/wp-content/uploads/graficos/CECAFE-Relatorio-Mensal-JULHO-2022.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2022.

CORRÊA, R. C. G., et al. New phytochemicals as potential human anti-aging compounds: Reality, promise, and challenges. **Critical Review Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 6, Apr., p. 942–957, 2018.

COSTE, R. **Les caféiers et les cafés dans lê monde**. Paris: Larose, 1955. 365 p.

DEBONA, D. G. et al. Avaliação da composição química de café arábica submetido a diferentes perfis de torra. **Revista Ifes Ciência**, v. 6, n. 3, p. 124-133, 2020.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.2, p.389-399, 2012.

DELGADO-ANDRADE, C.; MORALES, F. J. Unraveling the contribution of melanoidins to the antioxidant activity of coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1403-1407, 2005.

DINIZ DOS REIS, T. A. et al. Café solúvel produzido com grãos pva tratados com vapor: Aspectos físico-químicos e sensoriais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 43, p. 1-9, 2019.

DÚRAN, C. A. A. et al. Café: Aspectos Gerais e seu aproveitamento para além da bebida. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p. 107- 134, 2017.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Café arábica corresponde a 70% e café conilon a 30% da produção dos Cafés do Brasil em 2019**. 2019. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/47028493/cafe-arabica-corresponde-a-70-e-cafe-conilon-a-30-da-producao-dos-cafes-do-brasil-em-2019>>. Acesso em: 13 set. 2022.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Série Tecnológica Cafeicultura: Defeitos do Café**. Disponível em: <

http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/publicacoes_tecnicas/Defeitos_do_cafe.pdf>. Acesso em: 29 dez. 2022.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. de. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 Ed. Editora: Educs, 2010. 638 p.

FARAH, A., FERREIRA DOS SANTOS, T. The Coffee Plant and Beans. **Coffee in Health and Disease Prevention**, p. 5–10, 2015.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, 2006.

FERNANDES DA SILVA, M. et al. Design and evaluation of non-conventional extraction for bioactive compounds recovery from spent coffee (*Coffea arabica* L.) grounds. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 177, p. 418- 430, Jan., 2022.

FERNANDES, S. A. et al. *Salmonella enterica* serotypes from human and nonhuman sources in Sao Paulo State, Brazil, 2004-2020. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 64, n. e66, 2022.

FERREIRA, V. R. F. et al. Colorimetric, electroanalytical and theoretical evaluation of the antioxidant activity of *Syzygium aromaticum* L., *Origanum vulgare* L., *Mentha spicata* L. and *Eremanthus erythropappus* M. essential oils, and their major constituents. **New Journal of Chemistry**, v. 43, p. 7653-7662, 2019.

FLORES, R. **Coffee Beans**. 2023. Disponível em: < <https://unsplash.com/pt-br/s/fotografias/coffee-beans>>. Acesso em: abr. 2023.

GAN, J. et al. Correlations between antioxidant activity and alkaloids and phenols of Maca (*Lepidium meyenii*). **Journal of Food Quality**, p. 1- 10, 2017.

GETACHEW, A. T.; CHUN, B. S. Influence of hydrothermal process on bioactive compounds extraction from green coffee bean. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 38, p. 24-31, 2016.

GIL-SERNA, J. et al. Revision of ochratoxin a production capacity by the main species of *Aspergillus* section *Circumdati*: *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. **Food Control**, v. 22, n. 2, p. 343-345, Feb., 2011.

GIL-SERNA, J. et al. *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* as potential risk of OTA contamination in food products in warm climates. **Food Microbiology**, v. 45, p. 168-175, 2015.

GRUBER-DORNINGER, C.; JENKINS, T.; SCHATZMAYR, G. Global mycotoxin occurrence in feed: A ten-year survey. **Toxins**, v. 7, n. 11, p. 375, 2019.

GRUDLEWSKA-BUDA, K. et al. Effect of radiant catalytic ionization and ozonation on *Salmonella* spp. on Eggshells. **Foods**, v. 11, n. 16, p. 2452, 2022.

GUPTA, N. et al. Free radicals as a double-edged sword: The cancer preventive and therapeutic roles of Curcumin. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5390, 2020.

HALL, R. D.; TREVISAN, F.; VOS, R. C. H. de. Coffee berry and green bean chemistry: Opportunities for improving cup quality and crop circularity. **Food Research International**, v. 151, n. 110825, 2022.

HAN, X. et al. Sequencing and functional annotation of the whole genome of the filamentous fungus *Aspergillus westerdijkiae*. **BMC Genomics** volume, v. 17, n. 633, 2016.

HOLBAN, A. M.; GRUMEZESCU, A. M. (ed.). **Microbial Contamination and Food Degradation**. 1^a ed. Academic Press, 2018. 514 p.

HUDZ, O. V. et al. Optical sensor for the detection of mycotoxins. **Semiconductor Physics, Quantum Electronics & Optoelectronics**, v. 24, n. 2, p. 227-233, 2021.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). (1993a). **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 56, 599**. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/iarc-monographs-on-the-evaluation-of-carcinogenic-risks-to-humans-65/>>. Acesso em: 2 out. 2022.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). (2006). **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans PREAMBLE**. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/CurrentPreamble.pdf>>. Acesso em: 2 out. 2022.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). (2019a). **Agents classified by the IARC monographs. Volumes 1–123. IARC**. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/agentsclassified-by-the-iarc/>>. Acesso em: 2 out. 2022.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, v. 56, p. 397–444, 1993b.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans**, v. 40, 452, 1987.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO). **Relatório sobre o mercado de Café- Junho 2022**. Disponível em: <<https://www.ico.org/documents/cy2021-22/cmr-0622-p.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2022.

JESZKA-SKOWRON, M.; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A.; GRZEŚKOWIAK, T. Analytical methods applied for the characterization and the determination of bioactive compounds in coffee. **European Food Research and Technology**, v. 240, p. 19–31, 2015.

JUBAYER, F. et al. Detection of mold on the food surface using YOLOv5. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 724-728, 2021.

KHOURY, A. E.; ATOUI, A. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. **Toxins**, v. 2, n. 4, p. 461-493, 2010.

- KITZBERGER, C. S. G. et al. Diterpenes in green and roasted coffee of *Coffea arabica* cultivars growing in the same edapho-climatic conditions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 30, n. 1, p. 52-57, 2013.
- KLEINWÄCHTER, M.; BYTOF, G.; SELMAR, D. Coffee Beans and Processing. **Coffee in Health and Disease Prevention**, p. 73–81, 2015.
- KORNIENKO, J. S., et al. Altas doses de antioxidantes sintéticos induzem senescência prematura em células-tronco mesenquimais cultivadas. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1296, 2019.
- KRISHNAN, S. Sustainable coffee production. **Oxford Research Encyclopedia**, 2017.
- KUPSKI, L. et al. Determination of ochratoxin a and its metabolite ochratoxin alpha in different food matrices after enzymatic biotransformation. **Food Analytical Methods**, v. 15, p. 3003–3012, 2022.
- LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 13^a ed. Porto Alegre: ARTMED. 2016. 788 p.
- LI, Y. et al. A genome-scale phylogeny of the kingdom Fungi. **Current Biology**, v. 31, p. 1653–1665, Apr., 2021.
- LOURENÇO, S. C.; MOLDÃO-MARTINS, M.; ALVES, V. D. Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4132, Nov., 2019.
- MAGIAR, O. et al. *Listeria monocytogenes* meningitis in an immunocompetent patient. **Infection and Drug Resistance**, v. 15, p. 989-994, 2022.
- MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. Integrative approaches for species delimitation in Ascomycota. **Fungal Diversity**, v. 109, p. 155-179, 2021.
- MAI-PROCHNOW, A. et al. Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. **Scientific Reports**, v. 6, n. 38610, 2016.
- MANSSOURI, M.; ZNINI, M.; MAJIDI, L. Studies on the antioxidant activity of essential oil and various extracts of *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. Fruits from Morocco. **Journal of Taibah University for Science**, v. 14, n. 1, p. 124-130, 2020.
- MARCOLAN, A. L.; ESPINDULA, M. C. **Café na Amazônia**. Brasília: EMBRAPA, 2015. 474 p.
- MARREZ, D. A.; AYESH, A. M. Mycotoxins: The threat to food safety. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 65, n. 1, p. 353 – 372, 2022.
- MARTEL, J., et al. Antiaging effects of bioactive molecules isolated from plants and fungi. **Medicinal Research Reviews**, v. 39, p. 1515–1552, 2019.

MARTINS, A. L. **História do Café**. 2ªed. São Paulo: Contexto, 2012. 320 p.

MATHUR, I., et al. Comparative evaluation of antifungal activity of green coffee and green tea extract against *Candida albicans*: An In Vitro Study. **World Journal of Dentistry**, v. 12, n. 4, p. 265-270, 2021.

MEHARI, B. et al. Simultaneous Determination of Alkaloids in Green Coffee Beans from Ethiopia: Chemometric Evaluation of Geographical Origin. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 6, 2016.

MEHAYA, F. M.; MOHAMMAD, A. A. Thermostability of bioactive compounds during roasting process of coffee beans. **Helyion**, v. 6, n. 11, e05508, 2020.

MENDES, G. A. et al. Origin geographical classification of green coffee beans (*Coffea arabica* L.) produced in different regions of the Minas Gerais state by FT-MIR and chemometric. **Current Research in Food Science**, v. 5, p. 298-305, 2022.

MOKOBI, F. **Microbe notes: Aspergillus niger- An Overview**. 2021. Disponível em: <<https://microbenotes.com/aspergillus-niger/>>. Acesso em: 31 dez. 2022.

MOLSKA, G. R. et al. Green coffee extract attenuates Parkinson's related behaviors in animal models. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, suppl. 4, e20210481, 2021.

MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S. Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 6, n. 5, p. 1022-1041, Sep., 2017.

MUTIGA, S. K. et al. Multiple mycotoxins in Kenyan Rice. **Toxins**, v. 13, n. 3, p. 203, 2021.

NATIONAL COFFEE ASSOCIATION (NCA). **The History of Coffee**. Disponível em: <https://www.ncausa.org/about-coffee/history-of-coffee>. Acesso em: 12 jul. 2022.

