UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

AMANDA LUÍSA SALES

Efeito de extratos aquosos e compostos bioativos do café (*Coffea arabica*) sobre a multiplicação de bactérias probióticas

Rio de Janeiro
2017

EFEITO DE EXTRATOS AQUOSOS E COMPOSTOS BIOATIVOS DO CAFÉ (*Coffea arabica*) SOBRE A MULTIPLICAÇÃO DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS

Amanda Luísa Sales

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Orientadores: Adriana Farah de Miranda Pereira e Marco Antônio Lemos Miguel

Rio de Janeiro

Agosto/2017

Sales, Amanda Luísa

Efeito de extratos aquosos e compostos bioativos do café (*Coffea arabica*) sobre a multiplicação de bactérias probióticas. / Amanda Luísa Sales. - Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Nutrição Josué de Castro, 2017.

114 f.: il. ; 31 cm.

Orientadores: Adriana Farah de Miranda Pereira e Marco Antônio Lemos Miguel.

Dissertação (mestrado) – UFRJ, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Nutrição Humana, 2017.

Referências bibliográficas: f. 87-102.

1. Café - história. 2. Probióticos. 3. Prebióticos. 4. Microbioma Gastrointestinal. 5. Cafeína. 6. Ácidos Cafeicos. 7. Nutrição - Tese. I. Pereira, Adriana Farah de Miranda. II. Miguel, Marco Antônio Lemos. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição. IV. Título.

EFEITO DE EXTRATOS AQUOSOS E COMPOSTOS BIOATIVOS DO CAFÉ (*Coffea arabica*) SOBRE A MULTIPLICAÇÃO DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS

Amanda Luísa Sales

Orientador (a): Adriana Farah de Miranda Pereira
Coorientador (a): Marco Antônio Lemos Miguel

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Aprovada por:

_____

Presidente, Prof. Dra. Adriana Farah de Miranda Pereira
Instituto de Nutrição Josué de Castro – UFRJ

_____

Prof. Dr. Marco Antônio Lemos Miguel
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - UFRJ

_____

Prof. Dra. Eliane Lopes Rosado
Instituto de Nutrição Josué de Castro – UFRJ

_____

Prof. Dra. Selma Gomes Ferreira Leite
Escola de Química – UFRJ

_____

Prof. Dr. Sergio Eduardo Longo Fracalanzza
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - UFRJ

Rio de Janeiro
Agosto/2017

Dedico aos meus pais, Magno e Dirlene, pelo interminável investimento no meu conhecimento e educação.

AGRADECIMENTOS

Não foi fácil chegar até aqui, mas a presença de algumas pessoas tornou este caminho muito mais leve e divertido.

Agradeço a Deus por ter colocado esta oportunidade em meio caminho.

À Nossa Senhora de Schoenstatt, pois sua imagem em cima da minha mesa me deu força e concentração para escrever esta dissertação.

Aos meus pais, Magno e Dirlene, e meu irmão Caio, por me apoiarem neste caminho e em muitos outros.

Aos meus orientadores, Adriana Farah e Marco Miguel, pela paciência e por mostrarem que a ciência vai muito além do que eu pensava.

Adriana, obrigada por ter escolhido este projeto para mim. Por mais difícil que tenha sido, me fez crescer muito. Obrigada pela sua paciência em ensinar, por me ajudar e pela inspiração na ciência. Obrigada por ter me aceitado como sua aluna e fez com que eu desse o melhor desde o capítulo que escrevemos.

Marco, também obrigada pela paciência e, principalmente, pela paciência com meus experimentos desastrosos, por me ajudar e pelos conselhos.

Ao Antonio, técnico do Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Obrigada pelas conversas, companhia, ajuda nos momentos de desespero e dicas infalíveis. Sentirei muito a sua falta.

Aos meus futuros doutores preferidos, Juliana (Ju), Thiago, Ana Carolina e Giselle (Gi) por tornarem minhas quartas-feiras (e outros dias) muito mais divertidos.

