

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Gilmar Alves de Mesquita Júnior

Investigação da atividade antibacteriana *in vitro* e caracterização química do extrato etanólico de folhas de *Coffea arabica* L.

**Juiz de Fora
2022**

Gilmar Alves de Mesquita Júnior

Investigação da atividade antibacteriana *in vitro* e caracterização química do extrato etanólico de folhas de *Coffea arabica* L.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Maria Pinto Vilela

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Silvana Alves

Juiz de Fora

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Alves de Mesquita Júnior, Gilmar.

Investigação da atividade antibacteriana in vitro e caracterização química do extrato etanólico de folhas de Coffea arabica L. / Gilmar Alves de Mesquita Júnior. -- 2022.

99 f. : il.

Orientadora: Fernanda Maria Pinto Vilela

Coorientadora: Maria Silvana Alves

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2022.

1. Coffea arabica L.. 2. Folhas de Planta. 3. Antibacterianos. I. Maria Pinto Vilela, Fernanda, orient. II. Silvana Alves, Maria, coorient. III. Título.

Gilmar Alves de Mesquita Júnior

Investigação da atividade antibacteriana *in vitro* e caracterização química do extrato etanólico de folhas de *Coffea arabica* L.

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
Graduação em
Ciências
Farmacêuticas
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre em
Ciências
Farmacêuticas. Área
de
concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos
Ativos.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Fernanda Maria Pinto Vilela - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Erick Vicente da Silva Motta

The University of Texas at Austin

Dra. Mirian Pereira Rodarte

Universidade Federal de Juiz de Fora



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Maria Pinto Vilela, Professor(a)**, em 04/03/2022, às 11:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mirian Pereira Rodarte, Professor(a)**, em 10/03/2022, às 11:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erick Vicente da Silva Motta, Usuário Externo**, em 10/03/2022, às 18:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0698210** e o código CRC **2C3275F6**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por iluminar meus caminhos;

À minha família, pelo amor e apoio;

À Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por possibilitar a realização do presente trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro através da bolsa de estudos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001;

À Central Analítica de Bioprodutos e Bioprocessos (CENTRALBIO), Laboratório de Análise de Alimentos e Águas (LAAA), Laboratório de Bioatividade Celular e Molecular (LBCM), Laboratório de Controle de Qualidade, Laboratório de Química Biomedicinal e Farmacologia Aplicada e Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFJF;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Faculdade de Farmácia da UFJF, pelos ensinamentos;

À minha orientadora, Profa. Dra. Fernanda Maria Pinto Vilela, pela paciência, dedicação e ensinamentos;

À minha coorientadora, Profa. Dra. Maria Silvana Alves, pela disponibilidade, ensinamentos e atenção;

Ao Prof. Dr. Fabiano Freire Costa, pelas folhas de café sem as quais este trabalho não seria possível;

À produtora rural Eni Freire Costa, pelo fornecimento das folhas do café e do material para identificação botânica;

À Profa. Dra. Juliana de Carvalho da Costa, pelo auxílio e dedicação para a interpretação e obtenção dos resultados;

Aos mestrandos Ygor Ferreira Garcia da Costa e Wesley Gonçalves de Moraes, e alunas de iniciação científica Nicole Moreira e Giovana Garcia, e demais membros do LBCM, por todo o suporte, ensinamento e apoio na realização deste trabalho;

À doutoranda Ana Flávia Lawall Werneck, pelo auxílio na liofilização do extrato;

À doutoranda Valéria de Mello, pelo auxílio na interpretação dos dados;

Aos Técnicos Administrativos em Educação (TAEs), em especial, Marco Antônio Manhães, pela identificação botânica da exsicata, Éder Luís Tostes e Jésus de Paula Sarmiento, pelo auxílio no preparo das folhas e do extrato, João Paulo Moreira, pelo auxílio no Laboratório de Controle de Qualidade, Lívia Mara Silva, pelo suporte no LBCM, Carolina Miranda Gasparetto, pelo auxílio na execução da análise cromatográfica do extrato na CENTRALBIO, e Arlem Martins de Rezende e Sullivan Ramos Moreira Andrade, pelo auxílio administrativo na secretaria do PPGCF;

Aos meus amigos, pelo apoio e incentivo;

E a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

RESUMO

A espécie *Coffea arabica* L. corresponde a mais de 60% de todo o café produzido no mundo. O produto que de fato é comercializado internacionalmente são seus grãos verdes, enquanto suas folhas são consideradas um resíduo. O aproveitamento das folhas de café revela-se promissor uma vez que estão amplamente disponíveis e são fontes de diversas substâncias bioativas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do extrato etanólico liofilizado de folhas de café arábica (EE-CaL) e investigar os compostos presentes nesse extrato. O efeito antibacteriano *in vitro* de EE-CaL foi avaliado usando o método de microdiluição em caldo e o método de *drop plate* em ágar adaptado para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM), respectivamente. Foram selecionadas cepas bacterianas de referência Gram-positiva [*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 29213)] e Gram-negativa fermentadora [*Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC 25922)] e não-fermentadora [*Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula (ATCC 27853 e ATCC 9027)] com base na lista de bactérias patogênicas prioritárias para orientar a descoberta, pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos publicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A caracterização química de EE-CaL foi realizada por meio de CLUE-EM-Q-ToF. EE-CaL foi ativo frente a *S. aureus* (ATCC 29213) e *E. coli* (ATCC 25922), sendo mais efetivo frente a esta última (CIM = 2500 µg/mL e efeito bactericida), e sendo inativo frente a *P. aeruginosa* (ATCC 27853 e ATCC 9027) nas concentrações testadas. A análise química de EE-CaL revelou a presença de compostos da classe dos alcaloides, como a trigonelina e a cafeína, além de compostos fenólicos como o ácido quínico, ácido 5-cafeioquínico, ácido cafeico-O-hexosídeo, mangiferina, (epi)catequina, (epi)catequina mono glicosídeo e trímero de procianidina. A maioria desses compostos apresentam atividade antimicrobiana descrita na literatura, incluindo frente a *E. coli* e *S. aureus*, sendo assim, eles podem estar relacionados com a atividade antibacteriana observada em EE-CaL no presente estudo.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L. Folhas de Planta. Antibacterianos.

ABSTRACT

The *Coffea arabica* L. species accounts for more than 60% of all coffee worldwide produced. In fact, the product that is internationally traded is its green beans, while its leaves are considered waste. The use of coffee leaves is promising as they are widely available and are sources of several bioactive substances. Thus, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* antibacterial activity of the lyophilized ethanol extract of arabica coffee leaves (EE-CaL) and to investigate the compounds present in this extract. The *in vitro* antibacterial effect of EE-CaL was evaluated using the broth microdilution method and the adapted drop plate agar method to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC), respectively. Reference Gram-positive bacterial strains [*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 29213)] and Gram-negative fermenters [*Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC 25922)] and non-fermenters [*Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula (ATCC 27853 and ATCC 9027)] were selected based on the list of priority pathogenic bacteria to guide the discovery, research and development of new drugs published by the World Health Organization (WHO). The chemical characterization of EE-CaL was performed using UPLC-MS-Q-ToF. EE-CaL was active against *S. aureus* (ATCC 29213) and *E. coli* (ATCC 25922), being more efficient against this strain (MIC = 2500 µg/mL and effect bactericidal), and inactive against *P. aeruginosa* (ATCC 27853 and ATCC 9027) at the concentrations tested. The chemical analysis of EE-CaL revealed the presence of compounds from the alkaloid class, such as trigonelline and caffeine, in addition to phenolic compounds such as quinic acid, 5-caffeioquinic acid, caffeic acid-O-hexoside, mangiferin, (epi)catechin, (epi)catechin mono glycoside and procyanidin trimer. Most of these compounds have antimicrobial activity described in the literature, including against *E. coli* and *S. aureus*, so they may be related to the antibacterial activity observed in EE-CaL in the present study.

Keywords: *Coffea arabica* L. Plant Leaves. Antibacterial Agents.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Fotografia de uma plantação de café no município de Capelinha, Minas Gerais, Brasil.....	17
Figura 2	- Figura ilustrativa da espécie <i>Coffea arabica</i> L. presente no livro Plantas Medicinais de Köhler e disponibilizada por <i>Royal Botanic Gardens, Kew</i>	18
Figura 3	- Fotografia do interior do fruto do café.....	19
Figura 4	- Figura ilustrativa da biossíntese da cafeína.....	22
Quadro 1	- Principais subgrupos dos ácidos clorogênicos (ACG).....	25
Figura 5	- Figura ilustrativa das estruturas moleculares dos principais compostos fenólicos de interesse relacionados com as folhas de café.....	30
Figura 6	- Figura ilustrativa da linha do tempo da descoberta dos antibióticos.....	36
Figura 7	- Figura ilustrativa da localização geográfica da Fazenda Campo do Meio.....	41
Figura 8	- Figura ilustrativa dos processos realizados para obtenção do pó das folhas de café.....	42
Figura 9	- Figura ilustrativa das etapas de preparo do extrato etanólico das folhas de café.....	43
Quadro 2	- Cepas bacterianas utilizadas.....	44
Figura 10	- Esquema demonstrativo da diluição seriada realizada na placa de microtitulação.....	47
Figura 11	- Esquema ilustrativo da composição dos controles para o teste de microdiluição em caldo.....	48
Figura 12	- Esquema ilustrativo da organização dos antibióticos na placa de microtitulação.....	49
Figura 13	- Esquema ilustrativo da organização de EE-CaL e controles na	

	placa de microtitulação.....	49
Figura 14	- Fotografia ilustrativa da organização da placa de microtitulação utilizada no teste para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) com <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922).....	53
Figura 15	- Fotografia ilustrativa da organização da placa de microtitulação utilizada no teste para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) com <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213).....	54
Figura 16	- Fotografia ilustrativa da organização da placa de Petri utilizada no teste para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) para <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922).....	55
Figura 17	- Cromatograma de EE-CaL obtido por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à técnica de espectrometria de massas com analisador quadrupolo e tempo de voo (CLUE-EM-Q-ToF) em modo negativo.....	57
Figura 18	- Cromatograma de EE-CaL obtido por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à técnica de espectrometria de massas com analisador quadrupolo e tempo de voo (CLUE-EM-Q-ToF) em modo positivo.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Gradiente das fases móveis utilizado na cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE).....	51
Tabela 2	- Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EE-CaL e dos antibióticos frente as cepas bacterianas testadas.....	52
Tabela 3	- Faixas de Concentração Inibitória Mínima (CIM) recomendadas pelo documento M100-S30 do <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (CLSI) para organismos não fastidiosos.....	53
Tabela 4	- Compostos químicos majoritários encontrados em EE-CaL através da análise em CLUE-EM-Q-ToF no modo negativo.....	57
Tabela 5	- Compostos químicos majoritários encontrados em EE-CaL através da análise em CLUE-EM-Q-ToF no modo positivo.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACG	Ácidos clorogênicos
AMP	Ampicilina
CHL	Cloranfenicol
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INT	Cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazólio
LEVO	Levofloxacina
LPS	Lipopolissacarídeo
MMP	Metaloproteinases
OMS	Organização Mundial da Saúde
P.A.	Para análise
POWO	<i>Plants of the World Online</i>
RPM	Rotações por minuto
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
CLUE	Cromatografia Líquida de ultra eficiência
UV	Ultravioleta
UVB	Ultravioleta B
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1	HISTÓRICO E O MERCADO DO CAFÉ.....	15
2.2	CARACTERÍSTICAS DO CAFÉ.....	16
2.3	RESÍDUOS E FOLHAS DO CAFÉ.....	19
2.4	COMPOSTOS DE INTERESSE PRESENTES NAS FOLHAS DE CAFÉ.....	20
2.4.1	Alcaloides.....	20
2.4.2	Compostos fenólicos.....	23
2.5	POTENCIAL BIOLÓGICO E/OU FARMACOLÓGICO DAS FOLHAS DE CAFÉ.....	31
2.6	AGENTES ANTIBACTERIANOS: PASSADO, PRESENTE E DESAFIOS FUTUROS.....	34
2.7	RESISTÊNCIA AOS ANTIBACTERIANOS.....	37
2.8	EXTRATOS VEGETAIS COMO FONTE DE FÁRMACOS.....	38
3	OBJETIVOS.....	40
3.1	OBJETIVO GERAL.....	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1	OBTENÇÃO E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL.....	41
4.2	EXTRATO ETANÓLICO LIOFILIZADO DAS FOLHAS.....	42
4.3	INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA <i>IN VITRO</i>	44
4.3.1	Preparo das soluções estoque do extrato e dos antibióticos.....	45
4.3.2	Preparo do inóculo bacteriano padronizado.....	46
4.3.3	Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	46
4.3.4	Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	50
4.4	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO.....	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA <i>IN VITRO</i>	52
5.2	ANÁLISE QUÍMICA DO EXTRATO.....	56
6	CONCLUSÃO.....	66
	REFERÊNCIAS.....	67

APÊNDICE A - PICOS E RESPECTIVOS FRAGMENTOS DOS COMPOSTOS EM MODO NEGATIVO.....	78
APÊNDICE B - PICOS E RESPECTIVOS FRAGMENTOS DOS COMPOSTOS EM MODO POSITIVO.....	87
APÊNDICE C - CROMATOGRAMAS DO BRANCO EM MODO NEGATIVO E POSITIVO.....	95
APÊNDICE D - CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES EM MODO NEGATIVO E POSITIVO.....	96

1 INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são agentes naturais, semissintéticos ou sintéticos capazes de atuar contra microrganismos (OMS, 2019). Apesar das grandes descobertas e avanços na área, principalmente nas décadas de 40 e 60, a resistência aos antimicrobianos e o baixo desenvolvimento de novas moléculas têm sido descritos como um importante e grave problema global de saúde pública que precisa ser resolvido (CAMPANINI-SALINAS *et al.*, 2018).

Considerando esse cenário, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou em 2017 uma lista de bactérias patogênicas prioritárias para orientar e promover a descoberta, pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos (OMS, 2017). Alternativas incluem melhorar moléculas conhecidas, descobrir novos alvos terapêuticos e investigar substâncias de origem marinha, animal ou vegetal (AMINOV, 2010).

Extratos de plantas são fontes potenciais para descoberta de medicamentos e podem fornecer novas armas contra infecções bacterianas resistentes (ATEF *et al.*, 2019). A atividade antibacteriana *in vitro* do café originou, décadas atrás, uma nova área de pesquisa (ALMEIDA *et al.*, 2012; RUNTI *et al.*, 2015; SINGH ARORA *et al.*, 2009; TODA *et al.*, 1989), enfatizando seu uso como agente antibacteriano eficaz, mas até agora menos avanços científicos em pesquisas têm sido observados com folhas de café.

As folhas de café representam um resíduo da colheita dos grãos de café e estão amplamente disponíveis como fontes de compostos bioativos (CHEN, 2019; SEGHE TO *et al.*, 2018). Elas são tradicionalmente utilizadas no Haiti, México, Nicarágua e Peru para aliviar edema, anemia, astenia, dores de cabeça, febre, dor de estômago, tosse, entre outros, revelando seu uso etnofarmacológico (ROSS, 2005).

Dentre os compostos de interesse presentes nas folhas de café, podem ser citados os alcaloides, a cafeína, os ácidos fenólicos, os flavonoides e as xantonas (CHEN, 2019). A cafeína é considerada a substância farmacologicamente ativa mais consumida em todo o mundo, e estudos têm demonstrado seu potencial antibacteriano (CROZIER *et al.*, 2008; SLEDZ *et al.*, 2015). Dentre os ácidos fenólicos presentes nas folhas de café, destacam-se os ácidos hidroxicinâmicos (KY

et al., 2001), pois estudos demonstraram sua atividade anti-inflamatória e antioxidante (ABRAHÃO *et al.*, 2010; SEGHETO *et al.*, 2018).

Em relação às xantonas, a presença de mangiferina foi confirmada em folhas de café, mas não foi encontrada nos seus grãos (CAMPA *et al.*, 2012; CHEN, 2019; DE ALMEIDA *et al.*, 2019; TREVISAN *et al.*, 2016). A mangiferina possui uma atividade farmacológica promissora relacionada a diversas propriedades como antidiabética, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antialérgica, antipirética, antiviral, neuroprotetora, imunomoduladora, cardioprotetora, controladora de colesterol e antibacteriana (DU *et al.*, 2018; IMRAN *et al.*, 2017). A atividade antibacteriana da mangiferina já foi identificada frente a cepas Gram-positivas e Gram-negativas como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* e *Salmonella virchow* e *Escherichia coli*, respectivamente. A mangiferina também apresentou atividade antifúngica frente a *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Thermoascus aurantiacus* (MAZLAN *et al.*, 2019; SINGH ARORA *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2012).

Considerando a necessidade de pesquisa e descoberta de novos agentes antimicrobianos para o tratamento de bactérias patogênicas resistentes e o potencial de compostos bioativos encontrados em folhas de café, o presente estudo teve como objetivo investigar a composição química e a atividade antibacteriana do extrato etanólico liofilizado de folhas de *Coffea arabica* L. (EE-CaL).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO E O MERCADO DO CAFÉ

O café selvagem tem sua origem no interior da Etiópia onde os frutos e as folhas eram consumidos pela população local. Contudo, a propagação do consumo da bebida produzida a partir dos grãos é atribuída aos árabes. A produção em escala comercial iniciou-se no Iêmen no século XIV, mas os primeiros pés de café chegaram na Europa apenas em 1616, onde foram cultivados pelos holandeses em estufas. No início do século XVIII, os franceses receberam dos holandeses sua primeira muda e o café se espalhou para as colônias desses dois países. As primeiras plantações no Brasil ocorreram no estado do Pará em 1727 a partir de sementes e mudas oriundas da Guiana Francesa (MARTINS, 2012).

Ao longo do tempo, a localização e a produtividade das plantações de café no Brasil sofreram grandes mudanças. Segundo Volsi *et al.* (2019), durante os séculos XIX e XX o café se expandiu pelo território brasileiro e teve grande papel na economia do país. Apesar de o estado do Pará ter recebido as primeiras plantações no país, os estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia e Rondônia responderam por 82% da produção nacional nos anos 2014 e 2015. Em seus estudos, estes autores observaram que durante o período de 1984/85 a 2014/15 ocorreu uma redução de 20,3% da área plantada ao passo que a produção cresceu 6%, o que indica um aumento substancial de produtividade.

A produção é predominante em países da América do Sul e Central, além dos continentes africano e asiático, sendo a segunda *commodity* mais comercializada no mundo. Além de sua importância no comércio internacional, a bebida preparada a partir dos grãos torrados do café está entre as três mais populares do mundo, perdendo apenas para a água e o chá (CHEN; MA; KITTS, 2018).

Durante os anos 2018 e 2019, a produção mundial de café cresceu aproximadamente 3,7% em comparação com o período anterior, atingindo 168,87 milhões de sacas. Quase metade da produção do café global é proveniente da América do Sul, região que apresentou uma produção 4,8% maior em relação ao ano anterior, com 80,95 milhões de sacas. O consumo de café subiu 2,1% em nível global neste período (ICO, 2019a).

Segundo Volsi *et al.* (2019), o Brasil enquadra-se como o país que mais produz e exporta grãos de café no mundo. Além disso, em 2020 o Brasil foi o segundo maior consumidor de café do mundo, com um crescimento de 1,34% no consumo em comparação com o ano de 2019. No ano de 2020, 70% das empresas eram operadas exclusivamente por famílias, demonstrando a importância das micro e pequenas empresas para o setor no país. O café torrado e moído foi responsável por 81,4% do faturamento, seguido do café torrado em grão com 15% (ABIC, 2020).

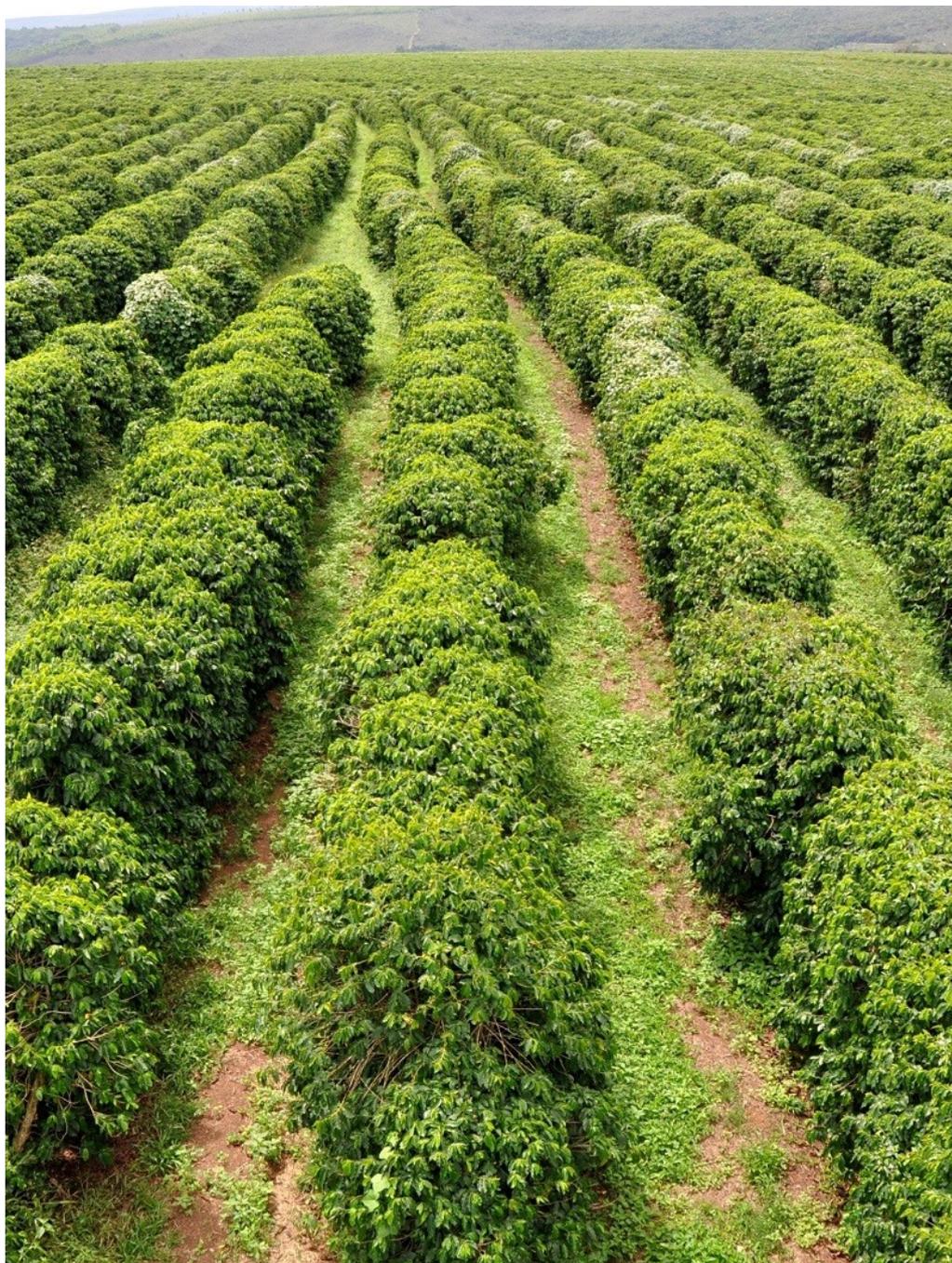
2.2 CARACTERÍSTICAS DO CAFÉ

O café pertence à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*, onde estão incluídas diversas espécies. Há grandes variações entre elas no que diz respeito ao tamanho, sementes e cores de suas folhas. Porém, todas as plantas deste gênero são lenhosas. Destacam-se as espécies *Coffea arabica* L., conhecida como café arábica, e *Coffea canephora*, popularmente denominada de café Conillon ou Robusta, uma vez que são as mais utilizadas para o preparo da bebida do café (ICO, 2019b).

O ciclo fenológico do café, ou seja, a sucessão de fases vegetativas e reprodutivas da planta, completa-se dentro de dois anos (LAVIOLA *et al.*, 2007). A floração ocorre apenas no início do segundo ano fenológico, após a ocorrência de um choque hídrico. Com a fecundação das flores, formam-se os chumbinhos que, por sua vez, passam pela fase de expansão até atingirem o tamanho normal. Posteriormente, ocorre o processo de granação em que os grãos são formados e os frutos amadurecem. Por fim, a planta passa pela etapa de senescência que se caracteriza pela morte dos ramos reprodutivos (CAMARGO; CAMARGO, 2001; MEIRELES *et al.*, 2009).

Conforme ilustra a Figura 1, o café arábica, descrito pela primeira vez em 1753 por Lineu, é uma planta com tamanho médio entre 2-8 metros. Enquanto as demais espécies desse gênero são diploides ($2n = 22$), o café arábica é tetraploide ($4n = 44$). As flores são hermafroditas e apresentam uma corola branca. Os frutos são vermelhos, mas quando maduros podem apresentar coloração amarela ou mesmo roxa. As sementes apresentam-se normalmente aos pares no interior dos frutos e possuem uma tonalidade entre marrom e marrom claro (BRISDON, 1988; ICO, 2019b; POWO, 2020; SILVAROLLA *et al.*, 1999).

Figura 1 - Fotografia de uma plantação de café no município de Capelinha, Minas Gerais, Brasil

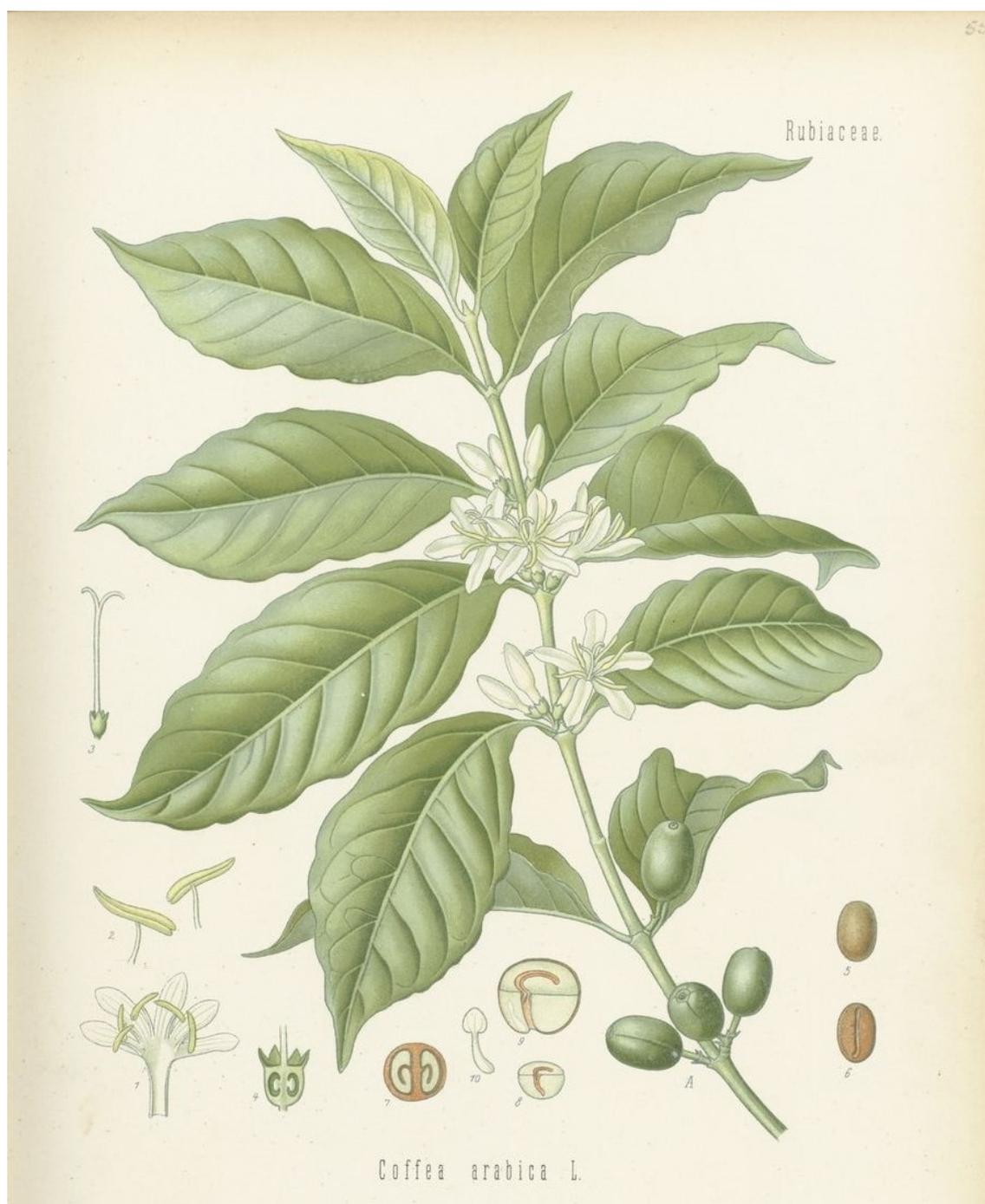


Fonte: Tavares (2021).

Conforme ilustrado na Figura 2, as folhas de café arábica são verde-escuras, enceradas, com aspecto levemente coriáceo e brilhantes na parte superior. Ondulações nas margens as vezes estão presentes. Quando jovens, as folhas podem apresentar coloração verde clara ou bronze. Seus nervos laterais são visíveis

e distribuem-se entre 7 a 10 pares. O comprimento varia entre 7 e 18 cm e a largura fica entre 3 e 7,5 cm. Os pecíolos crescem em pares opostos no tronco e nos galhos (BRISDON, 1988; WINTGENS, 2004).

Figura 2 - Figura ilustrativa da espécie *Coffea arabica* L. presente no livro *Plantas Medicinais* de Köhler e disponibilizada por *Royal Botanic Gardens, Kew*

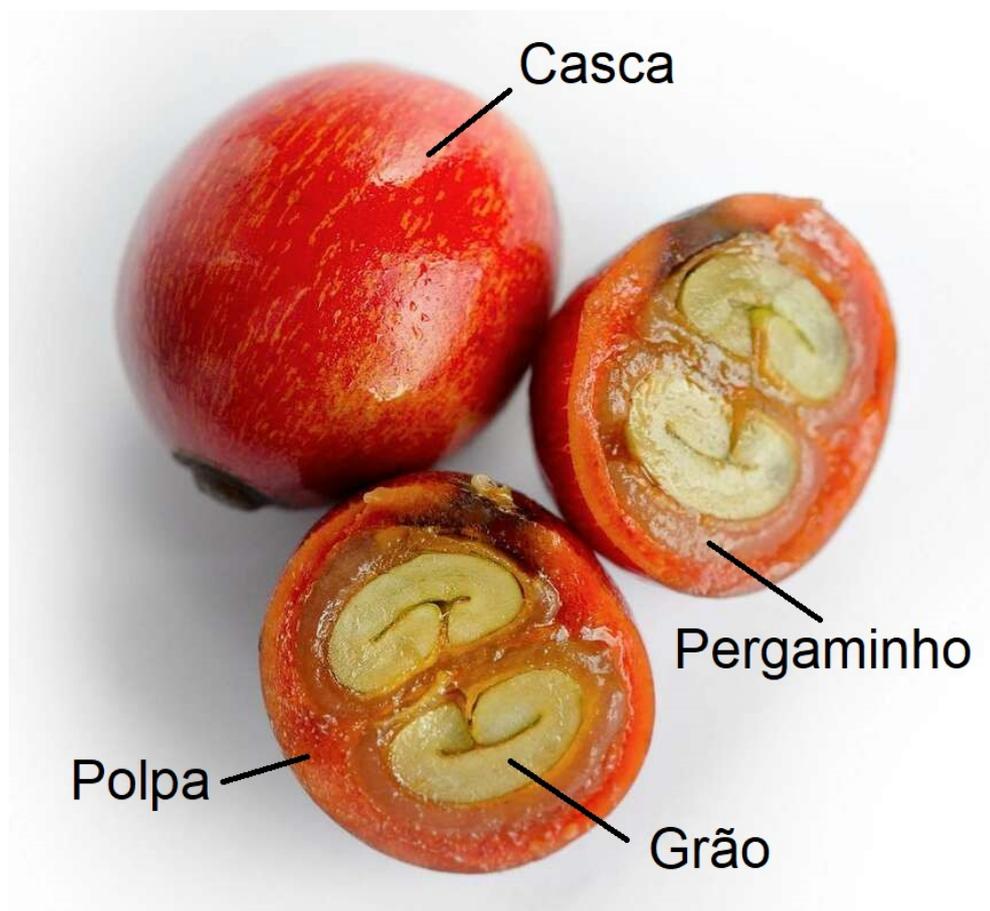


Fonte: *Plants of the World Online* (POWO) (2020).

2.3 RESÍDUOS E FOLHAS DO CAFÉ

Os frutos crus do café constituem-se por casca (epicarpo), polpa/mucilagem (mesocarpo), pergaminho, película prateada (espermoderma) e grão (endosperma) (Figura 3) (MUSSATTO *et al.*, 2011; SILVEIRA *et al.*, 2016). Após a colheita dos frutos de café, o produto que de fato é comercializado internacionalmente são os grãos verdes de café e sua obtenção se dá a partir do processamento das cerejas, os frutos maduros, por via seca ou úmida. Esse processamento gera diversos resíduos sólidos ou líquidos como polpa, casca, mucilagem e água residual (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012; MURTHY; NAIDU, 2012). Esquivel e Jiménez (2012) chamam a atenção para o fato dos grãos de café representarem menos de 50% do fruto, o que revela uma oportunidade para mais estudos visando o aproveitamento dos resíduos.

Figura 3 - Fotografia do interior do fruto do café



Fonte: adaptado de Davis (2019).

Durante o processo de colheita dos frutos, também chamado de derrça, há possibilidade de desfolha da planta, com maior ou menor intensidade conforme as técnicas empregadas (SANTOS *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2006). As folhas podem ser consideradas um resíduo porque não têm aplicação comercial relevante e posteriormente são separadas dos frutos de café colhidos (SEGHEO *et al.*, 2018). O aproveitamento das folhas revela-se promissor já que elas estão amplamente disponíveis e, segundo vários pesquisadores, elas são fontes de substâncias bioativas de interesse (CHEN, 2019; CHEN; MA; KITTS, 2018; DE ALMEIDA *et al.*, 2019; MONTEIRO *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020).

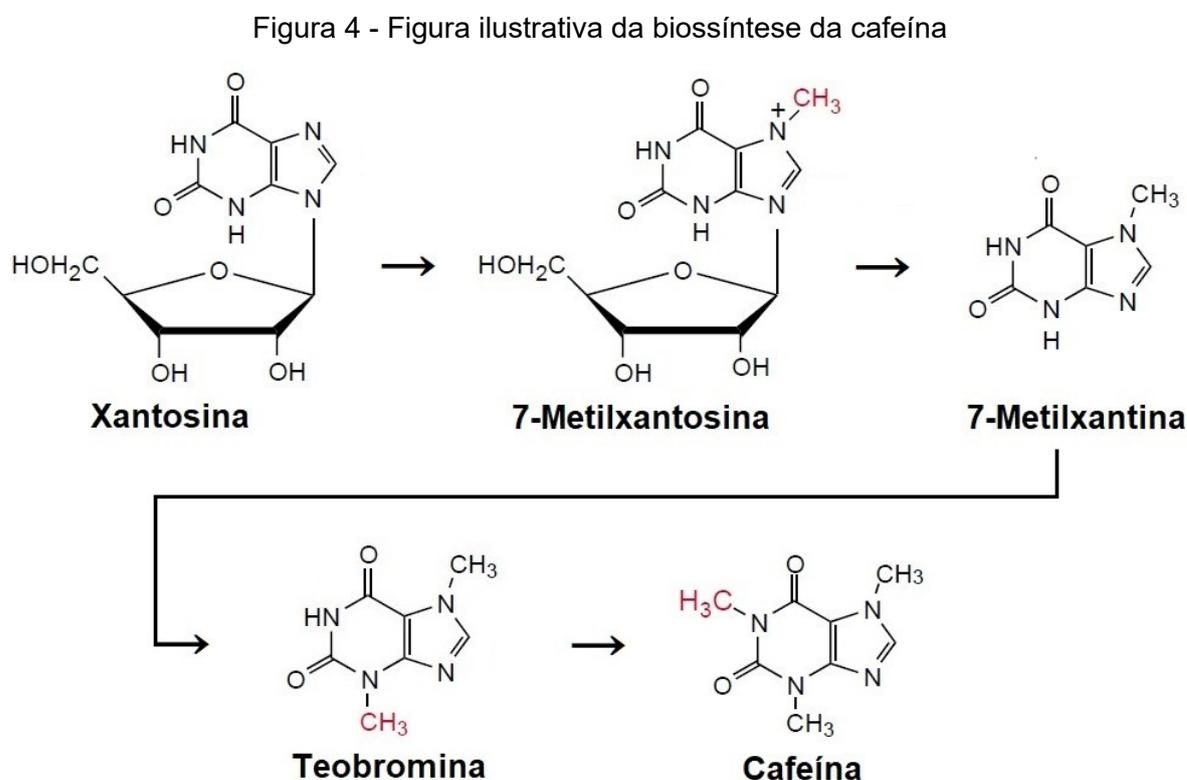
2.4 COMPOSTOS DE INTERESSE PRESENTES NAS FOLHAS DE CAFÉ

Entre os compostos de interesse presentes nas folhas do café, podemos citar os alcaloides e os compostos fenólicos que incluem os ácidos fenólicos, flavonoides e xantonas (CHEN, 2019). Esses compostos são classificados como metabólitos secundários e participam da defesa da planta contra patógenos, herbivoria e fatores ambientais além de auxiliarem na atração de agentes polinizadores (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010). Nota-se que o processo de torrefação dos grãos do café provoca grande perda de ácidos clorogênicos (ACG) enquanto o preparo de chá das folhas do café é capaz de reter a maioria desses compostos. Além disso, a xantona mangiferina, relacionada com diversas propriedades bioativas, foi detectada nas folhas do café, mas não foi encontrada nos seus grãos (CHEN, 2019).