NEHA, K., et al. Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 178, p. 687–704, 2019.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, v. 5, n. 27986, 2015.

NOVAES, F. J. M. et al. The occurrence of cafestol and kahweol diterpenes in different coffee brews. **Coffee science**, Lavras, v. 14, n. 2, p. 265 - 280, Apr. /Jun., 2019.

OLIVEIRA, G. et al. Influence of temperature and water activity on Ochratoxin A production by *Aspergillus* strain in coffee south of Minas Gerais/Brazil. **LWT- Food Science and Technology**, v. 102, p. 1–7, 2019.

OLIVEIRA, P. M. A. de., et al. Enrichment of diterpenes in green coffee oil using supercritical fluid extraction – Characterization and comparison with green coffee oil from pressing. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 137-145, 2014.

PAYROS, D. et al. Les mycotoxines em alimentation humaine: um défi pour la recherche. **Cahiers de Nutrition et de Diététique**, v. 56, n. 3, p. 170–183, 2021.

PENDERGRAST, M. **Uncommon Grounds: The history of coffee and how it transformed our world**. New Edition. New York: Basic Books, 2019. 480 p.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, Nov., 2012.

PÉREZ-TORRES, I. et al. Oxidative stress, plant natural antioxidants, and obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. e1786, 2021.

PETRESCU, F. I. T.; PETRESCU, R. V. V.; BUZEA, E. M. New natural antioxidants. **Independent Journal of Management & Production**, v. 11, n. 3, 2020.

PFLIEGLER, W. P. et al. The Aspergilli and their mycotoxins: Metabolic interactions with plants and the soil biota. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. e2921, 2020.

PIMPLEY, V. et al. The chemistry of chlorogenic acid from green coffee and its role in attenuation of obesity and diabetes. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 50, n. 10, p. 969-978, Jul., 2020.

PINHEIRO, F. A. et al. Arabica and Conilon coffee flowers: Bioactive compounds and antioxidant capacity under different processes. **Food Chemistry**, v. 336, p. e127701, Jan., 2021.

PITT, J. I., & HOCKING, A. D. Aspergillus and Related Teleomorphs. **Fungi and Food Spoilage**, p. 275–337, 2009.

PRIORI, D. et al. Characterization of bioactive compounds, antioxidant activity and minerals in landraces of pumpkin (*Cucurbita moschata*) cultivated in Southern Brazil. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 33-40, 2017.

PULFORD, C. V. et al. The diversity, evolution and ecology of Salmonella in venomous snakes. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 6, p. e0007169, 2019.

RAMANA, K. V. et al. Therapeutic Potential of Natural Antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, article 9471051, 2018.

ROBERTS, B. N. et al. *Listeria monocytogenes* response to anaerobic environments. **Pathogens**, v. 9, n. 3, p. 210, 2020.

RODRIGUES, M. P. et al. Inhibitory effect of GRAS essential oils and plant extracts on the growth of *Aspergillus westerdijkiae* and *Aspergillus carbonarius* strains. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. e6422, 2022.

RUNTI, G., et al. 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**, v. 62, n. 1, p. 108–114, 2015.

SANGTA, J. et al. Recovery of polyphenolic fraction from arabica coffee pulp and its antifungal applications. **Plants**, v. 10, n. 7, p. e1422, 2021.

SANTOS, A. M. dos., et al. Botanical aspects, caffeine content and antioxidant activity of *Coffea arabica*. **American Journal of Plant Sciences**, v. 10, n. 6, p. 1013, 2019.

SANTOS, J. R.; RODRIGUES, J. A. Characterization of volatile carbonyl compounds in defective green coffee beans using a fan assisted extraction process. **Food Control**, v. 108, n. 106879, 2020.

SANTOS, R. A. dos., et al. Análises de açúcares e ácidos clorogênicos de cafés colhidos em diferentes estádios de maturação e após o processamento. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.

SCHLÖSSER, I.; PRANGE, A. Antifungal activity of selected natural preservatives against the foodborne molds *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus westerdijkiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 13, Jul., 2018.

SEGUNDO, R. F.; MESSIAS, C. T. Salmonelose ocasionada por produtos de origem animal e suas implicações para saúde pública: revisão de literatura. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 4, p. 3715-3746, Out. /Dez., 2020.

SHAHIDI, F. Antioxidants in food and food antioxidants. **Nahrung**, v. 44, n. 3, p. 158- 163, 2000.

SHARIFI-RAD, M. et al. Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. **Frontiers in Physiology**, v. 11, n. 694, 2020.

SHARMA, G. N.; GUPTA, G.; SHARMA, P. A Comprehensive review of free radicals, antioxidants, and their relationship with human ailments. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 28, n. 2, p. 139- 154, 2018.

SIBANDA, T.; BUYS, E. M. *Listeria monocytogenes* pathogenesis: The role of stress adaptation. **Microorganisms**, v. 10, n. 8, p. 1522, 2022.

SILVA, J. V. B. da; OLIVEIRA, C. A. F. de; RAMALHO, L. N. Z. An overview of mycotoxins, their pathogenic effects, foods where they are found and their diagnostic biomarkers. **Food Science and Technology**, v. 42, e48520, 2022.

SIRTOLI, D. B.; COMARELLA, L. O papel da vigilância sanitária na prevenção das doenças transmitidas por alimentos (DTA). **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 12, n. 10, p. 197–209, 2018.

SOCALA, K. et al. Neuroprotective effects of coffee bioactive compounds: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 107, 2021.

SRIDEVI, V.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G. A. Evaluation of roasting and brewing effect on antinutritional diterpenes – cafestol and kahweol in coffee. **Global Journal of Medical Research**, v. 11, n. 5, p. 11-22, Dec., 2011.

STEENWYK, J. L. et al. A robust phylogenomic time tree for biotechnologically and medically important fungi in the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. **mBio**, v. 10, n. 4, 2019.

STEYN, P. S. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. **Toxicology Letters**, v. 82/83, p. 843- 851, 1995.

TADAPANENI, R. K. **Effect of high pressure processing & dairy on the antioxidant activity of strawberry based beverages**. 2010. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciência em Engenharia de Processo Alimentar). Faculdade do Instituto de Tecnologia de Illinois, Chicago, 2010.

TINI, F.; BECCARI, G.; COVARELLI, L. Fungal species and toxins in wines and grapes in the Mediterranean area. **The Mediterranean Diet**, p. 503–515, 2020.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12 ed., Editora: Artmed, 2017, 964 p.

TWAIJ, B. M.; HASAN, M. N. Bioactive secondary metabolites from plant sources: Types, synthesis, and their therapeutic uses. **International Journal of Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 4-14, 2022.

ULHAQ, Z. S., et al. Antibacterial activity of *Citrus hystrix* toward *Salmonella* spp. infection. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 39, n. 6, p. 283-286, Jun. /Jul., 2020.

VASCONCELOS, T. B. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo?. **Unopar Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 16, n.3, p. 213-9, 2014.

VIEIRA, A.J.S.C., GASPAR, E.M., SANTOS, P.M.P. Mechanisms of potential antioxidant activity of caffeine. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 174, n. 108968, 2020.

WANG W., et al. Synthetic phenolic antioxidants and their metabolites in indoor dust from homes and microenvironments. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 1, p. 428-434, Jan., 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Salmonella (non-typhoidal)**. 2018. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))>. Acesso em: 23 out. 2022.

XU, J. G.; HU, Q. P.; LIU, Y. Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 46, Nov., 2012.

YALÇINKAYA, C.; ABDALLA, H. A.; BAKKALBAŞI, E. Bioactive compounds, antioxidant activity, physical and sensory characteristics of Mırra coffee. **Food Science and Technology**, v. 42, e96221, 2022.

YISAK, H.; REDI-ABSHIRO, M.; CHANDRAVANSI, B. S. Selective determination of caffeine and trigonelline in aqueous extract of green coffee beans by FT-MIR-ATR spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 97, p. 33-38, Jul., 2018.

ZAPÁSNIK, A. et al. Ochratoxin A and 2'R-Ochratoxin A in selected foodstuffs and dietary risk assessment. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 188, 2022.

ZHANG, C.; LINFORTH, R.; FISK, I. Cafestol extraction yield from different coffee brew mechanisms. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 27-31, Nov., 2012.

ZHANG, D. et al. Mycotoxins in maize silage from China in 2019. **Toxins**, v. 14, n. 4, p. 241, 2022.

ZHAO, Y. S. et al. Fermentation affects the antioxidant activity of plant-based food material through the release and production of bioactive components. **Antioxidants**, v. 10, n. 12, p. 2004, 2021.

SEGUNDA PARTE- ARTIGO

REVALORIZAÇÃO DE GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) DE QUALIDADE INFERIOR COMO SUBPRODUTO COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIFÚNGICA E ANTIBACTERIANA

Maria Beatriz Pereira Rosa¹; Cassia Duarte Oliveira¹; Marcus Vinícius Prado Alves²; Antônia Isadora Fernandes²; Luís Roberto Batista¹; Eduardo Alves³; Maria das Graças Cardoso^{2*}

¹ Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil.

² Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil.

³ Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil.

*Autor correspondente:

Maria das Graças Cardoso, Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras (UFLA), CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Email: mcardoso@ufla.br

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho avaliar o potencial antioxidante, antifúngico e antibacteriano de extratos etanólicos obtidos de grãos de café de qualidade inferior, de forma a revalorizar a sua utilização na indústria como um produto com alto valor agregado. Foram preparados extratos a partir de grãos de café verde e torrado por meio da técnica de extração sólido-líquido por refluxo. O potencial antioxidante foi avaliado pelo método de eliminação do radical DPPH. A atividade antifúngica foi avaliada por meio da análise do crescimento micelial dos fungos *Aspergillus westerdijkiae* e *Aspergillus carbonarius* e o efeito dos extratos sobre os fungos foi visualizado por meio do MEV. O potencial antibacteriano contra *Salmonella enterica Choleraesuis* e *Listeria monocytogenes* foi avaliado por microdiluição e os efeitos observados por MEV. O extrato de café verde foi o mais eficiente na inibição dos radicais DPPH, e o extrato de café torrado não apresentou atividade antioxidante nas concentrações testadas. Os dados estatísticos diferiram para os extratos quanto ao potencial antifúngico. O extrato de café verde foi mais eficiente na inibição do crescimento micelial. A espécie *A. carbonarius* foi mais sensível aos extratos do que *A. westerdijkiae*, sendo completamente inibido na concentração de 20.000 ppm pelo extrato de café verde. Ambos os extratos de café não apresentaram atividade bactericida, sendo que o extrato de café torrado também não apresentou efeito bacteriostático. A concentração mínima inibitória (CMI) do extrato de café verde para *L. monocytogenes* e *S. Choleraesuis* foi de 5000 ppm. Conclui-se que o extrato etanólico de café verde foi o que apresentou melhor atividade antioxidante, antifúngica e antibacteriana, apresentando alto potencial como subproduto para a indústria.