Em especial à Ju, pois se não fosse ela esta dissertação não seria realizada por mim. Obrigada por ter visto o meu potencial na pesquisa e por ter acreditado em mim. Se você não tivesse conversado comigo, o mestrado nunca seria uma opção. Além disso, obrigada por ter feitos as análises dos compostos bioativos do café solúvel. Você é uma pessoa muito especial para mim.

Também em especial à Gi, a definição da pessoa certa que aparece na nossa vida na hora certa. Obrigada pelas risadas e por me ajudar! Obrigada pelas experiências microbiológicas, profissionais e de vida. Você estará para sempre em meu coração.

Ao pessoal do Laboratório de Química e Bioatividade de Alimentos pelo companheirismo e apoio.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia de Alimentos: Giselle Duarte (Gi), Thayane (meu livro de microbiologia ambulante volume 1), Mariana (obrigada pelo FOS!!), Ana Beatriz, Gabriela, Maria Claudia, Elizeu, Tatiane, Felipe (meu livro de microbiologia ambulante volume 2), Luiz, Gisele Ferreira, Gabrielle, Paula e Júlia. Os dias no laboratório foram muito mais divertidos com vocês.

Gabrielle, sua ajuda foi fundamental na reta final. Muito obrigada! Paula e Júlia, obrigada por oferecem ajuda quando podiam.

À Caroline e Jade, alunas de iniciação científica, que quando tinham horários disponíveis me ajudavam com os experimentos e preparo de material.

Ao pessoal da Ourofit pelos momentos de descontração nos dias cansativos.

À COCAM, por ter disponibilizado as amostras de café solúvel utilizadas nesta dissertação.

A todos que de alguma forma estiveram presentes nestes 2 anos, que torceram por mim e, principalmente, torceram para meus experimentos darem certo, muito obrigada!

"(…) *Nobody said it was easy, no one ever said it would be this hard* (…)"

The Scientist – Coldplay

RESUMO

EFEITO DE EXTRATOS AQUOSOS E COMPOSTOS BIOATIVOS DO CAFÉ (*Coffea arabica*) SOBRE A MULTIPLICAÇÃO DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS

Amanda Luísa Sales

Orientadores: Adriana Farah de Miranda Pereira e Marco Antônio Lemos Miguel

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Efeito prebiótico é o desfecho fisiológico benéfico a partir da modulação da composição e/ou atividade da microbiota intestinal, proveniente da metabolização de um composto não-digerível. Componentes não-digeríveis ou parcialmente digeríveis como polissacarídeos (galactomanana e arabionogalactana tipo 2) e os ácidos clorogênicos da bebida dos grãos de *Coffea arabica*, têm sido relacionados a efeitos benéficos na microbiota intestinal. Entre outros compostos bioativos importantes no café estão a cafeína e a trigonelina, que apresentaram efeito antimicrobiano seletivo em estudos *in vitro*. O objetivo desta dissertação foi avaliar o potencial prebiótico de extratos aquosos da espécie *Coffea arabica* em diferentes graus de torrefação e de seus compostos bioativos. Extratos de café solúvel integral e descafeinado e os compostos bioativos ácidos clorogênicos (ACG), trigonelina (TG), cafeína (CAF), galactomanana (GM) e arabinogalactana tipo 2 (AG) foram incorporados em diferentes concentrações, separadamente, em meio de cultivo modificado para avaliar a multiplicação das estirpes probióticas *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 (GG), *L. acidophilus* LA-5 (LA), *Bifidobacterium animalis* DN-173010 (BA) e *B. animalis* subesp. *lactis* BB12 (BB12) e da estirpe não probiótica *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli*). Após 48 horas de incubação, os extratos de café integral ocasionaram aumento da multiplicação das estirpes de *Lactobacillus* (~ 4,43 log UFC/mL) e *Bifidobacterium* (~ 4,34 log UFC/mL), independente do grau de torrefação e concentração. Não foram detectadas diferenças na