2.4.1 Alcaloides

A cafeína destaca-se como um dos principais alcaloides presentes nas folhas de café (CHEN, 2019). A cafeína é biossintetizada a partir da xantosina, um nucleosídeo purínico constituído pela base xantina e uma pentose. Fujimori e Ashihara (1994) observaram em seus estudos que o teor de teobromina era levemente superior ao teor de cafeína em folhas recém-emergidas ao passo que o teor de cafeína era superior ao de teobromina nas folhas jovens. Uma possível explicação está no fato da teobromina ser precursora da cafeína durante o processo de biossíntese, conforme ilustra a Figura 4. A cafeína é considerada a substância farmacologicamente ativa mais consumida em todo o mundo (CROZIER;

CLIFFORD; ASHIHARA, 2008). Seu grande consumo justifica-se por sua capacidade de diminuir o cansaço, melhorar a concentração e reduzir o tempo de reação (RANG *et al.*, 2016).



Fonte: adaptado de Ashihara e Crozier (2001).

O teor de cafeína nas folhas de café arábica varia muito entre os estudos. Fatores como localização geográfica, idade da planta, condições ambientais, espécie, momento da coleta, forma de cultivo e estágio de desenvolvimento são responsáveis por variações nos teores dos compostos das folhas de café (CHEN, 2019). Observa-se que normalmente as folhas jovens possuem teores maiores de cafeína quando comparadas com as folhas maduras.

No estudo conduzido por Ashihara *et al.* (1996), o teor médio de cafeína por peso de folhas frescas de café arábica observado nos brotos (5,7 mg/g) e folhas jovens (7,1 mg/g) foi maior quando comparado com o teor encontrado nas folhas maduras (2,1 mg/g) e envelhecidas (2,4 mg/g). A xantina e a teobromina foram detectadas em menores concentrações que a cafeína. O teor médio de teobromina foi significativamente maior nos brotos (1,9 mg/g) e folhas jovens (1,8 mg/g) em comparação com folhas maduras (0,13 mg/g) e envelhecidas (0,06 mg/g). Os níveis

de xantina encontrados nas folhas jovens (0,22 mg/g) foram mais elevados em comparação com os brotos (0,07 mg/g), folhas maduras (0,10 mg/g) e envelhecidas (0,09 mg/g). A teofilina e a paraxantina não foram detectadas no estudo. Uma análise do teor médio de cafeína das folhas de café arábica revelou maiores concentrações nas folhas jovens (3,21 mg/g) em comparação com folhas maduras (1,80 mg/g) (RATANAMARNO; SURBKAR, 2017). Em outro estudo, diferentes métodos de preparo de chá a partir de folhas jovens e maduras de café arábica foram avaliados. Maiores níveis de cafeína e trigonelina foram encontrados em folhas jovens em comparação com folhas maduras, com exceção dos chás preparados com método Oolong. O método de chá-verde estilo chinês apresentou o maior teor de cafeína e trigonelina para folhas jovens, com uma média de 8,69 mg/g e 6,58 mg/g, respectivamente. Além disso, a duração do tempo de infusão não afetou a concentração destes compostos (CHEN; MA; KITTS, 2018).

Uma avaliação do teor de trigonelina, teobromina e cafeína nas folhas jovens e maduras de café arábica variedade Bourbon revelou que a concentração desses alcaloides foi superior nas folhas jovens em comparação com folhas maduras. A concentração média de trigonelina foi de 11,71 mg/g de peso seco para folhas jovens e 2,95 mg/g para folhas maduras. O teor médio de teobromina para folhas jovens e maduras foi de 0,81 mg/g e 0,04 mg/g, respectivamente. Já a concentração média de cafeína obtida foi de 14,93 mg/g para folhas jovens e 5,99 mg/g para folhas maduras (MONTEIRO *et al.*, 2020).

A variação no teor de cafeína observada entre as folhas jovens e maduras pode ser explicada pela reação entre a biossíntese desse composto e as fases de desenvolvimento da planta. A biossíntese é maior nas folhas mais jovens e atinge um ponto máximo quando as folhas ficam totalmente expandidas (ASHIHARA; CROZIER, 2001; LATOSIŃSKA; LATOSIŃSKA, 2017). Justamente nessa fase de maior síntese, as folhas estão mais vulneráveis aos predadores, o que levanta a hipótese de que a cafeína esteja relacionada com a defesa da planta (HARBORNE, 2014). Observa-se um importante sinal de provável atividade antibacteriana da cafeína contra patógenos (SLEDZ *et al.*, 2015).

Outro fator que pode influenciar o teor de cafeína nas folhas é o número de cromossomos do café. Em um estudo com diversas espécies de café, observou-se que na espécie café arábica o menor teor de cafeína encontrado foi de 5,01 mg/g (0,501% p/p) para a variedade Icatu Vermelho R44P9 com 44 cromossomos

enquanto o maior valor foi de 10,80 mg/g (1,080% p/p) para a variedade *Angustifolia* 67/226 com 22 cromossomos. Ou seja, as variedades de café arábica com 22 cromossomos possuíam maiores níveis de cafeína quando comparadas com as de 44 cromossomos (SILVAROLLA *et al.*, 1999).

Como muitos fatores podem influenciar a biossíntese da cafeína nas folhas de café, não é surpreendente que os teores desse composto variem de estudo para estudo. Um dos fatores mais relevantes no teor de cafeína observado nas folhas é a região de cultivo. Em uma análise realizada por Bubueanu, Pavaloiu e Pirvu (2018), o teor médio de cafeína observado nas folhas de café arábica foi de 7,0 mg/g (0,7% p/p). No estudo publicado por De Almeida *et al.* (2019), os teores de cafeína nas folhas de café variaram conforme a região geográfica analisada. O teor médio de cafeína foi de 9,68 mg/g para folhas do estado de Minas Gerais, 5,87 mg/g para folhas do estado do Ceará e 6,36 mg/g para folhas do estado de São Paulo. Asfew e Dekebo (2019) analisaram o teor de cafeína das folhas de variedades de café arábica provenientes de três regiões de Wollega, Etiópia. Os teores médios foram de 5,7 mg/g (0,57% p/p) para folhas do Leste Wollega, 6,3 mg/g (0,63% p/p) para folhas do Oeste Wollega e 7,6 mg/g (0,76% p/p) para Kelem Wollega. A média para as três amostras foi de 6,5 mg/g (0,65% p/p).

No estudo realizado por Dado, Asresahegn e Goroya (2019), o teor de cafeína em folhas verdes de café arábica variou entre 2,53 e 2,73 mg/g. No estudo de Caceres *et al.* (2020), avaliou-se o teor de cafeína das folhas de diferentes variedades de café arábica oriundas da Guatemala. Os valores obtidos variaram entre 4,53 mg/g (0,453% p/p) de folhas da variedade Caturra provenientes de Tajumulco (San Marcos) e 7,25 mg/g (0,725% p/p) de folhas da variedade Caturra provenientes de Salamá (Baja Verapaz).

2.4.2 Compostos fenólicos

Outra categoria de compostos de interesse presentes nas folhas de café são os compostos fenólicos que incluem os ácidos fenólicos, os flavonoides e as xantonas (CHEN, 2019). A atividade antioxidante dos fenólicos está relacionada com as suas estruturas químicas e suas ações redutoras, o que permite neutralizar espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) e quelar metais de transição (RODRIGUES; MARIUTTI; MERCADANTE, 2013). Portanto, os compostos

fenólicos atuam tanto no início quanto na propagação de processos oxidativos (ABRAHÃO *et al.*, 2010). Segundo Farah e Donangelo (2006), os fenólicos podem auxiliar na proteção contra radiação ultravioleta (UV) e também contra o ataque de patógenos.

Entre os ácidos fenólicos presentes no café, os ácidos hidroxicinâmicos merecem destaque. Eles podem ser encontrados em suas formas livres ou mais comumente nas formas conjugadas (CAMPA *et al.*, 2012). Os principais exemplos de ácidos hidroxicinâmicos encontrados nas plantas vasculares são o ácido cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinapínico (FARAH; DONANGELO, 2006). A maior parte dos compostos fenólicos produzidos pelas plantas são ésteres formados entre os ácidos hidroxicinâmicos com o ácido quínico. As plantas da família Rubiaceae, a qual o café pertence, também são capazes de produzir diésteres (MONDOLOT *et al.*, 2006).

Quadro 1 - Principais subgrupos dos ácidos clorogênicos (ACG)

Subgrupo dos ácidos clorogênicos (ACG)	Principais representantes
Ácidos cafeioquínicos (ACQ)	Ácido 3-cafeioquínico (3-ACQ)
	Ácido 4-cafeioquínico (4-ACQ)
	Ácido 5-cafeioquínico (5-ACQ)
Ácidos dicafeioquínicos (ADICQ)	Ácido 3,4-dicafeioquínico (3,4-ADICQ)
	Ácido 3,5-dicafeioquínico (3,5-ADICQ)
	Ácido 4,5-dicafeioquínico (4,5-ADICQ)
Ácidos feruloilquínicos (AFQ)	Ácido 3-feruloilquínico (3-AFQ)
	Ácido 4-feruloilquínico (4-AFQ)
	Ácido 5-feruloilquínico (5-AFQ)

Fonte: adaptado de Ky *et al.* (2001) e Rodriguez-Gomes *et al.* (2018).

Os ésteres formados entre os ácidos hidroxicinâmicos com o ácido quínico configuram o grupo dos ácidos clorogênicos (ACG) (KY *et al.*, 2001). Conforme demonstrado no Quadro 1, os ACG podem ser divididos em três subgrupos principais: ácidos cafeioquínicos (ACQ), ácidos dicafeioquínicos (ADICQ) e ácidos feruloilquínicos (AFQ) (RODRÍGUEZ-GÓMEZ *et al.*, 2018). O subgrupo dos ACQ inclui os ácidos 3-cafeioquínico (3-ACQ), 4-cafeioquínico (4-ACQ) e 5-cafeioquínico (5-ACQ), esse último também é chamado por alguns autores de ácido clorogênico.

O subgrupo dos ADICQ inclui os ácidos 3,4-dicafeioquínico (3,4-ADICQ), 3,5-dicafeioquínico (3,5-ADICQ) e 4,5-dicafeioquínico (4,5-ADICQ). Já o subgrupo dos AFQ inclui os ácidos 3-feruloilquínico (3-AFQ), 4-feruloilquínico (4-AFQ) e 5-feruloilquínico (5-AFQ). Outra subdivisão citada por alguns autores é a do grupo dos ACGs.s., que inclui tanto os ACQ quanto os ADICQ (KY *et al*, 2001).

Uma análise da concentração de fenólicos totais de folhas de café arábica jovens e maduras revelou que o teor de fenólicos totais nas folhas jovens produtoras (174,0 mg/g) e não produtoras de frutos (186,5 mg/g) foi maior quando comparado com folhas maduras produtoras (138,9 mg/g) e não produtoras (127,6 mg/g). Uma vez que a produção de frutos não afetou significativamente o conteúdo de fenólicos totais das folhas, os autores concluíram que os metabólitos secundários não são exclusivamente dependentes dos carboidratos não alocados para os frutos (SALGADO *et al.*, 2008).

O teor de fenólicos totais também pode ser bem diferente entre as folhas e os grãos de café arábica. No estudo de Bubueanu, Pavaloiu e Pirvu (2018), as folhas apresentaram maiores níveis de fenólicos totais (12 g/100 g em equivalente de ácido gálico) em relação aos grãos verdes (9,8 g/100 g). Contudo, os grãos torrados, que são utilizados no preparo da bebida do café, apresentaram níveis ainda mais baixos de fenólicos totais (4,6 g/100 g) em comparação com os grãos verdes, o que demonstra uma possível superioridade das folhas para obtenção de compostos fenólicos.

O processamento das folhas também deve ser levado em consideração porque pode influenciar diretamente na composição química final. Um estudo considerou diferentes tipos de chás preparados a partir de folhas de café arábica e analisou as amostras quanto aos teores de compostos fenólicos. O 5-ACQ foi o mais abundante entre os ACG analisados, sendo que seu teor foi afetado pelo método de processamento. De maneira geral, as maiores concentrações dos compostos analisados foram encontradas utilizando o estilo japonês de chá-verde com folhas jovens, ao passo que as menores concentrações foram obtidas com os processamentos tipo chá-preto com folhas maduras e tipo chá oolong com folhas jovens, o que pode ser consequência do processo oxidativo destes dois últimos processamentos. A partir destes resultados, os autores concluíram que o método de processamento, a idade das folhas e o tempo de infusão são fatores que afetam a extração dos constituintes químicos das folhas de café (CHEN; MA; KITTS, 2018).

Além disso, deve-se considerar que o extrato inicial e seus fracionamentos podem apresentar constituição química significativamente diferente. No estudo de Segheto *et al.* (2018), os teores de compostos fenólicos, flavonoides, 5-ACQ e mangiferina foram comparados entre o extrato metanólico de café arábica e suas frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. O maior teor de compostos fenólicos (20,6 g/100 g em equivalente de ácido gálico) e flavonoides totais (14,96 g/100 g em equivalente de rutina) foi encontrado na fração em acetato de etila, com os menores teores na fração em diclorometano (1,65 g/100 g em equivalente de ácido gálico) e hexano (0,26 g/100 g em equivalente de rutina), respectivamente. O 5-ACQ apresentou maior teor na fração em acetato de etila (5,5 g/100 g) enquanto a mangiferina foi encontrada em maiores níveis na fração em butanol (4,0 g/100 g).

Em relação ao conteúdo de ésteres de ácidos hidroxicinâmicos, um estudo conduzido por Campa *et al.* (2012) demonstrou que as folhas de café arábica apresentaram 3,960% em peso seco de ACG. Deste total, 3,584% foram de ACQ (3-ACQ, 4-ACQ e 5-ACQ), 0,116% de AFQ (considerando os ácidos 4-AFQ e 5-AFQ, uma vez que o 3-AFQ foi geralmente indetectável com os métodos empregados) e 0,260% de ADICQ (3,4-ADICQ, 3,5-ADICQ e 4,5-ADICQ) (CAMPÁ *et al.*, 2012).

Uma avaliação do teor de ACQ de extratos aquosos obtidos a partir das folhas de oito espécies de café cultivadas em estufas (Meise, Bélgica), incluindo café arábica, demonstrou que o 5-ACQ foi o isômero ACQ mais abundante em todas as espécies testadas. No caso das folhas de café arábica, foram encontrados os três principais representantes de ACQ (3-ACQ, 4-ACQ e 5-ACQ) no mês de janeiro, sendo que o 4-ACQ foi detectado, não sendo possível de ser quantificado. No mês de julho, foram encontrados o 3-ACQ e 5-ACQ apenas, não sendo detectada a presença do 4-ACQ (RODRIGUES-GOMES *et al.*, 2018).

No estudo conduzido por Mondolot *et al.* (2006) com folhas de *C. canephora*, observou-se que os ácidos cafeioquínicos e dicafeioquínicos foram os mais abundantes. Os autores encontraram um representante para cada grupo de AFQ (5-AFQ) e ACQ (5-ACQ). Foram encontrados os três representantes dos ADICQ (3,4-ADICQ, 3,5-ADICQ e 4,5-ADICQ). Folhas mais jovens apresentaram maiores teores de ACG, com níveis quase tão altos de ADICQ (2,75% p/p de folha seca) quanto de 5-ACQ (2,94% p/p), que é o mais abundante do gênero *Coffea*. O teor de ACGs.s. nas folhas maduras foi 10 vezes menor em comparação com as jovens, uma

provável consequência da redução no teor de ADICQ com o passar do tempo. Uma análise histoquímica das folhas revelou uma associação entre os ACGs.s. com os cloroplastos, um indício de que esses compostos podem ter um papel na proteção dos cloroplastos contra danos causados pela radiação solar.

O local de cultivo pode ter grande influência nos constituintes químicos das folhas de café. Uma análise do teor de 5-ACQ de folhas e grãos verdes de café arábica coletados a partir de árvores de diferentes regiões da Guatemala revelou que os níveis de 5-ACQ nas folhas variaram entre 0,102% e 1,045%, enquanto nos grãos a variação ficou entre 0,412% e 6,675% (CACERES *et al.*, 2020).

Como apresentado anteriormente, a mangiferina é outro composto de interesse presente nas folhas do café e caracteriza-se por ser uma xantona C-glicosilada com promissoras atividades farmacológicas. Em 2008, essa xantona foi identificada pela primeira vez em folhas de café (*Coffea pseudozanguebariae*) por Talamond *et al.* (2008). A mangiferina está relacionada com diversas propriedades como antidiabética, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antialérgica, antipirética, antiviral, neuroprotetora, imunomoduladora, cardioprotetora, controle do colesterol e antibacteriana, com ação em cepas Gram-negativas e Gram-positivas (DU *et al.*, 2018; IMRAN *et al.*, 2017).

Um estudo com 23 espécies de café revelou que sete apresentaram mangiferina nas folhas, incluindo café arábica variedade Laurina, cujo teor desse composto encontrado foi de 0,566% de peso seco. Ao avaliarem o teor de mangiferina nos grãos de três espécies, incluindo café arábica, os autores não foram capazes de detectar esse composto. Nas folhas, o teor de mangiferina foi aproximadamente 30% menor nas maduras em comparação com as folhas jovens. Como a isomangiferina geralmente apresenta-se apenas em traços, os autores não consideraram esse composto no estudo. Das sete espécies que apresentaram mangiferina nas folhas, cinco são espécies de cultivo em elevadas altitudes, condição em que a radiação UV normalmente apresenta-se mais alta.

A influência da incidência de luz nos teores de mangiferina e isomangiferina das folhas de café também foi observada em outro estudo com folhas de café arábica do Brasil e da Costa Rica. Observou-se que os teores totais de mangiferina (mangiferina e isomangiferina) no Brasil variaram entre 0,67 g/kg (cultivo orgânico em Manhumirim, Minas Gerais) a 4,97 g/kg (folhas jovens de cultivo convencional em Bom Sucesso, Minas Gerais). No caso das folhas cultivadas em Bom Sucesso,

observou-se maiores níveis de mangiferina (4,17 g/kg) e isomangiferina (0,80 g/kg) em folhas jovens em comparação com as folhas envelhecidas (1,21 g/kg de mangiferina e 0,28 g/kg de isomangiferina). Os teores totais de mangiferina na Costa Rica variaram entre 0,85 g/kg (orgânico) e 4,01 g/kg (Herradura). De maneira geral, os teores de mangiferina foram maiores em cultivos naturais com acesso livre ao sol em comparação com outros tipos de cultivos, como os orgânicos. Com isso, os autores concluíram que as folhas de café podem ser uma boa fonte natural de mangiferina (TREVISAN *et al.*, 2016).

Em outro estudo, foram avaliados os teores de ACG, mangiferina e isomangiferina em folhas jovens e maduras de quatro espécies de café, incluindo café arábica variedade Bourbon. Os maiores teores de ACGs.s. (ACQ e ADICQ) foram encontrados nas espécies café arábica e *Coffea eugenoides*, enquanto as espécies *C. canephora* e *Coffea racemosa* apresentaram os valores mais baixos. Em concordância com outros estudos já publicados, as folhas jovens apresentam maiores teores de ACGs.s. em comparação com folhas maduras. A queda no teor de ACGs.s. com o envelhecimento foi mais pronunciada nas folhas de café arábica, caso em que houve uma redução de 78% nas folhas maduras em comparação com as jovens, sendo que as principais reduções ocorreram com os compostos 5-ACQ (redução de 74,2%) e 3,5-ADICQ (redução de 97,20%). Por outro lado, os teores de 3-ACQ e 4-ACQ aumentaram com o envelhecimento das folhas de café arábica. Outros ACG foram detectados em concentrações mais baixas, como 4-AFQ e 5-AFQ, além de alguns isômeros *cis* de compostos já citados. O composto 3-AFQ não foi detectado neste estudo (MONTEIRO *et al.*, 2020).

Além disso, outros compostos fenólicos de interesse, como os flavonoides, também podem ser encontrados nas folhas de café. Os principais exemplos incluem as catequinas, quercetina, isoquercetina, kaempferol e rutina (DE ALMEIDA *et al.*, 2019; MARTINS *et al.*, 2014; RATANAMARNO; SURBKAR, 2017).

Uma diferença observada entre as folhas jovens e maduras de café está no teor de catequinas. Uma análise do teor de catequinas nas folhas de café arábica revelou que folhas jovens frescas apresentaram maiores níveis de catequina (0,1850 mg/g), epigallocatequina galato (16,3537 mg/g), epicatequina (0,3998 mg/g) e epicatequina galato (0,4810 mg/g) em comparação com folhas maduras frescas. Quanto maior o tempo de maceração em água, maior o teor de catequinas totais obtido. Os chás de folhas fermentadas naturalmente e torradas apresentaram

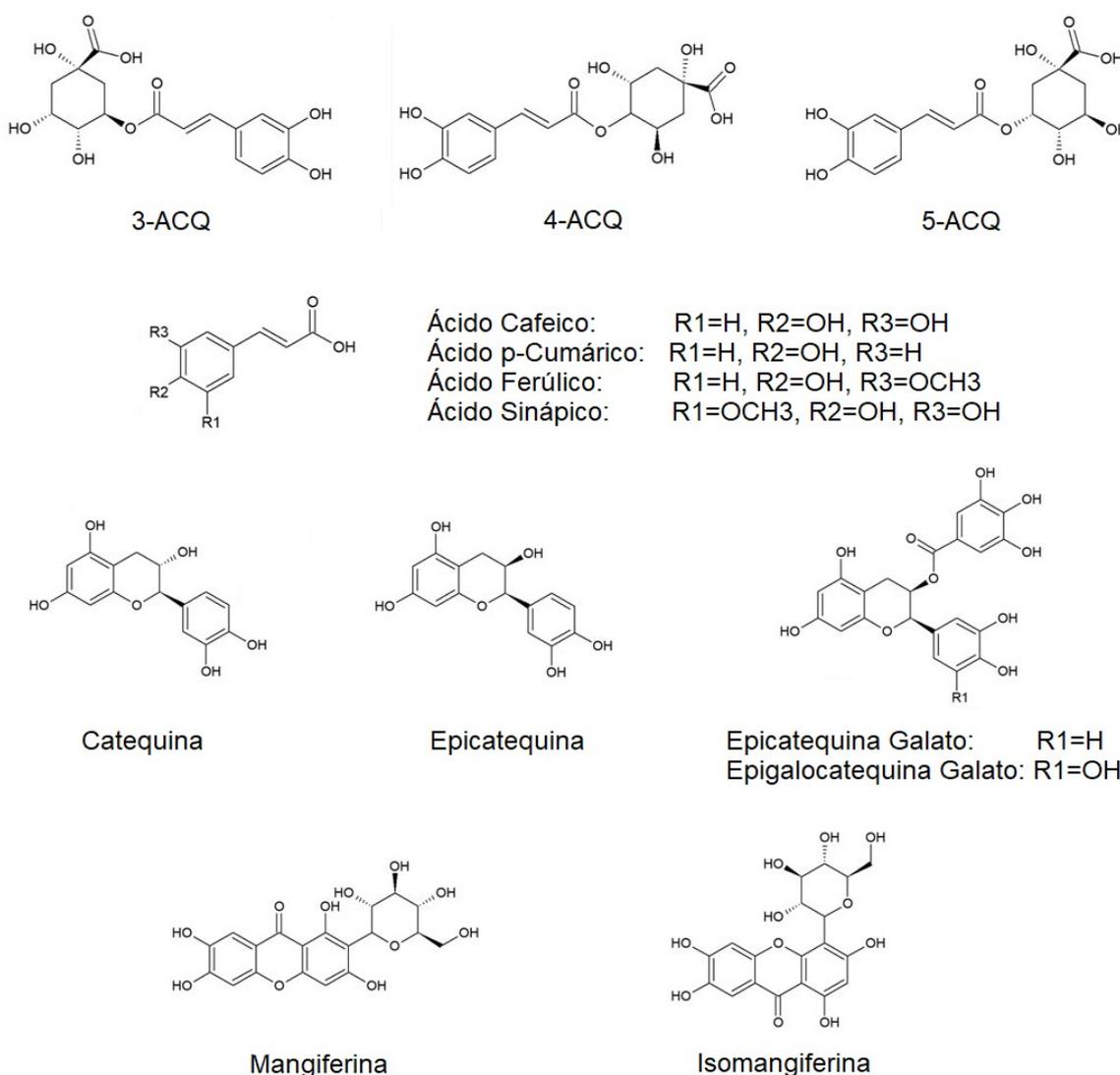
menores teores das catequinas em comparação com as folhas não fermentadas na maioria dos casos. A única exceção foi a epicatequina galato no chá de folhas maduras torradas, cujo teor foi maior nas folhas fermentadas. Com isso, observa-se que a fermentação pode reduzir o teor de catequinas obtido a partir das folhas de café (RATANAMARNO; SURBKAR, 2017).

Deve-se considerar que a radiação UV pode estar relacionada com os níveis dos compostos encontrados nas folhas de café. A partir de um estudo com duas variedades de café arábica, foi observado que na variedade *Purpurascens* foram identificadas as antocianinas chamadas delphinidina 3,5-diglucosídeo e delphinidina 3-(malonoil) glicosídeo, possivelmente relacionadas com a cor roxa observada nas folhas jovens dessa variedade. A maior produção de antocianinas pela variedade *Purpurascens* é acompanhada por menores níveis de ésteres de ácido cafeico em comparação com a outra variedade estudada, o café arábica variedade *Catuaí*. Esta situação pode ser explicada pelo fato destes compostos possuírem a mesma origem biossintética, a via do ácido chiquímico. Portanto, suspeita-se que a biossíntese das antocianinas afete negativamente a dos ACQ na variedade *Purpurascens*. Contudo, após exposição à radiação UV, os níveis de ACQ aumentaram nas folhas da variedade *Purpurascens* ao passo que diminuíram na variedade *Catuaí*. Com isso, os pesquisadores concluíram que a síntese de antocianinas pode auxiliar na redução dos danos provocados pela radiação UV nas folhas (DOMINGUES JÚNIOR *et al.*, 2012).

Em uma análise dos teores de compostos fenólicos das folhas de café arábica de três estados do Brasil (Minas Gerais, Ceará e São Paulo) conduzida por De Almeida *et al.* (2019), observou-se que as folhas do Ceará apresentavam menores teores de compostos polifenólicos. Segundo os autores, as árvores do Ceará cresceram na sombra, ao passo que as árvores dos estados de Minas Gerais e São Paulo cresceram com total exposição ao sol, o que poderia explicar essa diferença no conteúdo de polifenóis. As xantonas mangiferina e isomangiferina e os três principais representantes do grupo dos ACQ e dos ADICQ foram detectados. Além disso, detectou-se sete flavonoides, dos quais dois já haviam sido previamente identificados (rutina e isoquercetina) e cinco ainda não tinham sido detectados no gênero *Coffea* (glicosídeo de rutina, diglicosídeo de quercetina, quercetina-3-O-ramnogalactosídeo, diglicosídeo de kaempferol ramnosídeo, kaempferol-3-O-ramnoglicosídeo). O ACQ mais abundante nas folhas das três regiões foi o 5-ACQ,

resultado semelhante aos estudos publicados anteriormente. Na Figura 5 estão representadas as estruturas moleculares de alguns dos principais compostos fenólicos presentes nas folhas de café.

Figura 5 - Figura ilustrativa das estruturas moleculares dos principais compostos fenólicos de interesse relacionados com as folhas de café



Fonte: adaptado de Chen (2019).

A alta incidência de luz também pode impactar na fotossíntese e no estresse oxidativo em folhas de café arábica. Um estudo com folhas jovens da variedade Catuaí revelou que a maior incidência de luz resultou em aumento da capacidade antioxidante ao passo que a produção de fotossíntese não foi estimulada. Em uma análise dos metabólitos secundários, verificou-se que não houve um padrão para a

variação dos ésteres de ácidos hidroxicinâmicos (ACQ, ADICQ e AFQ) entre plantas com alta ou baixa exposição a luz. Porém, plantas tratadas com excesso de luz apresentaram valores superiores de xantona mangiferina e um aumento expressivo de flavonoides, mais especificamente quatro derivados de quercetina e quatro derivados de kaempferol, sendo que a rutina e o kaempferol-3Glc-6"Rha apresentaram níveis mais de 100 vezes superiores aos encontrados nas plantas tratadas com pouca luz (MARTINS *et al.*, 2014).

2.5 POTENCIAL BIOLÓGICO E/OU FARMACOLÓGICO DAS FOLHAS DE CAFÉ

As folhas de café são utilizadas tradicionalmente em diversos países onde há o cultivo da planta (CHEN; MA; KITTS, 2018). Além disso, as folhas de café são empregadas em alguns países, como Haiti, México, Nicarágua e Peru, no tratamento e alívio de inúmeras doenças, como edema, anemia, astenia, dores de cabeça, febre, dor de estômago e tosse, revelando a utilização etnofarmacológica das mesmas (ROSS, 2005). Faz-se necessário uma maior investigação científica para possível comprovação ou refutação dos benefícios à saúde que estão ligados ao consumo das folhas de café. Porém, diversos estudos já demonstraram o potencial antioxidante e anti-inflamatório de extratos das folhas de café (Ngamsuk *et al.*, 2019; SEGHE TO *et al.*, 2018).

Chiang *et al.* (2011) avaliaram a atividade antioxidante e protetora celular contra radiação ultravioleta B (UVB) do extrato metanólico de folhas de café arábica e seus hidrolisados. Observou-se que a concentração do extrato necessária para inibir 50% (IC₅₀) do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) foi de 9,8 µg/mL. Estudos realizados com células Hs68, de fibroblastos humanos, demonstraram que nem o extrato nem seus hidrolisados apresentaram efeitos de citotoxicidade sobre a proliferação celular. Observou-se que o pré-tratamento das células com o extrato de folhas de café foi capaz de reduzir a expressão de três tipos de metaloproteinases (MMP) em cultura de fibroblastos humanos após exposição à radiação UVB. Considerando que as MMP são liberadas após exposição à radiação UV e estão envolvidas na degradação de colágenos fibrilares, nota-se um potencial do extrato de folhas de café na proteção das células contra o fotoenvelhecimento. Os autores do estudo sugerem que o ácido cafeico e o 5-ACQ, além de outros constituintes,

podem estar envolvidos na capacidade protetora do extrato contra o fotoenvelhecimento.

Em outro estudo, avaliou-se a capacidade do extrato metanólico de folhas de café arábica de reduzir o estresse oxidativo, a inflamação e o fotodano em fibroblastos humanos e em camundongos BALB-c sem pelos expostos à radiação UVB. Observou-se que o extrato foi semelhante ao poder de redução do ácido ascórbico, revelando uma potente atividade redutora do extrato. O tratamento com extrato de folhas de café foi capaz de inibir a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em fibroblastos de maneira dose dependente. O estudo conduzido com camundongos BALB-c sem pelos demonstrou que o extrato reduziu significativamente o índice de eritema após exposição à radiação UVB. A aplicação tópica do extrato também foi capaz de restaurar o conteúdo de colágeno e reduzir a hiperplasia epidérmica (WU *et al.*, 2017).

Na comparação da atividade antioxidante das folhas e grãos de café arábica, observou-se que no teste com DPPH, o IC₅₀ encontrado para o extrato das folhas foi de 2,5 µg/mL, valor inferior ao encontrado nos grãos verdes (2,8 µg/mL) e grãos torrados (3,2 µg/mL). Os maiores teores de fenólicos totais foram encontrados nas folhas, enquanto os grãos torrados apresentaram os menores teores. Dessa forma, verificou-se no estudo uma correlação entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante. Além disso, as folhas de café foram mais promissoras quanto a capacidade antioxidante em comparação aos grãos (BUBUEANU; PAVALOIU; PIRVU, 2018).

A atividade antioxidante e anti-inflamatória das folhas de café arábica preparadas com diferentes métodos de processamento de chá (branco, verde, oolong e preto) foi comparada no estudo conduzido por Chen, Ma e Kitts (2018). O método de chá-verde estilo japonês com folhas jovens apresentou os melhores resultados de atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC), capacidade de absorção dos radicais oxigenados (ORAC) e compostos fenólicos totais, além dos menores valores de IC₅₀ no teste com DPPH. Além disso, os autores concluíram que o processamento das folhas de café pelo método de chá-preto pode ser útil na redução da pressão arterial ou proteção contra microrganismos. Já as folhas de café processadas pelo método de chá-verde estilo japonês podem auxiliar em produtos que visam uma atividade antioxidante e anti-inflamatória.

No estudo de Segheto *et al.* (2018), as atividades antioxidante e anti-inflamatória do extrato metanólico de folhas de café arábica e suas frações foram comparadas. Os valores para a IC₅₀ no teste com DPPH variaram entre 7,47 µg/mL (fração em acetato de etila), muito semelhante ao encontrado no padrão rutina (7,07 µg/mL), e 122,76 µg/mL (fração em diclorometano). Os autores avaliaram também a atividade do extrato metanólico e do 5-ACQ contra o edema induzido em orelha de camundongo. No caso do edema induzido por óleo de Cróton e fenol, o extrato metanólico e o 5-ACQ demonstraram uma capacidade de redução do edema. Já no caso do edema induzido por histamina, o extrato metanólico foi capaz de reduzir o edema, enquanto o 5-ACQ não foi capaz. Segundo os autores, estes resultados podem indicar que a atividade do extrato metanólico está relacionada com outros compostos fenólicos além do 5-ACQ.

Extratos metanólicos de folhas de café arábica de três estados do Brasil foram comparados por De Almeida *et al.* (2019) quanto as suas atividades antioxidantes utilizando testes de DPPH, capacidade de redução férrica do plasma (FRAP) e ORAC. O extrato de folhas do estado de Minas Gerais apresentou maior atividade antioxidante em comparação com o extrato de folhas de São Paulo, que por sua vez teve atividade superior ao encontrado no extrato de folhas do estado do Ceará. Além disso, os autores observaram uma clara correlação entre a presença de compostos fenólicos e a atividade antioxidante apresentada pelos extratos.

No estudo de Chen, Mu e Kitts (2019), a avaliação da atividade anti-inflamatória das folhas de café observada no estudo anterior (CHEN; MA; KITTS, 2018) foi aprofundada. Observou-se que o extrato de folhas jovens preparadas pelo método de chá-verde japonês foi capaz de inibir as interleucinas IL-6 e IL-10 em células Raw 264.7, células de sangue de camundongo, induzidas por interferon gama (IFN-γ) e lipopolissacarídeo (LPS). Este método de processamento foi justamente o que apresentou maiores teores de ACG, mangiferina, rutina e fenólicos totais no estudo de 2018, além das melhores atividades anti-inflamatórias e antioxidantes. Em uma análise da atividade antioxidante das folhas de café arábica conduzida por Caceres *et al.* (2019), verificou-se também uma correlação entre atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais dos extratos das folhas.

Em relação à atividade antibacteriana das folhas do café, ao efetuar uma busca no banco de dados *Pubmed* inserido na plataforma do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando como palavras-chave *antimicrobial*

activity of Coffea arabica leaves, obteve-se como resultado um total de cinco (05) referências que não estavam relacionadas diretamente com a atividade antimicrobiana das folhas de café (PUBMED, 2021), o que demonstra a relevância do presente estudo. De fato, a atividade antibacteriana *in vitro* do café abriu, há décadas, uma nova área de pesquisa (ALMEIDA *et al.*, 2012; SINGH ARORA; KAUR; KAUR, 2009; RUNTI *et al.*, 2015; TODA *et al.*, 1989), enfatizando seu uso como agente antibacteriano eficaz, sendo que a mesma sustentação científica não se observa com suas folhas.