Palavras-chave: DPPH. Fungo. Bactéria. Grãos de café.

1 INTRODUÇÃO

Apesar do criterioso controle imposto na indústria de alimentos, a cada ano são reportados 600 milhões de casos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs). As DTAs constituem um problema global de saúde pública, resultando em diversas mortes e impactando em questões sociais e econômicas. A transmissão ocorre pelo consumo de alimentos e água contaminados, originando infecções que são causadas principalmente por bactérias, toxinas, vírus e parasitas. Segundo o Ministério da Saúde, entre os anos de 2012 a 2021, foram reportados 6.347 surtos de DTAs, totalizando 104.839 doentes, 13.446 hospitalizados e 89 óbitos (BARBOZA, ALMEIDA, SILVA, 2022; BRASIL, 2022; FINGER et al., 2019; GE, WANG, ZHAO, 2022; PIRES et al., 2021; SOTO-VARELA et al., 2018; WHO, 2015).

Sabe-se que os alimentos predisõem de condições favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos, podendo ser contaminados no campo, durante o processamento e no transporte (MAJUMDAR et al., 2018). Dentre os microrganismos associados a DTAs, pode-se citar *Salmonella* sp. (CDC, 2007), *Listeria monocytogenes* (RAMASWAMY et al., 2007) e espécies de *Aspergillus* produtoras de toxinas (BHAT et al. 2010).

Salmonella spp. e *Listeria monocytogenes* constituem espécies de bactérias patogênicas importantes, sendo transmitidas por alimentos (MORALES-PARTERA et al. 2018). As principais fontes de contágio ocorrem pelo consumo de alimentos de origem animal (YANG et al., 2022). A listeriose causada por *L. monocytogenes* acomete principalmente mulheres grávidas, recém-nascidos e pessoas imunodeficientes. Os surtos da doença estão relacionados com o consumo de alimentos prontos para o consumo, laticínios, salsichas, queijo, leite e carne crua (LEDLOD et al. 2020).

Além das bactérias, os fungos podem contaminar os alimentos, causando a deterioração, afetando a palatabilidade e, conseqüentemente, a qualidade dos produtos alimentícios. Algumas espécies de fungos filamentosos podem produzir metabólitos secundários denominados micotoxinas, que quando consumidas, podem resultar em danos à saúde humana de animais. Dentre as micotoxinas, destaca-se a ocratoxina A (OTA) identificada principalmente no café e no cacau, podendo apresentar efeitos genotóxicos e carcinogênicos quando consumida, e sua produção está associada a

espécies de *Aspergillus*, como *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae* (OLIVEIRA FILHO et al., 2022; TANIWAKI et al., 2019; TIAN et al., 2022).

Além disso, outros problemas são enfrentados pela indústria alimentícia, como a presença de radicais livres, que podem desencadear o processo de oxidação, principalmente em alimentos ricos em gordura, resultando na deterioração do alimento e, conseqüentemente, em perdas econômicas. Devido a esses fatos, a utilização de métodos de conservação são necessários. Com o objetivo de evitar essas perdas, são utilizados antioxidantes sintéticos; porém, esses podem apresentar efeitos tóxicos, o que tem aumentado a procura por alternativas menos prejudiciais. A utilização de extratos provenientes de produtos naturais para essa preservação é uma alternativa que vem sendo bastante estudada (BARBOZA; ALMEIDA; SILVA, 2022; FERREIRA et al., 2019).

O café é considerado uma bebida funcional devido à presença de constituintes com atividades biológicas, como compostos fenólicos, alcaloides, dentre outros (WU et al., 2022). Segundo Masek et al. (2020), os compostos bioativos presentes nos grãos de café apresentam atividade antioxidante e antibacteriana, principalmente relacionada aos compostos fenólicos. E estudos recentes têm comprovado que os grãos de café apresentam efeitos terapêuticos, como anti-inflamatório e antifúngico (RAKATAMA; PRAMONO; YULIANTI, 2018).

O Brasil é o maior produtor e exportador de café, com participação de 32% na produção mundial e 23% nas exportações. Em 2021, foi responsável pela exportação de 42,4 milhões de sacas de 60 quilos de café verde, gerando uma receita de US\$ 6,4 bilhões (BRASIL, 2022). De acordo com Diniz dos Reis et al. (2019), 20% da produção de café é constituída de grãos defeituosos; porém, ainda há poucos estudos sobre a utilização desse material.

Dessa forma, objetivou-se neste estudo avaliar as atividades biológicas como atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica de extratos etanólicos obtidos de grãos de café verde e torrado, provenientes de grãos de qualidade inferior.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção, preparo das amostras e processo de torrefação

Os grãos de café (*Coffea arabica* L.) foram cedidos pelo Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Lavras - UFLA. Foram obtidos grãos de café verdes (crus) de qualidade inferior, correspondentes à safra 2019/2020 do sul de Minas Gerais.

Inicialmente, parte dos grãos obtidos foram torrados no Laboratório de Processamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola da UFLA. Para a realização da torra, foi usado o torrador Atila (Modelo Standard) com controles de pressão e temperatura com capacidade de 5 kg. A temperatura inicial da torra foi de 200 °C e pressão de 10mbar, com posterior redução de pressão para 5mbar ao som do primeiro “crack” (que representa a expansão dos grãos). A temperatura final foi de 220 °C e o tempo total do processo de torra foi de 9,5 minutos. A torra é classificada como torra alta.

Após a torra, os grãos foram moídos em granulometria média, enquanto os grãos verdes de café foram triturados em liquidificador industrial. Por fim, as amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno de 1 kg em temperatura ambiente para subseqüentes análises.

2.2 Obtenção dos extratos etanólicos

Para a obtenção dos extratos etanólicos de café verde e torrado, utilizou-se a técnica de extração sólido-líquido por refluxo. As amostras foram acondicionadas em balões utilizando-se a proporção de 5:1 (etanol: amostra) a 78 °C durante 4 horas. Posteriormente, as amostras foram filtradas em funil de Büchner (a vácuo) e armazenadas em frascos de vidro.

O filtrado resultante foi submetido à baixa pressão (-650 mm Hg) a 50 °C em rotaevaporador (Rotavapor Buchi R-144) até a evaporação do solvente. O concentrado foi mantido em capela de exaustão por 24 horas em temperatura ambiente, para a evaporação total do solvente. Em seguida, os extratos puros foram acondicionados em frascos de vidro âmbar e mantidos a -10 °C para posteriores análises.

2.3 Análise antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos de café cru (verde) e torrado foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras- UFLA.

2.3.1 Diluição das amostras de café

Preparam-se diluições contendo 0,125 g de extrato, que foram solubilizadas em 25mL de etanol; em seguida, foi preparada uma solução-estoque de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ que foi diluída nas seguintes concentrações: 25, 50, 100, 150, 200 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como controle positivo, utilizou-se o antioxidante sintético 2,6-ditertbutil-4- hidroxitolueno (BHT) (REZENDE et al., 2017).

2.3.2 Avaliação do método de estabilização do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

A metodologia utilizada foi descrita por Teixeira et al. (2012), com modificações. A priori, preparou-se uma solução etanólica de DPPH na concentração de 40 mg L^{-1} , que foi mantida na ausência de luz e sob refrigeração.

Em seguida, adicionou-se aos tubos de ensaio 0,3mL dos extratos diluídos nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, juntamente com 2,7 mL de solução DPPH. Para o controle negativo, pipetaram-se 2,7 mL de solução DPPH e 0,3 mL de etanol. Para o branco, foram adicionados 2,7 mL de etanol e 0,3 mL da amostra na maior concentração. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os tubos de ensaio foram acondicionados sob o abrigo de luz por 60 minutos. Em seguida, as medidas das absorvâncias foram avaliadas em espectrofotômetro UV/Vis (Shimadzu UV-160 1 PC) no comprimento de onda de 515 nm.

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) foi calculada pela Equação 1.

$$\%AA = 1 - \frac{A_{amostra}}{A_{controle}} \times 100 \quad (1)$$

Em que: $A_{amostra}$ é a absorvância da solução contendo todos os reagentes e $A_{controle}$ é a absorvância do controle.

2.4 Análises Microbiológicas

Os ensaios microbiológicos foram conduzidos no Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras- UFLA.

2.4.1 Atividade Antifúngica

2.4.1.1 Microrganismos e condições de cultivo

As espécies de fungos utilizadas nas análises microbiológicas foram adquiridas da Coleção de Cultura de Microrganismos do DCA-UFLA. Foram submetidas às análises duas espécies de fungos filamentosos *Aspergillus westerdijkiae* (CCDCA 11424) e *Aspergillus carbonarius* (CCDCA 10484).

Foram utilizadas placas de Petri (90 mm de diâmetro) acrescidas de meio *Czapek Yeast Agar* (CYA; HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.) para o cultivo de cada espécie fúngica, sendo mantidas a 25°C por 7 dias, em uma incubadora BOD. Após o tempo de incubação, os fungos foram padronizados mediante a preparação de uma solução de esporos em água destilada estéril contendo 1% de *Tween* 80 (Synth). Posteriormente, com o auxílio da câmara de *Newbaer* (Sigma, São Paulo, Brasil), determinou-se a contagem de esporos, sendo essa padronizada para 10^6 esporos mL⁻¹.