multiplicação das estirpes na presença de extratos de café descafeinado em relação aos controles. Quanto aos compostos bioativos, destaca-se a multiplicação de GG na concentração de 50mg de CAF (1,64 log UFC/mL). Para as estirpes de *Bifidobacterium*, as maiores multiplicações foram observadas para BA em 400mg de ACG (1,87 log UFC/mL); 50, 100, 200 e 800mg de GM (~ 0,28 log UFC/mL) e 400mg de AG (~ 0,16 log UFC/mL). Para BB12, as maiores multiplicações foram em 200 e 400mg de ACG (~ 1,62 log UFC/mL) e em 200, 400 e 800mg de GM (~ 0,60 log UFC/mL) e em todas as concentrações testadas deAG (~ 0,76 log UFC/mL). Diferentemente dos resultados encontrados para as bactérias probióticas testadas, nenhum dos extratos de café e compostos bioativos incorporados ao meio base de E. coli estimularam sua multiplicação. Os resultados da presente dissertação sugerem que os compostos bioativos do café podem estimular a multiplicação de microorganismos benéficos à saúde, que ocorrem naturalmente no trato intestinal ou que podem ser utilizados como probioticos, apresentando assim, um potencial efeito prebióticos.

Palavras-chaves: Café; prebióticos; probióticos; galactomananas; arabinogalactanas tipo 2; ácidos clorogênicos; cafeína; trigonelina

ABSTRACT

EFFECT OF AQUEOUS EXTRACTS AND BIOACTIVE COMPOUNDS OF COFFEE (*Coffea arabica*) ON PROBIOTIC BACTERIA GROWTH.

Amanda Luísa Sales

Orientadores: Adriana Farah de Miranda Pereira e Marco Antônio Lemos Miguel

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Prebiotic effect is the beneficial physiological outcome that arises from the modulation of the composition and/or activity of the intestinal microbiota through the metabolism of a non-digestible compound. Nondigestible or partially digestible compounds such as polysaccharides (galactomannan and type 2 arabionogalactan) andchlorogenic acids in *Coffea arabica* have been studied recently, as an enhancing agent for beneficial microbiota growth. Among important bioactive compounds in coffee are caffeine and trigonelline, which showed selective antimicrobial effect *in vitro.* The aim of this dissertation was systematically evaluate the prebiotic potential of aqueous extracts of *Coffea arabica* species in different roasting degrees, as well as its bioactive compounds present in these extracts. Regular and decaffeinated soluble coffee extractsand the bioactive compounds chlorogenic acids (CGA), trigonelline (TG), caffeine (CAF), galactomannan and type 2 arabinogalactan (AG), were separately incorporated into a modified culture medium in diferent concentrations. The growth of the probiotic strains *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 (GG), *L. acidophilus* LA-5 (LA) *Bifidobacterium animalis* DN-173010 (BA) and *B. animalis* subsp. *lactis* BB12 (BB12), and the non-probiotic *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli*). After 48h of incubation, regular coffee extracts increased the count of *Lactobacillus* species (~ 4.43 log CFU/mL) and *Bifidobacterium* species (~ 4.34 log CFU/mL), regardless of roasting degree

and concentration. No differences were found in the growth of the strains in the presence of decaffeinated coffee extracts, when compared to the base medium without the coffee extracts. However, in relation to bioactive compounds, the growth of GG in 50mg of caffeine (1.64 log CFU/mL). For the *Bifidobacterium* strains, the greatest growth was observed for BA in 400mg of CGA (1.87 log CFU/mL); 50, 100, 200, 800mg of GM (~ 0.28 log CFU/mL), 50 and 400mg of AG (~ 0.16 log CFU/mL). For BB12, the greatest growth were in 200 and 400 mg of CGA (~1.62 log CFU/mL) and 200, 400 and 800 mg of GM (~ 0.60 log CFU/mL) and in all concentrations of AG (~ 0.76 log CFU/mL). Differently from the results found for the probiotic bacteria, none of the coffee extracts and bioactive compounds stimulated *E. coli* growth. The present dissertation results suggest that the coffee bioactive compounds can improve the growth of health-beneficial microorganisms that occur naturally in the intestinal tract, or used as probiotics, thus exerting a potencial prebiotic effect.