2.6 AGENTES ANTIBACTERIANOS: PASSADO, PRESENTE E DESAFIOS FUTUROS

Originalmente, quimioterapia é o termo empregado para descrever o uso de fármacos “seletivamente tóxicos” para microrganismos invasores com efeitos mínimos no hospedeiro. Refere-se, também, a utilização desses medicamentos para o tratamento de tumores, sendo geralmente associada à agentes anticancerígenos citotóxicos que provocam efeitos adversos como queda de cabelo, náuseas e vômitos. Para evitar dúvidas, adotou-se a denominação quimioterapia antimicrobiana quando se deseja discorrer sobre o primeiro uso (RANG *et al.*, 2016). De fato, os antimicrobianos são provavelmente uma das formas mais bem-sucedidas de quimioterapia na história da medicina humana, contribuindo para o salvamento de incontáveis vidas e para o significativo controle de doenças infecciosas, principais causas de morbimortalidades dos indivíduos (AMINOV, 2010). Vale ressaltar que, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, do inglês *World Health Organization*), antimicrobiano é definido como um

[...] agente ou substância derivada de qualquer fonte (microrganismos, plantas, animais, sintéticos ou semissintéticos) que atua contra qualquer tipo de microrganismo, como bactérias (antibacteriano), micobactérias (anti-micobacteriano), fungos (antifúngico), vírus (antiviral) e parasita (antiparasitário). Todos os antibióticos são antimicrobianos, mas nem todos os antimicrobianos são antibióticos (WHO, 2019, p. 10).

Ainda segundo a OMS, antibiótico difere-se do antimicrobiano uma vez que o antibiótico é um

[...] agente ou substância que é produzida ou derivada de um microrganismo que mata ou inibe o crescimento de outro microrganismo vivo. Substâncias antibióticas sintéticas, semissintéticas ou derivadas de plantas ou animais não são, estritamente falando, antibióticos (WHO, 2019, p. 10).

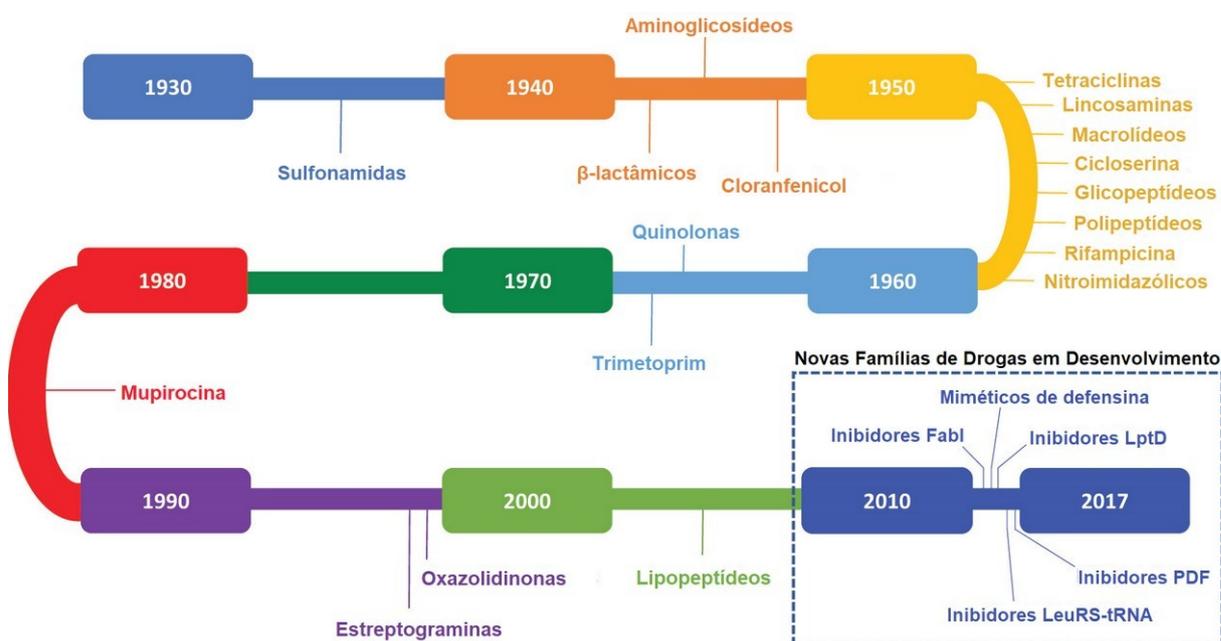
Conforme descrito por Aminov (2010), historicamente, o início da “era dos antibióticos” está relacionado aos estudos de Paul Ehrlich e Alexander Fleming. Brevemente, em 1909, Paul Ehrlich, em companhia de Alfred Bertheim e Sahachiro Hata, descobriram o primeiro agente antimicrobiano por meio da utilização de um derivado da arsfenamina (composto nº 606, comercializado sob o nome de Salvarsan®) contra *Treponema pallidum*, agente etiológico da sífilis. Em 1928, Alexander Fleming identificou, acidentalmente, uma substância produzida pelo fungo *Penicillium notatum* capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*. Posteriormente, em 1940, uma equipe de Oxford liderada por Howard Florey e Ernest Chain publicou o procedimento de purificação dessa substância denominada penicilina, em quantidade suficiente para a realização de testes clínicos, e no ano seguinte, esse antibiótico foi introduzido na prática clínica (AMINOV, 2017).

Entre as décadas de 1940 e 1960, a partir do estudo de Selman Waksman, pioneiro na identificação do gênero *Streptomyces* como eficiente produtor de compostos antimicrobianos, teve início a “era de ouro” (do inglês *Golden Age*) na descoberta de antibióticos. Waksman descobriu vários deles produzidos a partir de actinomicetos residentes no solo, incluindo neomicina e estreptomicina, a primeira substância ativa contra *Mycobacterium* (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019). Nos últimos 40 anos (de 1970 a 2000), a pesquisa, a descoberta e o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos diminuíram drasticamente, de forma que quase todas as classes de antibióticos que temos usado até os dias atuais na prática médica foram descobertas na “era de ouro”, mas sua eficácia tem sido cada vez mais prejudicada pelo aumento da resistência antimicrobiana (RAM) (CAMPANINI-SALINAS *et al.*, 2018) (Figura 6).

Em relação aos antimicrobianos que ainda estão em fase de estudo pré-clínico, um estudo conduzido por Theuretzbacher *et al.* (2020) revelou que 46% dos projetos tratam de moléculas pequenas de ação direta, 14% de anticorpos e vacinas, 13% de fagos e microbiota e os demais utilizam outras abordagens. No caso dos projetos com moléculas de ação direta, aproximadamente 70% miram em novos

alvos terapêuticos e em bactérias Gram-negativas, com poucos projetos voltados para Gram-positivas ou ambas. Estudos com fagos incluem tanto fagos naturais quanto modificados e apresentam um espectro mais amplo. Em comparação com os antimicrobianos clínicos disponíveis, os estudos pré-clínicos revelam-se mais inovadores. Mas projetos com moléculas de ação direta geralmente apresentam abordagens já conhecidas que fracassaram em estudos anteriores. (THEURETZBACHER *et al.*, 2020).

Figura 6 - Figura ilustrativa da linha do tempo da descoberta dos antibióticos



Legenda: FabI: proteína carreadora de enoil-acil redutase; LptD: proteína transportadora de lipopolissacarídeo; PDF: metaloenzima peptídeo deformilase; LeuRS-tRNA: leucil-tRNA sintetase.

Fonte: adaptada de Campanini-Salinas *et al.* (2018).

Estudos sobre a história dos genes responsáveis pela resistência aos antibióticos indicam que esses existem na natureza muito antes da era dos antibióticos (AMINOV, 2010). Contudo, a utilização incorreta ou excessiva dos fármacos antibacterianos nos seres humanos e na agricultura aliada a medidas de prevenção insuficientes podem acelerar o surgimento da resistência aos antibióticos (SEPTIMUS, 2018; WHO, 2018). A incorreta utilização dos antibióticos pode partir tanto de profissionais da saúde quanto dos pacientes. Alguns exemplos de uso incorreto incluem a prescrição indevida destes medicamentos quando não há infecção bacteriana; má orientação sobre a forma de uso; escolha inadequada do

antibiótico contra determinada bactéria; utilização sem prescrição médica; compartilhamento de antibióticos que sobraram de tratamentos anteriores; interrupção do tratamento ao apresentar melhora clínica e alteração na forma indicada de uso (DOS SANTOS *et al.*, 2018; WHO, 2018).

2.7 RESISTÊNCIA AOS ANTIBACTERIANOS

O objetivo da terapia com antibióticos é inibir uma infecção bacteriana para evitar o comprometimento da saúde do paciente. Porém, como as bactérias apresentam processo de multiplicação muito rápido, o que favorece mutações, e também são capazes de compartilhar material genético, os antibióticos podem exercer uma pressão seletiva. O resultado é o favorecimento das bactérias com mecanismos de resistência e o posterior compartilhamento destes genes de resistência para outras bactérias (CHAMCHOD; RUAN, 2012). A utilização de antibióticos está claramente relacionada com a presença de bactérias resistentes no indivíduo (MACGOWAN; MACNAUGHTON, 2017; SEPTIMUS, 2018).

As bactérias resistentes representam uma ameaça aos avanços científicos e constituem um problema de saúde pública com implicações clínicas e econômicas. Se os antibióticos de primeira linha não forem eficazes, fármacos de maior custo devem ser empregados, aumentando também o tempo de tratamento e/ou hospitalização. Porém, as alternativas contra algumas infecções já se revelam insuficientes. Além disso, o atraso na administração do tratamento correto dificulta o controle das infecções, o que eleva a morbidade e a mortalidade (DA COSTA; SILVA JÚNIOR, 2017; LOUREIRO *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2018).

A indústria farmacêutica reduziu seus investimentos na pesquisa de novos antibióticos uma vez que o retorno financeiro é baixo considerando o pequeno tempo de tratamento e os riscos de perda de atividade em consequência do surgimento de bactérias resistentes. Além disso, como as agências reguladoras aumentaram suas exigências sobre os testes, os investimentos na área também subiram (MACGOWAN; MACNAUGHTON, 2017).

Considerando as consequências das infecções provocadas por cepas resistentes, a OMS ressalta a importância do uso racional dos medicamentos e dos investimentos em novos antibacterianos, além de novas técnicas de diagnóstico e vacinas (WHO, 2018). Novos antibióticos serão necessários para combater bactérias

não susceptíveis aos fármacos atuais e mais alternativas contra bactérias resistentes devem ser encontradas.

Em 2017, a OMS publicou um documento contendo uma lista de bactérias patogênicas prioritárias na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos. Esta organização destaca que a preocupação com doenças infecciosas aumentou em consequência da incapacidade dos sistemas públicos de saúde em lidar com novos problemas, aumento das viagens internacionais, imigrações e a capacidade dos microrganismos de sofrerem adaptações e infectarem novas espécies. Se nada for feito, é possível que no futuro enfrentemos uma era pós-antibióticos. Segundo a OMS, a maior prioridade para o desenvolvimento de novos antibióticos deve estar voltada ao *Mycobacterium tuberculosis* uma vez que a tuberculose é responsável pelo maior número de mortes entre todas as doenças infecciosas (WHO, 2017).

De acordo com este documento, as bactérias com prioridade crítica na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos incluem a *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos e a família *Enterobacteriaceae* com resistência aos carbapenêmicos e 3ª geração das cefalosporinas. Com alta prioridade, o documento cita *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina e meticilina, *Helicobacter pylori* resistente à claritromicina, *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. resistentes à fluoroquinolonas e *Neisseria gonorrhoeae* resistente à fluoroquinolonas e 3ª geração das cefalosporinas (WHO, 2017).

2.8 EXTRATOS VEGETAIS COMO FONTE DE FÁRMACOS

Entre todos os antibióticos utilizados, mais de 75% têm origem na natureza ou são derivados de moléculas naturais (DURAND; RAOULT; DUBOURG, 2019). Bactérias encontradas no solo são a principal origem dos antibióticos já descobertos, especialmente bactérias do gênero *Actinomyces* (AMINOV, 2010). Considerando este cenário, é imprescindível que novos antibióticos sejam descobertos a fim de possibilitar maiores opções terapêuticas aos pacientes.

Novos medicamentos antibacterianos podem e devem ser pesquisados a partir de outras fontes, além das bactérias encontradas no solo. As alternativas incluem o melhoramento das moléculas já conhecidas, descoberta de novos alvos

terapêuticos e investigação de substâncias de origem marinha ou vegetal (AMINOV, 2010).

A pesquisa da atividade antimicrobiana a partir de extratos vegetais é uma promissora alternativa (ATEF *et al.*, 2019). Além disso, se um extrato apresentar resultados promissores, é possível explorar melhor seu potencial através do estudo dos seus constituintes individualmente.

Considerando o grave problema de saúde pública ocasionado pelas infecções microbianas resistentes e o baixo número de novos antimicrobianos sendo lançados no mercado, o estudo da atividade antibacteriana das folhas de café é promissor dada a extensa produção de café no Brasil, a pequena quantidade de estudos com essa parte do vegetal e a presença de compostos de interesse nas folhas. Portanto, este trabalho tem como objetivo caracterizar quimicamente e investigar a atividade antibacteriana do extrato de folhas de café frente a cepas bacterianas de interesse.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo analisar quimicamente o extrato etanólico liofilizado de folhas de *Coffea arabica* L. (EE-CaL) e avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* desse extrato.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato etanólico liofilizado das folhas de *Coffea arabica*. L. utilizando etanol P.A.
- Analisar quimicamente o EE-CaL utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à técnica de espectrometria de massas com analisador quadrupolo e tempo de voo (CLUE-EM-Q-ToF).
- Investigar a atividade antibacteriana *in vitro* do EE-CaL.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EE-CaL contra cepas bacterianas de referência selecionadas.
- Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e classificar o efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

As amostras das folhas de café arábica foram coletadas na Fazenda Campo do Meio (latitude 20°49'36.6" S e longitude 45°08'15.4" W) no dia 11 de outubro de 2019 na cidade de Candeias, Minas Gerais, Brasil (Figura 7). A excisata foi identificada pelo especialista botânico Marco Antônio Manhães e depositada no Herbário Leopoldo Krieger do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFJF, com o número de identificação CESJ 73046.

Figura 7 - Figura ilustrativa da localização geográfica da Fazenda Campo do Meio



Fonte: Google Maps (2020).

Um total de 2,450 kg de folhas foram levadas para secagem em estufa com circulação forçada de ar (SOLAB®, modelo SL-102, Piracicaba, SP, Brasil) a 40,0 °C. A secagem das folhas na estufa foi observada pela aparência física quebradiça, o que levou um total de 6 dias. As folhas secas foram previamente trituradas em liquidificador (BIMG Brasil®, modelo METVISA LAR 2, Brusque, SC, Brasil) e moídas no moinho de facas (SOLAB®, modelo SL 30, Piracicaba, SP, Brasil) (Figura 8).

Obteve-se um total de 503,97 g de pó após a moagem, o que indica uma perda de 79,43% de umidade em relação ao peso inicial das folhas frescas (2,450 kg). O pó resultante da moagem foi armazenado em sacos plásticos ao abrigo do calor, luz e umidade.

Figura 8 - Figura ilustrativa dos processos realizados para obtenção do pó das folhas de café



Legenda: A: secagem das folhas em estufa de ar circulante; B: trituração das folhas em liquidificador; C: moagem do material vegetal em moinho de facas; D: pó das folhas secas em frasco de vidro.

Fonte: elaborada pelo autor (2020).

4.2 EXTRATO ETANÓLICO LIOFILIZADO DAS FOLHAS

Foi preparado um extrato das folhas do café utilizando o processo de maceração descrito por Kenconoajati *et al.* (2019a), com modificações. Um total de 300 g de pó seco das folhas foi macerado inicialmente com 1,2 L de solvente etanol P.A. por 24 horas, em temperatura de 25 °C sob agitação (120 rpm), utilizando uma

incubadora *shaker* (SOLAB®, modelo SL-223, Piracicaba, SP, Brasil). O solvente após extração foi transferido para um novo frasco e o processo de maceração foi repetido utilizando o mesmo material vegetal nas mesmas condições citadas anteriormente. Os procedimentos de maceração foram realizados em um frasco de vidro com tampa (Figura 9).

Figura 9 - Figura ilustrativa das etapas de preparo do extrato etanólico das folhas de café



Legenda: A: extração sob agitação em incubadora *shaker*; B: rotaevaporação do solvente; C: liofilização do extrato; D: extrato após liofilização.

Fonte: imagem elaborada pelo autor (2020).

Ao término dos processos de maceração, os extratos foram reunidos, filtrados a vácuo em papel de filtro de 14 μm (Prolab®, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e

rotaevaporados com vácuo a 40 °C para remoção do solvente (Heidolph Instruments, modelo Laborota 4000, Schwabach, Alemanha). Ao final do processo de rotaevaporação, adicionou-se água destilada ao extrato etanólico para possibilitar a liofilização. As amostras foram congeladas e depois liofilizadas na faixa de temperatura de -45 a -50 °C e pressão de 150-200 mmHg (JJ Científica®, modelo LJJ04, São Carlos, SP, Brasil).

Ao final do processo foram obtidos um total de 15,61 g de extrato seco, o que corresponde ao rendimento de 5,2% em relação a massa do pó seco utilizado na maceração. O extrato liofilizado foi homogeneizado com auxílio de almofariz e pistilo, e posteriormente armazenado em geladeira em frasco de vidro com tampa e protegido com papel-alumínio.

4.3 INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO*

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi obtida por meio do método de microdiluição em caldo conforme as especificações fornecidas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) em seus documentos M07-A10 e M100-S30 (CLSI, 2015, 2020). Os documentos foram utilizados para determinar a concentração máxima dos solventes e diluentes, realização dos controles e escolha dos antibióticos. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada conforme Fernandes (2019) que ajustou o meio de cultura do método previamente descrito por Andrews (2001). Neste caso, utilizou-se Ágar Müeller Hinton (Difco Laboratories, Sparks, MD, Estados Unidos da América, EUA) em substituição ao meio de cultura Ágar Iso-Sensitest (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) do método original.

Quadro 2 - Cepas bacterianas utilizadas

Cepa	Gram
<i>Escherichia coli</i> (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC 25922)	Negativa
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach (ATCC 29213)	Positiva
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter) Migula (ATCC 27853)	Negativa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter) Migula (ATCC 9027)	Negativa

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

A escolha das cepas baseou-se no documento publicado pela OMS no ano de 2017 contendo uma lista de patógenos resistentes que devem ser prioridade na pesquisa de novos antimicrobianos e no trabalho de Fernandes (2019) realizado previamente no Laboratório de Bioatividade Celular e Molecular (LBCM) do Centro de Pesquisas Farmacêuticas da UFJF (WHO, 2017). O grupo escolhido incluiu cepas de referência Gram-positiva [*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 29213)] e Gram-negativa fermentadora [*Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC 25922)] e não-fermentadora [*Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula (ATCC 27853 e ATCC 9027)] padronizadas pela organização *American Type Culture Collection* (ATCC) provenientes do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro (Brasil) e armazenadas no LBCM.

Como controle positivo, foram utilizados os antimicrobianos ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL) e levofloxacina (LEVO) devido aos seus diferentes modos de ação (CLSI, 2015). AMP é uma penicilina de largo espectro e seu mecanismo de ação decorre da inibição das transpeptidases que participam da síntese do peptidoglicano. LEVO é uma quinolona que atua inibindo a topoisomerase II, uma enzima essencial para a transcrição ou replicação do DNA bacteriano. Já CHL é capaz de se ligar na subunidade 50S do ribossomo bacteriano e impedir a síntese proteica das bactérias (RANG *et al.*, 2016).

4.3.1 Preparo das soluções estoque do extrato e dos antibióticos

Uma solução estoque de 10 mg/mL do EE-CaL foi preparada. Pesou-se 10 mg do extrato e transferiu-se para um eppendorf estéril. Adicionou-se 20 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e homogeneizou-se com agitador tipo vórtex. Um total de 100 µL de etanol P.A. foi adicionado e homogeneizou-se com vórtex. O eppendorf foi levado ao banho de ultrassom sem aquecimento durante 5 min (Embrasol Tec®, modelo LimpSonic, Itanhaém, Brasil). Após este tempo, adicionou-se 880 µL de água destilada, homogeneizou-se com vórtex e levou-se por mais 5 min ao banho de ultrassom. Considerando a diluição nos poços das placas de microtitulação, a quantidade de DMSO adicionada para solubilizar o extrato não ultrapassou o limite de 1% indicado pelo documento M100-S30 (CLSI, 2020). A quantidade de etanol P.A. utilizada para solubilizar o EE-CaL não afetou o crescimento bacteriano,

conforme observado nos controles dos solventes e diluentes realizados durante o teste.

Uma solução estoque inicial de 1 mg/mL dos antibióticos foi preparada com os solventes e diluentes apropriados conforme as recomendações do documento M100-S30 (CLSI, 2020). O solvente utilizado para a AMP foi o tampão fosfato pH 8,0 0,1 mol/L e o diluente foi o tampão fosfato pH 6,0 0,1 mol/L até completar o volume de 1 mL. O solvente utilizado no CHL foi uma solução de etanol a 95% e a água destilada foi o diluente até completar o volume total de 1 mL. LEVO foi dissolvida em solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 mol/L e o volume foi completado até 1 mL com água destilada.

4.3.2 Preparo do inóculo bacteriano padronizado

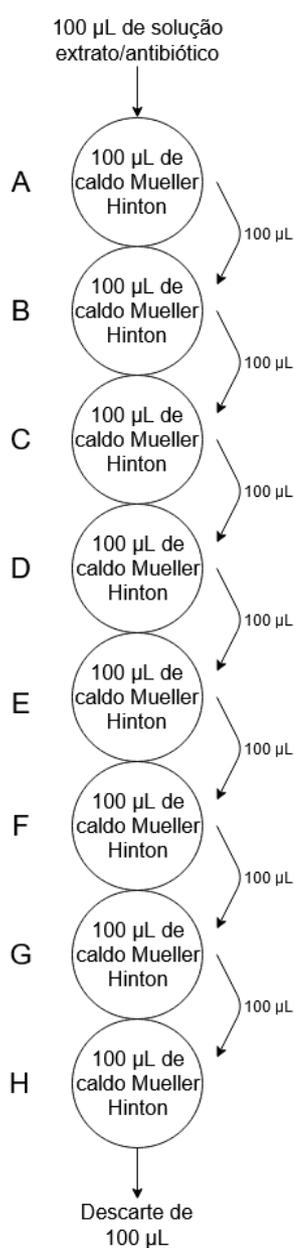
As cepas foram ativadas previamente em caldo BHI (Acumedia[®], Lansing, MI, EUA) pelo período de 18 a 24 h a 37 °C em aerobiose. Realizou-se um repique para Ágar Müeller Hinton e incubou-se novamente pelo período de 18 a 24 h a 37 °C em aerobiose. Preparou-se uma suspensão bacteriana padronizada a partir de colônias isoladas no Ágar Müeller Hinton e solução estéril de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% p/v (peso por volume). A padronização foi determinada conforme o documento M07-A10 (CLSI, 2015). O ajuste da turbidez da suspensão foi realizado com auxílio de espectrofotômetro (BEL[®] Photonics do Brasil, modelo Bel SPECTRO S05, Piracicaba, SP, Brasil) no comprimento de onda de 625 nm até que a absorbância ficasse entre 0,08 e 0,13. Esta faixa de absorbância corresponde a 0,5 na escala de McFarland, ou seja, a concentração bacteriana no inóculo foi padronizada entre 1-2 x 10⁸ Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL (UFC/mL). A suspensão foi utilizada nos testes seguintes.

4.3.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O método de microdiluição em caldo foi utilizado para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), conforme as especificações do CLSI no documento M07-A10 (CLSI, 2015). Em placas de microtitulação com 96 poços, adicionou-se 100 µL de Caldo Müeller Hinton (Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) em todos os poços. Um total de 100 µL da solução estoque de EE-CaL foram

adicionados em 4 poços da linha A (quadruplicata) e homogeneizou-se. Procedeu-se, então, uma diluição seriada, de forma que 100 μ L dos 4 poços da linha A foram transferidos para a fileira B e a solução resultante foi homogeneizada. O mesmo foi feito da fileira B até a última fileira H. Descartou-se 100 μ L da fileira H a fim de manter igual volume em todas as linhas (Figura 10). O resultado foi uma diluição de 5.000 μ g/mL na linha A até 40 μ g/mL na última linha H. Um total de 10 μ L da suspensão bacteriana padronizada foi adicionada em cada poço.

Figura 10 – Esquema demonstrativo da diluição seriada realizada na placa de microtitulação

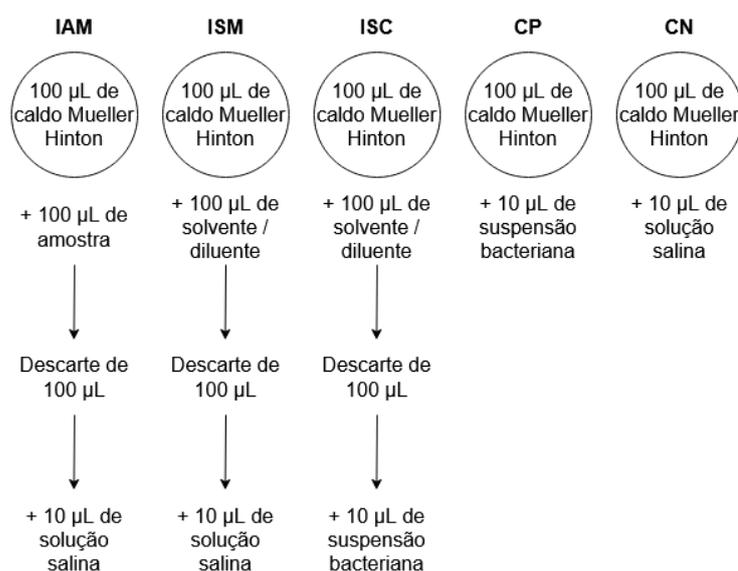


Fonte: adaptado de Fernandes, 2019.

Em outra placa de microtitulação, adicionou-se 100 μL de Caldo Müller Hinton em todos os poços. Procedeu-se a adição de 100 μL de cada antibiótico na linha A em triplicata (3 colunas para cada antibiótico). Procedeu-se a mesma diluição seriada aplicada ao extrato (Figura 11). Descartou-se 100 μL da fileira H a fim de manter igual volume em todas as linhas. O resultado foi uma diluição de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ na linha A até 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ na última linha H. Um total de 10 μL da suspensão bacteriana padronizada foi adicionada em cada poço.

Os controles foram preparados para validar o teste. Foi avaliada a influência das amostras (extrato e antibióticos) sobre o meio caldo Müller Hinton (IAM), dos solventes e diluentes sobre o meio (ISM) e sobre o crescimento bacteriano (ISC) e controles positivo (CP) e negativo (CN). Os controles garantem que não há contaminação microbiana nas amostras, que os solventes e diluentes não estão contaminados e não interferem no crescimento bacteriano e que o meio utilizado está estéril e é capaz de promover o crescimento bacteriano. Os dados sobre a composição dos controles estão presentes no Figura 11. A organização dos antibióticos, extratos e controles está representada nas Figuras 12 e 13.

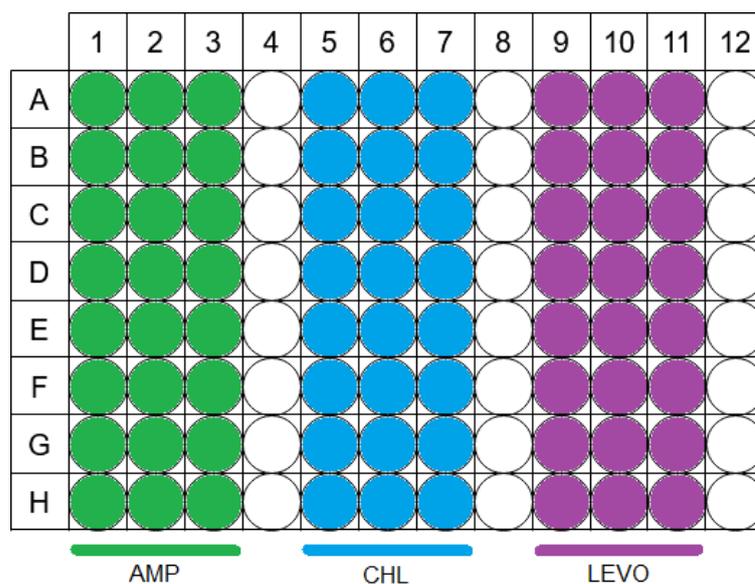
Figura 11 - Esquema ilustrativo da composição dos controles para o teste de microdiluição em caldo



Legenda: IAM: influência das amostras (extrato e antibióticos) sobre o meio caldo Müller Hinton; ISM: influência dos solventes e diluentes sobre o meio; ISC: influência dos solventes e diluentes sobre o crescimento bacteriano; CP: controle positivo; CN: controle negativo.

Fonte: adaptado de Fernandes, 2019.

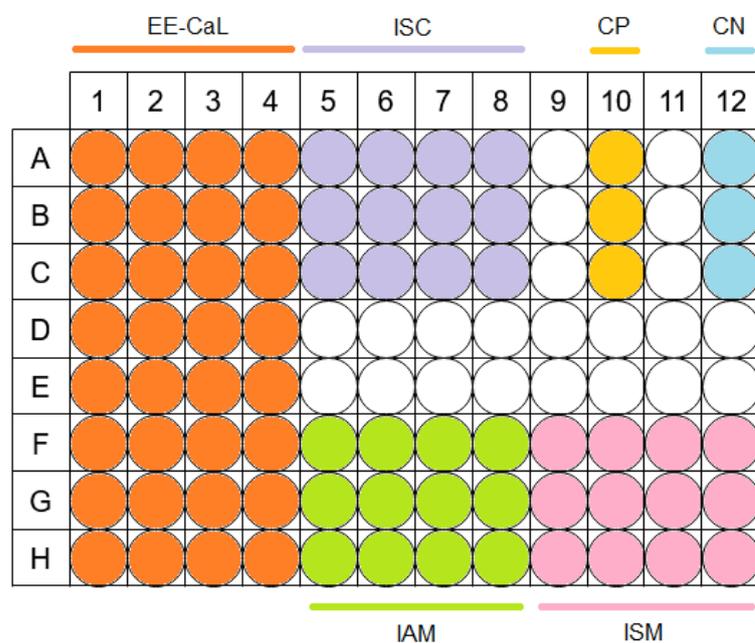
Figura 12 - Esquema ilustrativo da organização dos antibióticos na placa de microtitulação



Legenda: AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol; LEVO: levofloxacina.

Fonte: adaptado de Fernandes, 2019.

Figura 13 - Esquema ilustrativo da organização de EE-CaL e controles na placa de microtitulação



Legenda: IAM: influência das amostras (extrato e antibióticos) sobre o meio caldo Mueller Hinton; ISM: influência dos solventes e diluentes sobre o meio; ISC: influência dos solventes e diluentes sobre o crescimento bacteriano; CP: controle positivo; CN: controle negativo.

Fonte: adaptado de Fernandes, 2019.

Todas as placas de microtitulação foram incubadas em estufa a 35 ± 2 °C de 16 a 20 h em aerobiose. Após o tempo de incubação, procedeu-se a adição de 20 μ L de solução aquosa do indicador biológico cloreto de iodonitrotetrazólio (INT) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) a 1 mg/mL em cada poço para auxiliar na visualização de crescimento bacteriano. O indicador é capaz de conferir coloração rosa/avermelhada ao meio na presença de células bacterianas. Os poços correspondentes a quadruplicata do EE-CaL não receberam o INT a fim de permitir a realização da CBM. As placas foram novamente incubadas nas mesmas condições por 30 min. O poço com a menor concentração de extrato cujo crescimento bacteriano não foi visível equivaleu à Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato frente a cepa correspondente.

4.3.4 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CBM foi determinada pelo método descrito por Andrews (2001) e adaptado por Fernandes (2019) com alteração do meio utilizado. Coletou-se uma alíquota de 10 μ L dos poços do EE-CaL em quadruplicata (sem revelador INT) que não apresentaram crescimento bacteriano visível (CIM) e dos poços com concentrações superiores. A alíquota foi transferida para uma placa de Petri contendo Ágar Müeller Hinton através do método de *drop plate*. As placas foram incubadas em estufa a 35 ± 2 °C de 18 a 20 h em aerobiose. Determinou-se a CBM quando não houve crescimento bacteriano visível após a incubação das placas. O efeito foi classificado como bactericida ou bacteriostático.

4.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO

A caracterização química de EE-CaL foi realizada empregando-se a técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) acoplada à técnica de espectrometria de massas com analisador quadrupolo e tempo de voo (CLUE-EM-Q-ToF) com ionização por eletrospray nos modos negativo e positivo na Central Analítica de Bioprodutos e Bioprocessos (CENTRALBIO) da Faculdade de Farmácia da UFJF. O equipamento utilizado foi Acquity Xevo G2-S Q-ToF UPLC-MS (Waters®, Milford, Massachusetts, EUA) com coluna Acquity UPLC® BEH C18 (100 mm \times 2,1 mm \times 1,7 μ m) (Waters®, Milford, Massachusetts, EUA) a 45,0 °C.

Foram preparadas em triplicatas soluções metanólicas de EE-CaL na concentração de 2 mg/mL. As soluções foram filtradas através de filtro de 0,22 µm. Todas as amostras foram mantidas no amostrador a 18,2 °C. O volume de injeção foi de 4,2 µL e fluxo da fase móvel de 0,300 mL/min. Cada corrida cromatográfica teve a duração de 12 minutos. A fase móvel A consistiu em ácido fórmico a 0,1% em água e a fase móvel B consistiu em metanol. O gradiente dos solventes A e B ao longo da cromatografia está descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Gradiente das fases móveis utilizado na cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE)

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)	Curva
Inicial	0,300	95,0	5,0	Inicial
2,00	0,300	60,0	40,0	6
4,00	0,300	20,0	80,0	6
8,00	0,300	0,0	100,0	6
10,00	0,300	0,0	100,0	1
12,00	0,300	95,0	5,0	1

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

A energia de colisão na função 1 foi de 6 eV e na função 2 foi de 10 a 30 eV com um intervalo de relação massa-carga (m/z) entre 100 e 900 Da. Os parâmetros experimentais do instrumento foram: capilar 3,00 kV; cone de amostragem 40,00 V; temperatura da fonte 150 °C; temperatura de dessolvatação 500 °C; fluxo de gás cone 50,0 L/h; fluxo de gás de dessolvatação 1000,0 L/h. O *software* utilizado foi o Masslynx v 4.1 (Waters®, Milford, Massachusetts, EUA).

A caracterização dos compostos encontrados no extrato foi realizada por meio da interpretação de seus espectros de massa e dos padrões de fragmentação obtidos, levando em consideração os dados encontrados na literatura, comparação do tempo de retenção e espectro de massas dos padrões de ácido quínico (pureza ≥ 96%), ácido cafeico (pureza ≥ 98%), cafeína (pureza ≥ 99%), 5-ACQ (pureza ≥ 95%) e mangiferina (pureza ≥ 98%) (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO*

O EE-CaL apresentou CIM de 2500 µg/mL frente *E. coli* (ATCC 25922) e efeito bactericida (Figuras 14 e 16). A CIM frente *S. aureus* (ATCC 29213) foi de 5000 µg/mL e efeito bacteriostático (Figura 15). No caso dos testes contra *P. aeruginosa* (ATCC 27853 e ATCC 9027), a CIM para ambas foi superior a 5000 µg/mL. Portanto, os valores da CBM não foram estabelecidos para estas cepas. Todos os dados estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EE-CaL e dos antibióticos frente as cepas bacterianas testadas

Cepa	Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL			
	EE-CaL	AMP	CHL	LEVO
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	2500	< 4	8	< 4
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	5000	< 4	16	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	> 5000	> 500	500	< 4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	> 5000	> 500	125	< 4

Legenda: EE-CaL: extrato etanólico liofilizado de folhas de *Coffea arabica* L.; AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol; LEVO: levofloxacina; NT: não testado.

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Os valores de CIM para os antibióticos estão dentro das faixas indicadas pelo documento M100 30^a ed. (CLSI, 2020) conforme a Tabela 3.

