

Análise química e bioatividade do óleo fixo da borra de café (*Coffea arabica*) produzido na chapada diamantina (BA) frente ao *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Chemical analysis and bioactivity of fixed oil from coffee grounds (Coffea arabica) produced in Chapada Diamantina (BA) against Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)

Elaine Silva Santos do Nascimento^{1*}, Gabriella da Silva Nascimento⁴, Maria Assunta Busato³, Walter Antônio Roman Junior³, Junir Antônio Lutinski³, Cheila Nataly Galindo Bedor², Gabriela Lemos de Azevedo Maia²

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Biológicas, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF); ²Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Biológicas, UNIVASF, Petrolina; ³Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ); ⁴Acadêmica de Farmácia, UNIVASF, Petrolina

Resumo

Objetivo: A presente pesquisa se propõe a estudar o óleo fixo extraído do resíduo do preparo da bebida de café (borra de café), que geralmente é descartado. **Metodologia:** Foi avaliada a constituição química do óleo fixo extraído, bem como o potencial antioxidante, larvicida e antimicrobiano desse subproduto. **Resultados:** A análise química por cromatografia gasosa, acoplada à espectrometria de massas, revelou a presença de quatro ácidos graxos, sendo o componente majoritário o ácido linoleico (44,9%), seguido do ácido palmítico (43,56%). Na análise da atividade antioxidante *in vitro*, o óleo apresentou efeito superior (17,23±8,97) ao ácido ascórbico (10,40±1,40; controle positivo pelo Método β-Caroteno). Porém não houve atividade significativa com o método de sequestro de radicais livres (DPPH). Nos bioensaios com larvas de *Aedes aegypti* estágio L2 e L3, houve ação larvicida do óleo, onde quanto maior a concentração (500ug/mL) e maior o tempo (72h), maior a atividade larvicida. O teste da ação antimicrobiana, microdiluição em caldo, com cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC25923 e 10, *Escherichia coli* ATCC25922 e 06, e antibióticos sintéticos (ampicilina, gentamicina, norfloxacin) como controles positivos. Para as cepas de *E. coli*, o óleo da borra de café apresentou concentração inibitória mínima (CIM), dentro de um padrão clinicamente relevante. Sendo o mesmo para cepa *S. aureus* resistente. Houve efeitos sinérgicos do óleo com os três antibióticos contra cepas resistentes, com reduções nas CIM. **Conclusão:** Os compostos extraídos da borra do café apresentaram atividade larvicida e antimicrobiana, sendo promissor para a bioprospecção de novos produtos.

Palavras-chave: Antimicrobiano; antioxidante; larvicida.

Abstract

Objective: The present research aims to study the fixed oil extracted from the residue of the preparation of coffee drinks (coffee grounds), which is usually discarded. **Methodology:** The chemical constitution of the extracted fixed oil was evaluated, as well as the antioxidant, larvicidal and antimicrobial potential of this by-product. **Results:** Chemical analysis by gas chromatography, coupled with mass spectrometry, revealed the presence of four fatty acids, the major component being linoleic acid (44.9%), followed by palmitic acid (43.56%). In the analysis of the antioxidant activity *in vitro*, the oil showed a superior effect (17.23±8.97) to ascorbic acid (10.40±1.40; positive control by the β-Carotene Method). However, there was no significant activity with the free radical scavenging method (DPPH). In the bioassays with larvae of *Aedes aegypti* stage L2 and L3, there was larvicidal action of the oil, where the higher the concentration (500ug/mL) and the longer the time (72h), the greater the larvicidal activity. The test of antimicrobial action, microdilution in broth, with bacterial strains *Staphylococcus aureus* ATCC25923 and 10, *Escherichia coli* ATCC25922 and 06, and synthetic antibiotics (ampicillin, gentamicin, norfloxacin) as positive controls. For the *E. coli* strains, the coffee grounds oil showed minimum inhibitory concentration (MIC), within a clinically relevant standard. The same is true for the resistant *S. aureus* strain. There were synergistic effects of the oil with the three antibiotics against resistant strains, with reductions in MIC. **Conclusion:** The compounds extracted from coffee grounds showed larvicidal and antimicrobial activity, being promising for the bioprospecting of new products.

Keywords: Antimicrobial; antioxidant; larvicide.

INTRODUÇÃO

A espécie *Coffea arabica* L. pertence à família das Rubiaceas, sendo considerada uma árvore pequena ou

um arbusto perene. O valor dessa planta reside, quase exclusivamente, nas suas sementes, com as quais se prepara o café¹, bebida rica em compostos bioativos considerados benéficos para a saúde, como os polifenóis e alcaloides. Esses compostos químicos variam de acordo com o solo, o clima, as técnicas de cultivo, as condições de armazenamento, a temperatura, o tempo de torração e o nível de maturação².

Corresponding/Corresponding: *Elaine Silva Santos do Nascimento. – Endereço: Rua Joana Maria Rocha, 271, Umburana, Senhor do Bonfim (BA) – Email: elainejavan@gmail.com

Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, além de ser o segundo maior consumidor do produto. São cultivadas duas espécies: 62,19% correspondem à *C. arabica* e 37,81% à *C. canephora*³, essa última uma espécie mais resistente e mais barata. Entretanto, as duas espécies possuem semelhança na composição química⁴. No início da década de 1880, o Brasil era responsável por 32% da comercialização global do produto, sendo que as principais áreas de concentração de produção do café estão situadas no estado da Bahia e no norte de Minas Gerais⁵. A primeira estimativa da safra de café, em 2023-2024, aponta que a colheita do grão pode alcançar 46,4 milhões de sacas, o que está acima da média histórica de produção⁶.