2.4.1.2 Efeito dos extratos sobre o crescimento micelial

O efeito dos extratos sob as colônias fúngicas foi avaliado segundo metodologia proposta por Singh et al. (2008), com modificações. Utilizou-se o meio *Czapek Yeast Agar* (CYA; HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.) para o cultivo das espécies em estudo, que foram adicionadas em placas de Petri esterilizadas. Diferentes concentrações dos extratos de café verde e torrado foram diluídas em *Tween* a 0,1% e acrescidas ao meio de cultivo, resultando nas seguintes concentrações: 625 (0,013125 g mL⁻¹), 1250 (0,02625 g mL⁻¹), 2500 (0,0525 g mL⁻¹), 5000 (0,105 g mL⁻¹), 10000 (0,21 g mL⁻¹) e 20000ppm (0,42 g mL⁻¹). O controle negativo utilizado continha apenas meio de cultura e *Tween* a 0,1%, sem extrato; e como controle positivo foi utilizado o fungicida sintético Tebuconazole (1 mL L⁻¹). Em seguida, adicionaram-se 10 µL da suspensão de esporos (10^6 esporos/mL) no centro de cada placa, e essas foram mantidas em BOD por 10 dias a 25 °C. Todos os tratamentos e controles foram realizados em triplicata.

Posteriormente ao período de incubação, foi determinado o crescimento dos fungos, medindo o diâmetro de cada colônia, com auxílio de um paquímetro. Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial, foi utilizada a Equação 2:

$$\text{Porcentagem de Inibição Micelial (\%)} = \frac{[D_c - D_t]}{D_c} \times 100 \quad (2)$$

Em que D_c (cm) é o diâmetro do crescimento micelial do controle fúngico e D_t (cm) é o diâmetro de crescimento micelial de cada tratamento com o extrato.

2.4.2 Atividade Antibacteriana

2.4.2.1 Microrganismos, manutenção, padronização e obtenção do inóculo

As espécies de bactérias utilizadas nas análises foram adquiridas da Coleção de Cultura de Microrganismos do DCA-UFLA. Foram submetidas às análises duas espécies de bactérias, sendo uma Gram-positiva e outra Gram-negativa, correspondentes a *Listeria monocytogenes* (ATCC19117) e *Salmonella enterica Choleraesuis* (ATCC6539), respectivamente.

A metodologia foi realizada de acordo com a Anvisa (2003), com modificações. Os microrganismos foram mantidos sob congelamento em cultura-estoque. Para ativá-los, foi transferida uma alíquota das culturas para caldo *Brain Hearth Infusion* (BHI, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Índia), sendo que para *L. monocytogenes* o meio foi acrescido de 0,6% de extrato de levedura. Posteriormente, as bactérias foram incubadas em BOD a 37 °C por 24 horas. Em seguida, as culturas foram diluídas em solução salina a 0,9%, ajustando-se a turbidez para faixa de 0,08-0,1 a 635 nm com auxílio de um espectrofotômetro (Shimadzu V-160 1PC), obtendo-se a concentração de 10^8 UFC mL⁻¹.

2.4.2.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

A determinação da CMI e CMB foram realizadas segundo metodologia proposta pela Clinical and Laboratorial Standards Institute- CLSI (2015), com modificações. Os extratos de café verde e torrado foram diluídos em caldo *Miller Hilton* (Kasvi, Pinhals, PR, Brazil) e *Tween* (1%), obtendo-se a concentração de 0,42 g mL⁻¹ (20000ppm). Posteriormente, em cada poço da placa foram adicionados 150 µL⁻¹ de caldo *Miller Hilton*, com exceção da coluna 1, na qual foram adicionados 300 µL⁻¹ da solução de

extrato obtendo-se a concentração inicial. As concentrações subsequentes dos extratos de café foram obtidas após diluição seriada a partir da concentração inicial de $0,42 \text{ g mL}^{-1}$ (20000 ppm) (coluna 1) até $0,0002 \text{ g mL}^{-1}$ (9,76 ppm) (coluna 12), pela transferência de $100 \text{ }\mu\text{L}^{-1}$ do conteúdo ao poço subsequente. Para os poços da coluna 12, foram desprezados $100 \text{ }\mu\text{L}^{-1}$ do conteúdo, com o objetivo de igualar o volume total dos poços.

Posteriormente, adicionaram-se $10 \text{ }\mu\text{L}^{-1}$ de cultura padronizada em cada um dos poços. As microplacas foram vedadas e incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas. Neste experimento, utilizou-se como controle positivo o clorafenicol (1 g mL^{-1}) e para o controle negativo foi caldo *Miller Hilton* e *Tween* (1%). Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

Para indicar o crescimento bacteriano, acrescentaram-se $10 \text{ }\mu\text{L}^{-1}$ de sal de rezausurina dissolvida em água destilada estéril em cada poço; em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 60 minutos. A Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi determinada a partir da obtenção da última diluição dos extratos, que foi capaz de inibir o crescimento bacteriano. A presença de crescimento bacteriano foi observada como uma cor rosa, e poços com coloração azul indicaram a inibição do crescimento bacteriano pelos extratos.

A Concentração Mínima Bactericida (CMB) foi determinada pipetando-se alíquotas de $10\mu\text{L}^{-1}$ da diluição em série (após a incubação da CMI) em placas de Petri contendo *Ágar Mueller Hinton*. Em seguida, as placas foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas.

A CMB foi registrada como a concentração mínima dos extratos, que matou 100% dos microrganismos, não sendo observado crescimento bacteriano.

2.4.3 Análise Estatística

As análises foram baseadas em delineamento inteiramente casualizado e os valores médios foram comparados por meio do Teste de Tukey a 5% de probabilidade, usando o programa Sisvar (FERREIRA, 2011).

2.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O efeito dos extratos sobre a morfologia das bactérias e dos fungos foi avaliado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A metodologia foi realizada de acordo com Oliveira et al. (2017).

As amostras das bactérias foram preparadas, incubando a solução de extratos e Tween 80 (1%) com a suspensão bacteriana em caldo *Mueller-Hinton* por 24 horas a 37 °C. As concentrações dos extratos analisadas para ambas as espécies bacterianas foram de 0,105 g mL⁻¹. Os controles foram preparados sem a adição de extrato.

As amostras referentes aos fungos foram preparadas a partir das placas de Petri utilizadas nas análises de crescimento micelial. As concentrações analisadas foram 10.000 ppm (0,21 g mL⁻¹) (extrato de café verde) e 20.000 ppm (0,42 g mL⁻¹) (extrato de café torrado) para *A. carbonarius* e 20.000 ppm (0,42 g mL⁻¹) (extrato de café verde e torrado) para *A. westerdijkiae*. Três tampões de colônia (5 mm de diâmetro) foram removidos do meio de cada colônia, após 10 dias de incubação. Os controles foram preparados sem a adição de extrato.

As amostras de bactérias e fungos foram, então, fixadas em uma solução de *Karnovsky* modificada (2,5% glutaraldeído, 2%, formaldeído, tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,2 e CaCl₂ tampão 0,001 M; Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil). Em seguida, as amostras foram lavadas com tampão cacodilato duas vezes por 10 minutos cada uma, desidratadas usando uma série de concentrações crescentes de acetona (25%, 50%, 75% e 100%), secas em um aparelho de ponto crítico (Bal-tec CPD 030) e banhadas com ouro (Bal-tec CPD 050). As amostras foram examinadas em microscópio eletrônico de varredura (Leo Evo 040) para obtenção das eletromicrografias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos de café verde e torrado foram avaliadas por meio do método colorimétrico baseado na eliminação do radical DPPH. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Atividade antioxidante (IC_{50}) dos extratos de café verde e torrado e do antioxidante sintético (BHT).

IC_{50} (mg mL ⁻¹)	
DPPH	
Café Verde	91,67±0,44b
Café Torrado	>500c
BHT	9,89±0,08a
CV(%)	38.73

Legenda: CV= Coeficiente de Variação.

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos para os extratos etanólicos de café verde, café torrado e BHT se diferenciaram estatisticamente entre si. O ensaio de eliminação do radical DPPH apresentou resultado dose-dependente; dessa forma, a atividade antioxidante aumenta conforme aumenta a concentração do extrato. Em contrapartida, o café torrado não apresentou atividade antioxidante para o ensaio DPPH nas concentrações utilizadas (Tabela 1).

A caracterização dos extratos foi realizada por Fernandes (2022), observando a presença dos seguintes constituintes para o extrato de café verde: ácidos clorogênicos, ácido cafeico, vanilina, ácido ferúlico, ácido o-cumárico e resveratrol; e para o extrato de café torrado foram identificados: ácidos clorogênicos, ácido cafeico, vanilina e ácido m-cumárico.

Masek et al. (2020) avaliaram a atividade antioxidante do extrato etanólico e aquoso de café verde pelos métodos DPPH e ABTS, constatando que, com o aumento da concentração do extrato, a porcentagem de inibição dos radicais pelos métodos avaliados aumentou, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo. Dos constituintes presentes no café que são associados à atividade de eliminação de radicais livres, pode-

se citar os ácidos clorogênicos; além desses, estudos também relatam atividade antioxidante relacionada ao ácido gálico, cafeína e trigonelina (CHOI; KOH, 2017).

Os produtos da reação de *Maillard* no café também contribuem para a atividade antioxidante, e estudos anteriormente realizados focaram nos efeitos do grau de torra dos grãos de café em sua capacidade antioxidante (MASEK et al., 2020). Em estudo realizado por Prifits et al. (2015), avaliando o potencial antioxidante dos grãos de café submetidos a diferentes graus de torra, concluíram que o tempo de torra está diretamente relacionado com a atividade antioxidante apresentada pelos grãos de café. Castillo, Ames e Gordon (2002) constataram redução da atividade antioxidante em grãos submetidos a graus de torra altos. Além disso, segundo Farah e Donangelo (2006), graus elevados de torrefação podem ocasionar perdas de até 95% de ácidos clorogênicos. Ademais, Liang e Kitts (2014) demonstraram que o ensaio de DPPH apresenta uma limitação quando usado para determinar a atividade antioxidante do café devido à sua coloração interferir potencialmente na absorção de DPPH. Esses fatores podem ter resultado na baixa atividade antioxidante do extrato de café torrado.