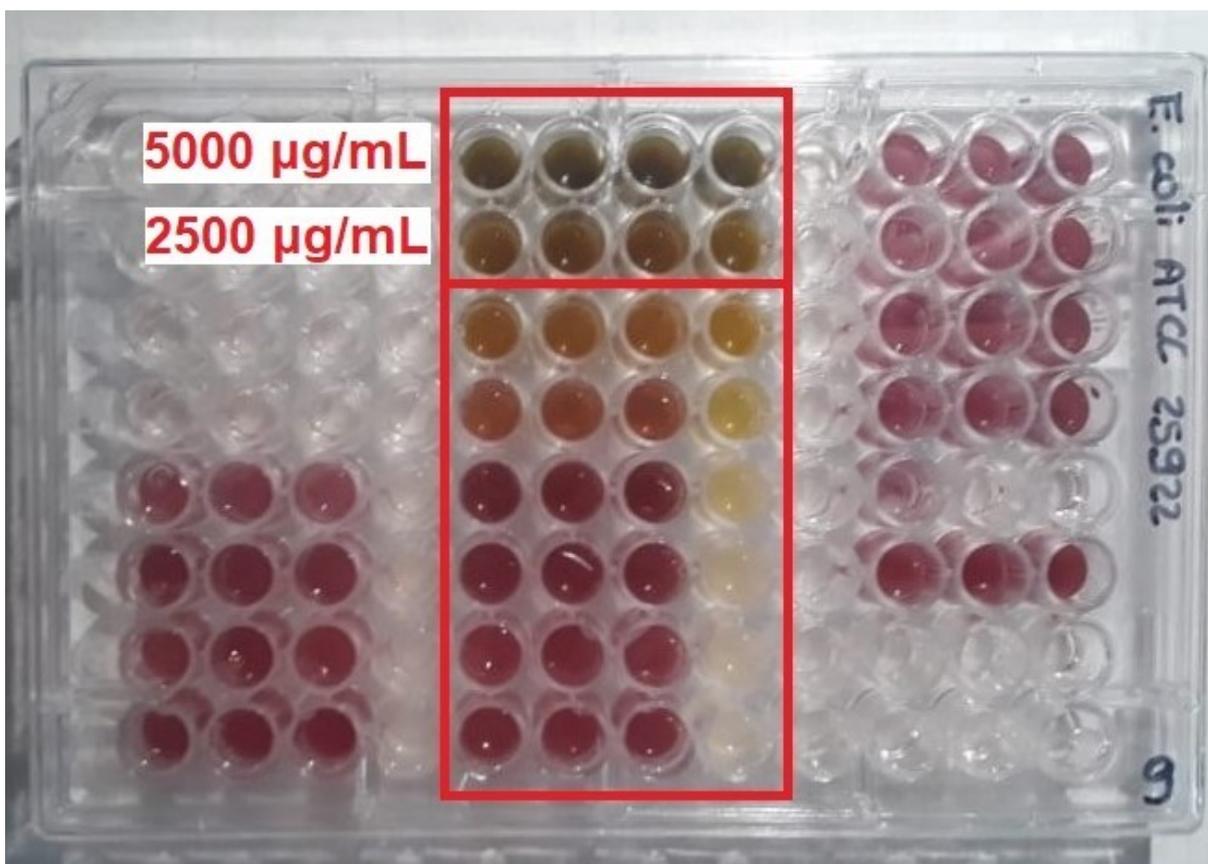
Tabela 3 - Faixas de Concentração Inibitória Mínima (CIM) recomendadas pelo documento M100-S30 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para organismos não fastidiosos

Cepa	Faixa recomendada em $\mu\text{g/mL}$		
	AMP	CHL	LEVO
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	2-8	2-8	0,008-0,06
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	0,5-2	2-16	0,25-2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	NT	NT	0,5-4

Legenda: AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol; LEVO: levofloxacina; NT: não testado.

Fonte: elaborado pelo autor com base no documento M100-S30 (CLSI, 2020).

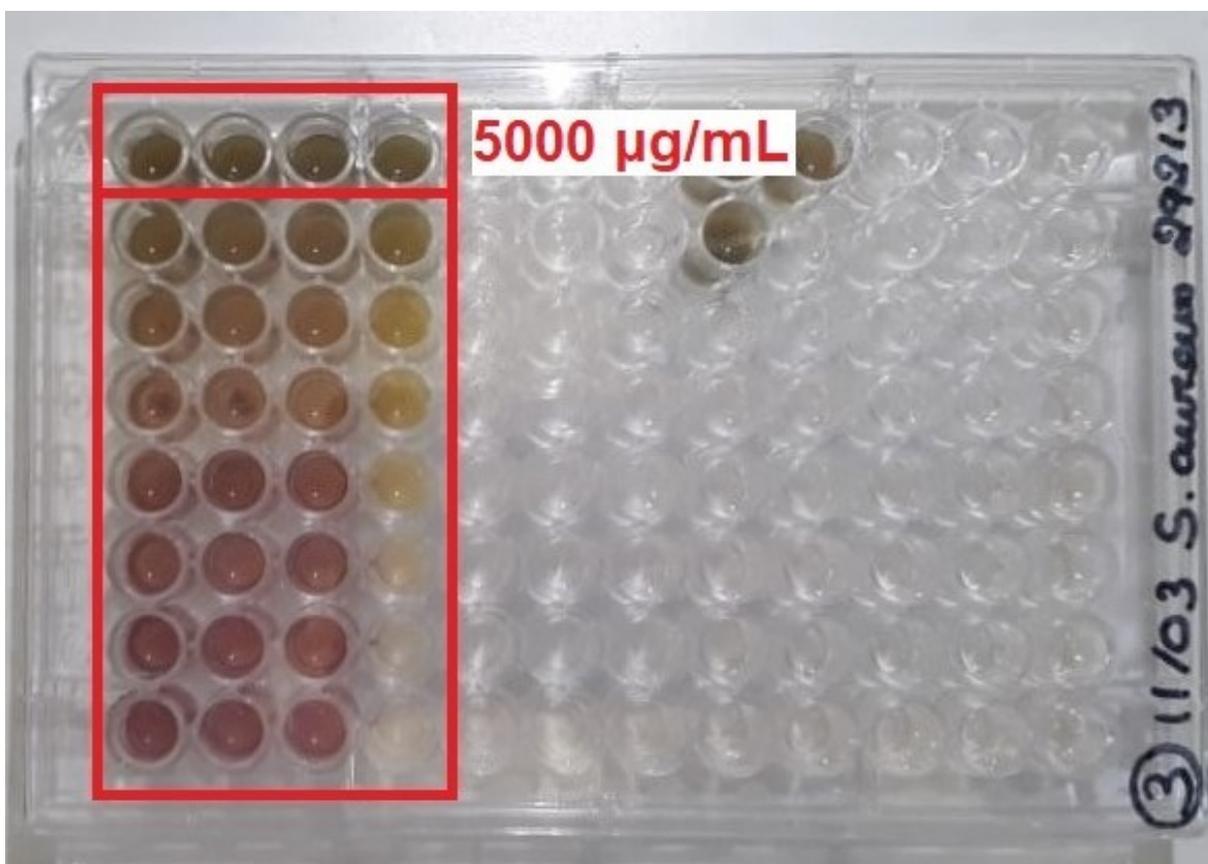
Figura 14 - Fotografia ilustrativa da organização da placa de microtitulação utilizada no teste para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) com *Escherichia coli* (ATCC 25922)



Os poços das linhas A (5000 $\mu\text{g/mL}$) e B (2500 $\mu\text{g/mL}$) não turvaram e não apresentaram coloração vermelha do indicador INT.

Fonte: elaborado pelo autor (2020).

Figura 15 - Fotografia ilustrativa da organização da placa de microtitulação utilizada no teste para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) com *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)

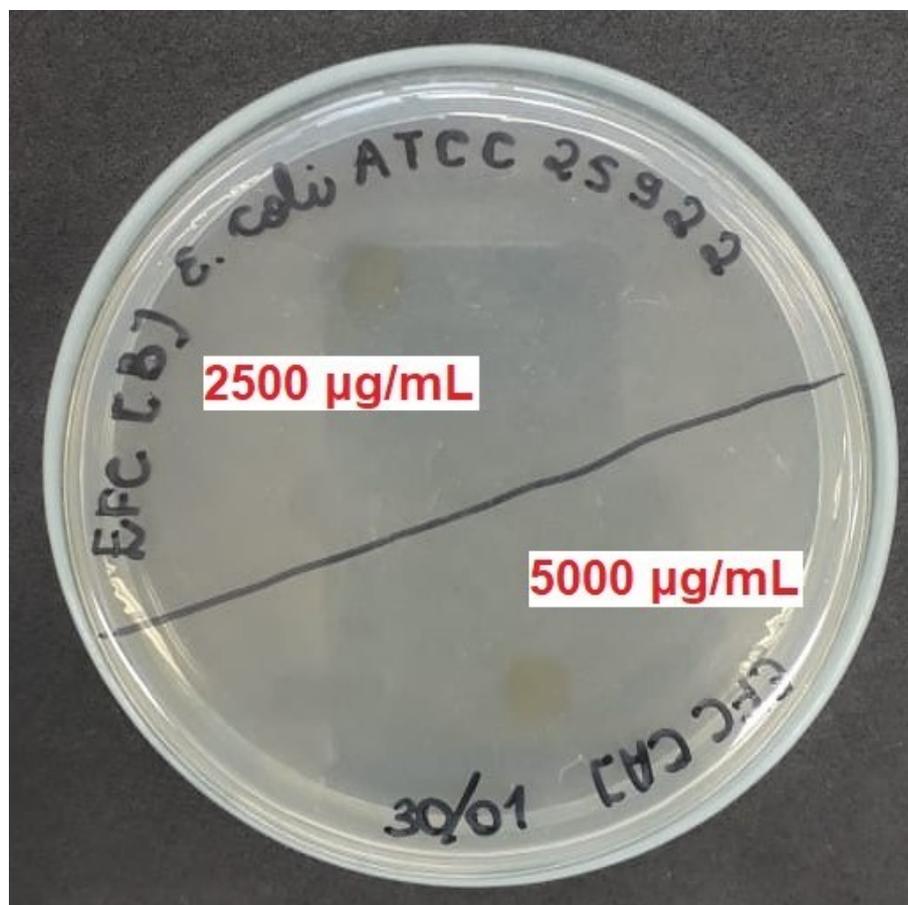


Os poços da linha A (5000 µg/mL) não turvaram e não apresentaram coloração vermelha do indicador INT.

Fonte: elaborada pelo autor (2020).

A CIM do EE-CaL para *E. coli* (ATCC 25922) (Gram-negativa) foi mais baixa em comparação com a CIM para *S. aureus* (ATCC 29213) (Gram-positiva) e o efeito do EE-CaL frente a *E. coli* (ATCC 25922) foi classificado como bactericida (Figura 16). Este resultado corrobora os dados encontrados por Kencono *et al.* (2019b) em que o extrato em acetato de etila de folhas de *C. canephora* foi mais efetivo contra *Edwardsiella tarda* (Gram-negativa) em comparação com *Streptococcus agalactiae* (Gram-positiva), o que levou os autores a sugerirem que o extrato de folhas de café pode ser mais efetivo contra bactérias Gram-negativas. A ineficácia do extrato frente a *P. aeruginosa* Gram-negativa (ATCC 27853 e ATCC 9027) pode estar relacionada à resistência natural desta cepa contra muitas classes de drogas (STRATEVA; YORDANOV, 2009).

Figura 16 - Fotografia ilustrativa da organização da placa de Petri utilizada no teste para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) para *Escherichia coli* (ATCC 25922)



As microgotas dos poços A (5000 µg/mL) e B (2500 µg/mL) não apresentaram crescimento bacteriano visível.
Fonte: elaborada pelo autor (2020).

Estudos publicados até o momento com extratos de folhas de café indicam atividade antibacteriana desses extratos frente a *S. aureus* e *E. coli* por meio de outras metodologias, o que corrobora os resultados obtidos neste estudo. A atividade dos extratos metanólicos das folhas de café arábica e *C. canephora* em 100 e 200 µg/mL frente a *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* através do método de *cup plate* foi previamente descrita por Nayeem, Denny e Mehta (2011). Em outro estudo, a atividade antibacteriana de diferentes frações (hexano, acetato de etila, água e etanol) do extrato etanólico das folhas de *C. canephora*, foram testadas frente a *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923) usando o método de difusão em disco. A fração acetato de etila apresentou a melhor inibição contra essas bactérias em relação às demais frações, variando entre 14,58 mm

(concentração de 5%) e 18,58 mm (15%) frente a *S. aureus* e variando entre 12,08 mm (10%) e 17,28 mm (15%) frente a *E. coli*. A fração em etanol não apresentou inibição frente a *E. coli* a 5%, mas apresentou o maior diâmetro de inibição (14,80 mm) frente a esta cepa a 10% e o segundo maior diâmetro de inibição (15,27 mm) a 15% (MUSLIM; DEPHINTO, 2019).

Da mesma forma, o presente estudo demonstrou atividade de EE-CaL frente a *E. coli* e *S. aureus*, sendo a atividade frente a *E. coli* a mais promissora. Vale ressaltar que a atividade frente a *E. coli* foi obtida com CIM de 2500 µg/mL e efeito bactericida. Ambas as bactérias estão presentes na lista publicada pela OMS que trata de bactérias patogênicas resistentes cuja pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos devem ser priorizados (OMS, 2017).

5.2 ANÁLISE QUÍMICA DO EXTRATO

A análise química do EE-CaL foi realizada através de CLUE-EM-Q-ToF para identificar os principais compostos químicos presentes nesse extrato. A identificação foi conduzida a partir da análise dos picos principais e respectivos fragmentos seguida da comparação com dados dos padrões e da literatura.

A injeção de solvente metanol resultou em picos que foram devidamente desconsiderados nos cromatogramas do EE-CaL. Todos os picos com razão massa carga (m/z) definida foram selecionados para posterior identificação.

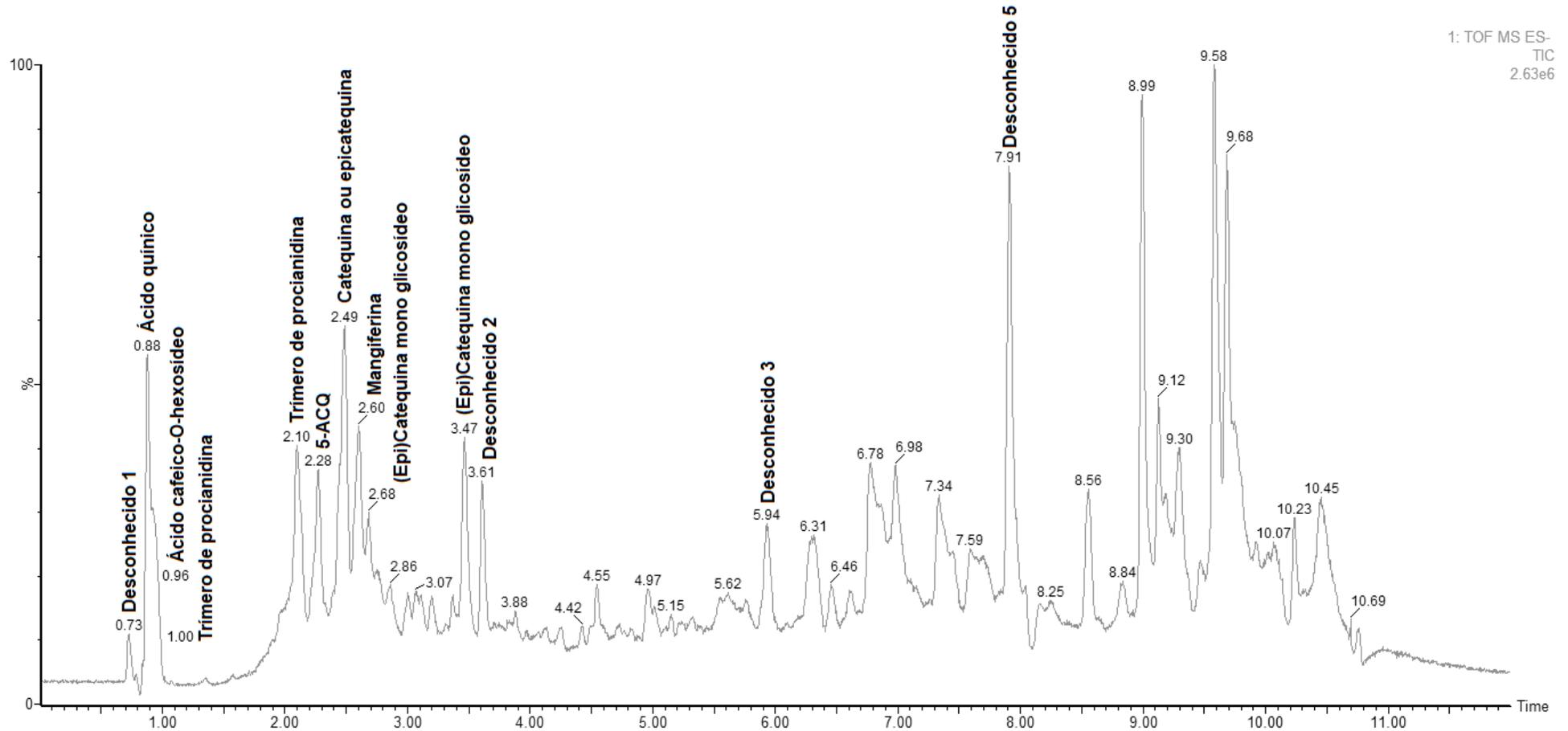
Na Tabela 4 e Figura 17 e na Tabela 5 e Figura 18 estão descritos os compostos químicos encontrados nas análises em modo negativo e positivo, respectivamente.

Tabela 4 - Compostos químicos majoritários encontrados em EE-CaL através da análise em CLUE-EM-Q-ToF no modo negativo

Tempo de retenção (min)	Composto químico	Peso molecular (Da)	Razão massa carga (m/z)	Picos de fragmentação (m/z)	Referências
0,732	Desconhecido 1	274	272,9589 [M-H] ⁻	159; 131	
0,881	Ácido quínico	192	191,0565 [M-H] ⁻	127	Padrão. Bertges <i>et al.</i> (2020)
0,961	Ácido cafeico-O-hexosídeo	342	341,1085 [M-H] ⁻	179; 135; 119	Miklavčič Višnjevec <i>et al.</i> (2021)
1,003	Trímero de procianidina	864	863,1744 [M-H] ⁻	711; 573; 411; 289; 125	Gong <i>et al.</i> (2018). Karonen <i>et al.</i> (2021). Ngamsuk <i>et al.</i> (2019). Sui <i>et al.</i> (2016)
2,103	Trímero de procianidina	864	863,1865 [M-H] ⁻	711; 693; 573; 559; 451; 411; 289; 125	Gong <i>et al.</i> (2018). Karonen <i>et al.</i> (2021). Ngamsuk <i>et al.</i> (2019); Sui <i>et al.</i> (2016)
2,271	Ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ)	354	353,0858 [M-H] ⁻	191	Padrão. Bertges <i>et al.</i> (2020)
2,493	Catequina ou epicatequina	290	289,0735 [M-H] ⁻	245; 205; 203; 179; 125	Di Lorenzo <i>et al.</i> (2019). Gong <i>et al.</i> (2018). Ngamsuk <i>et al.</i> (2019). Stöggel <i>et al.</i> (2004). Sui <i>et al.</i> (2016). Sun <i>et al.</i> (2007)
2,593	Mangiferina	422	421,0764 [M-H] ⁻	331; 301; 271; 259	Padrão. Ramirez <i>et al.</i> (2014)
2,681	(Epi)Catequina mono glicosídeo	452	451,1034 [M-H] ⁻	341; 289; 177	De Souza Mesquita <i>et al.</i> (2019). Zerbib <i>et al.</i> (2018)
3,470	(Epi)Catequina mono glicosídeo	452	451,1078 [M-H] ⁻	341; 289; 177	De Souza Mesquita <i>et al.</i> (2019). Zerbib <i>et al.</i> (2018)
3,612	Desconhecido 2	348	347,1838 [M-H] ⁻	303; 285	
5,933	Desconhecido 3	294	293,2086 [M-H] ⁻	275; 248; 184; 171; 121; 113	
7,912	Desconhecido 5	278	277,2159 [M-H] ⁻	183	

Fonte: elaborada pelo autor (2021).

Figura 17 - Cromatograma de EE-CaL obtido por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à técnica de espectrometria de massas com analisador quadrupolo e tempo de voo (CLUE-EM-Q-ToF) em modo negativo



Fonte: elaborado pelo autor (2021).

No modo de ionização negativa, foram observados compostos como o ácido quínico (t_R 0,881 min) com m/z 191,0565 e fragmento 127, sendo confirmado pelo padrão de ácido quínico e dados da literatura (BERTGES *et al.*, 2020), o ácido cafeico-O-hexosídeo (t_R 0,961 min) com m/z 341,1085 e fragmentos 179, 135, 119 que foi tentativamente identificado (MIKLAVČIČ VIŠNJEVEC *et al.*, 2021) assim como o ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) (t_R 2,271 min) com m/z 353,0858 e fragmento 191 confirmado com o padrão de 5-ACQ e dados da literatura (BERTGES *et al.*, 2020).

Também foram encontrados compostos como a catequina ou epicatequina (t_R 2,493 min) com m/z 289,0735 e fragmentos 245, 205, 203, 179 e 125 tentativamente identificada (DI LORENZO *et al.*, 2019; GONG *et al.*, 2018; NGAMSUK *et al.*, 2019; STÖGGL *et al.*, 2004; SUI *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2007) e compostos derivados como trímero de procianidina (t_R 1,003 min) com m/z 863,1744 e fragmentos 711, 573, 411, 289 e 125 (GONG *et al.*, 2018; KARONEN *et al.*, 2021; NGAMSUK *et al.*, 2019; SUI *et al.*, 2016), trímero de procianidina em outro tempo de retenção (t_R 2,103 min) com m/z 863,1865 e fragmentos 711, 693, 573, 559, 451, 411, 289 e 125 (GONG *et al.*, 2018; KARONEN *et al.*, 2021; NGAMSUK *et al.*, 2019; SUI *et al.*, 2016) além de (epi)catequina mono glicosídeo (t_R 2,681 min) com m/z 451,1034 e fragmentos 341, 289 e 177 (DE SOUZA MESQUITA *et al.*, 2019; ZERBIB *et al.*, 2018) e (epi)catequina mono glicosídeo em outro tempo de retenção (t_R 3,470 min) com m/z 451,1078 e fragmentos 341, 289 and 177 (DE SOUZA MESQUITA *et al.*, 2019; ZERBIB *et al.*, 2018) tentativamente identificados.

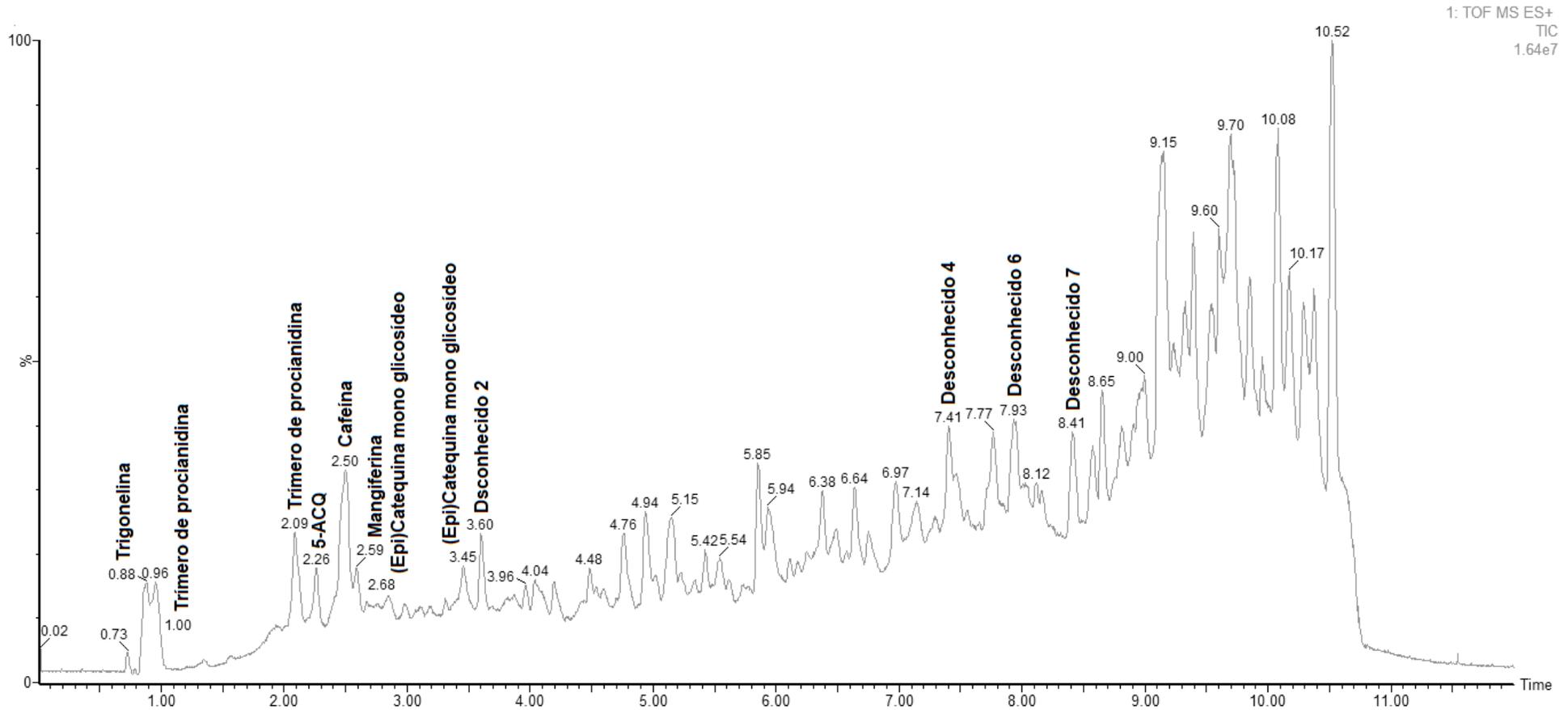
Por fim, foi identificada a mangiferina (t_R 2,593 min) com m/z 421,0764 e fragmentos 331, 301, 271 e 259 confirmada com padrão de mangiferina e dados da literatura (RAMIREZ *et al.*, 2014). Os demais compostos não foram identificados e foram descritos como desconhecido 1 (t_R 0,732 min) com razão massa carga (m/z) 272,9589 e fragmentos principais 159 e 131; desconhecido 2 (t_R 3,612) com m/z 347,1838 e fragmentos 303 e 285; desconhecido 3 (t_R 5,933) com m/z 293,2086 e fragmentos 275, 248, 184, 171, 121 e 113; e desconhecido 5 (t_R 7,912 min) com m/z 277,2159 e fragmento 183. Em contraste com Patay *et al.* 2016, o ácido cafeico não foi identificado no modo negativo.

Tabela 5 - Compostos químicos majoritários encontrados em EE-CaL através da análise em CLUE-EM-Q-ToF no modo positivo

Tempo de retenção (min)	Composto químico	Peso molecular (Da)	Razão massa carga (m/z)	Picos de fragmentação (m/z)	Referências
0,870	Trigonelina	137	138,0786 [M+H] ⁺	110	Bertges <i>et al.</i> (2020). Chen, Ma, Kitts (2018). Wood <i>et al.</i> (2002)
1,003	Trímero de procianidina	864	865,1731 [M+H] ⁺	713; 575; 533; 411; 287	Gong <i>et al.</i> (2018). Ngamsuk <i>et al.</i> (2019)
2,103	Trímero de procianidina	864	865,1190 [M+H] ⁺	713; 575; 533; 411; 287	Gong <i>et al.</i> (2018). Ngamsuk <i>et al.</i> (2019)
2,271	Ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ)	354	377,0771 [M+Na] ⁺	361; 163; 145; 135; 117	Padrão. Bertges <i>et al.</i> (2020)
2,501	Cafeína	194	195,2660 [M+H] ⁺	138; 123; 110	Padrão. Bertges <i>et al.</i> (2020)
2,593	Mangiferina	422	423,1075 [M+H] ⁺	405; 327; 303; 273	Padrão. Qiu <i>et al.</i> (2016)
2,681	(Epi)Catequina mono glicosídeo	452	475,0848 [M+Na] ⁺	453; 246	Zhu <i>et al.</i> (2018)
3,470	(Epi)Catequina mono glicosídeo	452	475,0714 [M+Na] ⁺	453; 246	Zhu <i>et al.</i> (2018)
3,612	Desconhecido 2	348	371,1526 [M+Na] ⁺	355; 331; 273	
7,410	Desconhecido 4	374	375,2805 [M+H] ⁺	359; 317; 256	
7,931	Desconhecido 6	376	377,3154 [M+H] ⁺	323; 317; 301; 279	
8,414	Desconhecido 7	354	353,3374 [M+H] ⁺	337; 313; 295	

Fonte: elaborada pelo autor (2021).

Figura 18 - Cromatograma de EE-CaL obtido por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à técnica de espectrometria de massas com analisador quadrupolo e tempo de voo (CLUE-EM-Q-ToF) em modo positivo



Fonte: elaborado pelo autor (2021).

No modo de ionização positiva, foram encontrados compostos alcaloides como a trigonelina (t_R 0,870 min) com m/z 138,0786 e fragmento 110 tentativamente identificada (BERTGES *et al.*, 2020; CHEN; MA; KITTS, 2018; WOOD *et al.*, 2002) e a cafeína (t_R 2,501 min) com m/z 195,2660 e fragmentos 138, 123 e 110 confirmados com padrão de cafeína e dados da literatura (BERTGES *et al.*, 2020). Observou-se também o ácido clorogênico 5-ACQ (t_R 2,271 min) com m/z 377,0771 e fragmentos 361, 163, 145, 135 e 117 confirmado com o padrão de 5-ACQ e dados da literatura (BERTGES *et al.*, 2020).

Compostos derivados da catequina ou epicatequina também foram encontrados como trímero de procianidina (t_R 1,003 min) com m/z 865,1731 e fragmentos 713, 575, 533, 411 e 287 (GONG *et al.*, 2018; NGAMSUK *et al.*, 2019), trímero de procianidina em outro tempo de retenção (t_R 2,103 min) com m/z 865,1190 e fragmentos 713, 575, 533, 411 e 287 (GONG *et al.*, 2018; NGAMSUK *et al.*, 2019), (epi)catequina mono glicosídeo (t_R 2,681 min) com m/z 475,0848 e fragmentos 453 e 246 (ZHU *et al.*, 2018) e (epi)catequina mono glicosídeo em outro tempo de retenção (t_R 3,470 min) com m/z 475,0714 e fragmentos 453 e 246 (ZHU *et al.*, 2018) tentativamente identificados.

Por último, foi identificada a mangiferina (t_R 2,593 min) com m/z 423,1075 e fragmentos 405, 327, 303 e 273 confirmada com padrão de mangiferina e dados da literatura (QIU *et al.*, 2016). Os demais compostos não foram identificados e foram descritos como desconhecido 2 (t_R 3,612 min) com m/z 371,1526 e fragmentos 355, 331 e 273; desconhecido 4 (t_R 7,410 min) com m/z 375,2805 e fragmentos 359, 317 e 256; desconhecido 6 (t_R 7,931 min) com m/z 377,3154 e fragmentos 323, 317, 301 e 279; e desconhecido 7 (t_R 8,414 min) com m/z 353,3374 e fragmentos 337, 313 e 295. O ácido cafeico também não foi identificado no modo positivo.

A análise química de EE-CaL permitiu a detecção de compostos da classe dos alcaloides, como a trigonelina e a cafeína, além de compostos fenólicos como o ácido quínico, 5-ACQ, ácido cafeico-O-hexosídeo, mangiferina, (epi)catequina, (epi)catequina mono glicosídeo e trímero de procianidina. Alguns compostos não foram identificados e foram então descritos como desconhecidos 1-7. A razão massa/carga (m/z) de seus picos principais e picos de fragmentação estão devidamente apresentados na Tabelas 4 e 5.

Compostos como a trigonelina (MONTEIRO *et al.*, 2020), cafeína (ACIDRI *et al.*, 2020), ácido quínico (FARAH; DONANGELO, 2006), 5-ACQ (CACERES *et al.*,

2020), mangiferina (DE ALMEIDA *et al.*, 2019) e a (epi)catequina (RATANAMARNO; SURBKAR, 2017) já foram detectados previamente nas folhas de café (CHEN, 2019). O ácido cafeico, contudo, não foi detectado no EE-CaL. O ácido cafeico faz parte do grupo dos ácidos hidroxicinâmicos e seus ésteres com o ácido quínico formam o grupo dos ácidos clorogênicos, que por sua vez inclui o 5-ACQ (MONDOLOT *et al.*, 2006). Portanto, é possível que a maior parte do ácido cafeico produzido pelas folhas tenha sido direcionada para a síntese dos ácidos clorogênicos, uma vez que o 5-ACQ foi detectado no extrato, assim como o ácido quínico. A maceração com etanol P.A., metodologia utilizada na extração, também pode ter contribuído para tal resultado.

O ácido cafeico-O-hexosídeo foi tentativamente identificado em EE-CaL (MIKLAVČIČ VIŠNJEVEC *et al.*, 2021), assim como a (epi)catequina mono glicosídeo (DE SOUZA MESQUITA *et al.*, 2019; ZERBIB *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2018) e trímero de procianidina (GONG *et al.*, 2018; KARONEN *et al.*, 2021; NGAMSUK *et al.*, 2019; SUI *et al.*, 2016) que também foram tentativamente identificados. Uma extensa pesquisa na literatura indicou que esta é a primeira vez que o ácido cafeico-O-hexosídeo, a (epi)catequina mono glicosídeo e o trímero de procianidina foram detectados nas folhas de café.

Dados disponíveis na literatura mostram que alguns compostos identificados em EE-CaL podem apresentar atividade antimicrobiana. As atividades antimicrobianas de trigonelina (ÖZÇELIK; KARTAL; ORHAN, 2011), cafeína (BAZZAZ *et al.*, 2018; GAUL; DONEGAN, 2015), ácido quínico (ÖZÇELIK; KARTAL; ORHAN, 2011), 5-ACQ (ÖZÇELIK; KARTAL; ORHAN, 2011) e catequina (GOMES *et al.*, 2018) já foram reportadas previamente frente a fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo cepas de *S. aureus* e *E. coli* ATCC e de isoladas clínicas. Também já foram reportadas atividades antimicrobianas da mangiferina, incluindo atividade frente a *S. aureus* e *E. coli* (MAZLAN *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2012).

No estudo conduzido por Özçelik, Kartal e Orhan (2011), a atividade antimicrobiana de alcaloides, flavonoides e ácidos fenólicos foram avaliadas com cepas provenientes da ATCC, *Refik Saydam Central Hygiene Institute* (RSKK) e isoladas clínicas. Trigonelina, ácido clorogênico e ácido quínico apresentaram atividade frente a todas as cepas testadas, incluindo *E. coli* (ATCC 35218), *P. aeruginosa* (ATCC 10145), *Proteus mirabilis* (ATCC 7002), *K. pneumoniae* (RSKK

574), *Acinetobacter baumannii* (RSKK 02026), *S. aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *B. subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), o que demonstra o potencial antimicrobiano desses compostos (ÖZÇELİK; KARTAL; ORHAN, 2011).

Em relação à cafeína, um estudo conduzido por Gaul e Donegan (2015) investigou a atividade antibacteriana frente a três cepas. A cafeína demonstrou maior inibição de crescimento frente a *Caulobacter crescentus*. A inibição de crescimento frente a *P. mirabilis* e *E. coli* foi observada, mas menos pronunciada. Em outro estudo, a catequina demonstrou a capacidade de atuar sinergicamente com alguns antibióticos frente *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922) (GOMES *et al.*, 2018). Não foram obtidos resultados satisfatórios da catequina junto aos antibióticos frente a *P. aeruginosa* (ATCC 9027) (GOMES *et al.*, 2018).

No estudo conduzido por Singh *et al.* (2012), a mangiferina e algumas análogas demonstraram atividade frente a cepas da *Microbial Type Culture Collection and Gene Bank* (MTCC) *Bacillus pumilus* (MTCC-1607), *Bacillus cerus* (MTCC-430) e *Salmonella virchow* (MTCC-1163). A mangiferina não foi capaz de inibir *P. aeruginosa* (MTCC-741), apenas algumas de suas análogas em altas concentrações. Atividade da mangiferina frente a *E. coli* também já foi relatada previamente (SINGH *et al.*, 2009). Em outro estudo, a mangiferina demonstrou efeito sinérgico com alguns antibacterianos frente a *S. aureus*, revelando-se um composto com potencial na terapia combinada (MAZLAN *et al.*, 2019).