A produção e o consumo de café no país (quase 8 bilhões de kg) levam também à geração de resíduos que podem causar impacto no meio ambiente, caso não sejam corretamente destinados. Em uma escala industrial, a borra é o resíduo sólido gerado durante o processo de extração na produção de café solúvel, quando a mistura de café moído e água é filtrada para separar os compostos solúveis dos não solúveis. A borra de café é incinerada ou despejada como resíduo sólido em aterros sanitários⁷. Esse resíduo possui características que lhe conferem importância econômica e tecnológica, devido a sua composição química rica em proteínas, lipídios, celulose e extrato não nitrogenado⁸.

O óleo extraído da borra do café é facilmente obtido e, dentre seus componentes, é considerado o mais valioso economicamente, sendo usado para produção de biodiesel⁹. Seu efeito na saúde humana também tem sido investigado, destacando-se a ação na prevenção de doenças degenerativas crônicas, câncer e problemas cardiovasculares. Devido a sua bioatividade, ele tem aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica¹⁰. Diante da abundância e do não aproveitamento dos resíduos de café, é coerente investigar sua ação frente a problemas de saúde pública, como as arboviroses e a resistência bacteriana.

O uso contínuo e indiscriminado de inseticidas sintéticos no combate a vetores transmissores de doenças, como, por exemplo, o *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762), transmissor de arboviroses como dengue, febre chikungunya, zika e febre amarela urbana, promove a seleção de resistência¹¹. A dengue é a arbovirose mais prevalente nas Américas, e o Brasil é o país que apresenta maior incidência desse agravo¹². Vários estudos¹³⁻¹⁵ relacionados a métodos naturais de prevenção e controle têm sido desenvolvidos na perspectiva de eliminar o vetor *Aedes aegypti*. A ausência de tratamento adequado e a resistência a inseticidas fomentam a necessidade de um controle vetorial alternativo².

De igual modo, pesquisas mostram que, nas últimas décadas, a utilização de fármacos de forma abusiva e indiscriminada tem levado muitas cepas de microrganismos a desenvolverem resistência aos antibióticos, um problema que se agravou após a pandemia causada pelo

novo coronavírus¹⁶. Os produtos naturais ensejam estratégias promissoras para combater as doenças causadas por bactérias, visto que apresentam composição química complexa e ampla variedade de moléculas. Alguns desses produtos têm atividade mesmo frente a cepas bacterianas que expressam mecanismos de resistência, exibindo capacidade de inibir a bomba de efluxo¹⁷.

Apesar de existirem várias pesquisas com o objetivo de analisar a constituição química do café e de seu resíduo, até o momento, não existem estudos extensivos e sistemáticos na literatura sobre a atividade antimicrobiana, antioxidante e larvicida do óleo extraído da borra de café. Além disso, a borra de café é rica em óleos que podem contaminar o meio ambiente. Portanto, faz-se necessário rastrear possibilidades para uso ou destino desses subprodutos, para minimizar contaminantes no meio ambiente¹⁸. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar as atividades larvicida, antioxidante e antimicrobiana do óleo fixo extraído da borra de café, bem como identificar os compostos nele presentes.

METODOLOGIA

Material vegetal e obtenção de óleos fixos

O pó de café utilizado foi produzido em novembro de 2020 na Cooperativa de Cafés Especiais e Agropecuária de Piatã, na Chapada Diamantina (BA), numa altitude média de 1300 metros. Cultivado de forma sustentável, sem uso de agrotóxicos, a espécie é 100% *C. arabica*. A bebida do café foi preparada colocando-se o pó do café em infusão na água fervente e coada em filtro de papel. A borra de café (BC) foi colocada para secar por 24 horas em estufa (45 °C), e a extração do óleo foi realizada com um extrator tipo Soxhlet, utilizando-se como solvente *n*-hexano (P.A.) As extrações foram realizadas durante duas horas. A retirada do solvente foi realizada em rotavapor (40 °C). Os óleos fixos obtidos foram armazenados e mantidos sob refrigeração em freezer para análises posteriores.

Identificação química

Para proceder à análise dos componentes presentes no óleo da BC, foi realizado um processo de derivatização dos ácidos graxos presentes na composição do óleo a ésteres metílicos, servindo-se do metóxido de sódio em metanol a 0,2% e ácido clorídrico a 3%. Após derivatização dos ácidos graxos a ésteres metílicos, utilizou-se a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), o que, de acordo com padrões comparativos empregados, revelou picos correspondentes à eluição e à massa molecular dos componentes graxos saturados e insaturados frequentemente encontrados em óleos fixos. Para as análises, foram utilizados cromatógrafo gasoso da marca Thermo Scientific, Bremen, Germany, modelo TRACE 1310, e espectrômetro de massas modelo TSQ-9000, com o au-

toamostrador TriPlus RSH. Uma coluna NA-5MS (60 m x 0,25 mm ID, 0,25µm espessura do filme) foi usada para separação dos compostos, utilizando-se hélio como gás de arraste 99,999% (White Martins S.A), com fluxo de 1 mL min⁻¹ e autoinjeter (split/splitless).