Diversos fatores estão associados à qualidade dos grãos de café, o que irá depender da espécie em estudo, grau de torrefação, condições geográficas da planta, como o tipo de solo, altitude, época de colheita, bem como as condições pré e pós-colheita e que irão afetar as atividades biológicas associada ao café (RAWANGKAN et al. 2022).

3.2 Atividade Antifúngica

Os efeitos dos extratos de café verde e torrado (*C. arabica*) sob o crescimento micelial dos fungos *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae* estão presentes na Tabela 2.

Tabela 2- Efeito dos extratos de café verde e café torrado na inibição fúngica.

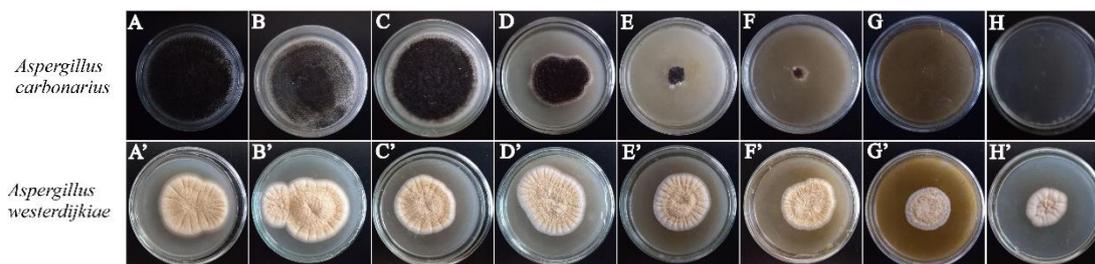
Concentração	Taxa de Inibição (%)			
	<i>Aspergillus carbonarius</i>		<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	
	Café verde	Café torrado	Café verde	Café torrado
0,013125 g mL ⁻¹	0,00 aA	0,00 aA	8,35 bB	0,00 aA
0,02625 g mL ⁻¹	0,00 aA	0,00 aA	14,52 bB	31,02 bA
0,0525 g mL ⁻¹	31,69 bA	0,00 aB	23,98 cA	24,32 bA
0,105 g mL ⁻¹	61,01 cA	0,00 aB	35,85 dB	24,55 bA
0,21 g mL ⁻¹	90,28 dA	68,11 bB	39,92 dB	27,99 bA
0,42 g mL ⁻¹	100,00 eA	81,97 cB	49,90 eB	34,58 cA
Antifúngico (mL L ⁻¹)	100,00 eA	100,00 dA	33,91 aA	33,91 aA
Controle	0,00 aA	0,00 aA	0,00 dA	0,00 cA
CV(%)	4.23		11.84	

Legenda: CV= Coeficiente de Variação.

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

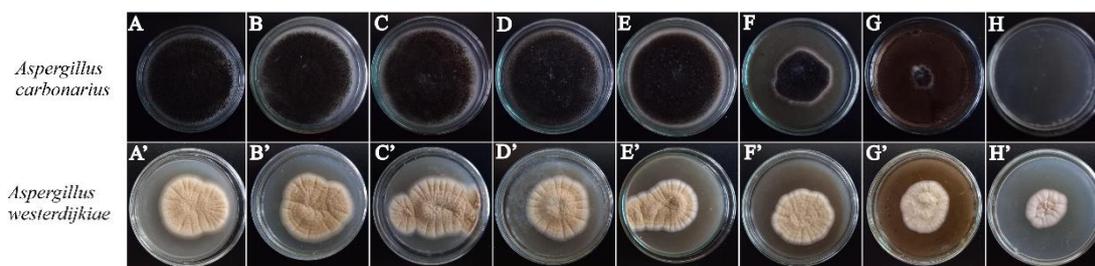
Ambas as espécies fúngicas apresentaram sensibilidade aos extratos de café verde e torrado; porém, os dados estatísticos diferiram para os extratos, sendo que o café verde apresentou maior atividade inibitória para *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae* a partir da concentração 0,0525 e 0,105 g mL⁻¹, respectivamente (Figuras 1 e 2). O crescimento micelial de *A. carbonarius* apresentou maior inibição pelos extratos, quando comparado com *A. westerdijkiae*, sendo possível observar um efeito dose-dependente para a primeira espécie que foi inibida completamente pelo extrato de café verde na concentração de 0,42 g mL⁻¹ (Tabela 2). Resultado parecido com o obtido por Rakatama, Pramono e Yulianti (2018), que observaram efeito dose-dependente de extrato etanólico de café na inibição do fungo *Candida albicans*.

Figura 1- Efeito inibitório do extrato de café verde no crescimento fúngico de *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae*.



Legenda: (A) e (A') controles; (B) e (B') tratamento com extrato de café verde na concentração 0,013125 g mL⁻¹; (C) e (C') tratamento com extrato de café verde na concentração 0,02625g mL⁻¹; (D) e (D') tratamento com extrato de café verde na concentração 0,0525 g mL⁻¹; (E) e (E') tratamento com extrato de café verde na concentração 0,105 g mL⁻¹; (F) e (F') tratamento com extrato de café na concentração 0,21 g mL⁻¹; (G) e (G') tratamento com extrato de café verde na concentração 0,42 g mL⁻¹; (H) e (H') tratamento com antifúngico tebuconazole.

Figura 2- Efeito inibitório do extrato de café torrado no crescimento fúngico de *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae*.



Legenda: (A) e (A') controles; (B) e (B') tratamento com extrato de café torrado na concentração 0,013125 g mL⁻¹; (C) e (C') tratamento com extrato de café torrado na concentração 0,02625g mL⁻¹; (D) e (D') tratamento com extrato de café torrado na concentração 0,0525 g mL⁻¹; (E) e (E') tratamento com extrato de café torrado na concentração 0,105 g mL⁻¹; (F) e (F') tratamento com extrato de café torrado na concentração 0,21 g mL⁻¹; (G) e (G') tratamento com extrato de café torrado na concentração 0,42 g mL⁻¹; (H) e (H') tratamento com antifúngico tebuconazole.

Segundo Malheiros et al. (2019), extratos de plantas e óleos essenciais são capazes de reduzir o crescimento micelial de fungos do gênero *Aspergillus*. Anteriormente, Calheiros et al. (2023) avaliaram o efeito fungicida de extratos de café cafeinado e descafeinado sobre espécies de leveduras e fungos filamentosos. Foi constatada atividade antifúngica sobre *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*, agentes causadores de doenças de pele. Além disso, foi possível observar atividade fungicida sobre *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*. No entanto, não foram identificados estudos anteriores sobre o efeito de extratos etanólicos de grãos de café (*C. arabica* L.) de qualidade inferior sob espécies de *Aspergillus*, sendo esse estudo o primeiro a relatar esses resultados relacionados aos fungos em estudo.

Os extratos de café verde e torrado apresentaram taxa de inibição superior a 80% para *A. carbonarius* nas concentrações 0,21 e 0,42, e 0,42 g mL⁻¹, respectivamente. Badr et al. (2022), avaliando a atividade antifúngica e antiocrotogênica do extrato de borra de café sobre fungos produtores de toxinas dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, observaram redução do crescimento micelial dos fungos tratados com o extrato. Calheiros et al. (2023) observaram em seu estudo que os fungos tratados com extrato de café apresentaram mitocôndrias desorganizadas, indefinidas e talvez disfuncionais, quando comparadas com o controle.

Tanto para *A. carbonarius* quanto para *A. westerdijkiae* o extrato de café verde demonstrou maior efeito na inibição do crescimento micelial. Alguns estudos sugerem a presença de compostos bioativos no café verde como agentes antimicrobianos, como os compostos fenólicos, alcaloides e saponinas (CASTALDO et al., 2018; MATHUR et al., 2021). Segundo Elizei et al. (2016), os ácidos clorogênicos compõem até 14% da fração fenólica do café verde, tendo sua função biológica nas plantas associada à proteção contra pragas e doenças. Em estudo realizado por Sung e Lee (2010) avaliando a atividade antimicrobiana dos ácidos clorogênicos contra *Candida albicans*, os autores observaram que o composto foi capaz de inibir a formação de hifas pelo fungo e também destruí-las quando tratadas com o composto.

A concentração 0,42 g mL⁻¹ do extrato de café verde foi capaz de inibir totalmente o crescimento de *A. carbonarius*, enquanto para *A. westerdijkiae* a inibição foi de 49,90%, sendo essa superior a inibição causada pelo antifúngico utilizado. Recentemente a cafeína foi relatada como inseticida, larvicida e inibidora de fungos, leveduras e bactérias (RAUT et al., 2013). Kwaśniewska-Sip, Cofta e Nowak (2018), avaliando a resistência do pinheiro-bravo (*Pinus sylvestris* L.) tratado com soluções aquosas de cafeína contra fungos, observaram que o crescimento dos fungos *A. niger* e *A. terreus* foram totalmente inibidos com concentrações de cafeína superiores a 0,025 g mL⁻¹, constatando-se que a cafeína foi capaz de inibir a atividade de quitinases, resultando na inibição do crescimento fúngico. Alguns autores também relatam atividade antifúngica associada aos ácidos cafeico e quinico e seus derivados (MA; MA, 2015; SARDI et al., 2016). Além disso, segundo Uma, Huang e Kumar (2017) existem relatos que *Aspergillus* spp. têm se mostrado resistentes a antifúngicos do tipo azóis, o que pode ter resultado na resistência de *A. westerdijkiae* ao controle positivo utilizado.

O extrato de café torrado para ambos os fungos estudados foi o que apresentou menor capacidade de inibição do crescimento micelial. Ao longo do processo de torra, ocorre a degradação de vários compostos bioativos presentes nos grãos de café, e estudos têm demonstrado que torras mais escuras resultam na redução do teor de ácidos clorogênicos totais, o que pode ter resultado na menor atividade de inibição (BASTIAN et al., 2021).