A atividade antibacteriana de EE-CaL frente a *E. coli* e *S. aureus* observada no presente estudo pode estar relacionada com os compostos já relatados, assim como outros compostos presentes no extrato, mas ainda não elucidados. Dessa forma, mais estudos com extratos de folhas de café devem ser conduzidos a fim de elucidar todos os compostos presentes no extrato e encontrar os modos e mecanismos de ação das atividades antimicrobianas já relatadas.

A resistência aos antibacterianos exige mais atenção e pesquisas para evitar o agravamento das infecções resistentes e suas consequências clínicas e econômicas. A busca por novos medicamentos antibacterianos deve considerar a rica diversidade de substâncias bioativas encontradas nas plantas e seus extratos.

Considerando que o Brasil é o maior produtor mundial de café e que as folhas da planta geralmente não são empregadas com finalidade comercial, o estudo da atividade biológica do extrato de folhas de café mostra-se uma alternativa

promissora. A utilização comercial das folhas de café pode apresentar-se como uma nova fonte de recursos para os produtores além de auxiliar no tratamento de doenças infecciosas.

6 CONCLUSÃO

A partir dos estudos realizados com o extrato de folha de café arábica frente aos microrganismos selecionados, observou-se atividade antibacteriana do EE-CaL frente a *E. coli*, apresentando uma CIM de 2500 µg/mL e efeito bactericida. O EE-CaL também foi capaz de inibir *S. aureus* com uma CIM de 5000 µg/mL e efeito bacteriostático.

A análise química de EE-CaL permitiu a detecção de alcaloides, como a trigonelina e a cafeína, e compostos fenólicos como o ácido quínico, 5-ACQ, ácido cafeico-O-hexosídeo, mangiferina, (epi)catequina, (epi)catequina mono glicosídeo e trímero de procianidina. A maioria desses compostos encontrados em EE-CaL possuem atividade antimicrobiana descrita na literatura, o que levanta a possibilidade deles estarem envolvidos na atividade antibacteriana observada no presente estudo. Além disso, esta é a primeira vez que o ácido cafeico-O-hexosídeo, a (epi)catequina mono glicosídeo e o trímero de procianidina foram detectados nas folhas de café.

Novos estudos são necessários para investigar os modos de ação do EE-CaL frente a *E. coli*. O potencial antibacteriano do EE-CaL frente a outras cepas de interesse também deve ser investigado, incluindo cepas clínicas, além de uma avaliação do efeito combinatório do EE-CaL e antibióticos contra as bactérias e também uma avaliação da toxicidade *in vitro* de EE-CaL.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; DUARTE, S. M. S.; LIMA, A. R.; ALVARENGA, D. J.; FERREIRA, E. B. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 414-420, 2010.
- ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; LIMA, A. R.; FERREIRA, E. B.; MALTA, M. R. Compostos bioativos em café integral e descafeinado e qualidade sensorial da bebida. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p.1799-1804, 2008.
- ACIDRI, R.; SAWAI, Y.; SUGIMOTO, Y.; HANDA, T.; SASAGAWA, D.; MASUNAGA, T.; YAMAMOTO, S.; NISHIHARA, E. Phytochemical profile and antioxidant capacity of coffee plant organs compared to green and roasted coffee beans. **Antioxidants**, v. 9, p. 93, 2020.
- ALMEIDA, A. A. P.; FARAH, A.; SILVA, D. A. M.; NUNAN, E. A.; GLÓRIA, M. B. A. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 8738-8743, 2006.
- ALMEIDA, A. A. P.; NAGHETINI, C. C.; SANTOS, V. R.; ANTONIO, A. G.; FARAH, A.; GLÓRIA, M. B. A. Influence of natural coffee compounds, coffee extracts and increased levels of caffeine on the inhibition of *Streptococcus mutans*. **Food Research International**, v. 49, p. 459-461, 2012.
- AMINOV, R. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, p. 1-7, 2010.
- AMINOV, R. History of antimicrobial drug discovery: major classes and health impact. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 4-19, 2017.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p.5-16, 2001.
- ANTONIO, A. G.; IORIO, N. L. P.; PIERRO, V. S. S.; CANDREVA, M. S.; FARAH, A.; DOS SANTOS, K. R. N.; MAIA, L. C. Inhibitory properties of *Coffea canephora* extract against oral bacteria and its effect on demineralisation of deciduous teeth. **Archives of Oral Biology**, v. 56, p. 556-564, 2011.
- ASFEW, Z.; DEKEBO, A. Determination of caffeine content in Wollega Zones, Ethiopian coffee bean, pulp and leaves by high performance liquid chromatography. **Trends in Phytochemical Research**, v. 3, p. 261-274, 2019.
- ASHIHARA, H.; CROZIER, A. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 407-413, 2001.
- ASHIHARA, H.; MONTEIRO, A. M.; GILLIES, F. M.; CROZIER, A. Biosynthesis of caffeine in leaves of coffee. **Plant Physiology**, v. 111, p. 747-753, 1996.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ (ABIC). **Indicadores da Indústria de Café | 2020 - ABIC**. Disponível em: <https://estatisticas.abic.com.br/estatisticas/indicadores-da-industria/indicadores-da-industria-de-cafe-2020/>. Acesso em: 08 mar. 2022.

ATEF, N. M.; SHANAB, S. M.; NEGM, S. I.; ABBAS, Y. A. Evaluation of antimicrobial activity of some plant extracts against antibiotic susceptible and resistant bacterial strains causing wound infection. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, p. 1-11, 2019.

BAZZAZ, B. S. F.; KHAMENEH, B.; OSTAD, M. R. Z.; HOSSEINZADEH, H. *In vitro* evaluation of antibacterial activity of verbascoside, lemon verbena extract and caffeine in combination with gentamicin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* clinical isolates. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 8, p. 246, 2018.

BERTGES, F. S.; DO AMARAL, M. P. H.; RODARTE, M. P.; FONSECA, M. J. V.; SOUSA, O. V.; VILELA, F. M. P.; ALVES, M. S. Assessment of chemical changes and skin penetration of green Arabica coffee beans biotransformed by *Aspergillus oryzae*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, p. 101512, 2020.

BRISDON, D. **Flora of Tropical East Africa - Rubiaceae Volume 2**. 1 ed. Abingdon: Routledge, 1988. 1778 p.

BUBUEANU, C.; PAVALOIU, R.; PIRVU, L. HPTLC profiles and antioxidant activities from leaves to green and roasted beans of *Coffea arabica*. **Malaysian Journal of Medical and Biological Research**, v. 5, p. 31-36, 2018.

CACERES, A.; PINALES-TOBAR, S. A.; RAMOS-MEDINA, M.M.; MARROQUÍN, M. N.; CRUZ, S. M. Alternative use of coffee beans and leaves from seven regions of Guatemala for its antioxidant activity and chemical composition. **International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients**, v. 7, p. 5-11, 2020.

CAMARGO, Â. P.; CAMARGO, M. B. P. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. **Bragantia**, v. 60, p. 65-68, 2001.

CAMPA, C.; MONDOLOT, L.; RAKOTONDRAVAO, A.; BIDEL, L. P. R.; GARGADENNEC, A.; COUTURON, E.; LA FISCA, P.; RAKOTOMALALA, J.-J.; JAY-ALLEMAND, C.; DAVIS, A. P. A survey of mangiferin and hydroxycinnamic acid ester accumulation in coffee (*Coffea*) leaves: biological implications and uses. **Annals Of Botany**, v. 110, p.595-613, 2012.

CAMPANINI-SALINAS, J.; ANDRADES-LAGOS, J.; MELLA-RAJPAN, J.; VASQUEZ-VELASQUEZ, D. Novel classes of antibacterial drugs in clinical development, a hope in a post-antibiotic era. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 1188-1202, 2018.

CHAMCHOD, F.; RUAN, S. Modeling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals: transmission dynamics, antibiotic usage and its history. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, v. 9, p. 25, 2012.

CHEN, X. A review on coffee leaves: phytochemicals, bioactivities and applications. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, v. 59, p.1008-1025, 2019.

CHEN, X.; MA, Z.; KITTS, D. D. Effects of processing method and age of leaves on phytochemical profiles and bioactivity of coffee leaves. **Food Chemistry**, v. 249, p.143-153, 2018.

CHEN, X.; MU, K.; KITTS, D. D. Characterization of phytochemical mixtures with inflammatory modulation potential from coffee leaves processed by green and black tea processing methods. **Food Chemistry**, v. 271, p. 248-258, 2019.

CHIANG, H.-M.; LIN, T.-J.; CHIU, C.-Y.; CHANG, C.-W.; HSU, K.-C.; FAN, P.-C.; WEN, K.-C. *Coffea arabica* extract and its constituents prevent photoaging by suppressing MMPs expression and MAP kinase pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p.309-318, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **CLSI STANDARD M07**: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 10 ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **CLSI SUPPLEMENT M100**: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30 ed. Wayne, PA, EUA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.

CORRÊA, J. L. G.; MENDONÇA, K. S.; RODRIGUES, L. R.; RESENDE, M. L. V.; ALVES, G. E. Spray drying of coffee leaf extract. **Coffee Science**, v. 11, p.359-367, 2016.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. **Plant Secondary Metabolites**: occurrence, structure and role in the human diet. Oxford: Blackwell Publishing, 2008. 384 p.

DA COSTA, A. L. P.; SILVA JUNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, p. 45-57, 2017.

DADO, A. T.; ASRESAHEGN, Y. A.; GOROYA, K. G. Comparative study of caffeine content in beans and leaves of *Coffea arabica* using UV/Vis spectrophotometer. **International Journal of Physical Sciences**, v. 14, p. 171-176, 2019.

DAVIS, R. G. **The bean that is really a seed**. 2019. Disponível em: <https://www.bobdaviswrites.com/blog/the-bean-that-is-really-a-see>. Acesso em 12 jan. 2022.

DE ALMEIDA, R. F.; TREVISAN, M. T. S.; THOMAZIELLO, R. A.; BREUER, A.; KLIKA, K. D.; ULRICH, C. M.; OWEN, R. W. Nutraceutical compounds: echinoids,

flavonoids, xanthenes and caffeine identified and quantitated in the leaves of *Coffea arabica* trees from three regions of Brazil. **Food Research International**, v. 115, p. 493-503, 2019.

DE SOUZA MESQUITA, L. M. S.; RODRIGUES, C. F. B.; ROCHA, C. Q.; BIANCHIM, M. S.; RODRIGUES, C. M.; OLIVEIRA, V. M.; GAETA, H. H.; BELCHOR, M. N.; TOYAMA, M. H.; VILEGAS, W. LC-ESI-IT-MS/MS and MALDI-TOF Approach: Identification of Natural Polymers from Rhizophora mangle Barks and Determination of Their Analgesic and Anti-inflammatory Properties. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 9, p. 23-34, 2019.

DI LORENZO, C. D.; COLOMBO, F.; BIELLA, S.; ORGIU, F.; FRIGERIO, G.; REGAZZONI, L.; DE SOUSA, L. P.; BAVARESCO, L.; BOSSO, A.; ALDINI, G.; RESTANI, P. Phenolic profile and antioxidant activity of different grape (*Vitis vinifera* L.) varieties. In: BIO Web of Conferences. **EDP Sciences**, p. 04005, 2019.

DOMINGUES JÚNIOR, A. P.; SHIMIZU, M. M.; MOURA, J. C. M. S.; CATHARINO, R. R.; RAMOS, R. A.; RIBEIRO, R. V.; MAZZAFERA, P. Looking for the Physiological Role of Anthocyanins in the Leaves of *Coffea arabica*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, p. 928-937, 2012.

DOS SANTOS, D. V. A.; OLIVEIRA, G. A.; PACHECO, L. G.; FARIA, L. M. O.; CUNHA, J. C.; MELLO, T. M. Antibióticos através da abordagem do mecanismo de resistência bacteriana. **Ciência Atual – Revista Científica Multidisciplinar das Faculdades São José**, v. 12, p. 2-14, 2018.

DU, S.; LIU, H.; LEI, T.; XIE, X.; WANG, H.; HE, X.; TONG, R.; WANG, Y. Mangiferin: An effective therapeutic agent against several disorders. **Molecular Medicine Reports**, v. 18, p. 4775-4786, 2018.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**, v. 7, p. 1-16, 2006.

DURAND, G. A.; RAOULT, D.; DUBOURG, G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, p. 371-382, 2019.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, v. 46, p.488-495, 2012.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 23-36, 2006.

FERNANDES, L. S. **Composição química e efeito antibiótico das frações diclorometânicas floral e foliar de *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae Bercht. & J. Presl)**. 2019. 120 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **FAOSTAT: Crops** (2020). Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 28 jan. 2022.

FUJIMORI, N.; ASHIHARA, H. Biosynthesis of theobromine and caffeine in developing leaves of *Coffea arabica*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 1359-1361, 1994.

GAUL, J.; DONEGAN, K. Caffeine and its effect on bacteria growth. **The Journal of Biological Sciences**, v. 1, p. 4-8, 2015.

GOMES, F. M. S.; XAVIER, J. C.; SANTOS, J. F. S.; MATOS, Y. M. L. S.; TINTINO, S. R. Evaluation of antibacterial and modifying action of catechin antibiotics in resistant strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 115, p. 175-178, 2018.

GONG, Y.; FANG, F.; ZHANG, X.; LIU, B.; LUO, H.; LI, Z.; ZHANG, X.; ZHANG, Z.; PANG, X. B type and complex A/B type epicatechin trimers isolated from litchi pericarp aqueous extract show high antioxidant and anticancer activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 301, 2018.

GOOGLE. **Google Maps**. Disponível em: <https://www.google.com.br/maps>. Acesso em: 07 jun. 2020.

HARBORNE, J. B. **Introduction to Ecological Biochemistry**. 4. ed. London: Academic Press, 2014. 384 p.

HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72-80, 2019.

IMRAN, M.; ARSHAD, M. S.; BUTT, M. S.; KWON, J. H.; ARSHAD, M. U.; SULTAN, M. T. Mangiferin: a natural miracle bioactive compound against lifestyle related disorders. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, p. 1-17, 2017.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO). **Aspectos botânicos**. 2019b. Disponível em: http://www.ico.org/pt/botanical_p.asp. Acesso em: 19 out. 2019.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO). **Monthly Coffee Market Report (2018-19)**: September 2019. 2019a. Disponível em: <http://www.ico.org/documents/cy2018-19/cmr-0919-e.pdf>. Acesso em: 22 out. 2019.

KARONEN, M.; IMRAN, I. B.; ENGSTRÖM, M. T.; SALMINEN, J-P. Characterization of Natural and Alkaline-Oxidized Proanthocyanidins in plant extracts by Ultrahigh-Resolution UHPLC-MS/MS. **Molecules**, v. 26, p. 1873, 2021.

KENCONOJATI, H.; ULKHAQ, M. F.; BUDI, D. S.; AZHAR, M. H. *In vitro* study of an ethanolic extract of *Coffea* leaves to inhibit freshwater pathogenic bacteria. *In: The 1st International Conference on Fisheries and Marine Science, 2019. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, v. 236, p. 1-5, 2019a.

KENCONOJATI, H.; ULKHAQ, M. F.; AZHAR, M. H.; BUDI, D. S. Evaluation of antibacterial activity of different solvent extract from *Coffea canephora* leaves against

Edwardsiella tarda and *Streptococcus agalactiae*. **AAFL Bioflux**, v. 12, p. 2371-2377, 2019b.

KY, C.-L.; LOUARN, J.; DUSSERT, S.; GUYOT, B.; HAMON, S.; NOIROT, M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. **Food Chemistry**, v. 75, p. 223-230, 2001.

LANDECKER, H. Antibiotic resistance and the biology of history. **Body & Society**, v. 22, p. 19-52, 2016.

LATOSIŃSKA, J. N.; LATOSIŃSKA, M. **The Question of Caffeine**. Bod – Books On Demand, 2017. 172 p.

LAVIOLA, B. G.; MARTINEZ, H. E. P.; SOUZA, R. B.; ALVAREZ V., V. H. Dinâmica de cálcio e magnésio em folhas e frutos de *Coffea arabica*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 319-329, 2007.

LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A. T.; HERDEIRO, M. T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, p.77-84, 2016.

MACGOWAN, A.; MACNAUGHTON, E. Antibiotic resistance. **Medicine**, v. 45, p. 622-628, 2017.

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

MARTINS, S. C. V.; ARAÚJO, W. L.; TOHGE, T.; FERNIE, A. R.; DAMATTA, F. M. In high-light-acclimated coffee plants the metabolic machinery is adjusted to avoid oxidative stress rather than to benefit from extra light enhancement in photosynthetic yield. **PLOS ONE**, v. 9, p. 1-11, 2014.

MAZLAN, N. A.; AZMAN, S.; GHAZALI, N. F.; YUSRI, P. Z. S.; IDI, H. M.; ISMAIL, M.; SEKAR, M. Synergistic antibacterial activity of mangiferin with antibiotics against *Staphylococcus aureus*. **Drug Invention Today**, v. 12, p. 14-17, 2019.

MEIRELES, E. J. L.; CAMARGO, M. B. P.; PEZZOPANE, J. R. M.; THOMAZIELLO, R. A.; FAHL, J. I.; BARDIN, L.; SANTOS, J. C. F.; JAPIASSÚ, L. B.; GARCIA, A. W. R.; MIGUEL, A. E.; FERREIRA, R. A. **Fenologia do cafeeiro: condições agrometeorológicas e balanço hídrico do ano agrícola 2004-2005**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica: Embrapa Café, 2009. 128 p. (Embrapa Café. Documentos, 5). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/27540/1/Fenologia-do-cafeeiro.pdf>. Acesso em: 21 out. 2019.

MIKLAVČIČ VIŠNJEVEC, A.; BAKER, P. W.; PEETERS, K.; SCHWARZKOPF, M.; KRIENKE, D.; CHARLTON, A. A. HPLC-DAD-qTOF compositional analysis of the phenolic compounds present in crude tomato protein extracts derived from food processing. **Molecules**, v. 26, p. 6403, 2021.

MONDOLOT, L.; LA FISCA, P.; BUATOIS, B.; TALANSIER, E.; KOCHKO, A.; CAMPA, C. Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during *Coffea canephora* leaf development. **Annals of Botany**, v. 98, p.33-40, 2006.

MONTEIRO, Â.; COLOMBAN, S.; AZINHEIRA, H. G.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; SILVA, M. C.; NAVARINI, L.; RESMINI, M. Dietary antioxidants in coffee leaves: impact of botanical origin and maturity on chlorogenic acids and xanthonenes. **Antioxidants**, v. 9, p. 1-16, 2020.

TAVARES, M. **Quase metade do café brasileiro sai de Minas, mas clima enfraquece produção**. 2021. Disponível em: <https://economia.uol.com.br/noticias/redacao/2021/11/11/quase-metade-do-cafe-brasileiro-sai-de-minas-mas-clima-afetou-producao.htm>. Acesso em: 03 mar. 2022.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition - A review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 66, p.45-58, 2012.

MUSLIM, Z.; DEPHINTO, Y. Antibacterial activity of Robusta coffee (*Coffea canephora* L.) leaves to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 12, p. 113-115, 2019.

MUSSATTO, S. I.; MACHADO, E. M. S.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J. A. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p.661-672, 2011.

NAYEEM, N.; DENNY, G.; MEHTA, S. K. Comparative phytochemical analysis, antimicrobial and antioxidant activity of the methanolic extracts of the leaves of *Coffea arabica* and *Coffea robusta*. **Der Pharmacia Lettre**, v. 3, p. 292-297, 2011.

NGAMSUK, S.; HUANG, T-C.; HSU, J-L. Determination of phenolic compounds, procyanidins, and antioxidant activity in processed *Coffea arabica* L. leaves. **Foods**, v. 8, p. 389, 2019.

ÖZÇELİK, B.; KARTAL, M.; ORHAN, I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, p. 396-402, 2011.

PATAY, E. B.; NÉMETH, T.; NÉMETH, T. S.; FILEP, R.; VLASE, L.; PAPP, N. Histological and phytochemical studies of *Coffea benghalensis* B. Heyne Ex Schult. compared with *Coffea arabica* L. **Farmacia**, v. 64, p. 125-130, 2016.

PLANTS OF THE WORLD ONLINE (POWO). **Coffea arabica** L. Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:747038-1>. Acesso em: 18 ago. 2020.

PUBMED. **Antimicrobial activity of Coffea arabica leaves - Search Results - PubMed**. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=antimicrobial+activity+of+Coffea+arabica+leaves>. Acesso em: 10 dez. 2021.

- QIU, X.; ZHAO, J-L.; HAO, C.; YUAN, C.; TIAN, N; XU, Z-S.; ZOU, R-M. Simultaneous determination of mangiferin and neomangiferin in rat plasma by UPLC–MS/MS and its application for pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 124, p. 138-142, 2016.
- RAMIREZ, J. E.; ZAMBRANO, R.; SEPÚLVEDA, B.; SIMIRGIOTIS, M. J. Antioxidant properties and hyphenated HPLC-PDA-MS profiling of chilean Pica mango fruits (*Mangifera indica* L. cv. piqueño). **Molecules**, v. 19, p. 438-458, 2014.
- RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale: Farmacologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2016. 808 p.
- RATANAMARNO, S.; SURBKAR, S. Caffeine and catechins in fresh coffee leaf (*Coffea arabica*) and coffee leaf tea. **Maejo International Journal of Science and Technology**, v. 11, p. 211-218, 2017.
- RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and phenolic compounds from *Solanum sessiliflorum*, an unexploited Amazonian fruit, and their scavenging capacities against reactive oxygen and nitrogen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 3022-3029, 2013.
- RODRIGUES, T. S.; SANTOS, A. M. R.; LIMA, P. C.; MOURA, M. E. B.; GOIANO, P. D. O. L.; FONTINELE, D. R. S. Resistência bacteriana a antibióticos na Unidade de Terapia Intensiva: revisão integrativa. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde (REPIS)**, v. 4, p. 1-17, 2018.
- RODRÍGUEZ-GÓMEZ, R.; VANHEUVERZWJIN, J.; SOUARD, F.; DELPORTE, C.; STEVIGNY, C.; STOFFELEN, P.; BRAEKELEER, K.; KAUFFMANN, J. M. Determination of three main chlorogenic acids in water extracts of coffee leaves by liquid chromatography coupled to an electrochemical detector. **Antioxidants**, v. 7, p. 143-156, 2018.
- ROSS, I. A. **Medicinal plants of the world, Volume 3: Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses**. 1 ed. New Jersey: Humana Press Inc., 2005. 648 p.
- RUNTI, G.; PACOR, S.; COLOMBAN, S.; GENNARO, R.; NAVARINI, L.; SCOCCHI, M. 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, p. 108-114, 2015.
- SALGADO, P. R.; FAVARIN, J. L.; LEANDRO, R. A.; LIMA FILHO, O. F. Total phenol concentrations in coffee tree leaves during fruit development. **Scientia Agricola**, v. 65, p.354-359, 2008.
- SANTOS, F. L.; QUEIROZ, D. M.; PINTO, F. A. C.; RESENDE, R. C. Efeito da frequência e amplitude de vibração sobre a derriça de frutos de café. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, p.425-431, 2010.

SEGHE TO, L.; SANTOS, B. C. S.; WERNECK, A. F. L.; VILELA, F. M. P.; SOUSA, O. V.; RODARTE, M. P. Antioxidant extracts of coffee leaves and its active ingredient 5-caffeoylquinic acid reduce chemically-induced inflammation in mice. **Industrial Crops and Products**, v. 126, p. 48-57, 2018.

SEPTIMUS, E. J. Antimicrobial resistance: an antimicrobial/diagnostic stewardship and infection prevention approach. **Medical Clinics**, v. 102, p. 819-829, 2018.

SILVA, F. M.; OLIVEIRA, E.; GUIMARÃES, R. J.; FIGUEIREDO, C. A. P. F.; SILVA, F. C. Desempenho operacional e econômico da derrça do café com uso da derrçadora lateral. **Coffee Science**, v. 1, p. 119-125, 2006.

SILVAROLLA, M. B.; MAZZAFERA, P.; LIMA, M. M. A.; MEDINA FILHO, H. P.; FAZUOLI, L. C. Ploidy level and caffeine content in leaves of *Coffea*. **Scientia Agricola**, v. 56, p. 661-663, 1999.

SILVEIRA, J. S.; LACOUR, S.; DURAND, N.; VAILLANT, F.; PEREZ, A.; LUTIN, F.; BELLEVELLE, M.-P.; DORNIER, M. Desenvolvimento de um novo tratamento de resíduos e reciclagem sustentável da cadeia produtiva do café. *In*: VIII Congresso da APDEA - Associação Portuguesa de Economia Agrária, 2016, Coimbra. **ESADR 2016 Políticas Públicas para a Agricultura PÓS 2020**, 2016.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017. 502 p.

SINGH ARORA, D. S.; KAUR, G. J.; KAUR, H. Antibacterial activity of tea and coffee: their extracts and preparations. **International Journal of Food Properties**, v. 12, p. 286-294, 2009.

SINGH, S. K.; TIWARI, R. M.; SINHA, S. K.; DANTA, C. C.; PRASAD, S. K. Antimicrobial evaluation of mangiferin and its synthesized analogues. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, p. S884-S887, 2012.

SLEDZ, W.; LOS, E.; PACZEK, A.; RISCHKA, J.; MOTYKA, A.; ZOLEDOWSKA, S.; PIOSIK, J.; LOJKOWSKA, E. Antibacterial activity of caffeine against plant pathogenic bacteria. **Acta Biochimica Polonica**, v. 62, p. 605-612, 2015.

STEIN, R. A. Antibiotic resistance: a global, interdisciplinary concern. **The American Biology Teacher**, v. 73, p. 314-321, 2011.

STÖGGL, W. M.; HUCK, C. W.; BONN, G. K. Structural elucidation of catechin and epicatechin in sorrel leaf extracts using liquid-chromatography coupled to diode array-, fluorescence-, and mass spectrometric detection. **Journal of Separation Science**, v. 27, p. 524-528, 2004.

STRATEVA, T.; YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1133-1148, 2009.

- SUI, Y.; ZHENG, Y.; LI, X.; LI, S.; XIE, B.; SUN, Z. Characterization and preparation of oligomeric procyanidins from *Litchi chinensis* pericarp. **Fitoterapia**, v. 112, p. 168-174, 2016.
- SUN, J.; LIANG, F.; BIN, Y.; LI, P.; DUAN, C. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. **Molecules**, v. 12, p. 679-693, 2007.
- TALAMOND, P.; MONDOLOT, L.; GARGADENNEC, A.; KOCHKO, A.; HAMON, S.; FRUCHIER, A.; CAMPA, C. First report on mangiferin (C-glucosyl-xanthone) isolated from leaves of a wild coffee plant, *Coffea pseudozanguebariae* (Rubiaceae). **Acta Botanica Gallica**, v. 155, p.513-519, 2008.
- THEURETZBACHER, U.; OUTTERSON, K.; ENGEL, A.; KARLÉN, A. The global preclinical antibacterial pipeline. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, p. 275-285, 2020.
- TODA, M.; OKUBO, S.; HIYOSHI, R.; SHIMAMURA, T. The bactericidal activity of tea and coffee. **Letters in Applied Microbiology**, v. 8, p. 123-125, 1989.
- TREVISAN, M. T. S.; ALMEIDA, R. F.; SOTO, G.; VIRGINIO FILHO, E. M.; ULRICH, C. M.; OWEN, R. W. Quantitation by HPLC-UV of mangiferin and isomangiferin in coffee (*Coffea arabica*) leaves from Brazil and Costa Rica after solvent extraction and infusion. **Food Analytical Methods**, v. 9, p. 2649-2655, 2016.
- TSOU, S.-H.; HU, S.-W.; YANG, J.-J.; YAN, M.; LIN, Y.-Y. Potential oral health care agent from coffee against virulence factor of periodontitis. **Nutrients**, v. 11, p. 1-12, 2019.
- VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C. R.; WEBER, G. E. B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 17p (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316).
- VOLSI, B.; TELLES, T. S.; CALDARELLI, C. E.; CAMARA, M. R. G. The dynamics of coffee production in Brazil. **PLOS ONE**, v. 14, p. 1-15, 2019.
- WINTGENS, J. N. **Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production. A Guidebook for Growers, Processors, Traders, and Researchers**. 1 ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2004. 1040 p.
- WOOD, K. V.; BONHAMB, C. C.; MILESC, D.; ROTHWELLA, A. P.; PEELD, G.; WOODD, B. C.; RHODES, D. Characterization of betaines using electrospray MS/MS. **Phytochemistry**, v. 59, p. 759-765, 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Antibiotic resistance**. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>. Acesso em: 25 fev. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Antimicrobial stewardship programmes in health-care facilities in low- and middle-income countries. A practical toolkit.** Geneva: World Health Organization, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis.** Geneva: World Health Organization, 2017.

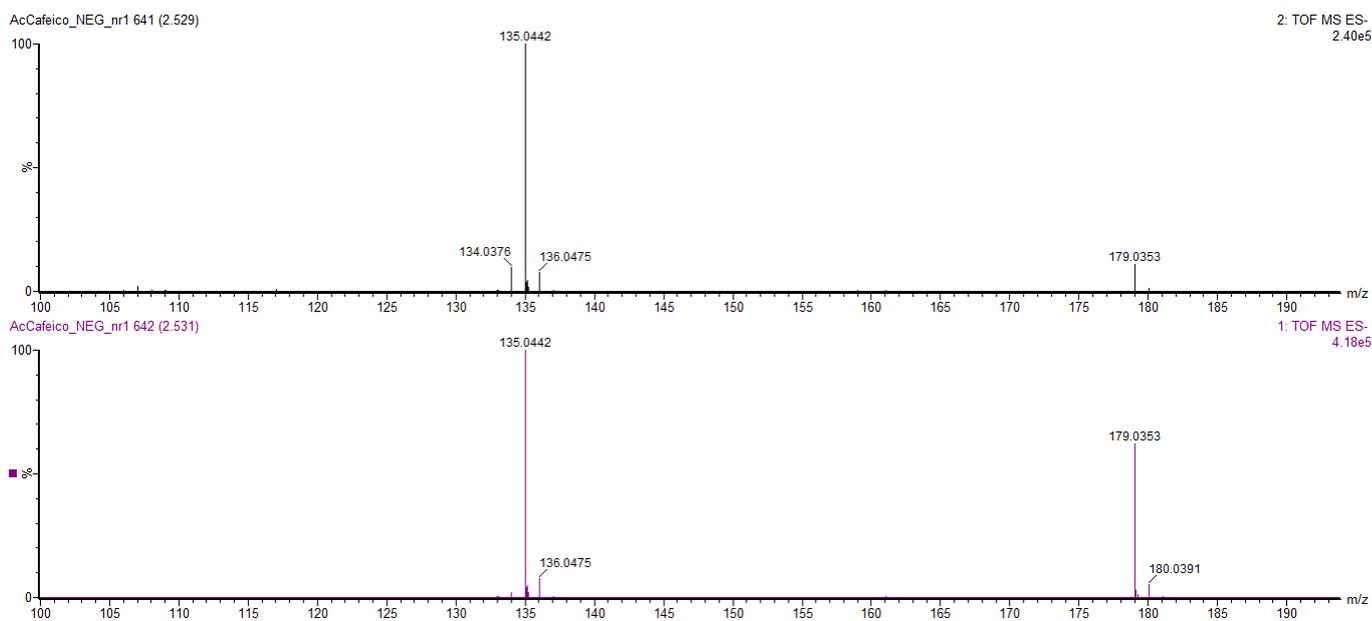
WU, P.-Y.; HUANG, C.-C.; CHU, Y.; HUANG, Y.-H.; LIN, P.; LIU, Y.-H.; WEN, K.-C.; LIN, C.-Y.; HSU, M.-C.; CHIANG, H.-M. Alleviation of ultraviolet B-induced photodamage by *Coffea arabica* extract in human skin fibroblasts and hairless mouse skin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p.782-782, 2017.

ZERBIB, M.; CAZALS, G.; ENJALBAL, C.; SAUCIER, C. Identification and quantification of flavanol glycosides in *Vitis vinifera* grape seeds and skins during ripening. **Molecules**, v. 23, p. 2745, 2018.

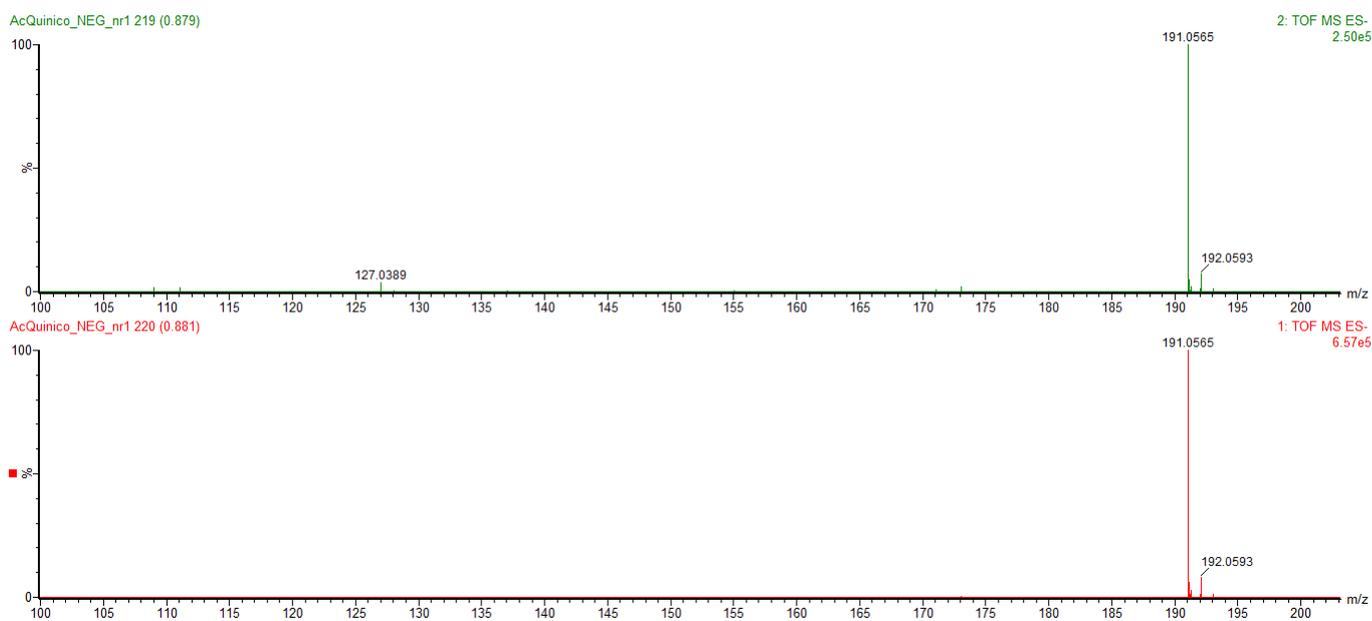
ZHU, W.; SUN, S.; YANG, F; ZHOU, K. UHPLC/MS Identifying Potent α -glucosidase Inhibitors of Grape Pomace via Enzyme Immobilized Method. **Journal of Food Science**, v. 83, p. 1131-1139, 2018.