Atividade antioxidante *in vitro*

Na análise da atividade antioxidante, utilizou-se o método da co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, que é baseado na perda da coloração amarela do β -caroteno, devido a sua reação com os radicais formados pela oxidação do ácido linoleico através da aeração do meio¹⁹. Para o preparo dos padrões hidroxianisól de butila (BHA), o hidroxitolueno de butila (BHT) e o ácido ascórbico do óleo de café, foram feitas soluções na concentração de 1,0 mg/ml. E, para o preparo do meio oxidante, uma solução de β -caroteno, dissolvendo-se 2 mg do reagente em 10 ml de clorofórmio. Em seguida, foram pipetadas 2 ml dessa solução em um balão, adicionando-se 44 µL de ácido linoleico e 440 µL de Tween 40. O solvente clorofórmio foi evaporado sob vácuo, a 40°C, e, em seguida, adicionado ao balão 100 ml de água destilada e agitado durante dois minutos. Durante o procedimento experimental em si, as amostras e os padrões foram tratados da mesma maneira. Assim, em um tubo de ensaio, foram adicionados 0,120 mL da solução-padrão ou da amostra com 3,0 mL do meio oxidante. O branco foi feito apenas com 3,0 mL da solução-padrão e 0,120 mL de etanol, e todo o ensaio foi realizado em triplicata. Após a adição das soluções e do meio oxidante nos tubos, foi realizada uma leitura da absorbância no espectrofotômetro, com comprimento de onda de 470 nm. Esses tubos de ensaio foram colocados em banho-maria, a 50°C, durante duas horas. Passado esse tempo, foi feita uma nova leitura das absorbâncias. Os resultados são expressos como percentual de atividade antioxidante (% AA).

A atividade antioxidante também foi avaliada pelo método do sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1 – picrilhidrazil)²⁰. A preparação da solução de DPPH em etanol foi feita na concentração de 50 µg/mL, em que 1,0 mL da solução de DPPH foi adicionado a 2,5 mL das soluções de diferentes concentrações (1 a 243 µg/mL), da amostra e padrões (BHT, BHA e Ácido ascórbico), deixando-se reagir à temperatura ambiente. Usando um espectrofotômetro (NOVA INSTRUMENTS UV-1600, Piracicaba, Brasil), os valores de absorbância foram medidos a 518 nm, após 30 min, à temperatura ambiente. Os ensaios foram realizados em triplicata. A concentração efetiva média CE₅₀ (µg/mL) foi calculada por regressão linear, usando-se o GraphPad Programa Prisma 5.0.

Bioensaio larvicida

Para a realização da atividade larvicida, foram utilizadas larvas do segundo e do terceiro estágios (L2 e L3), oriundas de criadouro do laboratório de Entomologia

da Universidade Comunitária de Chapecó, Unochapecó (Santa Catarina). Como controles positivos, foram utilizados o Vectobac – BTi (bioinseticida à base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) e Espinosade (Espinosa A + Espinosina D), derivado da fermentação biológica da bactéria *Saccharopolyspora spinosa*²¹, nas dosagens indicadas pelos fabricantes e pelo Ministério da Saúde. Para o controle negativo, foram utilizados 100 mL de água ultrapura e 500 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). O óleo fixo da borra de café (OBC) foi diluído em 0,2 mL de Tween 80, 0.5%, e água livre de cloro (20 mL), utilizada nas concentrações de 500µg/mL, 250µg/mL, 100µg/mL, 50µg/mL e 25µg/mL. Os bioensaios foram realizados em condições de laboratório, à temperatura de 28°C e fotoperíodo de 12 horas.

Os testes foram realizados em microcosmos, copos plásticos descartáveis de 150 mL, com 33,3 mL de solução experimental, e cada um recebeu dez larvas de *A. aegypti* para cada concentração (n=3)²². A atividade larvicida foi baseada na percentagem de larvas vivas, avaliada a cada 12 horas, até 72 horas após o tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Atividade antimicrobiana

Nos ensaios para análise da atividade antibacteriana, foram utilizadas linhagens bacterianas de *Staphylococcus aureus* 10, resistente a diversos aminoglicosídeos²³, e sua linhagem-padrão, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; e *Escherichia coli* 06, resistente a gentamicina, assim como a sua linhagem padrão *Escherichia coli* ATCC 25922. Essas linhagens foram mantidas em Agar Heart Infusion (HIA, Difco Laboratories Ltda.). Foram utilizadas, frente a bactérias multirresistentes, drogas da classe dos aminoglicosídeos (gentamicina), fluoroquinolonas (norfloxacina) e penicilinas (ampicilina). Como reagentes, foram usados rezasurina (corante redox que indica a presença de células bacterianas viáveis), e sua solução estoque foi preparada de acordo com diretrizes do CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute, 2005). Como meio de cultura, nos ensaios microbiológicos, foram utilizados Infusion Agar – HIA (Difco Laboratories Ltda.) e Caldo Brain Heart Infusion – BHI (Acumedia Manufacturers Inc.). Todos os meios de cultura foram preparados segundo as especificações do fabricante e posteriormente diluídos em água destilada e esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C. Houve preparação e padronização do inóculo bacteriano, mantido em tubos de ensaio com HIA, inclinado, sob refrigeração (4°C). Para os testes de concentração inibitória mínima e de modulação com antibióticos, inicialmente os isolados foram cultivados em meio HIA vertido em placa de petri a 37°C por 24 horas. A partir desse cultivo, foram preparadas suspensões dos microrganismos em tubos de ensaio com 3 mL de solução estéril (NaCl 0,9%). Logo em seguida, essas suspensões foram agitadas por dois minutos, com auxílio do aparelho

vortex, e cada suspensão teve sua turbidez comparada e ajustada à suspensão de sulfato de bário do tubo 0,5, escala de McFarland, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente 10^5 unidades formadoras de colônias/mL-UFC/mL²⁴. Para o preparo da solução, foram pesadas 10 mg da solução posteriormente diluída em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO– Merck, Darmstadt, Alemanha), obtendo-se uma concentração inicial de 100 mg/mL. A partir dessa concentração, foi feita uma diluição em água destilada estéril para se atingir a concentração de 1024 µg/mL, solução utilizada no teste.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo. A CIM é definida como a menor concentração, em que não é observado crescimento microbiano²⁵. Para realizá-la, foi utilizada uma placa de microdiluição estéril com 96 poços e preparado um meio de distribuição em tubos eppendorf®, uma solução de 1 mL contendo 900µL de BHI 10% e 100µL da suspensão bacteriana. A placa de microdiluição foi preenchida no sentido numérico, adicionando-se 100µL da solução de distribuição em cada cavidade. Posteriormente, foi realizada a microdiluição seriada com 100µL da solução-teste, com concentrações que variavam de 512 a 8 µg/mL, até a penúltima cavidade, sendo a última cavidade destinada ao controle do crescimento microbiano. Em seguida, as placas foram incubadas durante 24 horas a 35°C²⁶. A revelação da CIM bacteriana foi feita utilizando-se a resazurina.