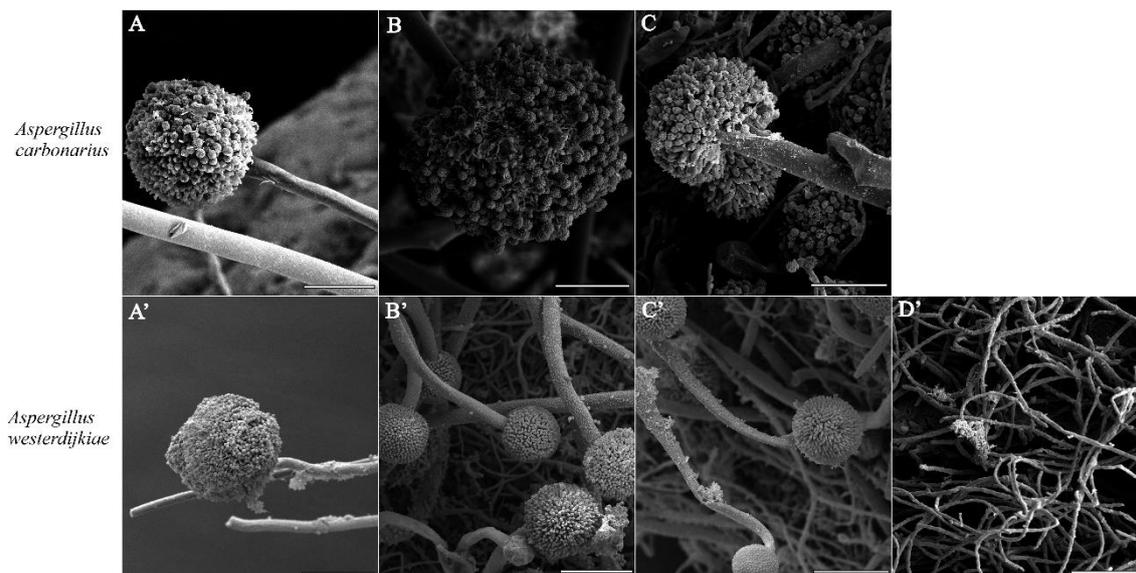
Alguns estudos relatam a atividade antimicrobiana dos produtos da reação de *Maillard*, como as melanoidinas (KUKUMINATO; KOYAMA; KOSEKI, 2021; RUFIÁN-HENARES; DE LA CUEVA, 2009). No trabalho realizado por Diaz-Morales et al. (2022) foi avaliado a atividade antimicrobiana de melanoidinas extraídas de pão e biscoito. Foram obtidos resultados positivos com ação antifúngica sobre os isolados *Penicillium charlessii*, *Fusarium avenaceum* e *Microsporium gypseum*. Ademais, Kuwabara, Simizu e Yajima (1972) observaram efeitos antifúngicos de produtos derivados de *Maillard* (ácido glutâmico-xilose) sobre *Penicillium glaucum*, *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus nigricans*. Sugere-se que a presença de melanoidinas no café torrado pode ter ocasionado a atividade antifúngica do extrato de café torrado, observando-se resultado de até 81,97% de inibição para *A. carbonarius* no presente estudo.

Dentre as espécies estudadas, *A. carbonarius* apresentou maior sensibilidade aos extratos, quando comparado com *A. westerdijkiae*. Esse resultado corrobora com os estudos anteriormente realizados por Brandão et al. (2020) em que foi observado maior inibição de crescimento de *A. carbonarius* quando comparado com outras espécies de *Aspergillus* quando usado o óleo essencial de *Eremanthus erythropappus*.

3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos fungos

A estrutura morfológica das espécies *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae* foi obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Figura 3). Apesar do crescimento inibido, quando avaliada a porcentagem de inibição do crescimento fúngico, não foram observadas alterações morfológicas nas estruturas fúngicas das espécies *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae* tratadas com extratos de café verde e torrado quando comparados ao controle (Figura 3B, B', C, C'). Sugere-se que o alvo da ação dos extratos sob os fungos em estudo tenha sido intracelular.

Figura 3- Eletromicrografia de varredura de *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae*.



Legenda: (A) e (A') Controle; (B) tratamento com concentração de $0,21 \text{ g mL}^{-1}$ de extrato de café verde; (B') tratamento com concentração de $0,42 \text{ g mL}^{-1}$ de extrato café verde; (C) e (C') tratamento com concentração de $0,42 \text{ g mL}^{-1}$ de extrato de café torrado; e (D') tratamento com tebuconazole (mL L^{-1}).

Nas imagens (Figura 3A, A'), observaram-se conídios e conidióforos com desenvolvimento normal e saudável. As hifas do tratamento controle apresentaram conidióforos típicos, ramificação dicotômica e citoplasma homogêneo (FERREIRA et al., 2013).

A presença do antifúngico sob a espécie *A. westerdijkiae* (Figura 3D') resultou na deformação da estrutura do fungo. As hifas tratadas com tebuconazole apresentaram enrugamento da superfície celular e esvaziamento do conteúdo citoplasmático, resultando na redução do diâmetro da mesma. Além disso, o tratamento com antifúngico resultou na não formação de conidióforos e, conseqüentemente, a não formação de conídios, sugerindo uma atividade fungistática. O mecanismo de ação dos antifúngicos azóis resulta na interrupção da conversão do lanosterol em ergosterol via ligação ao citocromo fúngico p-450, ocorrendo rompimento das membranas fúngicas e subsequente morte do microrganismo (PASKO; PISCITELLI; VAN SLOOTEN, 1990).

3.3 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana dos extratos de café verde e torrado foram avaliados sobre *Listeria monocytogenes* (Gram-positiva) e *Salmonella enterica Choleraesuis* (Gram-negativa). Observou-se que os extratos de café verde e torrado não apresentaram atividade bactericida sobre as bactérias em estudo. Os valores da CMI coincidiram para

L. monocytogenes e *S. Choleraesuis*, sendo sensíveis ao extrato de café verde a uma concentração de 0,105 g mL⁻¹ (5000 ppm) (Tabela 3).

Tabela 3- Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Mínima Bactericida (CMB) dos extratos de café verde, torrado e antibiótico.

Tratamento	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Salmonella Choleraesuis</i>	
	CMI (g mL ⁻¹)	CMB (g mL ⁻¹)	CMI (g mL ⁻¹)	CMB (g mL ⁻¹)
Café Verde	0,105	-	0,105	-
Café Torrado	-	-	-	-
Clorafenicol	0,000004	0,000063	0,000002	0,000063

Legenda: - Resistente.

A bactéria Gram-positiva (*L. monocytogenes*) foi inibida em concentrações menores que 0,105 g mL⁻¹ para o extrato de café verde, sendo o mesmo observado para a Gram-negativa (*S. Choleraesuis*). Resultados distintos foram obtidos em estudo realizado por Monente et al. (2015), em que as bactérias Gram-positivas (*L. monocytogenes*) exigiram concentrações menores de extratos de café (0,02 g mL⁻¹) para induzir a inibição do crescimento, quando comparado com bactérias Gram-negativas (*S. Choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa*) (0,04 g mL⁻¹). No mesmo contexto, Camargo et al. (2019) também constataram em seus estudos que a bactéria Gram-negativa (*E. coli*) foi mais resistente do que a Gram-positiva (*S. aureus*), quando tratadas com óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia*. Apesar da presença de uma membrana externa nas bactérias Gram-negativas, a bactéria *S. Choleraesuis* não demonstrou maior resistência, quando comparada com *L. monocytogenes*, o que demonstra uma boa ação antimicrobiana do extrato de café verde sobre bactérias com maiores fatores de resistência.

Os valores da CMI obtidas para ambas as espécies bacterianas estudadas foram mais elevados, o que difere de estudos já realizados. Pirbalouti et al. (2010), avaliando a atividade antimicrobiana de oito extratos de plantas sobre *L. monocytogenes*, observaram que os extratos de *Myrtus communis* e *Thymus daenensis* foram os mais eficazes, com valores de CMI variando entre 0,000039 e 0,01 g mL⁻¹. Voss-Rech et al. (2011), testando vários extratos de plantas, constataram que sete extratos testados sobre diferentes sorovares de *Salmonella* apresentaram atividade antibacteriana, sendo que o extrato de *Caryophyllus aromaticus* foi o mais eficiente, sendo observado CMI de 0,03 g mL⁻¹ para a sorovar *Salmonella Choleraesuis*. Resultados diferentes podem ser justificados provavelmente devido à variedade de métodos de avaliação, variações no nível de

inóculo, temperatura experimental e condição fisiológica das bactérias usadas, além de que os constituintes dos extratos de café podem não se diluir adequadamente no ágar no teste de microdiluição em poços, o que pode afetar a atividade antibacteriana.

De acordo com os resultados obtidos, o extrato de café verde foi capaz de inibir o crescimento das bactérias. Segundo Rawangkan et al. (2022), vários compostos químicos presentes nos grãos de café estão associados à atividade antibacteriana. Compostos como cafeína, ácidos clorogênicos, ácidos cafêico, diterpenos, ácido protocatecuico e trigonelina já foram associados como potentes agentes antibacterianos sobre bactérias entéricas (ALMEIDA et al., 2006; NAVEED et al., 2018; KHAN et al., 2021).

Almeida et al. (2006), investigando o efeito antimicrobiano de extratos de café comercializados sobre enterobactérias, constataram que os compostos trigonelina, cafeína e ácidos protocatecuicos são potentes agentes antibacterianos naturais contra *Salmonella enterica*. Muthanna e Firas (2009) avaliando os efeitos da cafeína isolada de grãos de café (*C. arabica* L.) e chá verde (*Camellia sinensis*) contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, observaram que ambos os compostos na concentração de 0,002 g mL⁻¹ mostraram atividades antibacterianas semelhantes sobre todas as bactérias testadas, exceto *Proteus mirabilis*, sendo a bactéria mais afetada *Pseudomonas aeruginosa*. Em outro estudo realizado por Su et al. (2019), foi observado que os ácidos clorogênicos apresentaram atividade antibacteriana sobre *P. aeruginosa* com CMI de 0,005 g mL⁻¹. E em trabalho realizado por Rawangkan et al. (2022), o ácido cafêico mostrou-se eficiente na atividade antibacteriana sobre *Vibrio cholerae* resistente a antibióticos, sendo capaz de reduzir o crescimento bacteriano em 3 log¹⁰ CFU mL⁻¹ a uma concentração de 0,008 g mL⁻¹ em uma hora. Além disso, já foi relatado que os compostos fenólicos apresentam alto potencial de inibição contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, como em *Salmonella*, *L. monocytogenes* e *Escherichia coli* (SU et al., 2019).