Keywords: Coffee; prebiotics; probiotics; galactomannans; type 2 arabinogalactans; chlorogenic acids; caffeine; trigonelline.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS 14
LISTA DE ILUSTRAÇÕES 15
LISTA DE TABELAS 18
1. INTRODUÇÃO 19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 21
2.1. Café: importância econômica, composição química e benefícios à saúde 21
2.2. Caracterização da microbiota intestinal humana 27
2.3. Caracterização de probióticos: estratégias para modulação da microbiota intestinal e benefícios à saúde 30
2.4. Caracterização de prebióticos: estratégias para modulação da microbiota intestinal, benefícios à saúde e fontes alimentares 35
2.5. O café como um alimento potencialmente prebiótico 37
2.5.1. Polissacarídeos presentes no café e seu potencial prebiótico 37
2.5.2. Melanoidinas e seu potencial prebiótico 40
2.5.3. Ácidos clorogênicos e seu potencial prebiótico 43
2.6. Outros compostos bioativos relevantes na bebida de café 45
2.6.1.Cafeína 45
2.6.2.Trigonelina 46
2.7. A bebida de café e seu potencial prebiótico 47
3. JUSTIFICATIVA 49
4. OBJETIVO GERAL 49
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 49
6. MATERIAIS E MÉTODOS 50
6.1. Obtenção das amostras de café solúvel e compostos bioativos 50
6.2. Quantificação dos compostos bioativos nos extratos aquosos de café 50
6.3. Ativação das bactérias 50
6.3.1. Ativação das bactérias probióticas 51
6.3.2. Ativação de *Escherichia coli* ATCC 25922 51
6.4. Determinação da atividade potencialmente prebiótica dos compostos do café 51
6.4.1. Meio de cultura utilizado 51
6.4.2. Preparo das soluções 52
6.4.3. Preparo dos inóculos para determinação da atividade prebiótica 52
6.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA 53
7. RESULTADOS 53
7.1. Análise dos compostos bioativos nos extratos de cafés solúveis utilizados 53
7.2. Avaliação do potencial prebiótico de extratos de café 54
7.3. Avaliação do potencial prebiótico de compostos bioativos presentes na bebida de café 59
7.4. Avaliação do potencial prebiótico de polissacarídeos presentes na bebida de café 69
8. DISCUSSÃO 77
9. CONCLUSÕES 86
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 87
ANEXOS 103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACG –ácido clorogênico

AG – arabinogalactana tipo 2

AGCC – ácidos graxos de cadeia curta

ATCC – American Type Culture Collection

BA – *Bifidobacterium animalis* DN-173010

BB12 – *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12

CAF – cafeína

D – extrato de café descafeinado com grau de torrefação médio

DN - Danone

E. coli – *Escherichia coli* ATCC 25922

FOS - frutooligossacarídeo

GG – *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103

GM - galactomanana

IN – inulina

LA – *Lactobacillus acidophilus* LA-5

LB – meio de cultura Luria-Bertani

Log UFC/mL – logaritmo de unidades formadoras de colônias por mililitro

MRS – meio de cultura De Man, Rogosa e Sharpe

MRSc – meio de cultura MRS convencional

MRSm – meio de cultura MRS modificado

Subesp. - subespécie

TE – extrato de café integral com grau de torrefação escuro

TG - trigonelina

TM – extrato de café integral com grau de torrefação médio

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura de uma galactomanana

Figura 2. Estrutura de uma arabinogalactana tipo 2

Figura 3. Processo de formação de melanoidinas

Figura 4. Estrutura do ácido clorogênico (5-cafeoilquínico)

Figura 5. Estrutura da cafeína

Figura 6. Estrutura da trigonelina

Figura 7. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 cultivado em meio MRSm com extratos de café, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 8. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 cultivado em meio MRSm com extratos de café, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 9. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* DN-173010 cultivada em meio MRSm com extratos de café, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 10. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12 cultivada em meio MRSm com extratos de café, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 11. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Escherichia coli* cultivada em meio LB com adição de extratos de café integrais e descafeinados