Para avaliar o potencial da substância como modificadora da resistência aos antibióticos, foi utilizado o método proposto por Coutinho et al.²⁷ (2008). O óleo foi misturado em caldo BHI 10%, em concentrações subinibitórias, obtidas e determinadas após a realização de teste de avaliação da CIM, sendo que, para o teste de modulação, a concentração do óleo foi reduzida oito vezes (CIM/8). O meio de distribuição foi preparado em tubos de eppendorf® que continham, cada um, BHI 10% + 150µL da suspensão bacteriana mais a substância-teste, atingindo 1,5 mL de solução. Para o controle, a solução de 1,5 mL apresenta apenas BHI 10% + 150µL de suspensão microbiana. A placa de microdiluição foi preenchida no sentido alfabético, adicionando-se 100µL da solução de distribuição em cada cavidade. Em seguida, foi realizada a microdiluição seriada (proporção 1:1 de volume), com 100µL da droga (antibiótico), até a penúltima cavidade. As placas preenchidas foram incubadas a 37°C por 24 horas, e, após esse período, a leitura foi feita da mesma forma que no teste de CIM. As concentrações dos antibióticos variaram gradualmente de 1024 a 1 µg/mL.

RESULTADOS

Na preparação do óleo em estudo, foram utilizados 245 g da borra do café, sendo obtidos 21,58 g do óleo fixo (rendimento de 8,8 %).

Identificação química

A análise por CG-EM, identificou, de forma qualitativa e quantitativa, os componentes da amostra. Na Tabela 1, estão listados os quatro ácidos graxos identificados na amostra do óleo, destacando-se, como constituintes majoritários, o ácido linoleico (44,9%) e o ácido palmítico (43,56%).

Tabela 1 – Composição de ácidos graxos por Cromatografia Gasosa – EM do óleo fixo extraído da borra de café (*C. arabica*).

Tempo de Retenção (min)	Ácido Graxo	Área (%)	Tipo de Ácido Graxo
16,86	Ácido linoleico	44,90	Ácido insaturado
15,00	Ácido palmítico	43,56	Ácido saturado
17,17	Ácido esteárico	7,19	Ácido saturado
16,91	Ácido oleico	4,11	Ácido insaturado

Fonte: dados da pesquisa

Atividade antioxidante

Na avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, foi possível verificar, no método da inibição da co-oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico, que o óleo da BC apresentou atividade antioxidante superior (17,23% ± 8,97), se comparada ao padrão ácido ascórbico (10,61% ± 2,28). No método do sequestro do radical DPPH, o óleo não apresentou atividade oxidante significativa (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividade antioxidante do óleo fixo extraído da borra de café (*C. arabica*).

Amostras/Padrões	β-Caroteno (AA%)	DPPH (CE ₅₀ , µg/mL)
Ácido Ascórbico	10,40 ± 140	2,35 ± 0,9
BHA	94,69 ± 0,74	4,52 ± 0,85
BHT	97,24 ± 0,07	109,6 ± 10,32
Óleo Fixo da Borra de Café	17,23 ± 8,97	ND

Fonte: dados da pesquisa

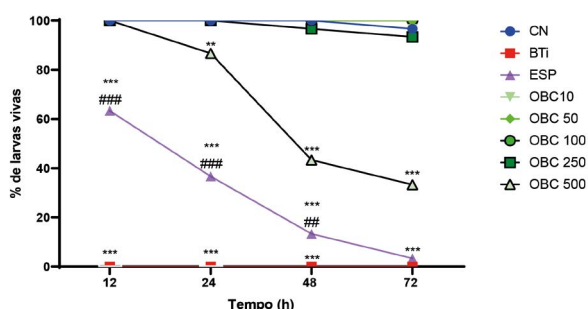
Atividade larvicida

A atividade larvicida do óleo fixo extraído da borra de café foi testada em cinco concentrações diferentes. Nas concentrações de 10, 50, 100 e 250 µg/mL, não houve atividade larvicida em todo o tempo do experimento, ou seja, a quantidade de larvas vivas (10) não variou. Para a concentração de 500 µg/mL, os resultados mostram efeito larvicida significativo. A partir de 24 horas, o óleo da borra de café apresentou uma redução estatisticamente significativa no número de larvas vivas, com um valor de $p < 0.01$, comparado ao controle negativo (CN).

A atividade aumenta ao longo do tempo, chegando a aproximadamente 67% de larvas mortas em 72 horas (Figura 1).

As duas substâncias utilizadas como controle positivo, o VectobacWG®(Bti) e o Spinosad, foram testadas e avaliadas quanto a sua potência como inseticidas sintéticos. O Vectobac WG®(Bti) teve 100% de ação larvicida em todas as concentrações testadas, a partir das primeiras horas dos bioensaios (12 horas), enquanto o biolarvicida Spinosad (ESP) variou sua ação de acordo com a concentração e o tempo de exposição. Na medida em que foram aumentados as concentrações e o tempo de exposição, a ação larvicida se potencializou (97% em 72h). A comparação entre o óleo de borra de café e os controles positivos indica que o óleo apresenta um efeito larvicida inferior em todas as concentrações avaliadas (Figura 1).