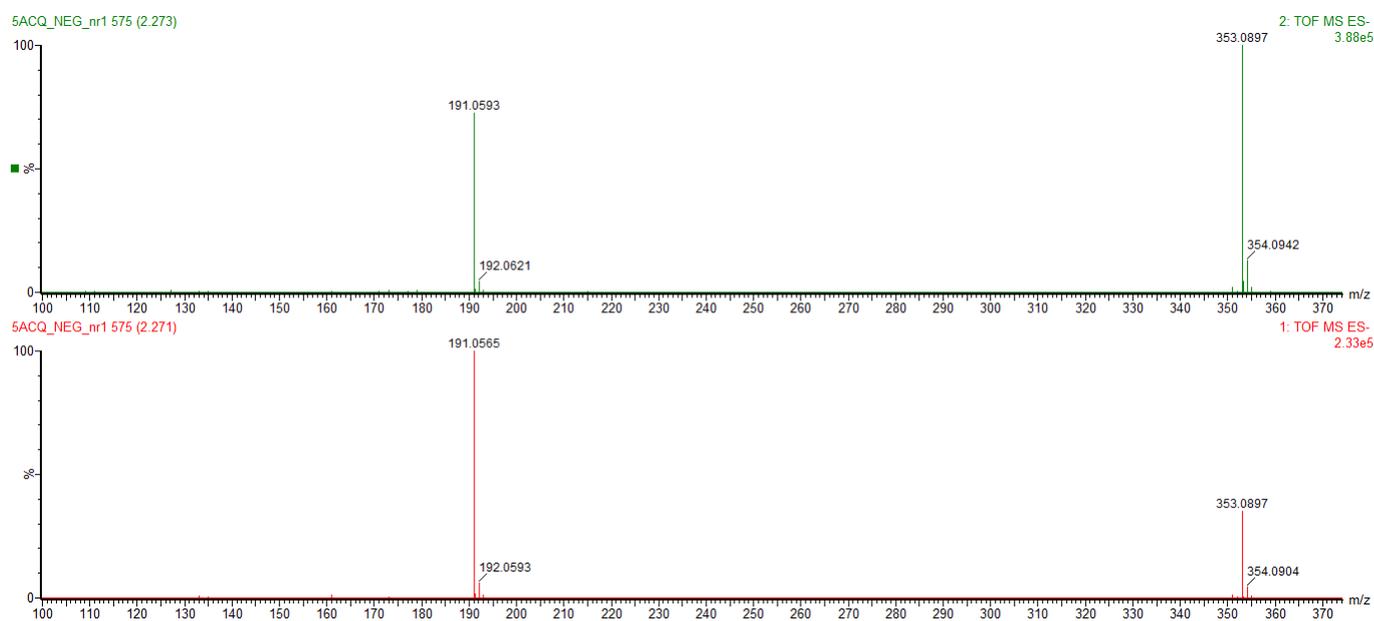
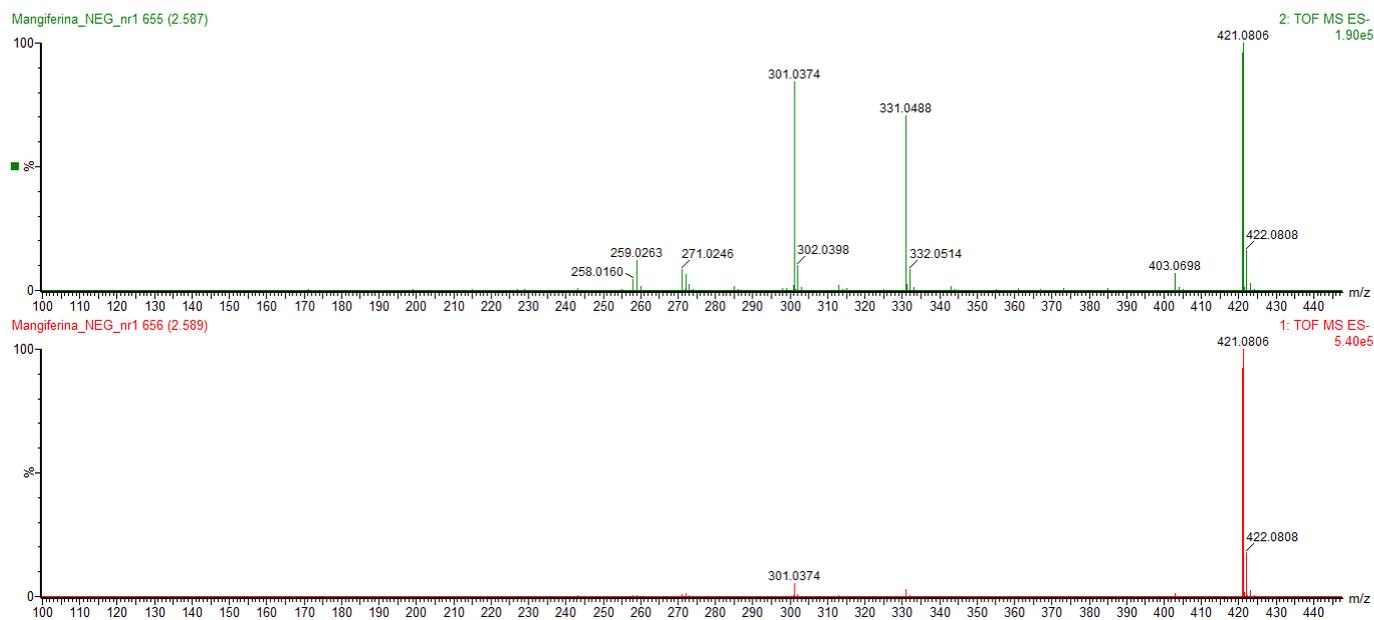
APÊNDICE A - PICOS E RESPECTIVOS FRAGMENTOS DOS COMPOSTOS EM MODO NEGATIVO

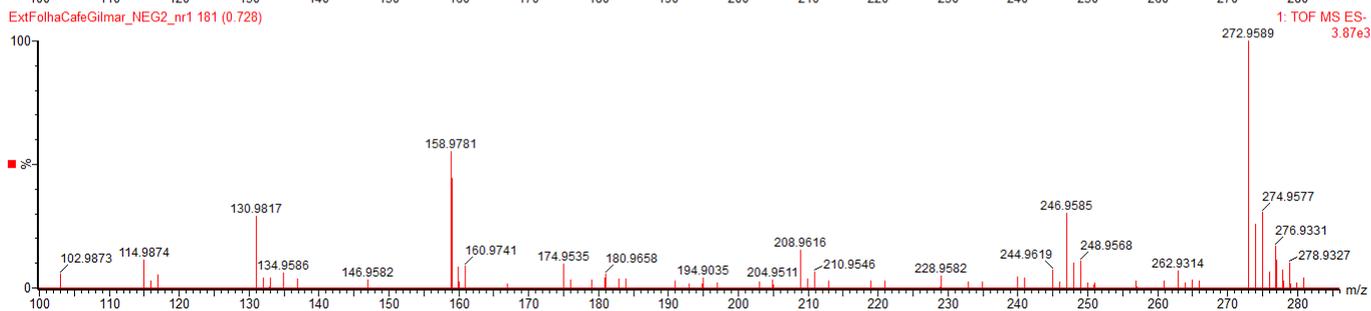
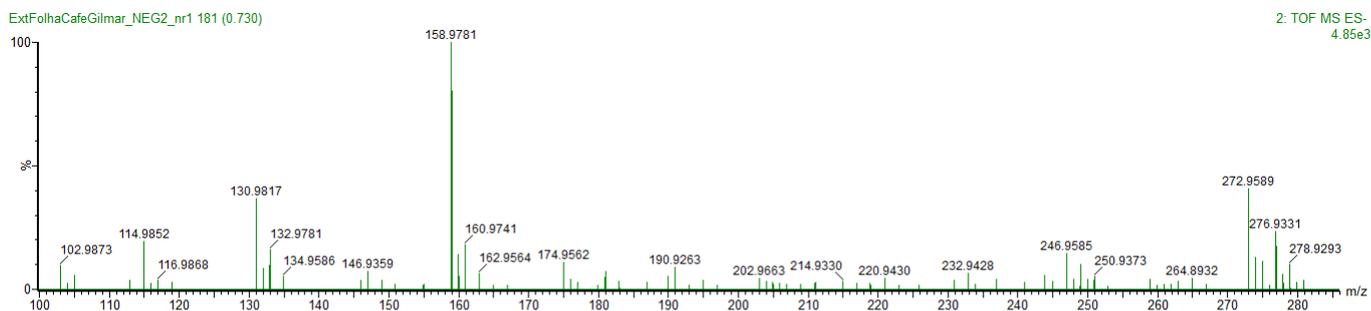
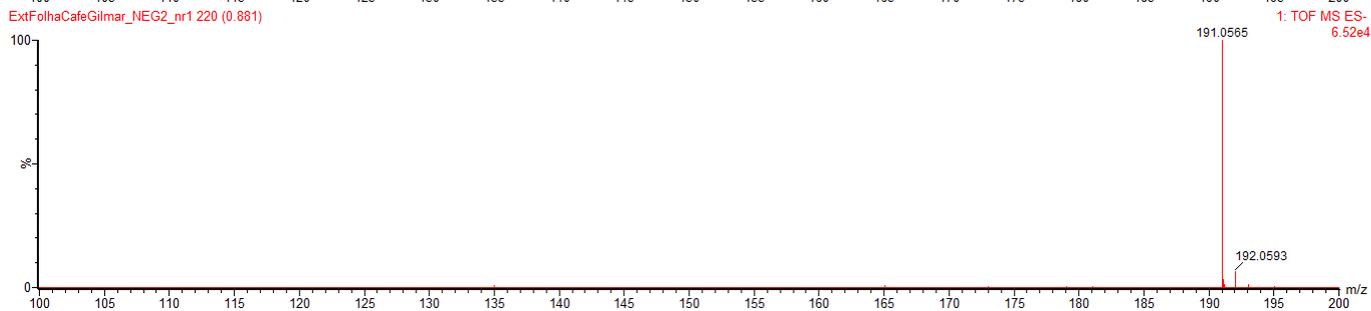
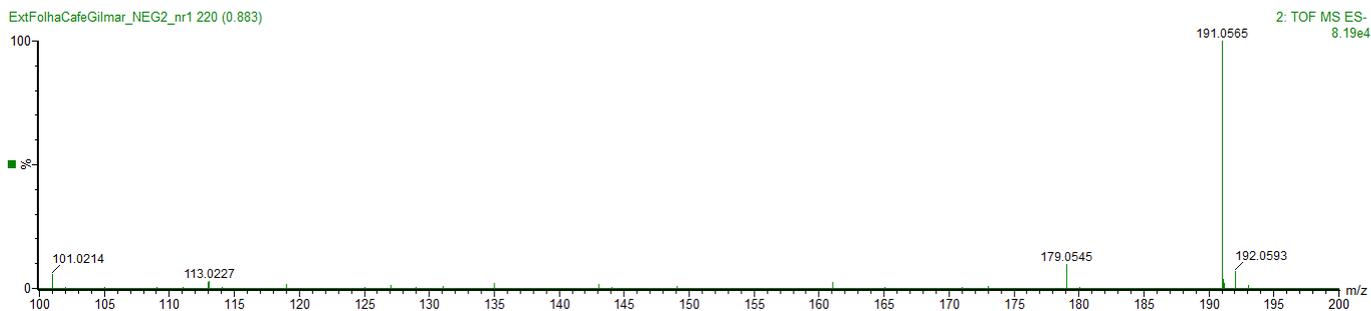
Ácido Cafeico (padrão) – m/z 179,0353

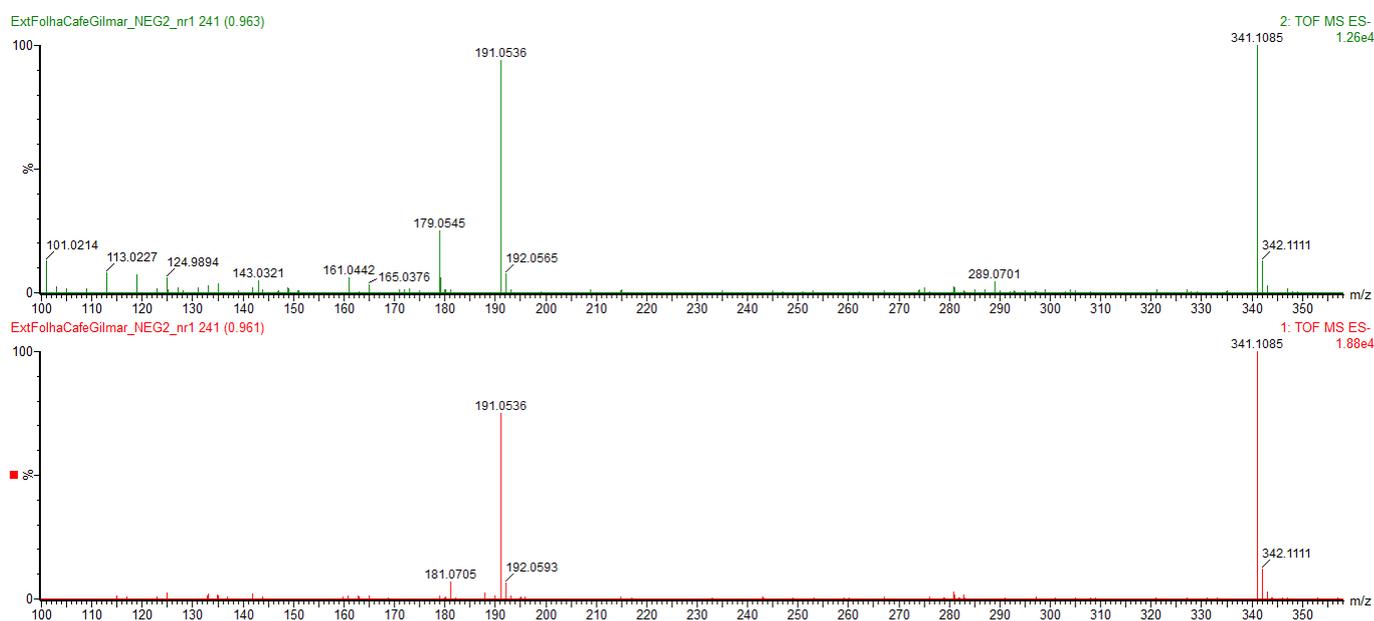
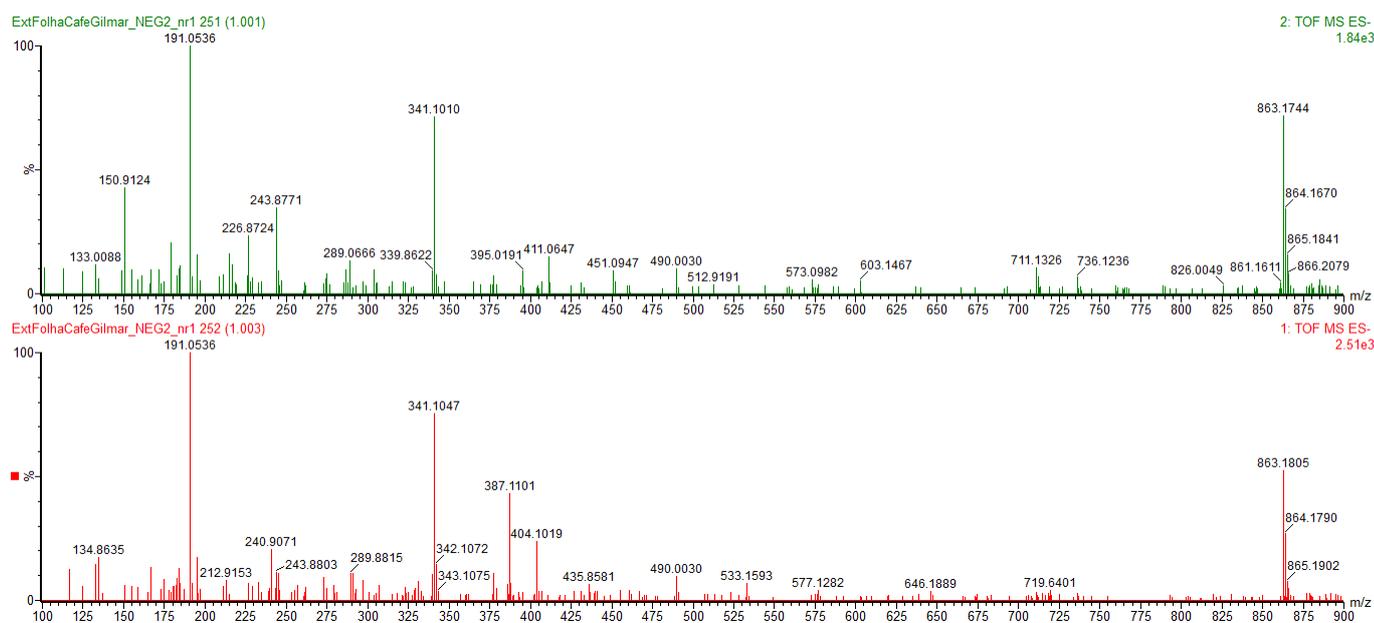


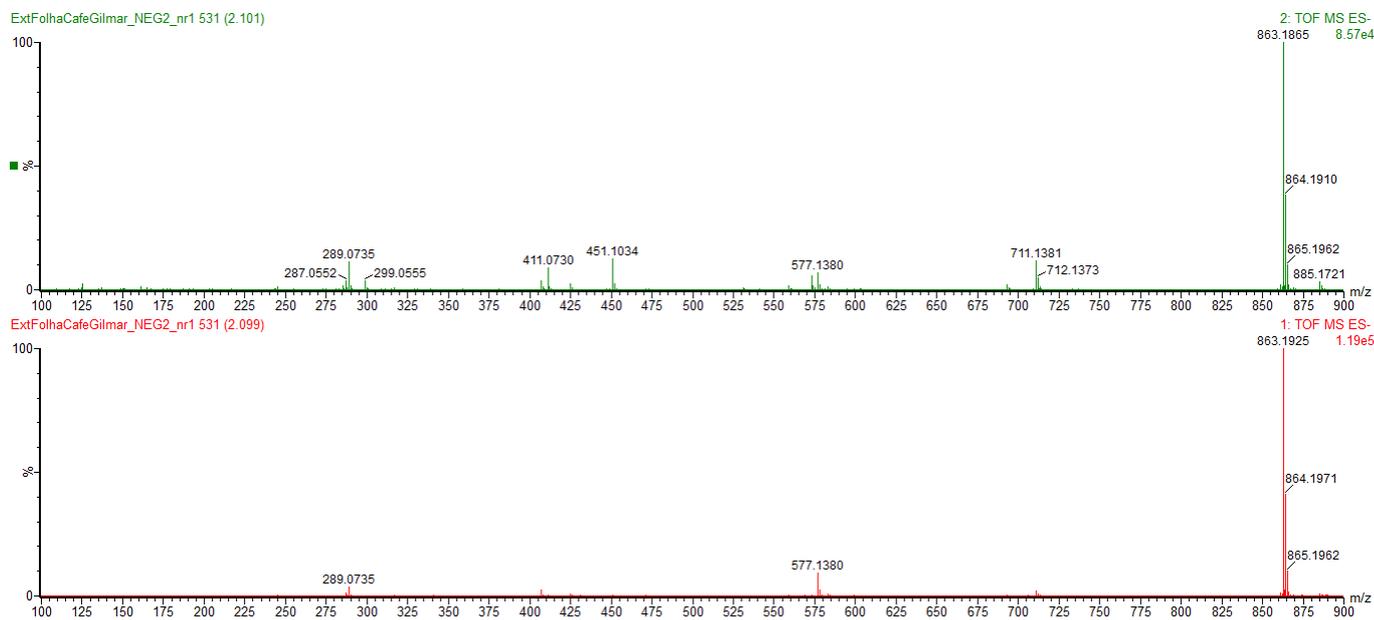
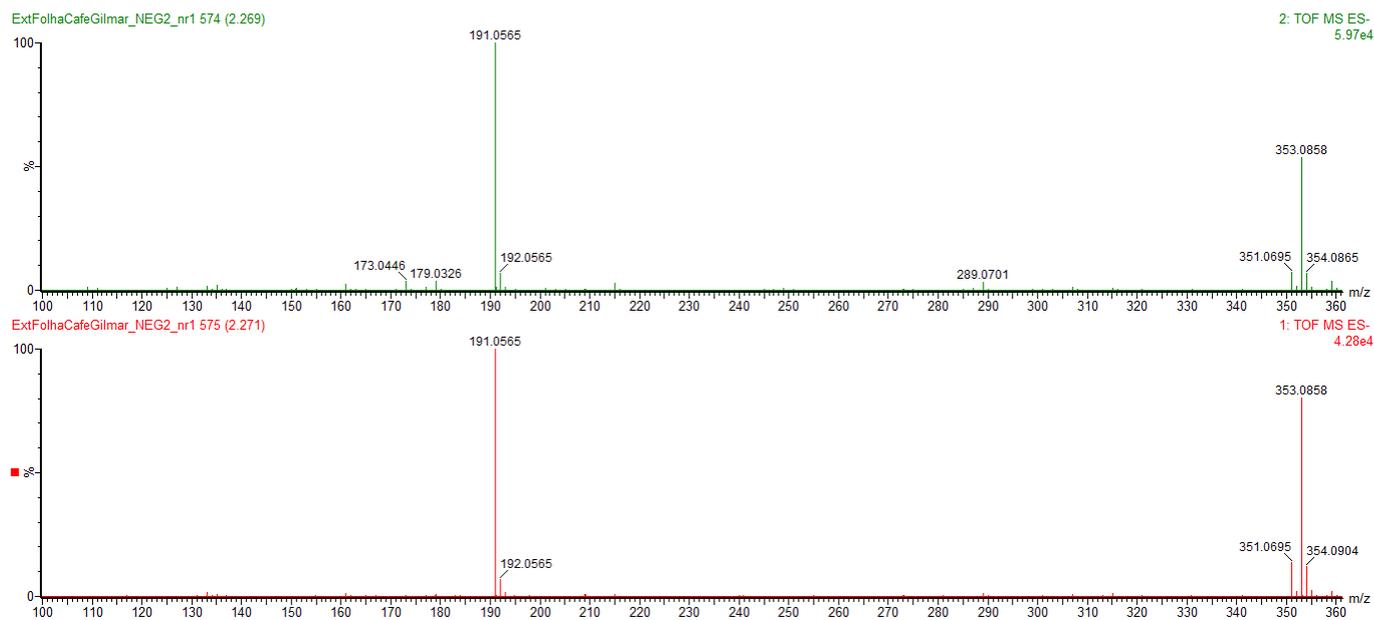
Ácido Quínico (padrão) – m/z 191,0565

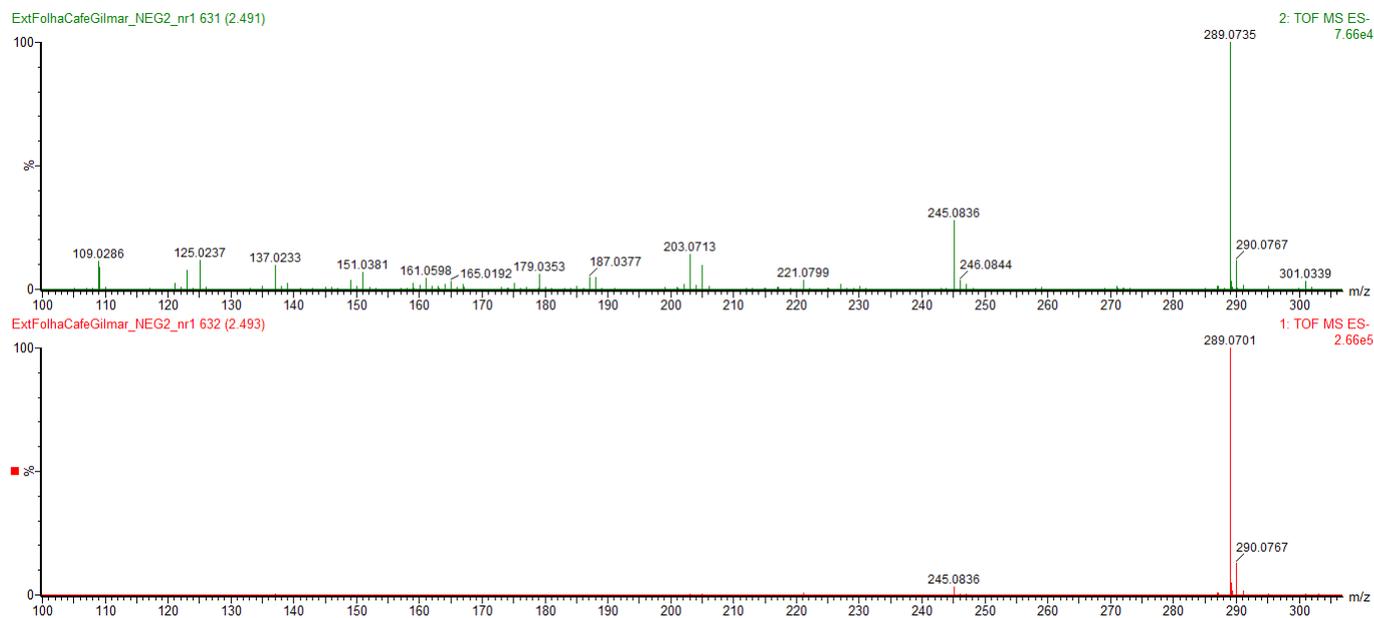
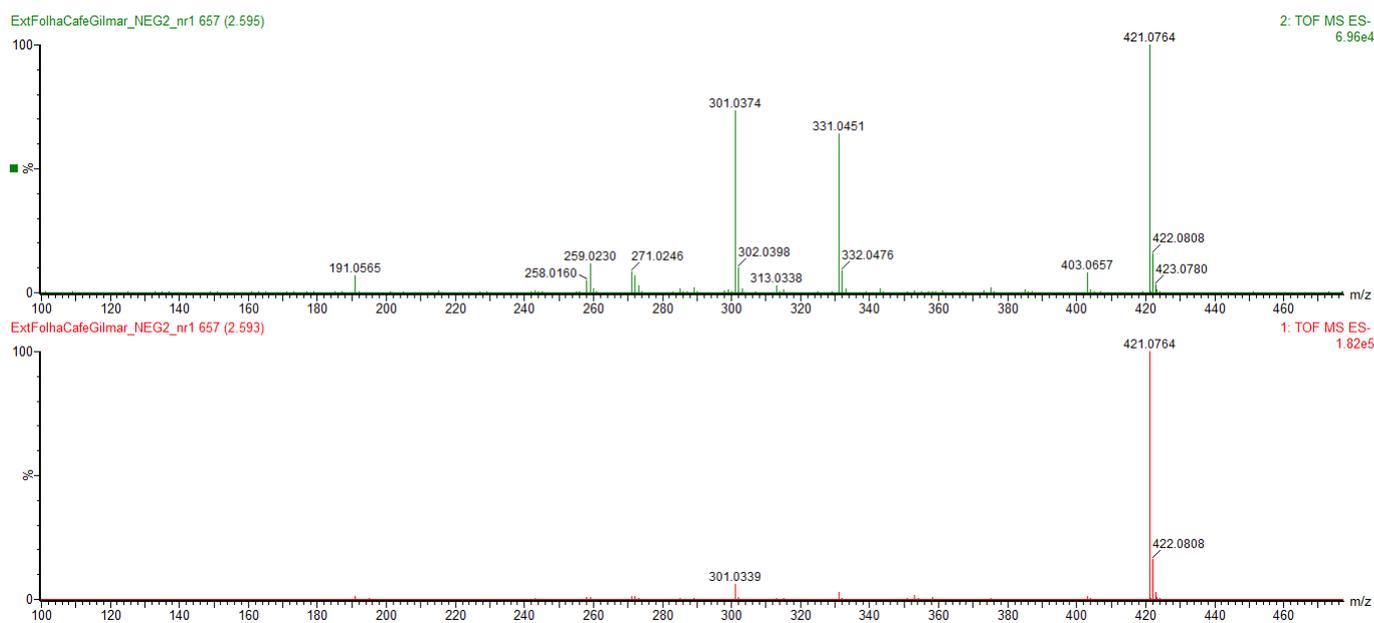


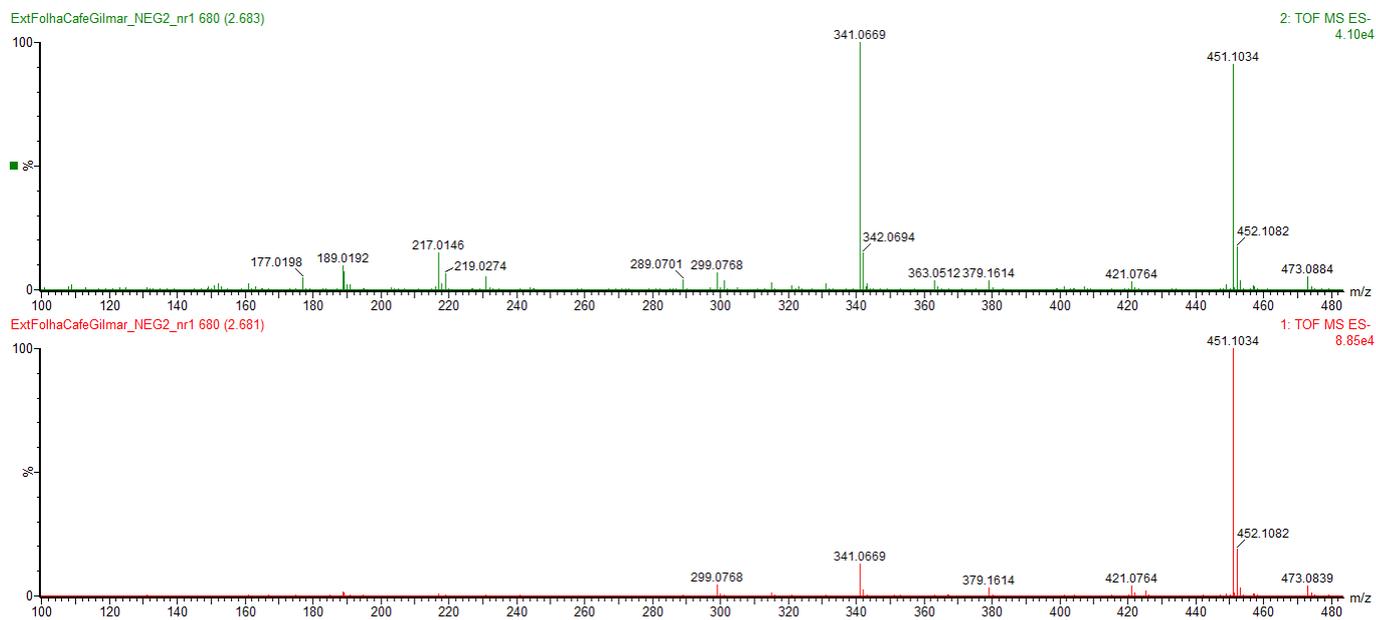
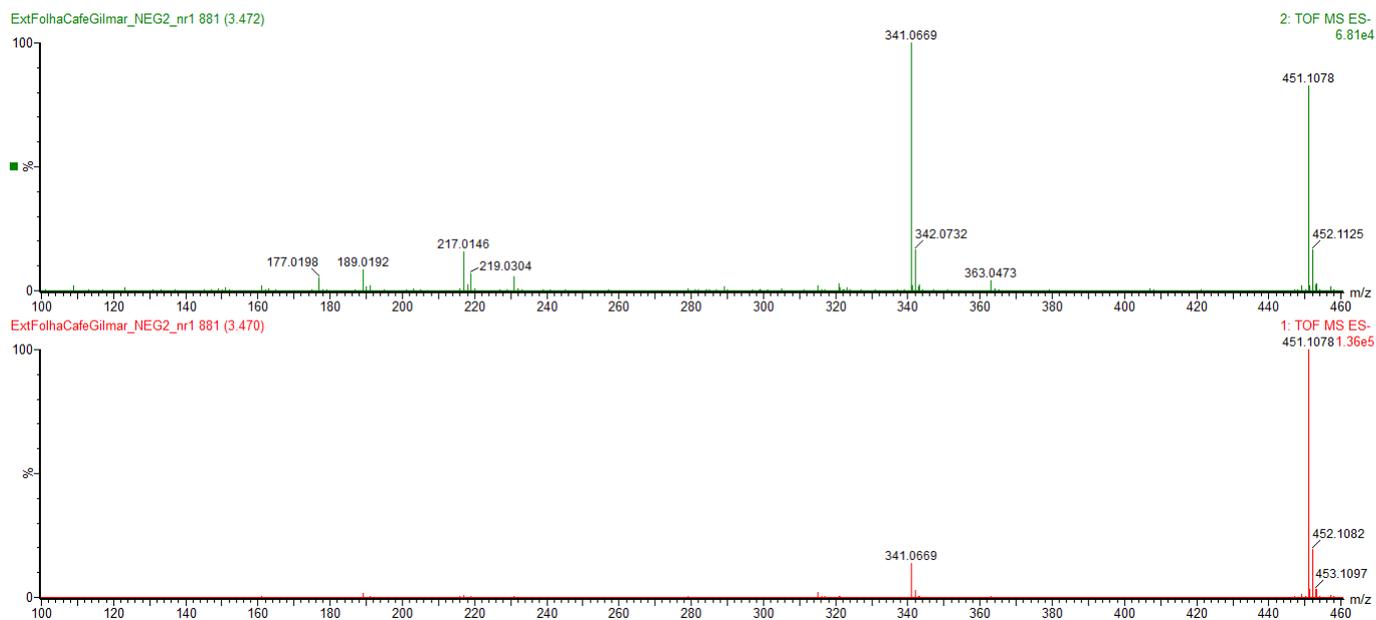
Ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) (padrão) – m/z 353,0897Mangiferina (padrão) – m/z 421,0806

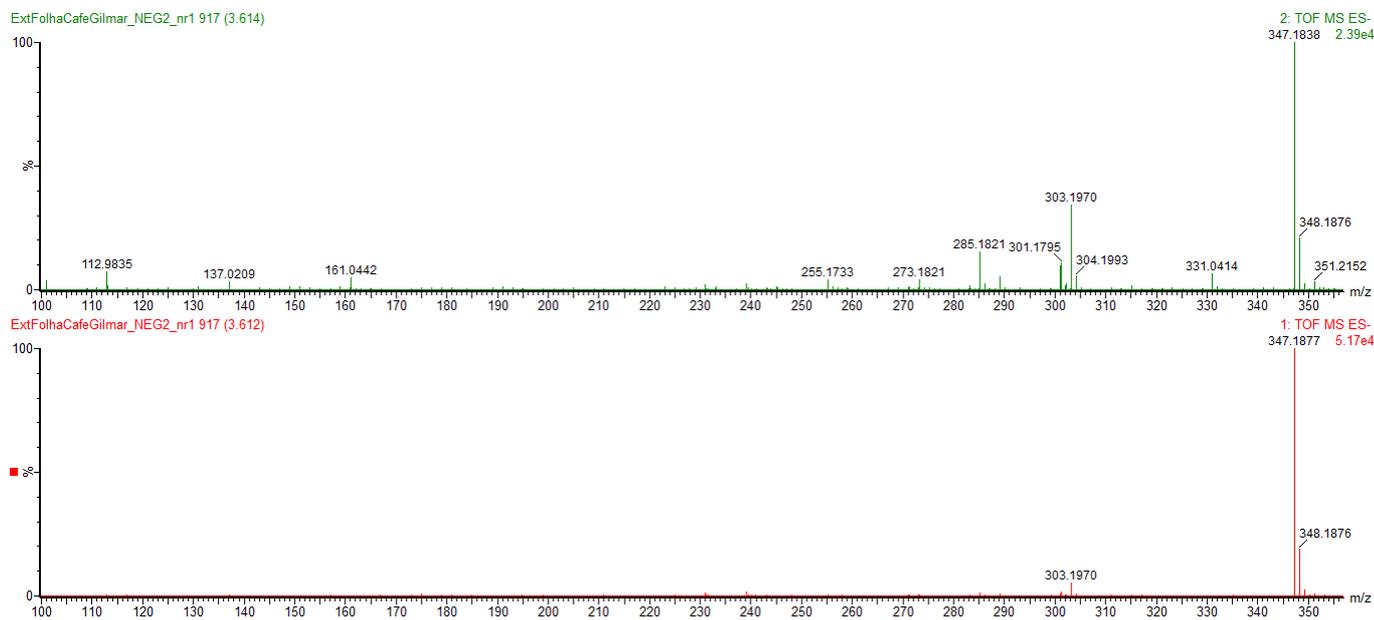
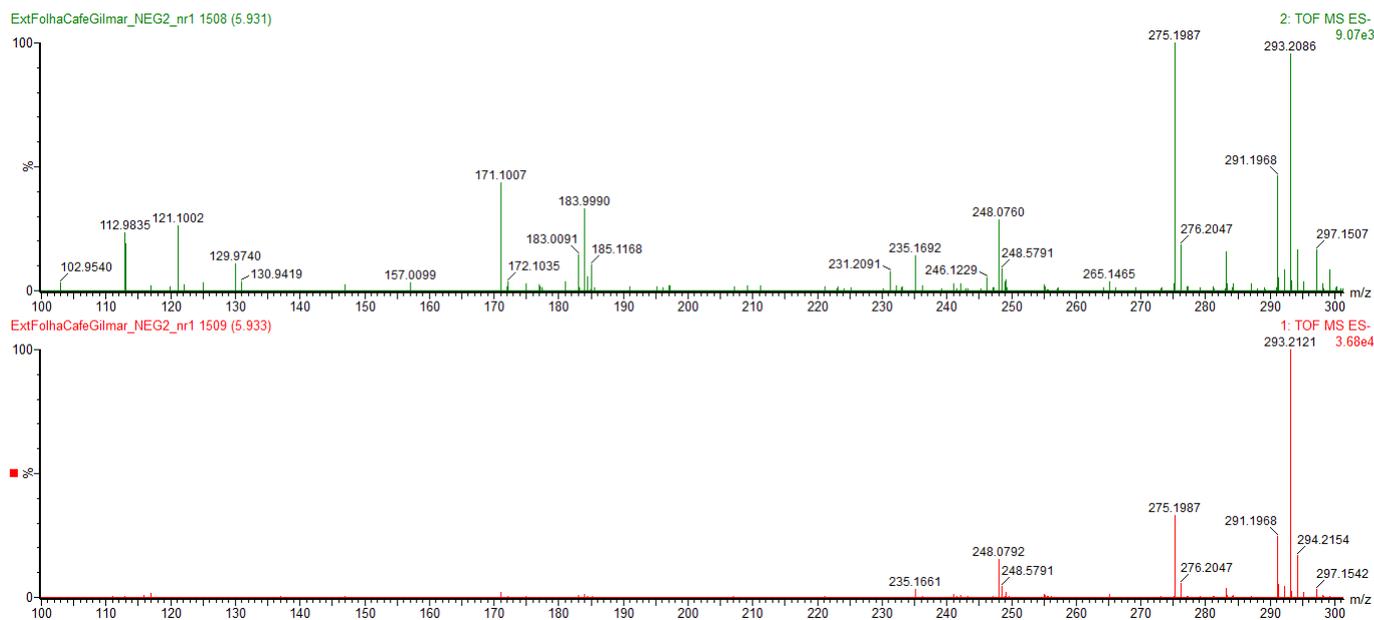
Desconhecido 1 – m/z 272,9589Ácido quínico – m/z 191,0565