Tanto *L. monocytogenes* quanto *S. Choleraesuis* foram resistentes ao extrato de café torrado; porém, estudos anteriores já constataram atividade antibacteriana associada aos grãos torrados de café. Daglia et al. (2007), avaliando o efeito do extrato de café torrado sobre *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, constataram que os compostos padrão glicoxal, metilglicoxal e diacetil (compostos α -dicarbonil) formados durante o processo de torrefação, como os principais agentes responsáveis pela atividade antibacteriana do café torrado, porém, a atividade antibacteriana destes compostos é aumentada quando acrescidos de cafeína, o que indica forte sinergismo entre os

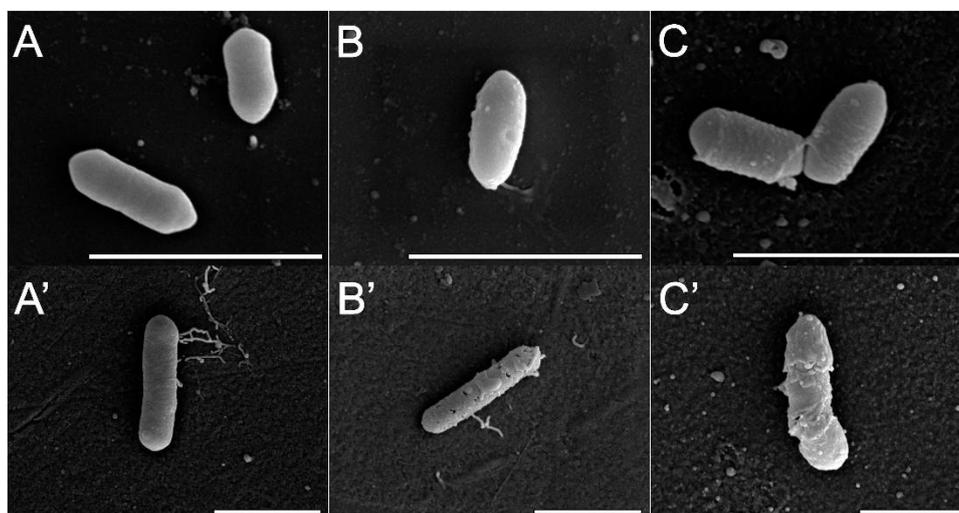
constituintes químicos presentes no café. Canci et al. (2022) avaliando os efeitos de extratos aquosos de café verde e torrado, constataram que *S. Typhimurium* e *E.coli* foram sensíveis a esses extratos nas concentrações de 0,5% a 5,0%.

Wu et al. (2022), avaliando a composição fenólica dos grãos de café submetidos a diferentes graus de torra, constataram que os grãos de café submetidos a graus de torra alta resultam na redução dos compostos fenólicos. Sugere-se que o grau de torra utilizado neste estudo pode ter ocasionado a redução dos compostos fenólicos e, portanto, a redução da atividade antibacteriana dos extratos de café torrado, resultando na resistência das bactérias às concentrações testadas.

3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das bactérias

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizada para comparar as alterações morfológicas causadas nas espécies bacterianas em estudo pelos extratos de café verde. Uma estrutura típica pode ser observada nas células de *S. Choleraesuis* e *L. monocytogenes* nos grupos controle, já nas células tratadas com extrato de café verde, pode-se observar alterações morfológicas na membrana (FIGURA 4).

Figura 4- Eletromicrografia de varredura de *S. Choleraesuis* e *L. monocytogenes*.



Legenda: (A) controle *L. monocytogenes* e (A') controle *S. enterica Choleraesuis*; (B) *L. monocytogenes*: tratamento com concentração de $0,105 \text{ g mL}^{-1}$ de extrato de café verde; (B') *S. enterica Choleraesuis*: tratamento com concentração de $0,105 \text{ g mL}^{-1}$ de extrato de café verde; (C) *L. monocytogenes*: tratamento com antibiótico Clorafenicol e (C') *S. enterica Choleraesuis*: tratamento com antibiótico Clorafenicol.

A partir das imagens obtidas, é possível observar alterações nas membranas das bactérias (Figura 4B, B'), o que conferiu a *L. monocytogenes* e *S. Choleraesuis* uma superfície rugosa. Porém, na bactéria Gram-negativa houve uma degradação parcial da

membrana que envolve o microrganismo. A análise em MEV confirma que a membrana citoplasmática de ambas as bactérias estudadas é o possível alvo do extrato.

Em geral, os constituintes bioativos do café verde são responsáveis por suas atividades biológicas. Segundo Díaz-Hernández et al. (2022), os ácidos clorogênicos e cafeína são capazes de alterar as funções e estruturas da membrana, além de inibir os mecanismos de reparo do DNA, ocasionando a inibição do crescimento do microrganismo. Em estudo realizado por Wu et al. (2020), que avaliaram os efeitos dos ácidos clorogênicos em *Bacillus subtilis*, os autores observaram alterações na membrana celular das células tratadas com os ácidos clorogênicos, quando comparadas com o controle, que apresentava superfície lisa. A liberação de proteínas intracelulares e mudanças na condutividade podem ser consideradas como uma indicação da integralidade da estrutura celular (WU et al., 2020). Além do mais, de acordo com Dash e Gummadi (2008), a cafeína inibe a síntese de DNA e dificulta a síntese de RNA e proteína. O que pode ter ocasionado a inviabilidade celular de *L. monocytogenes* e *S. Choleraesuis*, resultando na inibição do crescimento. Wu et al. (2020) relataram redução na síntese de ATP em cepas de *B. subtilis* tratadas com ácidos clorogênicos.

4 CONCLUSÃO

Verificou-se que o extrato etanólico de café verde foi o mais eficiente na eliminação do radical DPPH, quando comparado com o extrato etanólico de café, torrado que não apresentou atividade antioxidante nas concentrações testadas. Ambos os extratos apresentaram atividade antifúngica; porém, o extrato de café verde demonstrou maior atividade inibitória para *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae*. O crescimento micelial de *A. carbonarius* foi menor, quando comparado com *A. westerdijkiae*, sendo que a primeira espécie foi inibida completamente pelo extrato de café verde na maior concentração testada. Tanto o extrato de café verde quanto o de café torrado não apresentaram atividade bactericida sobre *S. Choleraesuis* e *L. monocytogenes*, sendo que para ambas as espécies os valores da CMI referentes ao extrato de café verde foram semelhantes. O extrato de café torrado não apresentou efeito bacteriostático sobre as espécies em estudo. Concluiu-se que o extrato de café verde apresenta alto potencial como subproduto para a indústria alimentícia como potente aliado no controle de microrganismos e estresse oxidativo, sendo necessários mais estudos acerca das atividades biológicas do extrato de café torrado.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados obtidos neste estudo, os extratos de café verde e torrado provenientes de grãos de qualidade inferior podem ser subprodutos, com promissora eficácia sobre radicais livres, fungos e bactérias, podendo ser utilizados como protótipos para novos medicamentos e também pela indústria alimentícia.

REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada** - Sexta Edição. M7-A6. V.23, n. 2, 2003.

ALMEIDA, A. A. P. et al. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 23, p. 8738- 8743, Nov., 2006.

BADR, A. N. et al. Spent coffee grounds valorization as bioactive phenolic source acquired antifungal, anti-mycotoxigenic, and anti-cytotoxic activities. **Toxins**, v. 14, n. 2, 2022.

BARBOZA, G. R.; ALMEIDA, J. M. de., SILVA, N. C. C. Use of natural substrates as an alternative for the prevention of microbial contamination in the food industry. **Food Science & Technology**, Campinas, v. 42, p. e05720, 2022.

BASTIAN, F. et al. From plantation to cup: changes in bioactive compounds during coffee processing. **Foods**, v. 10, n. 11, e2827, 2021.

BHAT, R.; RAI, R.V.; KARIM, A. A. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 1, p. 57–58, 2010.

BRANDÃO, R. M. et al. Antifungal and antimycotoxigenic effect of the essential oil of *Eremanthus erythropappus* on three different *Aspergillus* species. **Flavour and Fragrance Journal**, 2020.

BRASIL. **Coffee production is expected to reach 55.7 million bags in the 2022 harvest**. 2022. Disponível em: < [BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil: Informe 2022**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/arquivos/apresentacao-surtos-dtha-2022.pdf/view>. Acesso em: 18 agosto de 2022.](https://www.gov.br/en/government-of-brazil/latest-news/2022/coffee-production-is-expected-to-reach-55-7-million-bags-in-the-2022-harvest#:~:text=For%20almost%20%20centuries%2C%20Brazil,revenue%20of%20US%246.4%20billion.> . Acesso em: 21 de agosto 2022.</p></div><div data-bbox=)

CALHEIROS, D. et al. Antifungal activity of spent coffee ground extracts. **Microorganisms**, v. 11, n. 2, 2023.

CANCI, L. A. et al. Antimicrobial potential of aqueous coffee extracts against pathogens and *Lactobacillus* species: A food matrix application. **Food Bioscience**, v. 47, e101756, Jun. 2022.