Figura 1 – Atividade larvicida do óleo de borra de café nas concentrações de 500 µg/mL (OBC 500), 250 µg/mL (OBC 250), 100 µg/mL (OBC 100), 50 µg/mL (OBC 50) e 10 µg/mL (OBC 10) comparado ao ESP (espinozade, controle positivo), BTi (controle positivo) e CN (controle negativo) de 12 à 72h. *** $p < 0,001$ comparado ao CN (controle negativo). ** $p < 0,01$ comparado ao CN. ### $p < 0,001$ comparado ao BTi. ## $p < 0,01$ comparado ao BTi



Fonte: autoria própria

Concentração inibitória mínima

O óleo extraído da borra de café apresentou CIMs de 512 µg/mL frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 e 256 µg/mL frente a *Escherichia coli* 06. Para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, o óleo apresentou uma concentração inibitória de 512 µg/mL, e, para *S. aureus* 10, de 1024 µg/mL, o que foi percebido na leitura colorimétrica das placas de microdiluição. Para as cepas da *E. coli*, o óleo da borra de café apresentou CIMs dentro de um padrão clinicamente relevante, tanto na bactéria resistente quanto no padrão. Para *S. aureus*, o óleo apresentou CIMs relevante apenas para a cepa-padrão (Tabela 3).

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL do óleo da borra de café e da clorpromazina frente as cepas em estudo.

Bactérias	Óleo da Borra de Café (µg/mL)	Clorpromazina (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> 10	≥ 1024	128
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	512	64
<i>Escherichia coli</i> 06	256	256
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	512	16

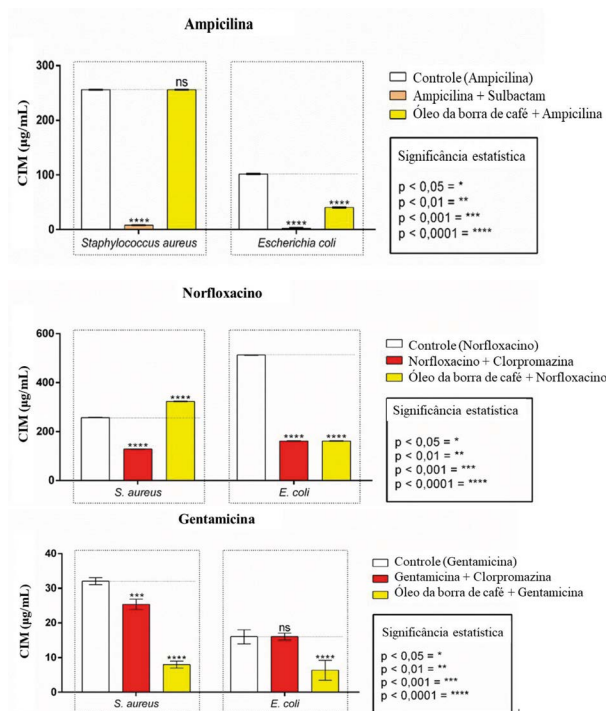
Fonte: dados da pesquisa

Modulação de drogas antibacterianas

O mecanismo de resistência enzimático foi demonstrado nas duas cepas testadas, usando-se a ampicilina como controle. Os valores CIM da ampicilina foram significativamente reduzidos apenas contra a cepa *E. coli*, indicando que o óleo apresenta efeito modulador de antibióticos contra essa cepa (Figura 2).

Nas cepas testadas usando-se associação da gentamicina com a clorpromazina, assim como de norfloxacino com clorpromazina, o mecanismo de bomba de efluxo teve uma expressão significativa, verificada pela diminuição da CIM dessa associação, quando comparada à CIM dos antibióticos isolados. Quando o óleo da BC foi combinado com gentamicina, apresentou sinergismo frente todas as cepas testadas, diminuindo a CIM. Quando em associação com o antibiótico norfloxacino, houve um efeito antagônico contra a cepa *Staphylococcus aureus*, usada no teste, e sinérgico contra *Escherichia coli* (Figura 2).

Figura 2 – Efeito modificador da Ampicilina, Norfloxacino e Gentamicina associado ao óleo da borra de café frente as cepas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.



Fonte: autoria própria

DISCUSSÃO

Este estudo permitiu a identificação dos compostos químicos presentes no óleo fixo extraído da borra de café (*C. arabica*), constituídos por 50% de ácidos graxos saturados e 50% de ácidos graxos insaturados, sendo que o ácido linoleico (44,90%) é o constituinte majoritário dentre os insaturados, e o ácido palmítico (43,56%) entre os saturados. Em um estudo de caracterização qualitativa, Rocha, Reis, Chaves¹⁸ (2013) já mencionam a presença desses ácidos graxos no óleo da borra de café. A composição de ácidos graxos pode influenciar significativamente a atividade biológica dos óleos fixos. Estudos têm demonstrado que o ácido linoleico possui propriedades antibacterianas e larvicidas^{28,29}. Além disso, a presença de ácidos graxos saturados, como o ácido palmítico, também tem sido associada a atividades larvicidas, contra larvas do *Aedes aegypti*³⁰. São necessários estudos adicionais para se compreender como os ácidos graxos agem, especialmente quando estão presentes em misturas nos óleos. A interação entre diferentes ácidos graxos pode influenciar suas propriedades individuais e, consequentemente, a atividade biológica do óleo como um todo.