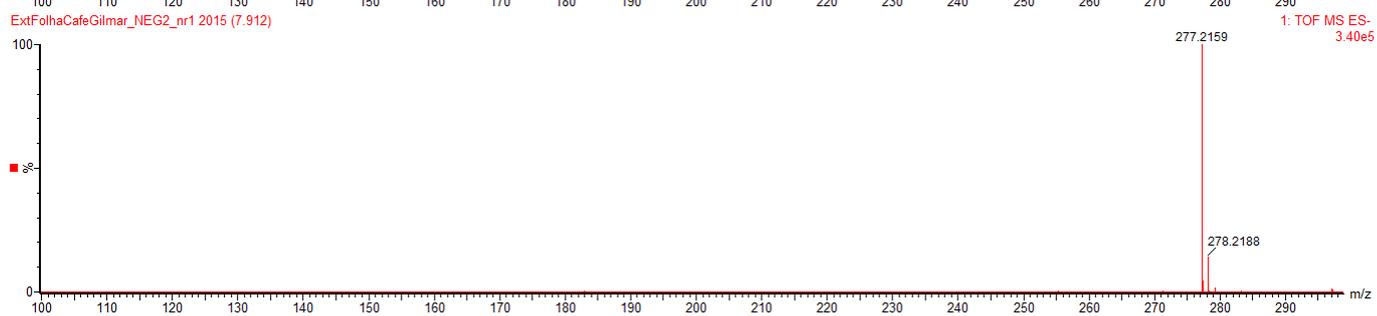
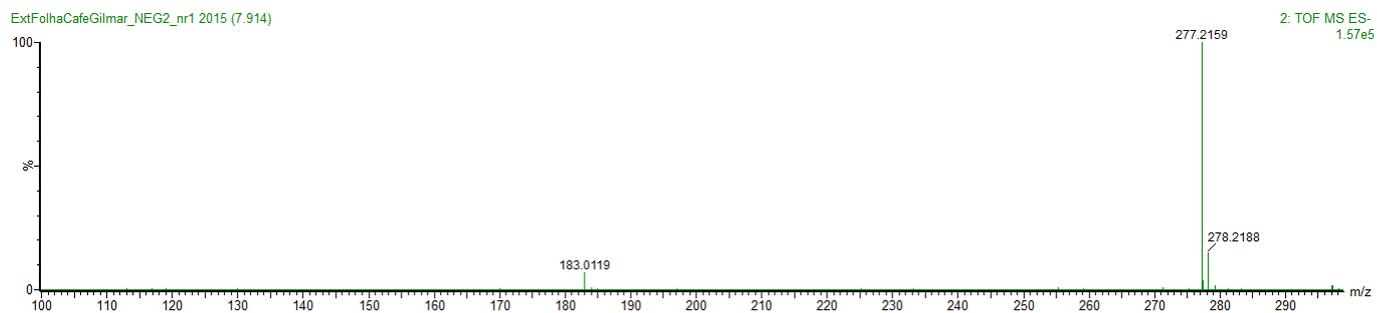
Ácido cafeico-O-hexosídeo – m/z 341,1085Trímero de procianidina – m/z 863,1744

Trímero de procianidina – m/z 863,1865Ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) – m/z 353,0858

Catequina ou epicatequina – m/z 289,0735Mangiferina – m/z 421,0764

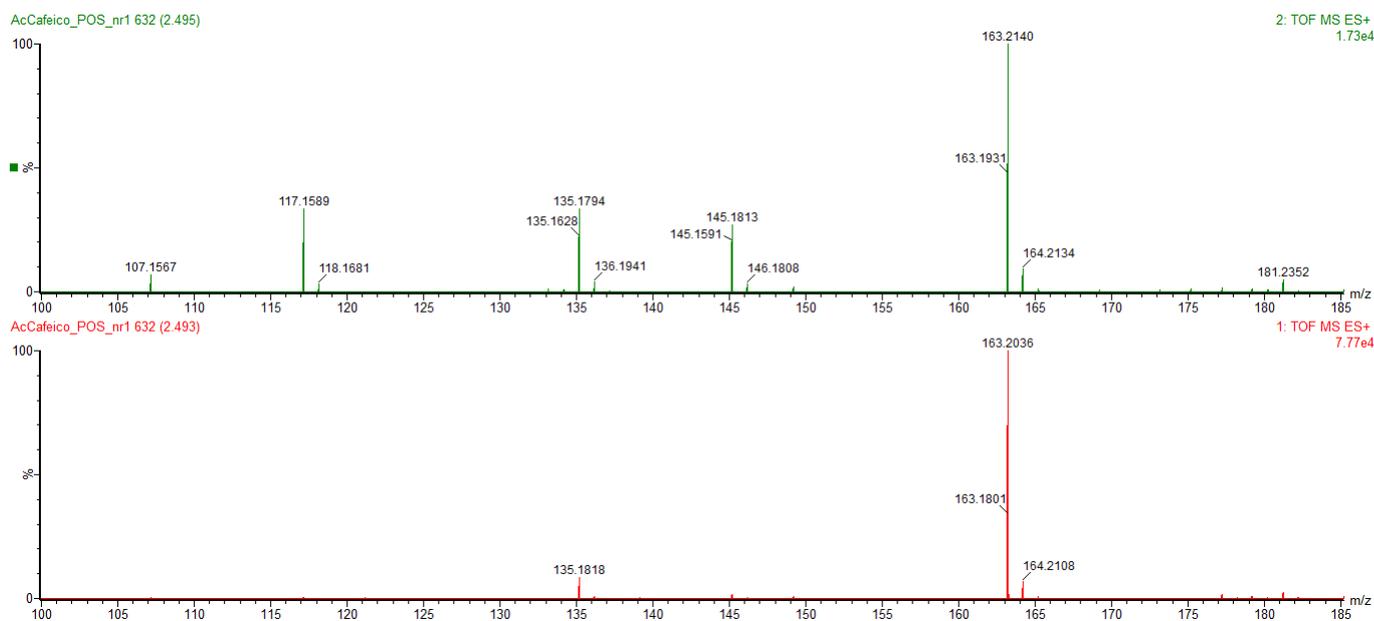
(Epi)Catequina mono glicosídeo – m/z 451,1034(Epi)Catequina mono glicosídeo – m/z 451,1078

Desconhecido 2 – m/z 347,1838Desconhecido 3 – m/z 293,2086

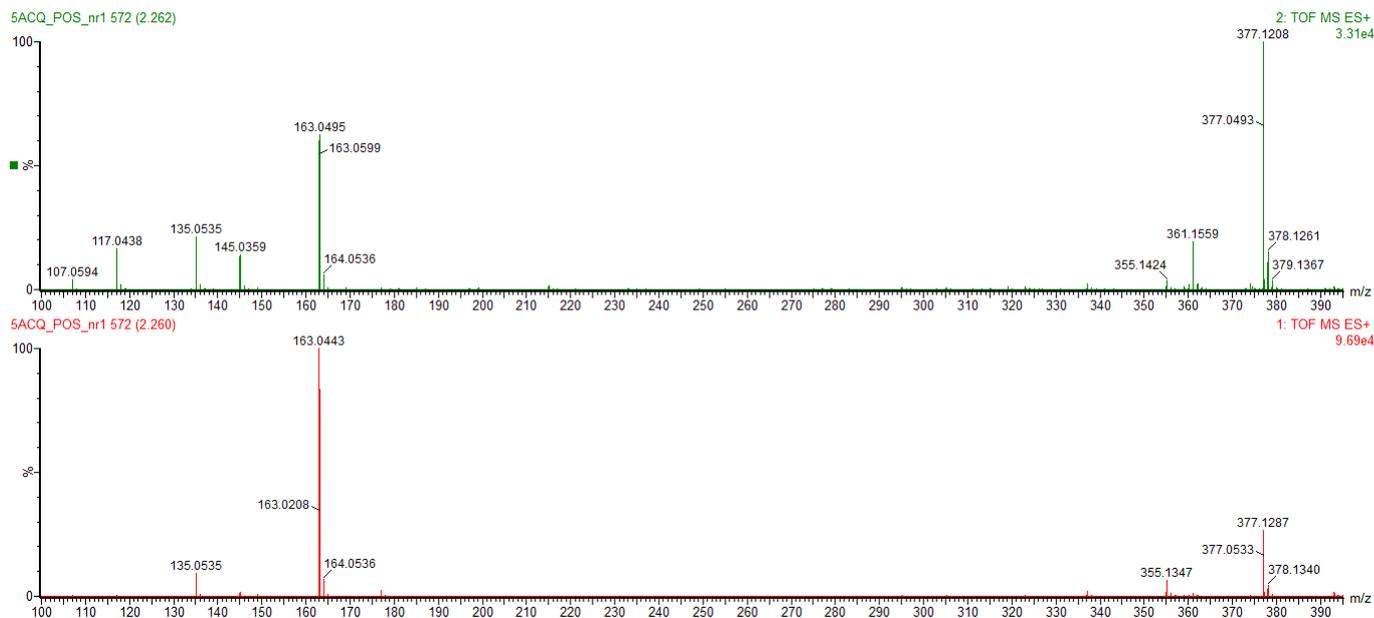
Desconhecido 5 – m/z 277,2159

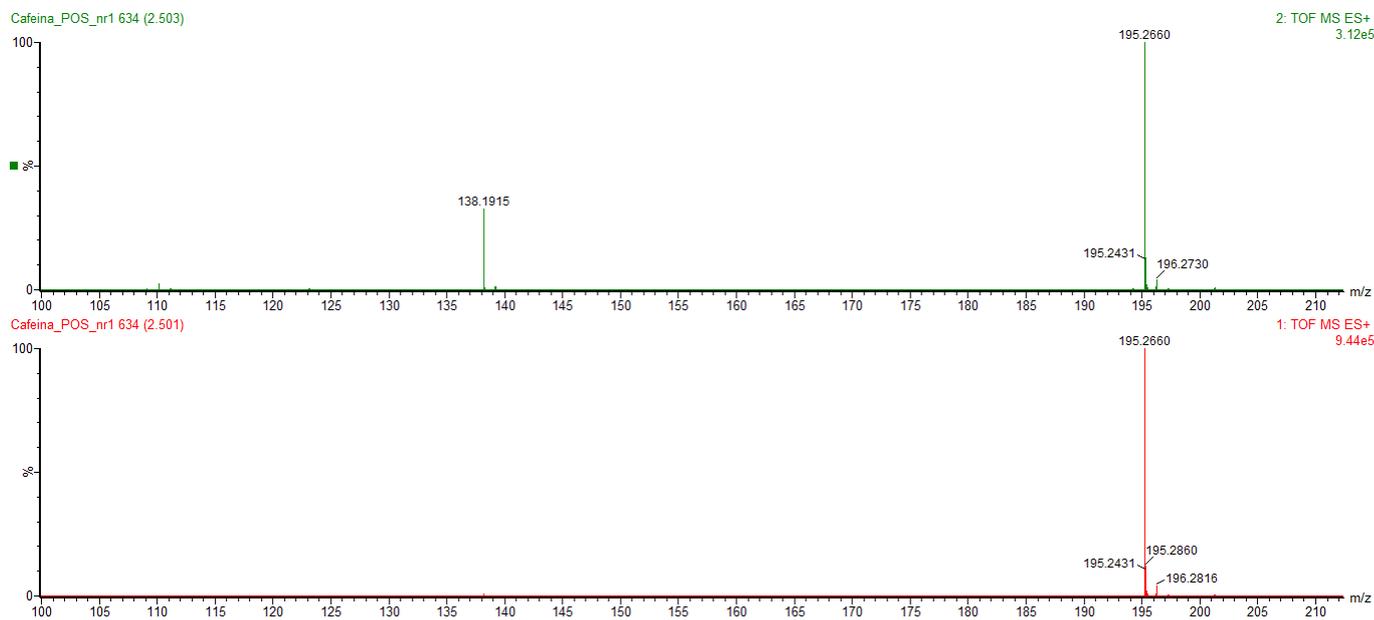
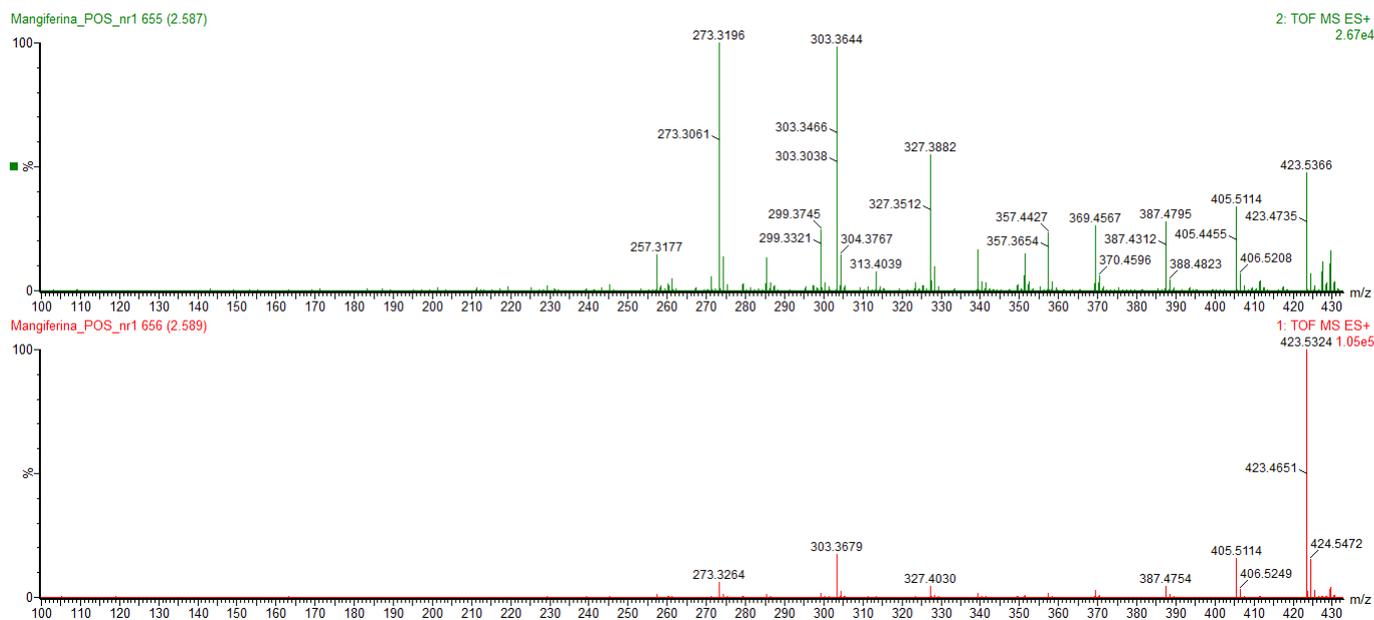
APÊNDICE B - PICOS E RESPECTIVOS FRAGMENTOS DOS COMPOSTOS EM MODO POSITIVO

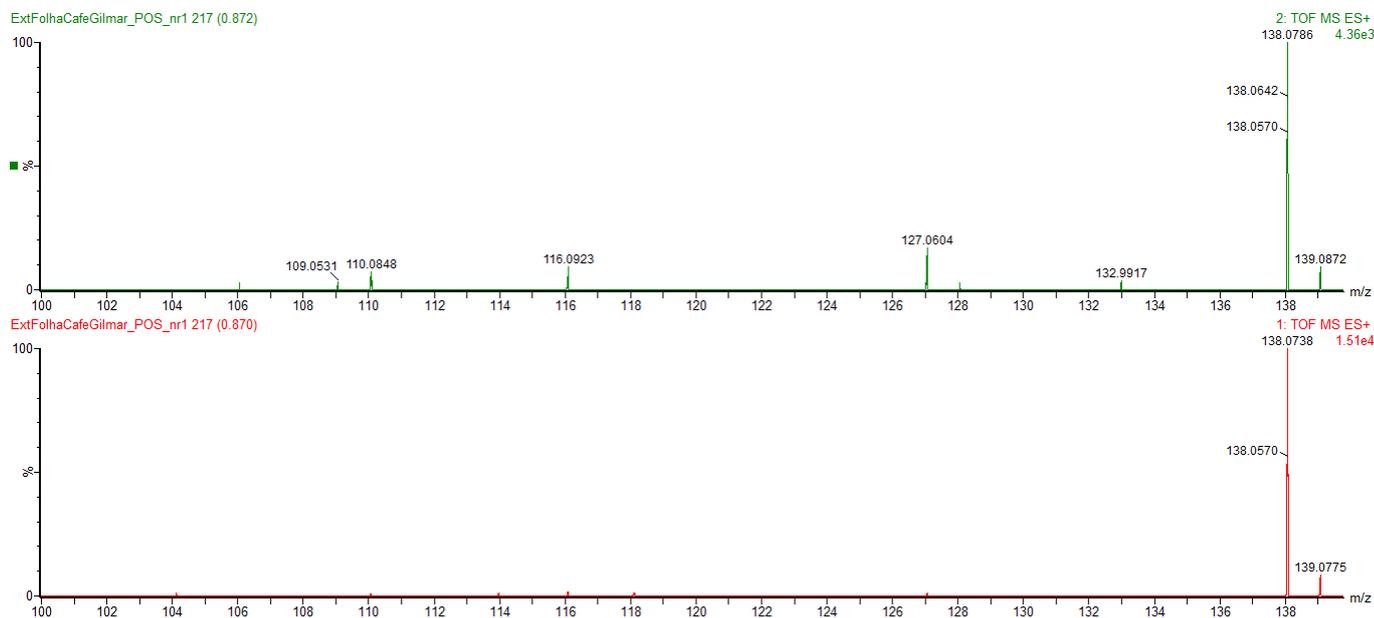
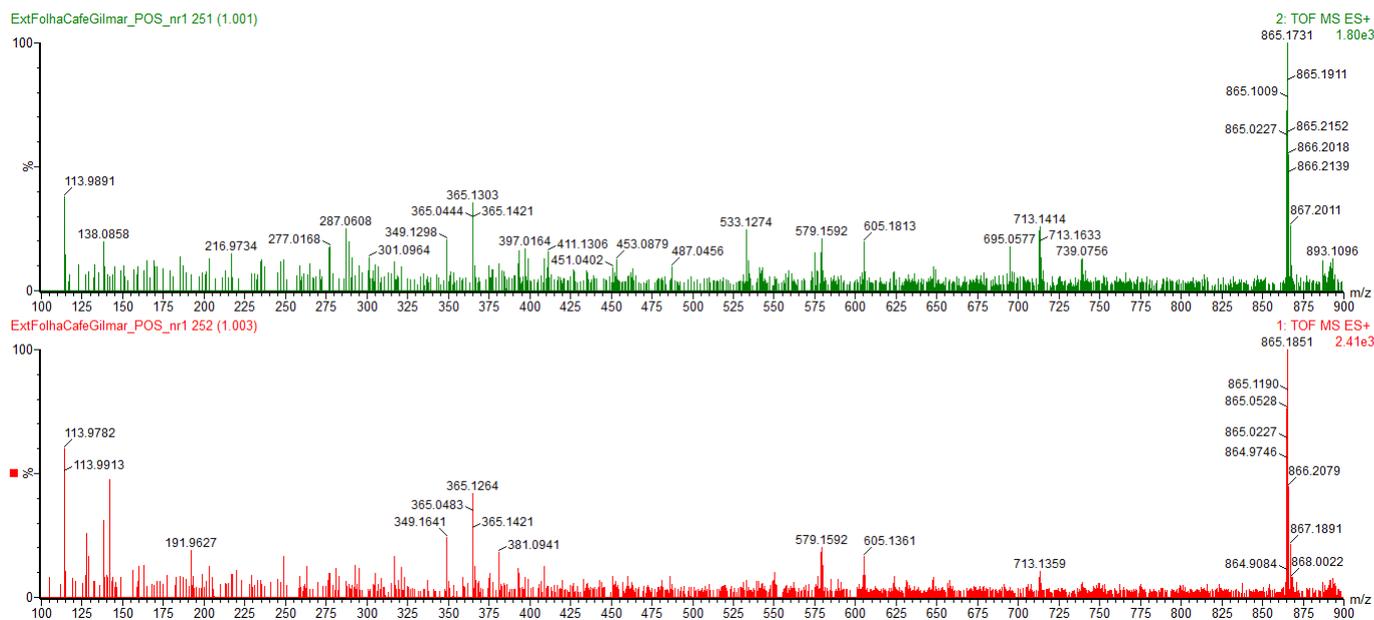
Ácido cafeico (padrão) – m/z 181,2352

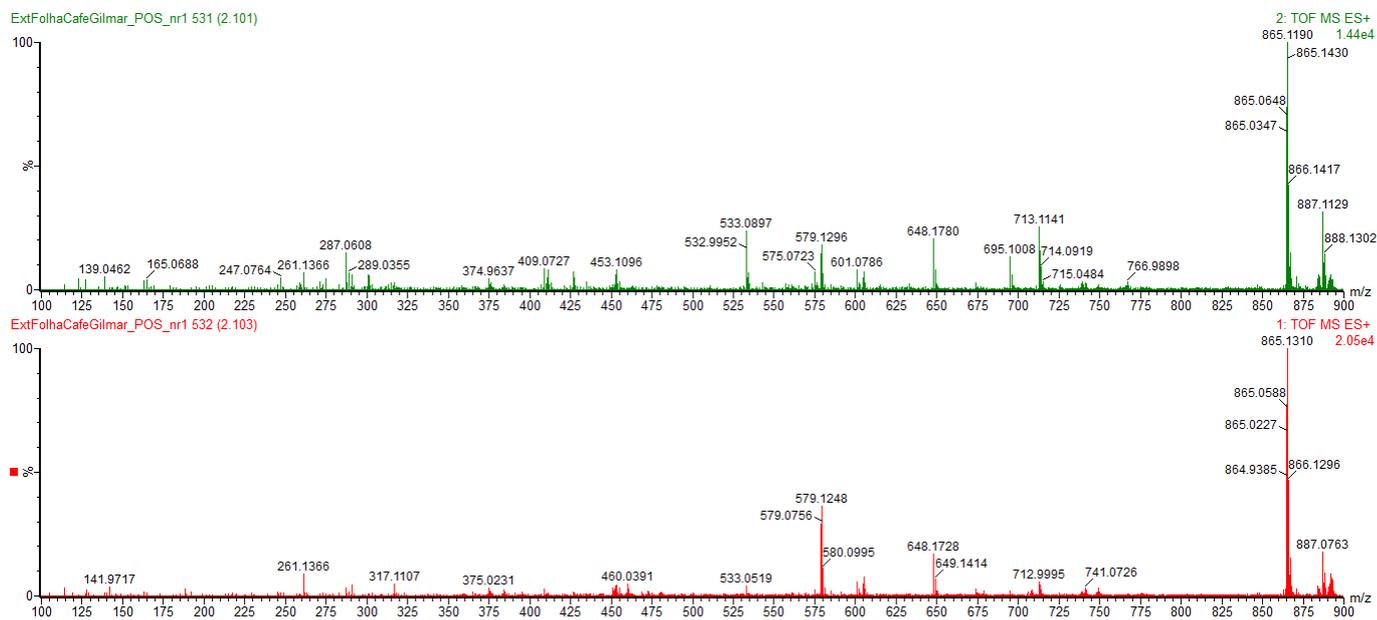
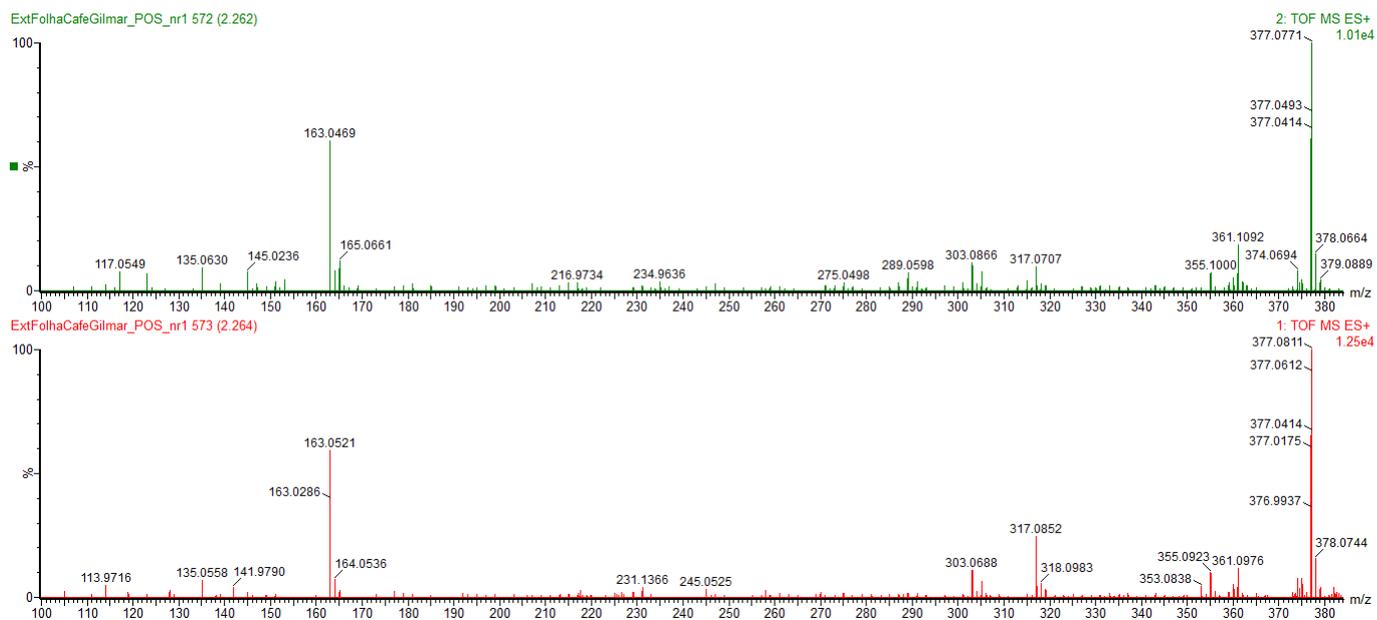


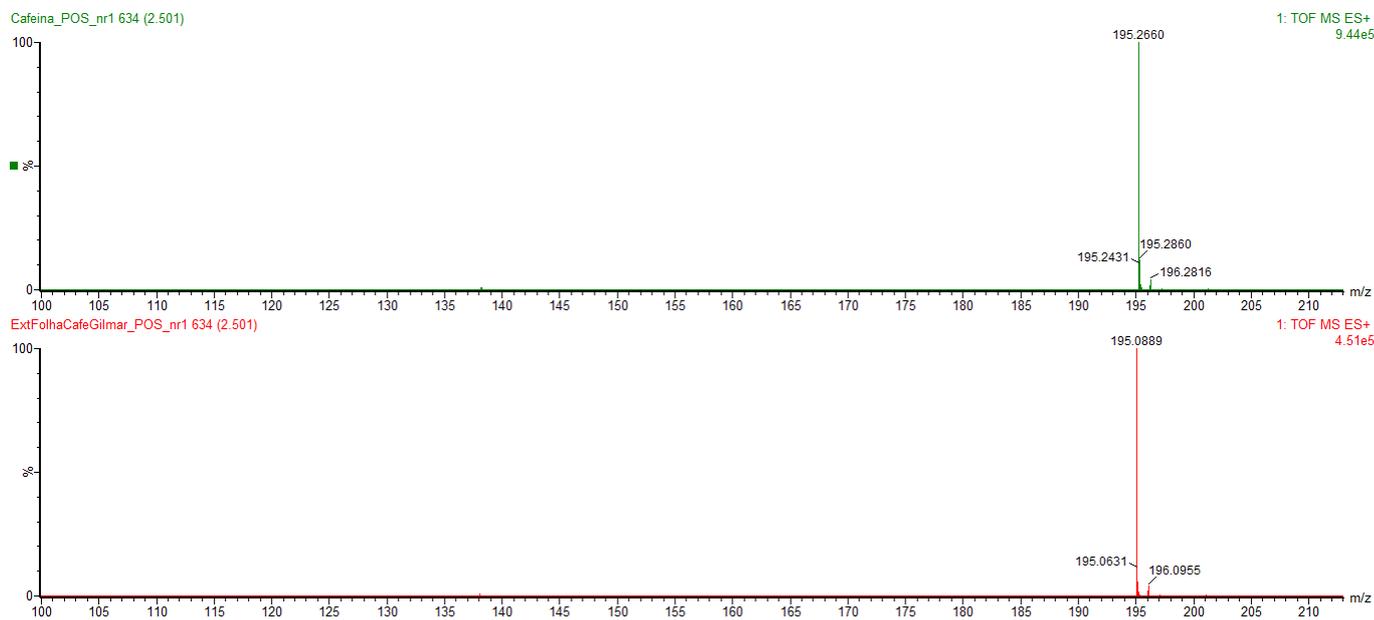
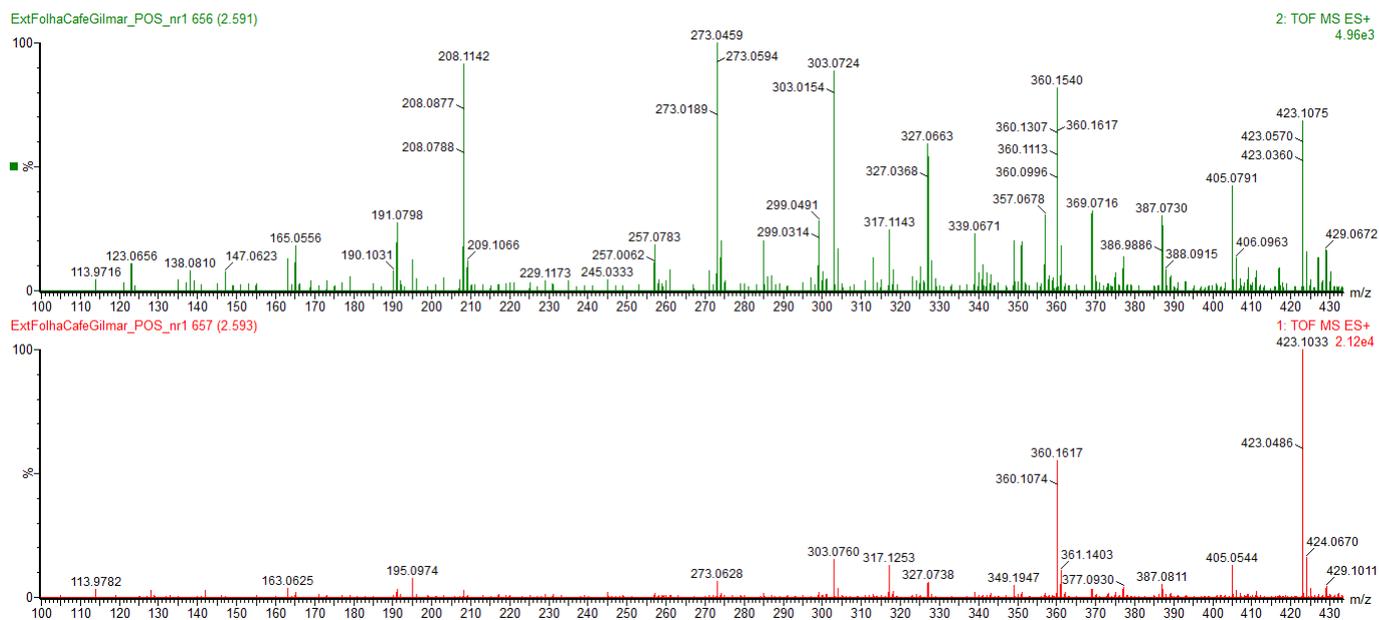
Ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) (padrão) – m/z 377,1208

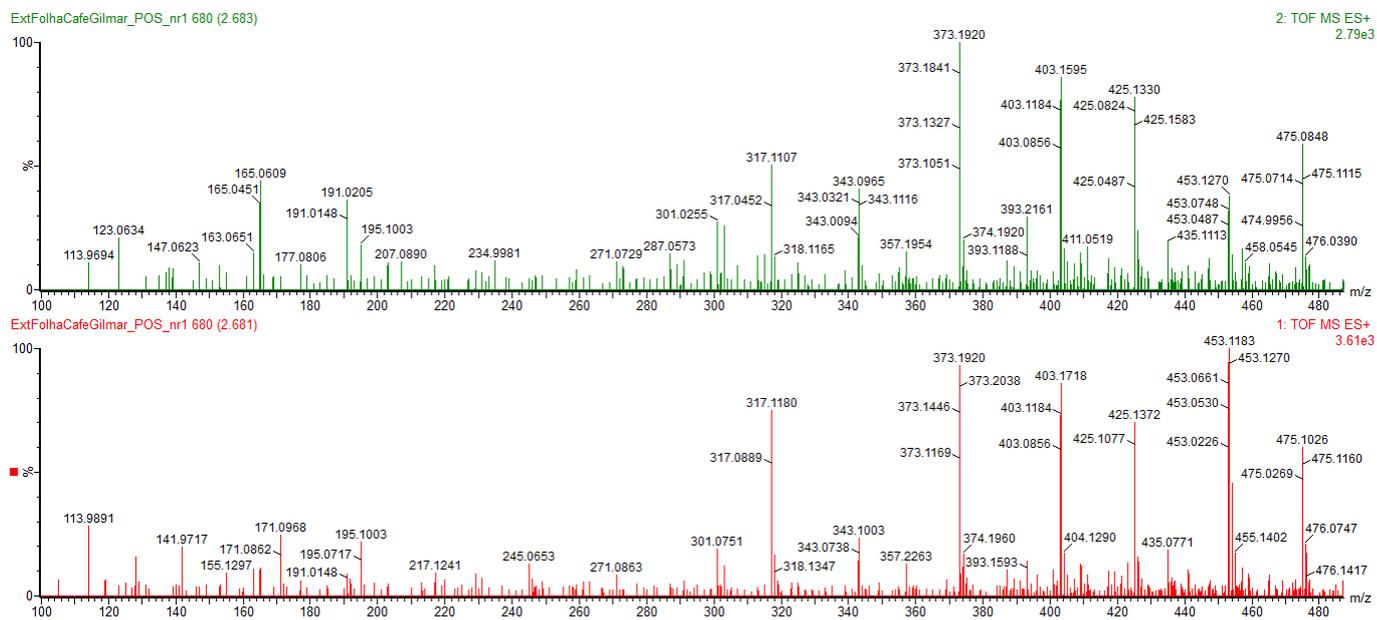
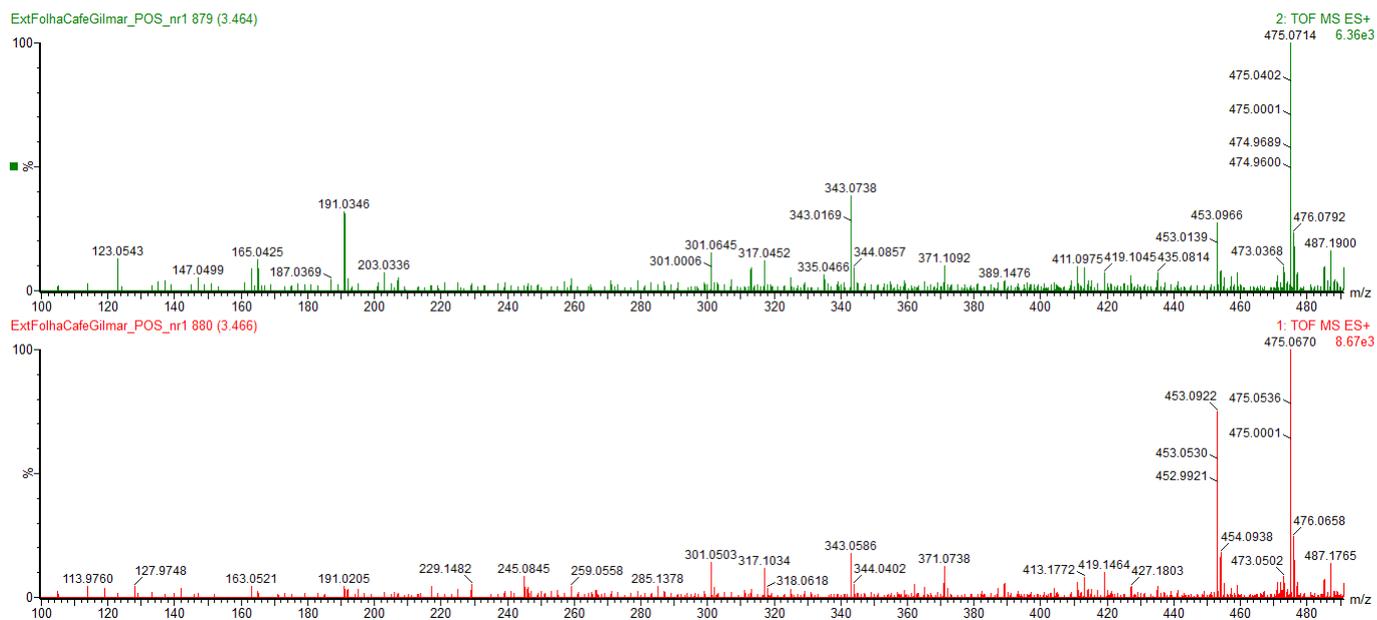