- CARMARGO, K. C. et al. Antibacterial action of the essential oil from *Cantinoa carpinifolia* benth. Against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 9, p. 1–8, Oct. 2019.
- CASTALDO, L. et al. Study of the chemical components, bioactivity and antifungal properties of the coffee Husk. **Journal of Food Research**, v. 7, n. 4, 2018.
- CASTILLO, M. D. de.; AMES, J. M.; GORDON, M. H. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3698–3703, 2002.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Multistate outbreak of Salmonella serotype Tennessee infections associated with Peanut butter: United States, 2006-2007. **Morbidity and Mortality Weekly Report- MMWR**, v. 56, n. 21, p. 521- 524, 2007.
- CHOI, B.; KOH, E. Spent coffee as a rich source of antioxidative compounds. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 921–927, 2017.
- Clinical and Laboratorial Standards Institute (CLSI). **M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically: Approved Standard- Tenth Edition**. V. 5, n. 2, 2015.
- DAGLIA, M. et al. Isolation, identification, and quantification of roasted coffee antibacterial compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 25, p. e10208– e10213, Dec. 2007.
- DASH, S. S.; GUMMADI, S. N. Inhibitory effect of caffeine on growth of various bacterial strains. **Research Journal of Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 457-465, 2008.
- DÍAZ-HERNÁNDEZ, G. C. et al. Antibacterial, antiradical and antiproliferative potential of green, roasted, and spent coffee extracts. **Applied Sciences**, v. 12, n. 4, e1938, 2022.
- DIAZ-MORALES, N. et al. Antimicrobial properties and volatile profile of bread and biscuits melanoidins. **Food Chemistry**, v. 373, p. e131648, 2022.
- DINIZ DOS REIS, T. A. et al. Instant coffee with steamed PVA beans: Physical-chemical and sensory aspects. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 43, e026119, 2019.
- ELIZEI, V. G. et al. Atividade antifúngica in vitro do óleo de café verde. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, 2016.
- FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, 2006.
- FERNANDES, Antônia Isadora. **Avaliação da atividade carrapaticida, bactericida e de inibição da enzimática de extratos de grãos verde e torrado de *Coffea arabica* de**

qualidade inferior. 2022. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2022.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez., 2011.

FERREIRA, F. D. et al. The inhibitory effects of *Curcuma longa* L. essential oil and curcumin on *Aspergillus flavus* link growth and morphology. **The Scientific World Journal**, n. 5, p. e343804, 2013.

FERREIRA, V. R. F. et al. Colorimetric, electroanalytical and theoretical evaluation of the antioxidant activity of *Syzygium aromaticum* L., *Origanum vulgare* L., *Mentha spicata* L. and *Eremanthus erythropappus* M. essential oils, and their major constituents. **New Journal of Chemistry**, n. 20, 2019.

FINGER, et al. Overview of foodborne disease outbreaks in Brazil from 2000 to 2018. **Foods**, v. 8, n. 10, p. 434, 2019.

GE, H.; WANG, Y.; ZHAO, X. Research on the drug resistance mechanism of foodborne pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 162, n. 105306, 2022.

KHAN, F. et al. Caffeic acid and its derivatives: antimicrobial drugs toward microbial pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, p. 2979-3004, 2021.

KUKUMINATO, S.; KOYAMA, K.; KOSEKI, S. Antibacterial properties of melanoidins produced from various combinations of Maillard reaction against pathogenic bacteria. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 3, e01142-21, Nov./Dec., 2021.

KUWABARA, S.; SIMIZU, U.; YAJIMA, M. Antimicrobial nature of the products of sugar-amino acid reaction Part I. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**, v. 46, n. 2, p. 89–93, 1972.

KWAŚNIEWSKA-SIP, P.; COFTA, G.; NOWAK, P. B. Resistance of fungal growth on Scots pine treated with caffeine. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 132, p. 178–184, 2018.

LEDLOD, S. et al. Development of a duplex lateral flow dipstick test for the detection and differentiation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in meat products based on loop-mediated isothermal amplification. **Journal of Chromatography B**, v. 1139, n. 121834, 2020.

LIANG, N.; KITTS, D. D. Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 19180–19208, 2014.

MA, J. N.; MA, C. M. Antifungal inhibitory activities of caffeic and quinic acid derivatives. **Coffee in Health and Disease Prevention**, p. 635–641, 2015.

- MAJUMDAR, A., et al. Food degradation and foodborne diseases: A microbial approach. **Microbial Contamination and Food Degradation**, p. 109–148, 2018.
- MALHEIROS, R. P. et al. Phytochemical characterization and effect of Cagaita leaf extracts on *Aspergillus* sp. **Floresta e Ambiente**, v. 26, n. 2, 2019.
- MASEK, A. et al. Antioxidant properties of green coffee extract. **Forests**, v. 11, n. 5, p. 557, 2020.
- MATHUR, I. et al. Comparative evaluation of antifungal activity of green coffee and green tea extract against *Candida albicans*: An In Vitro Study. **World Journal of Dentistry**, v. 12, n. 4, p. 265-270, 2021.
- MONENTE, C. et al. Coffee and spent coffee extracts protect against cell mutagens and inhibit growth of food-borne pathogen microorganisms. **Journal of functional foods**, v. 12, p. 365-374, 2015.
- MORALES-PARTERA, A. M. et al. Prevalence and diversity of *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and *Listeria monocytogenes* in two free-range pig slaughterhouses. **Food Control**, v. 92, p. 208- 215, 2018.
- MUTHANNA, J. M.; FIRAS, A. A. Isolation, identification and purification of caffeine from *Coffea arabica* L. and *Camellia sinensis* L.: a combination antibacterial study. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 3, n. 1, 2009.
- NAVEED, M. et al. Chlorogenic acid (CGA): a pharmacological review and call for further research, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 67-74, 2018.
- OLIVEIRA FILHO, J. G. de. External application of RNA interference (RNAi): an innovative tool for controlling fungi during food storage. **Current Opinion in Food Science**, v. 47, n. 100872, 2022.
- OLIVEIRA, M. M. M. de., et al. Morphological alterations in sessile cells of *Listeria monocytogenes* after treatment with *Cymbopogon* sp. essential oils. **Magistra**, v. 26, p. 385- 392, 2017.
- PASKO, M. T.; PISCITELLI, S. C.; VAN SLOOTEN, A. D. V. Fluconazole: a new triazole antifungal agente. **DICP- Annals of Pharmacotherapy**, v. 24, n. 9, p. 860-867, 1990.
- PIRBALOUTI, A. G. et al. Antimicrobial activity of some Iranian medicinal plants. **Archives of Biological Science**, v. 62, n. 3, p. 633-342, 2010.
- PIRES, A. M. et al. Burden of foodborne diseases: think global, act local. **Current Opinion in Food Science**, v. 39, p. 152–159, 2021.
- PRIFITS, A. et al. Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 5, p. e7293–e7302, 2015.

RAKATAMA, A. S.; PRAMONO, A.; YULIANTI, R. The antifungal inhibitory concentration effectiveness test from ethanol seed Arabica coffee (*Coffea arabica*) extract against the growth of *Candida albicans* patient isolate with in vitro method. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 970, n. 012023, 2018.

RAMASWAMY, V. et al. Listeria- review of epidemiology and pathogenesis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 40, p. 4- 13, 2007.

RAULT, J. S. et al. Inhibition of planktonic and biofilm growth of *Candida albicans* reveals novel antifungal activity of caffeine. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 13, p. 777-782, Apr., 2013.

RAWANGKAN, A. et al. Potential antimicrobial properties of coffee beans and coffee by-products against drug-resistant *Vibrio cholerae*. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. e865684, 2022.

REZENDE, D. A. C. S. et al. Characterization of the biological potential of the essential oils from five species of medicinal plants. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, n. 2, p. 154- 170, jan., 2017.

ROJAS- GONZÁLEZ, A. et al. Coffee chlorogenic acids incorporation for bioactivity enhancement of foods: A review. **Molecules**, v. 27, n. 11, e3400, jun. 2022.

RUFÍAN-HENARES, J. A.; DE LA CUEVA, S. P. Antimicrobial activity of coffee melanoidins: A study of their metal-chelating properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 432–438, 2009.

SARDI, J. C. O. et al. Synthesis, antifungal activity of caffeic acid derivative esters, and their synergism with fluconazole and nystatin against *Candida* spp. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 84, n. 4, p. 387- 391, 2016.

SINGH, P. et al. Assessment of *Pelargonium graveolens* oil as plant-based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 14, p. 2421-2425, Nov., 2008.

SOTO-VARELA, Z. E. et al. Detección molecular de *Salmonella* spp., *Listeria* spp. *Brucella* spp. en queso artesanal fresco comercializado en Barranquilla: un estudio piloto. **Biomédica**, v. 38, p. 30 -36, 2018.

SU, M. et al. The antibacterial activity and mechanism of chlorogenic acid against foodborne pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 16, n. 12, 2019.

SUNG, W. S.; LEE, D. G. Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, n. 1, p. 219–226, 2010.

TANIWAKI, M. H. et al. Understanding mycotoxin contamination across the food chain in Brazil: challenges and opportunities. **Toxins**, n. 11, v. 7, p. 411, 2019.

TEIXEIRA, M. L. et al. Citrumelo Swingle: Caracterização química, atividade antioxidante e antifúngica dos óleos essenciais das cascas frescas e secas. **Magistra**, Cruz das Almas, Bahia, v. 24, n. 3, p. 194-203, Jul./Set., 2012.

TIAN, M. et al. Mycotoxins in livestock feed in China - Current status and future challenges. **Toxicon**, n. 214, p. 112-120, 2022.

UMA, K., HUANG, X., KUMAR, B. A. Antifungal effect of plant extract and essential oil. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 23, n. 3, p. 233–239, 2017.

VOSS-RECH, D. et al. Antibacterial activity of vegetal extracts against serovars of *Salmonella*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 2, p. 314-320, Fev., 2011.

World Health Organization (WHO). WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases: Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group 2007–2015. **World Health Organization**: Geneva, Switzerland, 2015.

WU, H. et al. Effect of processing on bioaccessibility and bioavailability of bioactive compounds in coffee beans. **Food Bioscience**, v. 46, p. e101373, 2022.

WU, Y. et al. The effect of chlorogenic acid on *Bacillus subtilis* based on metabolomics. **Molecules**, v. 25, n. 18, p. 4038, 2020.

YANG, X. et al. Occurrence, serovars and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. in retail ready-to-eat food products in some Chinese provinces. **Food Science and Technology**, v.154, p. e112699, 2022.