Na análise da atividade antioxidante *in vitro*, o óleo da borra de café apresentou resultado significativo apenas no método de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, quando comparado ao padrão ácido ascórbico. Reconhecido por suas propriedades antioxidantes, o ácido ascórbico é associado à prevenção de doenças devido à sua eficácia na neutralização de radicais livres¹⁹. A capacidade de o óleo de café de apresentar atividade antioxidante nesse sistema sugere que ele pode conter compostos bioativos que, embora ainda não totalmente caracterizados, têm potencial para atuar como agentes protetores contra o estresse oxidativo. No teste feito pelo radical DPPH, ele não apresentou resultado significativo. Substâncias apolares, como o óleo testado, tendem a ter resultados pouco expressivos, visto que esse teste é mais eficiente na detecção da atividade antioxidante de compostos polares³¹.

Os resultados para atividade larvicida foram efetivos na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ do óleo da borra de café e no tempo de exposição de 72 horas, frente a larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Diferentemente dos controles positivos, o óleo testado não mostrou mortalidade significativa nas primeiras 12 horas. Esses resultados indicam que é necessário investigar estratégias para melhorar seu tempo de ação. Uma resposta mais rápida pode não apenas aumentar sua competitividade como larvicida, mas também reduzir o tempo de exposição das larvas ao produto, minimizando riscos ambientais e efeitos sobre organismos não alvo.

Estudos indicam que a borra do café causa mortalidade larval em *A. aegypti* e, portanto, pode ser considerada como um agente potencial para controle alternativo^{32,33}. Diferentemente desta pesquisa, nesses estudos não é

utilizado o óleo, e sim a borra do café, e em concentrações mais elevadas (75-300 mg/mL), o que pode indicar a necessidade de serem feitos novos testes com o óleo da borra do café com outras concentrações para obtenção de melhor resultado. Destaca-se que, no óleo da BC estudado, o principal constituinte é o ácido linoleico, que já teve sua atividade larvicida contra as larvas em 4º estágio do *A. aegypti* testada, mostrando-se muito eficaz²⁸. Esse dado, associado aos observados no teste com a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, reforça o óleo da BC como potencial agente larvicida natural. Novos estudos para aprimorar a potência e o tempo de ação do óleo da borra de café são essenciais. A combinação desse produto com outras substâncias pode ser uma alternativa para otimizar o controle larval e contribuir para a redução da resistência em longo prazo.

Na análise da atividade antibacteriana, com exceção da cepa de *Staphylococcus aureus* 10, o óleo da borra de café apresentou CIMs inferiores ou iguais a 512 $\mu\text{g/mL}$ em relação a todas as outras cepas testadas. Como os compostos vegetais são frequentemente classificados como antimicrobianos com base em testes de suscetibilidade que resultam em CIMs na faixa de 100 a 1.000 $\mu\text{g/mL}$, o óleo da BC possui potencial antibacteriano frente às cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* ATCC testadas³⁴. Os dados obtidos ressaltam a importância da atividade antibacteriana do óleo da borra de café, especialmente considerando que a menor CIM observada foi de 256 $\mu\text{g/mL}$ contra a cepa *Escherichia coli* 06. De acordo com a literatura, uma CIM nesse valor não apenas demonstra a eficácia do óleo, mas também indica relevância clínica, sugerindo uma atividade antibacteriana intrínseca, que pode ser explorada em futuras aplicações terapêuticas³⁵. Em um estudo realizado por Dilika, Bremner, Meyer²⁹ (2000), o ácido linoleico, um dos principais componentes do óleo da BC, não apresentou atividade bacteriana frente a bactérias Gram-negativas. Com base nesse relato, podemos sugerir que as CIMs relevantes observadas no presente estudo, frente a bactérias Gram-negativas, devam ser decorrentes de outros constituintes ou do sinergismo entre os ácidos graxos do óleo.

Como o óleo da BC apresentou atividade antibacteriana, este estudo analisou a capacidade de essa substância modular a resistência antibacteriana a alguns antibióticos (ampicilina, gentamicina, norfloxacin). No experimento, que utilizou sulbactam como inibidor enzimático e ampicilina como controle, o mecanismo de resistência enzimática foi evidenciado nas duas cepas testadas, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A associação entre sulbactam (um inibidor de beta-lactamases) e ampicilina (um antibiótico beta-lactâmico) resultou em uma CIM reduzida, em comparação com a ampicilina administrada isoladamente. A resistência enzimática em bactérias frequentemente se manifesta pela produção de enzimas, sendo beta-lactamases um dos exemplos mais significativos. Essas enzimas são ca-

pazes de hidrolisar o anel beta-lactâmico, uma estrutura essencial em antibióticos como a ampicilina³⁶. Assim, a combinação de sulbactam com ampicilina demonstrou eficácia em contornar a resistência, permitindo uma ação antimicrobiana mais eficiente. Nos testes realizados, o óleo da borra de café só apresentou atividade potencializadora do efeito do antibiótico frente a *Escherichia coli*, bacilo Gram-negativo, que é a principal responsável pelas infecções do trato urinário, atingindo, principalmente, indivíduos susceptíveis, como crianças, idosos e gestantes. É também responsável por grande parte das infecções hospitalares, apresentando resistência às grandes classes de medicamentos disponíveis na rede pública de tratamento³⁷. Portanto, a ação sinérgica da ampicilina associada ao óleo da borra do café pode exercer efeitos benéficos para o tratamento de infecções bacterianas relacionadas a cepas resistentes (Figura 2).