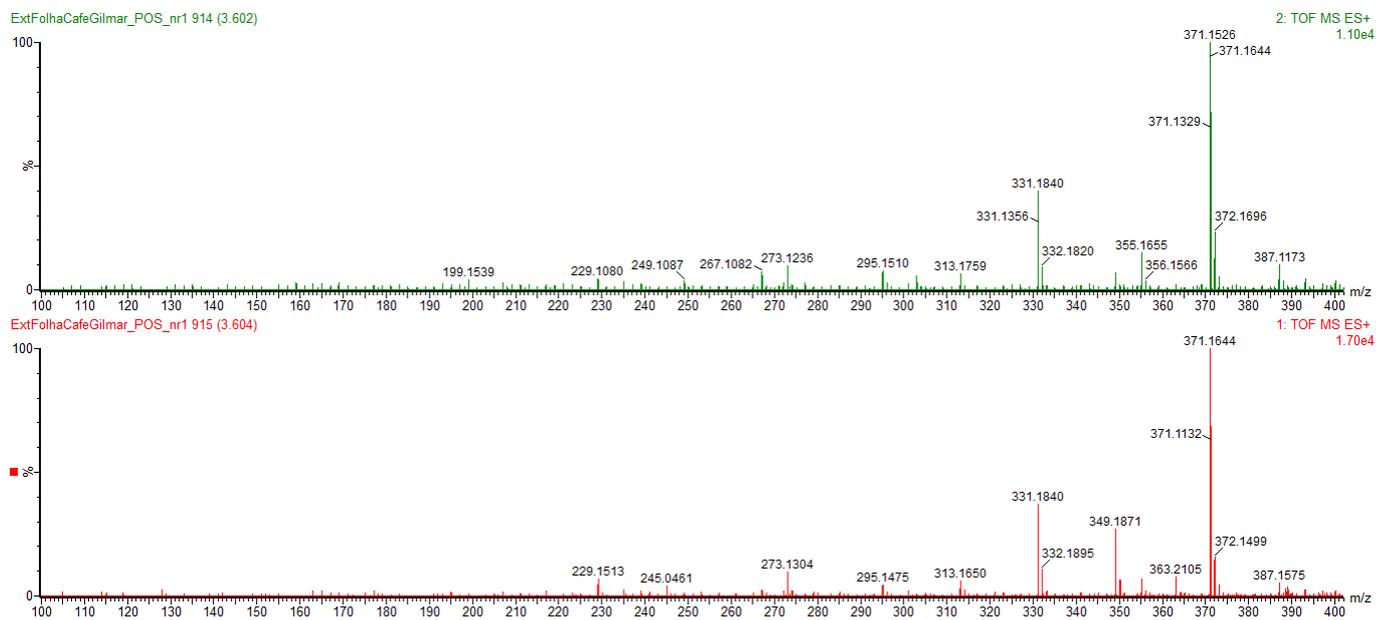
Cafeína (padrão) – m/z 195,2660Mangiferina (padrão) – m/z 423,5366

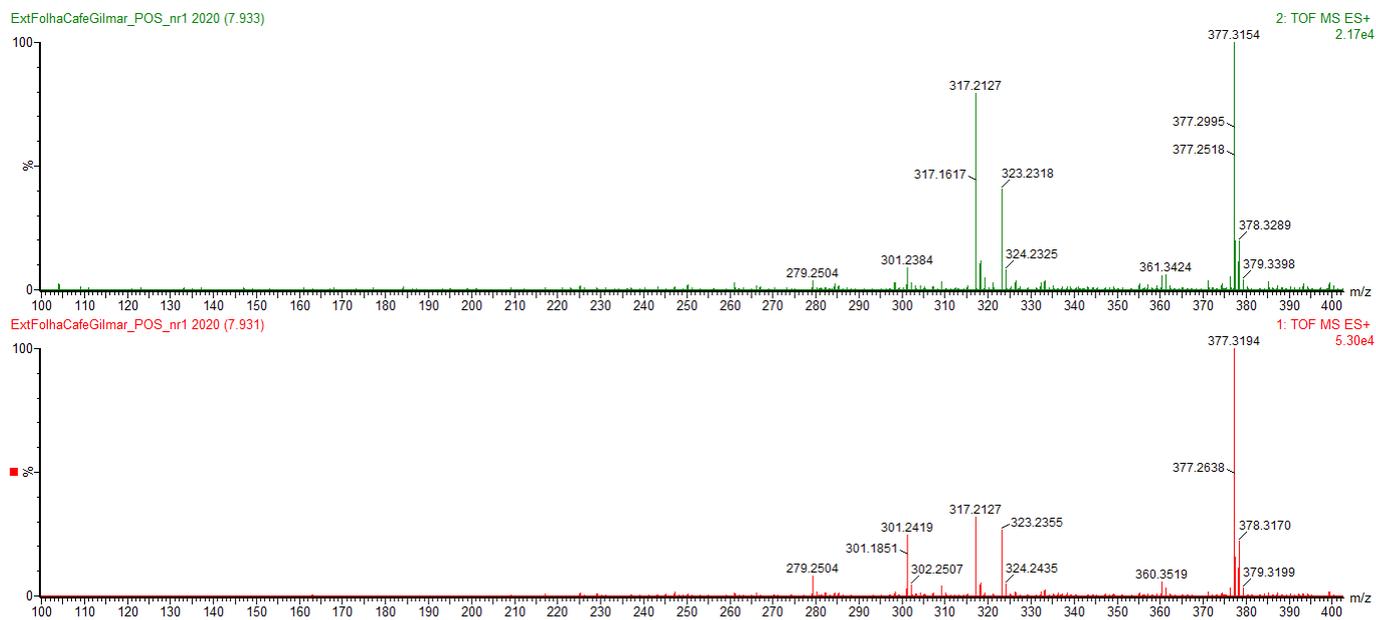
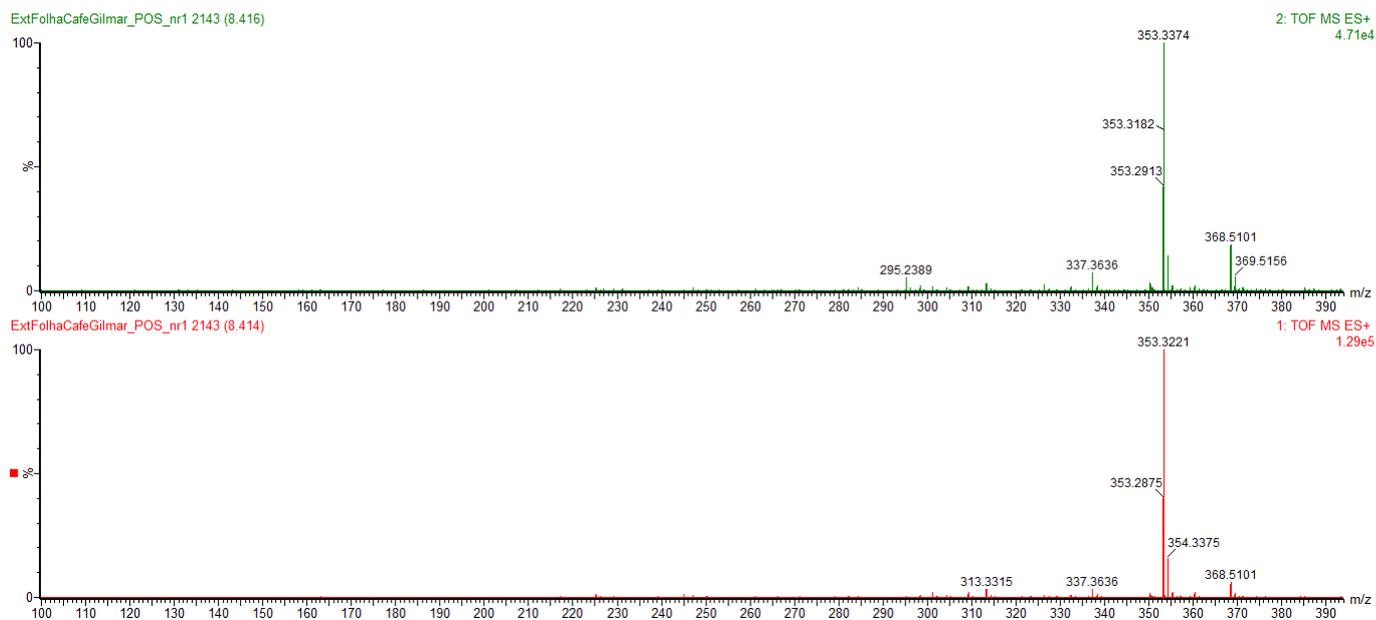
Trigonelina – m/z 138,0786Trímero de procianidina – m/z 865,1731

Trímero de procianidina – m/z 865,1190Ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) – m/z 377,0771

Cafeína – m/z 195,2660Mangiferina – m/z 423,1075

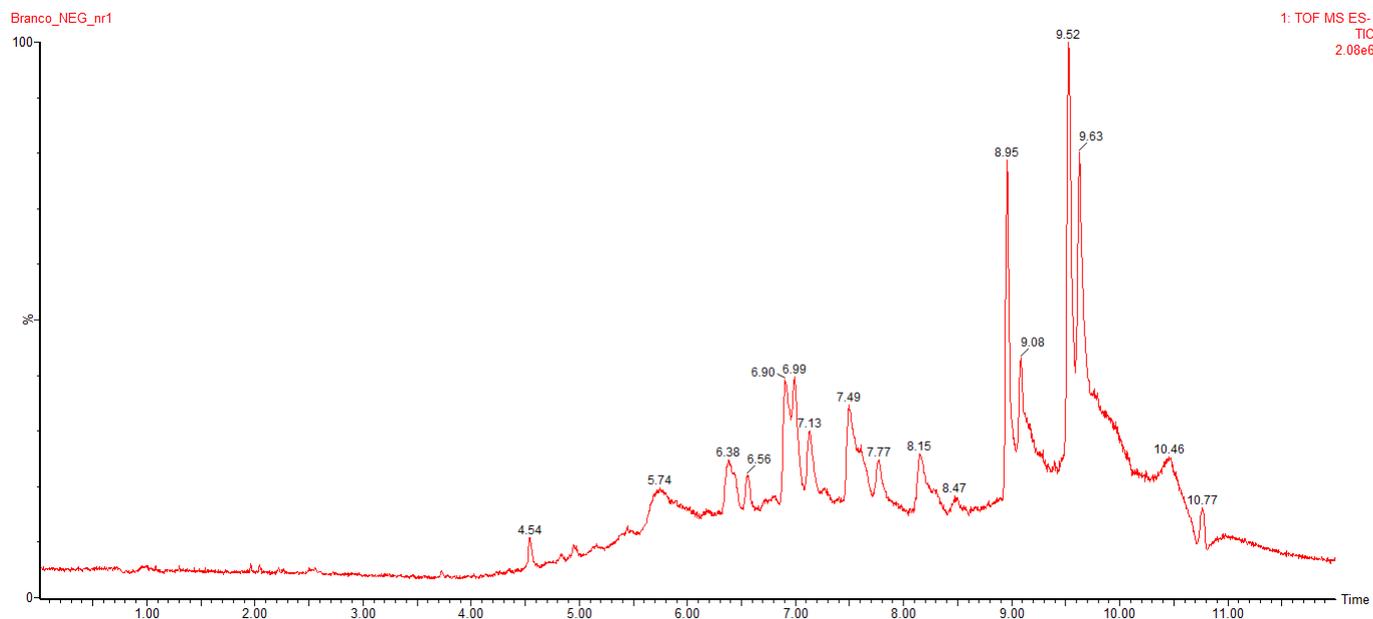
(Epi)Catequina mono glicosídeo – m/z 475,0848(Epi)Catequina mono glicosídeo – m/z 475,0714

Desconhecido 2 – m/z 371,1526

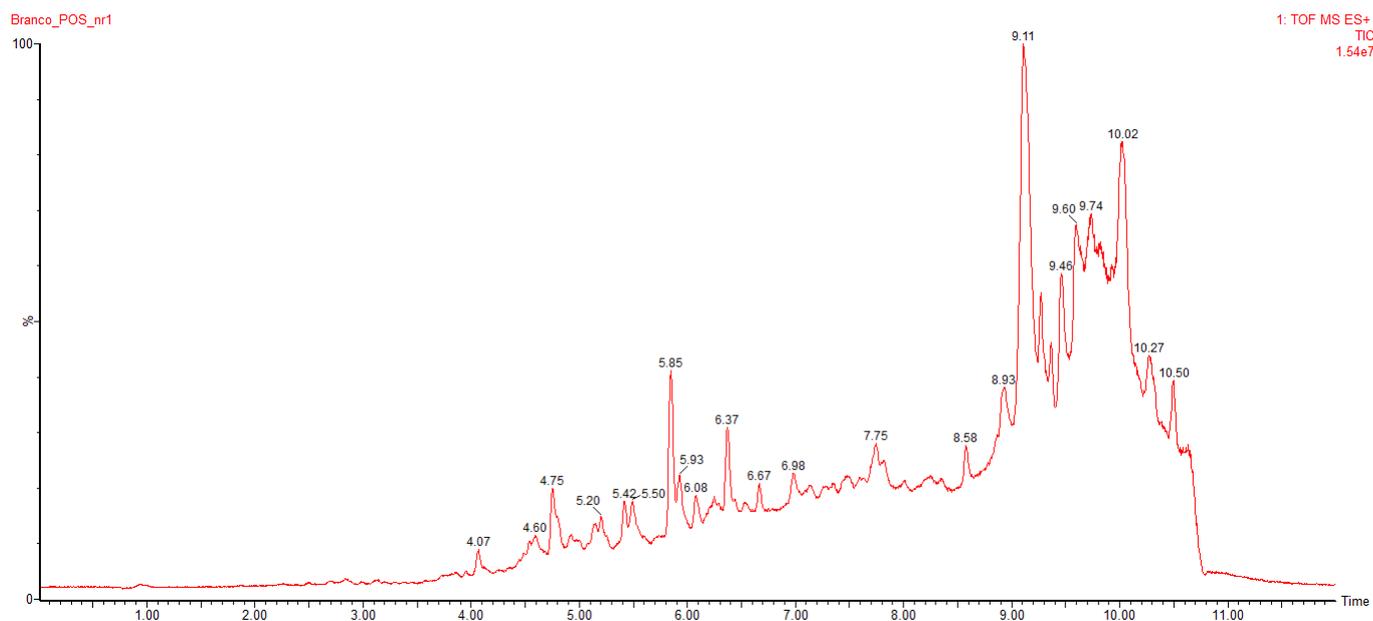
Desconhecido 6 – m/z 377,3154Desconhecido 7 – m/z 353,3374

APÊNDICE C - CROMATOGRAMAS DO BRANCO EM MODO NEGATIVO E POSITIVO

Modo negativo

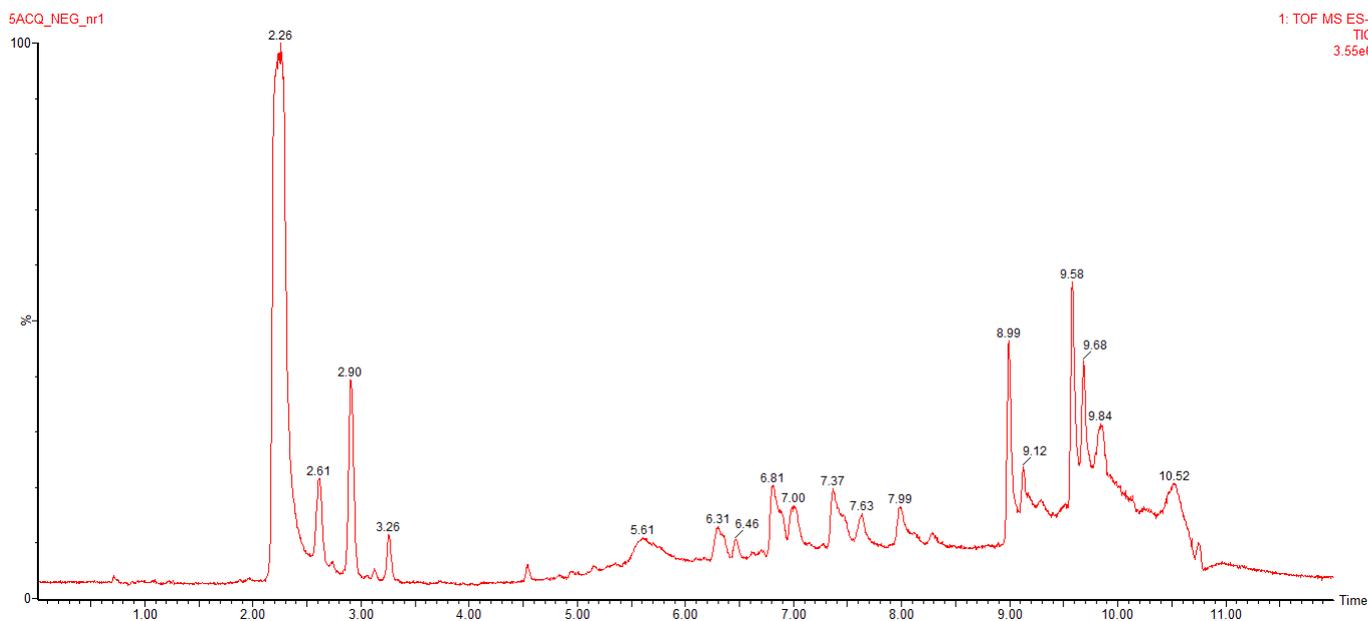


Modo positivo

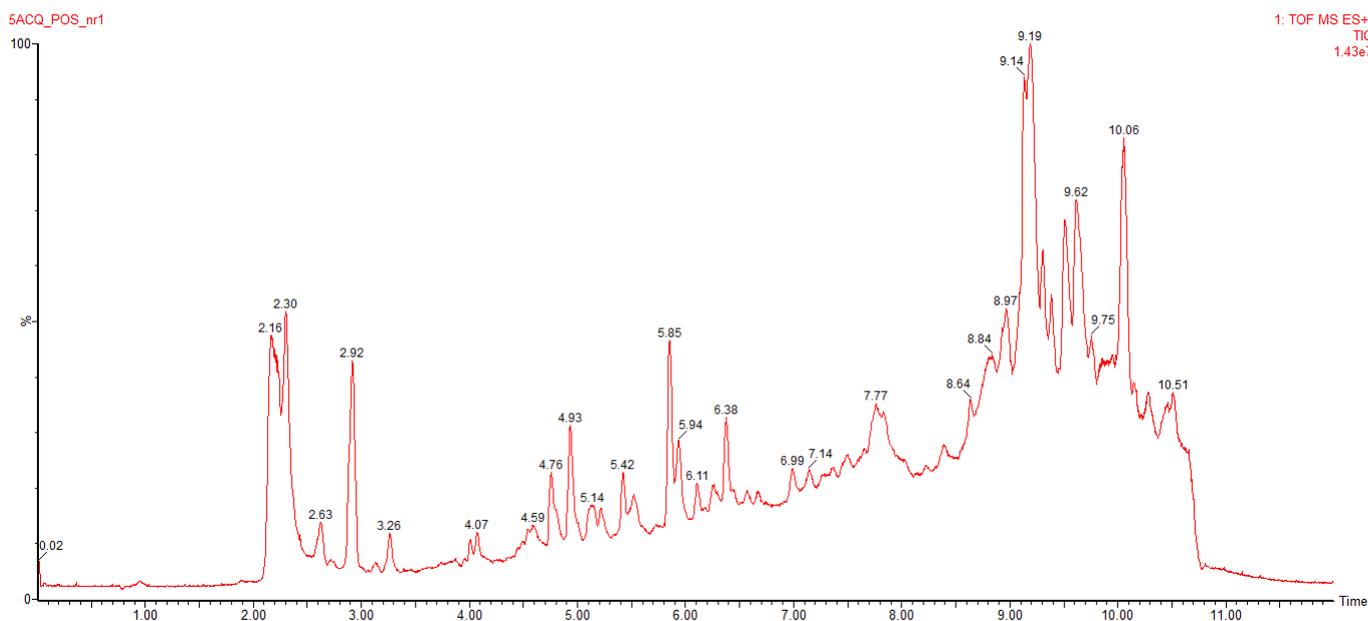


APÊNDICE D - CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES EM MODO NEGATIVO E POSITIVO

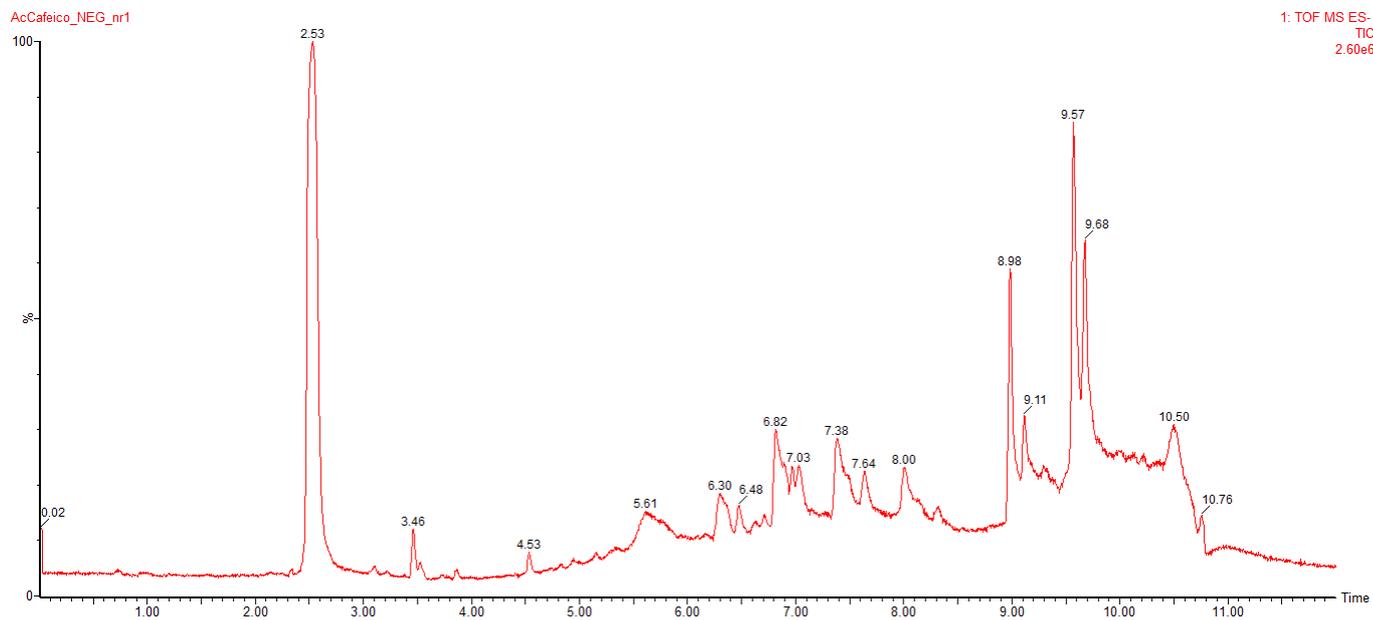
Ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) (padrão no modo negativo) – Tempo 2,271 min



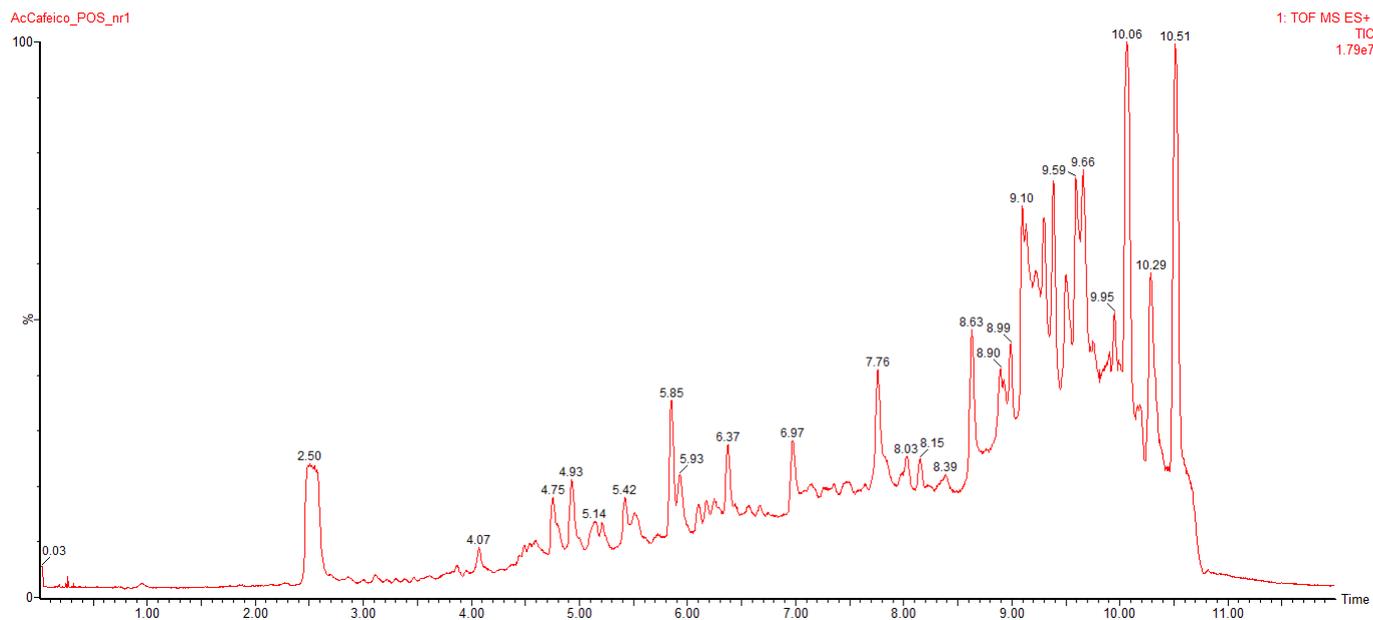
Ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) (padrão no modo positivo) – Tempo 2,271 min



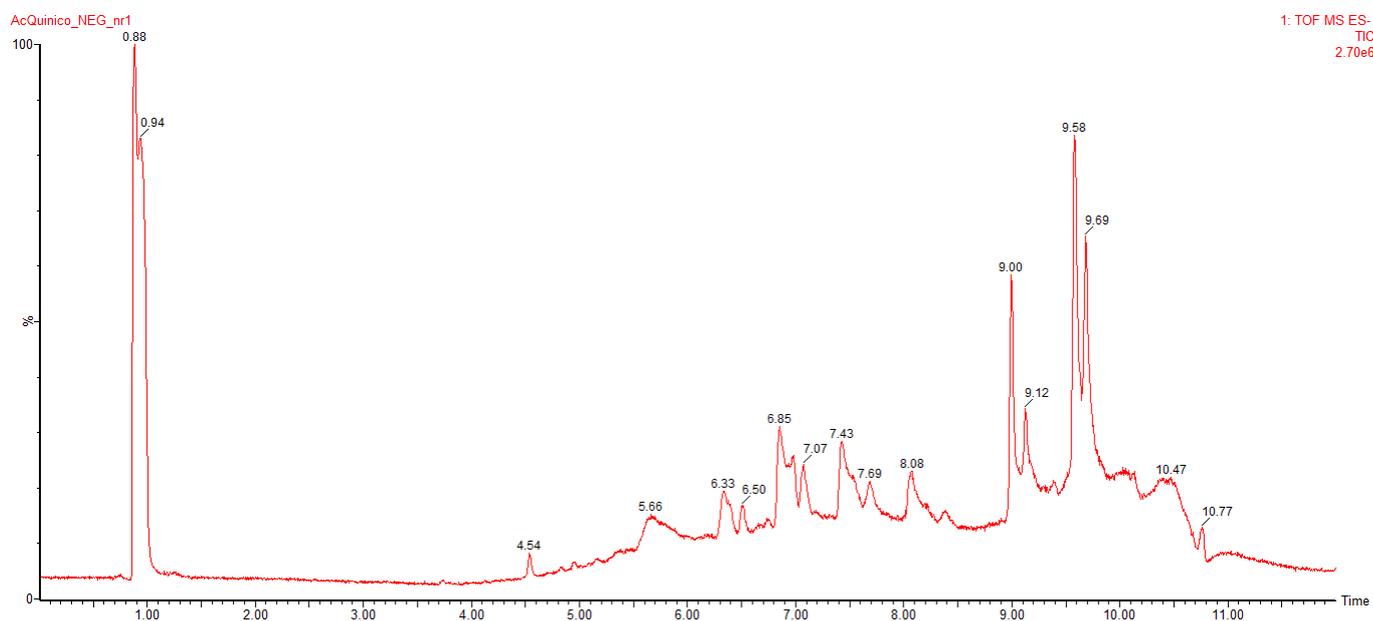
Ácido Cafeico (padrão no modo negativo) – Tempo 2,501 min



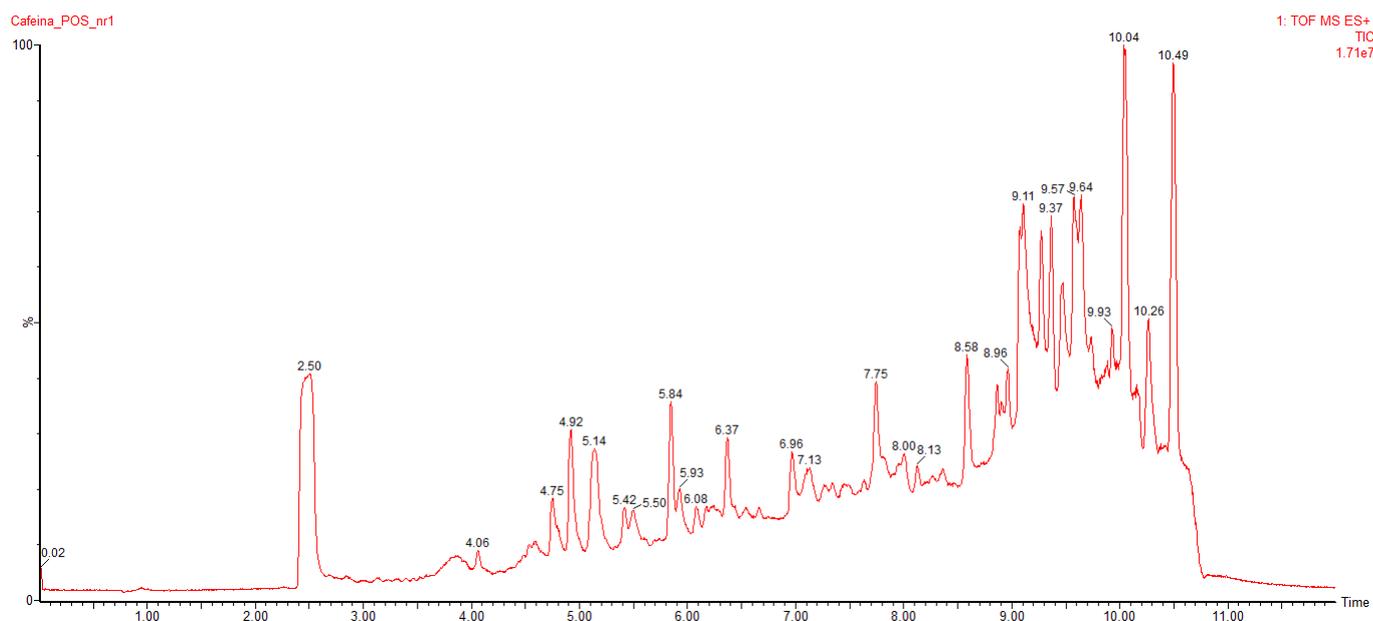
Ácido cafeico (padrão no modo positivo) – Tempo 2,501 min



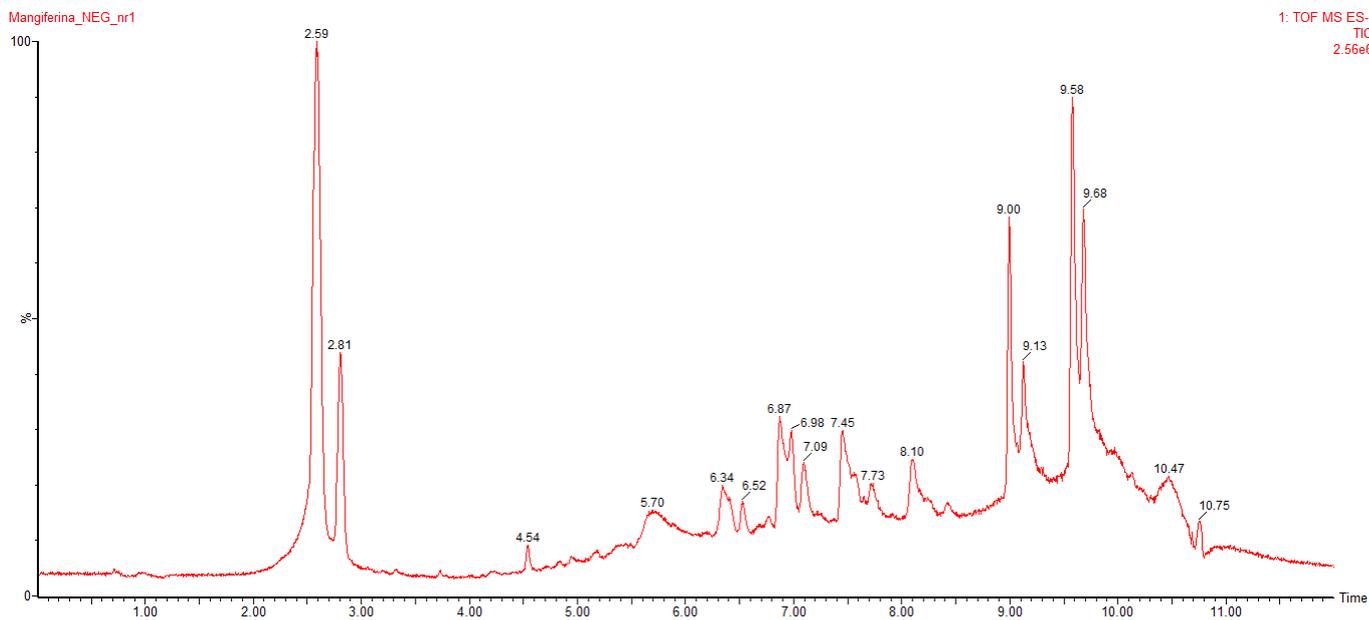
Ácido Quínico (padrão no modo negativo) – Tempo 0,881 min



Cafeína (padrão no modo positivo) – Tempo 2,501 min



Mangiferina (padrão no modo negativo) – Tempo 2,593 min



Mangiferina (padrão no modo positivo) – Tempo 2,593 min