Na associação do antibiótico de controle, gentamicina, com a clorpromazina (inibidor da bomba de efluxo), o mecanismo de bomba de efluxo teve sua expressão evidenciada nas cepas de *S. aureus*, apresentando uma CIM menor do que a do controle isolado. Ainda nesse teste, o óleo da borra de café se apresentou como bom agente modulador da atividade antimicrobiana, reduzindo a concentração necessária de gentamicina para inibir o crescimento das bactérias testadas. As bombas de efluxo são proteínas de transporte que levam antibióticos e que são dependentes de energia, uma vez que fazem o transporte contra um gradiente de concentração³⁸. Esse mecanismo pode ser encontrado em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. São imprescindíveis tanto na fisiologia como na defesa bacteriana, sendo responsáveis por exportar substratos estruturalmente diversos³⁹.

Diante do antibiótico de norfloxacin e do óleo da borra de café, nas duas cepas em estudo, *S. aureus* e *E. coli*, foi identificada a presença de bombas de efluxo, através da redução da MIC do antibiótico, quando associado com a clorpromazina. O óleo associado a esse antibiótico reduziu o seu efeito diante das cepas de *S. aureus* e potencializou o Norfloxacin frente as cepas de *E. coli*. Estudos demonstram que os óleos fixos têm potencial para alterar a ação dos antibióticos contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas de bactérias-padrão e multirresistentes. O efeito antibacteriano e modificador de antibióticos, principalmente contra cepas de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, e de óleos fixos de diversas espécies (*Mauritia flexuosa*, *Orbignya speciosa*) já foi demonstrado. A ação foi relacionada, principalmente, a mudanças na permeabilidade da membrana plasmática por ácidos graxos³⁵.

O óleo da borra de café em estudo é rico em ácidos graxos e apresentou efeitos sinérgicos na associação com gentamicina, norfloxacin e ampicilina contra cepas resistentes, com reduções nas CIM dos antibióticos. Os resultados sugerem que o óleo fixo de BC possui ácidos graxos com potencial para modificar sinergicamente

a atividade antibiótica. Esses achados oferecem uma perspectiva promissora para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Contudo, é crucial que estudos adicionais sejam realizados para validar a eficácia clínica desses compostos.

CONCLUSÃO

Foi possível observar que o óleo fixo extraído da borra de café apresenta resultados relevantes e promissores nas atividades antioxidante, larvicida, antibacteriana e modificadora da atividade antibiótica, as quais podem estar relacionadas com sua composição química.

O uso de resíduos para produção de novos materiais com alto valor agregado tem sido um desafio proposto pela economia circular, pois um resíduo de um processo produtivo, como a borra de café, pode servir de matéria-prima para um novo produto, como o óleo fixo, com aplicação útil à sociedade. Os resultados da presente pesquisa contribuem com estudos que visam o aproveitamento do resíduo do café (borra).

AGRADECIMENTOS

À Universidade Comunitária da Região de Chapecó (SC), por disponibilizar suas estruturas laboratoriais para o desenvolvimento da pesquisa com *Aedes aegypti*.

REFERÊNCIAS

1. Aguiar ATE. Atributos químicos de espécies de café [thesi]. Piracicaba, SP: Universidade de São Paulo; 2005. doi:10.11606/T.11.2005.tde-11012006-153857
2. Dieng H, , Elias SB, Satho T, Ahmad AH, Abang F, Ghani IA, et al. Coffee, its roasted form, and their residues cause birth failure and shorten lifespan in dengue vectors. *Environ Sci Pollut Res*. 2017;24(17):14782-94. doi:10.1007/s11356-017-8711-4
3. Organização Internacional do Café – OIC. Relatório sobre o mercado de café [Internet]. 2018 [acesso em 2022 July 10]. Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/12830>
4. Couto CC, Santos TF, Mamede AMGN, Oliveira TC, Souza AM, Freitas-Silva O, et al. Coffee arabica and C. canephora discrimination in roasted and ground coffee from reference material candidates by real-time PCR. *Food Res Int*. 2019;115:227-33. doi:10.1016/j.foodres.2018.08.086
5. Brainer MSCP, Ximenes LF. Produção e mercado do café. Caderno setorial ETENE. 2022;6(207):1-13. doi:s1dspp01.dmz.bnb:8443/s482-dspace/handle/123456789/1108
6. Sociedade Nacional de Agricultura – SNA. Safra brasileira de café 2023/24 pode totalizar 66.9 milhões de sacas [Internet]. [acesso em 2023 jan 05]. Disponível em: <http://www.sna.agr.br>
7. Panusa A, Zorro A, Lavecchia R, Marroso G, Petrucci R. Recovery of natural antioxidants from spent coffee grounds. *J Agric Food Chem*. 2013;61:4162–8. doi:10.1021/jf4005719
8. Toda TA. Minimização de resíduos do processamento do café solúvel através do reaproveitamento da borra para extração de óleo utilizando solvente renovável [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2016.

9. Mata TM, Martins AA, Caetano NS. Bio-refinery approach for spent coffee grounds valorization. *Bioresour Technol.* 2018;247:1077–84. doi:10.1016/j.biortech.2017.09.106
10. Mussatto SI, Macgado EMS, Martins S, Teixeira JA. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food Bioproc Tech.* 2011;4(5):661-72. doi:10.1007/s11947-011-0565-z
11. Vargas LDL, Ferreira SMB, Souza MD, Silva CAL da, Shimoya-Bittencourt W. Resistência das populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Insecta, Diptera, Culicidae) aos inseticidas utilizados para o controle: estado da arte do conhecimento. *Rev Ciênc Méd Biol.* 2022;21(1):98-116. doi:10.9771/cmbio.v21i1.44458
12. Ministério da Saúde (BR). Plano de contingência para resposta às emergências em saúde pública por dengue, chikungunya e zika. Brasília: Ministério da Saúde; 2022.
13. Zhang S, Blore K, Xue R-D, Qualls WA, Cermak S, Zhu J-W. Larvicidal Activity of Natural Repellents Against the Dengue Vector, *Aedes aegypti*. *J Amer Mosquito Control Assoc.* 2020;36(4):227-32. doi:10.2987/20-6916.1
14. Qualls WA, Xue R-D, Farooq M, Peper ST, Aryaprema V, Blore K, et al. Evaluation of lotions of botanical-based repellents against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entom.* 2021;58(2):979-82. doi:10.1093/jme/tjaa244
15. Farooq M, Qualls WA, Bangonan L, Xue R-D, Peper ST, Aryaprema VS, et al. Efficacy Evaluation of Medium-Chain Fatty Acids as Skin and Spatial Repellents Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes. *J Med Entomol.* 2022;60(2):333-8. doi:10.1093/jme/tjac184
16. Nogueira TL, Da Silva DAS, Da Silva LH, Leite MVS, Da Rocha JFA, Andreza RS. Pós covid-19: as sequelas deixadas pelo Sars-Cov-2 e o impacto na vida das pessoas acometidas. *Arch Health.* 2021;2(3):457-71. doi:10.46919/archv2n3-021
17. Guimarães DO, Momesso LS, Pupo MT. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova.* 2010;33:667-79. doi:10.1590/S0100-40422010000300035
18. Rocha CC, Reis C, Chaves ARM. Caracterização qualitativa de ácidos graxos como componentes dos óleos de grão de café verde, café torrado e borra de café. Brasília (DF): Embrapa Café; 2013.
19. Sucupira NR, Silva AB da, Pereira G, Costa JNda. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. *J Health Scienc.* 2012;14(4):263-9. doi:10.17921/2447-8938.2012v14n4p%25p
20. Oliveira, GLS. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH*: estudo de revisão. *Rev Bras Pl Med.* 2015;17(1):36-44. doi:10.1590/1983-084X/12_165
21. Mertz PP, Yao RC. *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. isolated from soil collected in a sugar rum still. *Int J Syst Bacteriol.* 1990;40:34-39. doi:10.1099/00207713-40-1-34
22. World Health Organization-WHO. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides [Internet]. 2005 [acesso em: 2022 Jul 29]. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69101>
23. Cussolim PA, salvi Junior A, Melo AL de, Melo A de. Mecanismos de resistência do *Staphylococcus aureus* a antibióticos. *Revista Faculdades do Saber.* 2021;6(12):831-43.
24. Sousa CM de M, Silva HR e, Vieira-Junior GM, Ayres MCC, Costa CLS da, Araújo DS, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova.* 2007;30(2):351-5. doi:10.1590/S0100-40422007000200021
25. National Comitee for Clinical Laboratory Standards-NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 11 ed. Wayne: CLS; 2008.
26. Javadpour MM, Juban MM, Lo WC, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM, et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J Med Chem.* 1996;39(16):3107-13. doi:10.1021/jm9509410
27. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy.* 2008;54(1):328-30. doi:10.1159/000151267
28. Rahuman AA, Venkatesan P, Gopalakrishnan G. Mosquito larvicidal activity of oleic and linoleic acids isolated from *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad. *Paras Res.* 2008;103(6):1383-90. doi:10.1007/s00436-008-1146-6
29. Dilika F, Bremner P, Meyer JJ. Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum*: a plant used during circumcision rites. *Fitoterapia.* 2000;71(4):450-2. doi:10.1016/S0367-326X(00)00150-7
30. Perumalsamy H, Jin Jang M, Kim J-R, Kadarkarai M, Ahn Y-J. Larvicidal activity and possible mode of action of four flavonoids and two fatty acids identified in *Milletia pinnata* seed toward three mosquito species. *Parasites Vectors.* 2015;8(237). doi:10.1186/s13071-015-0848-8
31. Lim SM, Loh SP. In vitro antioxidant capacities and antidiabetic properties of phenolic extracts from selected citrus peels. *Inter Food Res J.* 2016;23(1):211-9.
32. Guirado MM, Bicudo HEMC. Effect of used coffee grounds on larval mortality of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae): suspension concentration and age versus efficacy. *BioAssay.* 2007;2(0):1–7. doi:10.14295/BA.v2.0.52
33. Laranja AT, Manzatto AJ, Bicudo HEMDC. Effects of caffeine and used coffee grounds on biological features of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) and their possible use in alternative control. *Genet Mol Bio.* 2003;26(4):419-29. doi:10.1590/S1415-47572003000400004
34. Tegos G, Stermitz FR, Lomovskaya O, Lewis K. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2002;46(10):3133-41. doi:10.1128/aac.46.10.3133-3141.2002
35. Nobre CB, Sousa EO, Silva JML, Coutinho HD, Costa JG. Composição química e atividade antibacteriana de óleos fixos de *Mauritia flexuosa* e *Orbignya speciosa* associados a aminoglicosídeos. *Eur J Integr Med.* 2018;1:84-9. doi:10.3390/pathogens7040098
36. Suarez C, Gudiol F. Beta-lactam antibiotics. *Enfer Infec Microbio Clin.* 2009;27(2):116-29. doi:10.1016/j.eimc.2008.12.001
37. Korb A, Nazareno ER, Mendonça FA, Dalsenter PR. Perfil de resistência da bactéria *Escherichia coli* em infecções do trato urinário em pacientes ambulatoriais. *Revista de Biologia e Ciência da Terra.* 2013;13(1):72-9.
38. Sharma A, Gupta VK, Pathania R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *Indian J Med Res.* 2019;149(2):129-45. doi:10.4103/ijmr.IJMR_2079_17
39. Alvarez-Ortega C, Olivares J, Martínez JL. RND multidrug efflux pumps: what are they good for?. *Front Microbiol.* 2013;4:7. doi:10.3389/fmicb.2013.00007

Submetido em 06/09/2024
Aceito em 06/08/2025