Figura 12. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 cultivado em meio MRSm com ácidos clorogênicos, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 13. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 cultivado em meio MRSm com ácidos clorogênicos, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 14. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* DN-173010 cultivada em meio MRSm com ácidos clorogênicos, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 15. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12 cultivada em meio MRSm com ácidos clorogênicos, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 16. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 cultivado em meio MRSm com trigonelina, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 17. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 cultivado em meio MRSm com trigonelina, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 18. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* DN-173010 cultivada em meio MRSm com trigonelina, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 19. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12 cultivada em meio MRSm com trigonelina, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 20. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 cultivado em meio MRSm com cafeína, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 21. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 cultivado em meio MRSm com cafeína, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 22. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* DN-173010 cultivada em meio MRSm com cafeína, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 23. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12 cultivada em meio MRSm com cafeína, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 24. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Escherichia coli* cultivada em meio LB com adição de ácidos clorogênicos, trigonelina e cafeína

Figura 25. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 cultivado em meio MRSm com galactomanana, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 26. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 cultivado em meio MRSm com galactomanana, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 27. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* DN-173010 cultivada em meio MRSm com galactomanana, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 28. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12 cultivada em meio MRSm com galactomanana, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 29. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 cultivado em meio MRSm com arabinogalactana tipo 2, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 30. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 cultivado em meio MRSm com arabinogalactana tipo 2, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 31. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* DN-173010 cultivada em meio MRSm com arabinogalactana tipo 2, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 32. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12 cultivada em meio MRSm com arabinogalactana tipo 2, inulina e frutooligossacarídeos como principais fontes de carbono

Figura 33. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Escherichia coli* cultivada em meio LB com adição de galactomanana e arabinogalactana tipo 2

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química de grãos de café arábica (*Coffea arabica*) e robusta (*Coffea canephora*) verdes e torrados (g/100g)

Tabela 2. Composição química média da bebida de café

Tabela 3. Exemplos de microrganismos estudados como agentes probiótico

Tabela 4. Teores de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em extratos de café solúvel de *Coffea arabica* integrais e descafeinado (por mL de extratos de café)

Tabela 5. Multiplicação de bactérias lácticas probióticas e *Escherichia coli*, após 48 horas, em meios de cultivo contendo extratos de café integrais e descafeinados nos diferentes graus de torrefação, inulina e frutooligossacarídeo

Tabela 6. Multiplicação de bactérias lácticas probióticas e *Escherichia coli*, após 48 horas, em meios de cultivo contendo ácidos clorogênicos, trigonelina, cafeína, inulina e frutooligossacarídeo

Tabela 7. Multiplicação de bactérias lácticas probióticas e *Escherichia coli*, após 48 horas, em meios de cultivo contendo galactomanana, arabinogalactana tipo 2, inulina e frutooligossacarídeo

1. INTRODUÇÃO

O café (*Coffea arabica*), tem sido por séculos o alimento mais comercializado e a bebida mais amplamente consumida no mundo (Farah, 2012), como forma de socialização, lazer, para melhorar rendimento no trabalho, bem-estar (Dórea e da Costa, 2005), efeitos estimulantes, além de suas características organolépticas (Alves *et al.*, 2010).

Atualmente, sabe-se que o consumo regular da bebida de café pode reduzir a incidência de uma série de doenças (Farah, 2017) como diabetesmellitus tipo 2 (Ding *et al*., 2014), doenças neurológicas como Alzheimer e Parkinson (Nehlig, 2015), doenças coronarianas de uma forma geral (Crippa *et al*., 2014), doenças hepáticas crônicas como doenças hepática gordurosa não alcoólica, cirrose e hepatocarcinoma (Heath, 2017), entre outras. Estes benefícios estão relacionados com a presença e a quantidade de compostos bioativos na bebida (Caprioli *et al.*, 2015). Diferenças na composição dos grãos verdes, nas condições de torrefação e procedimentos de extração para o preparo da bebida resultam em diferenças na composição química do produto final (Farah, 2017).

Componentes não-digeríveis na bebida como os polissacarídeos, galactomanana e arabinogalactana tipo 2 (Gniechwitz *et al.*, 2007) e as melanoidinas (Gniechwitz *et al.*, 2008; Reichardt *et al.*, 2009; Jímenez-Zamora *et al.*, 2014), ou componentes parcialmente não absorvidos como os ácidos clorogênicos (Parkar *et al.*, 2013; Raimondi *et al.*, 2014; Mills *et al*., 2015) vêm sendo estudados recentemente devidoaos seus efeitos benéficos na microbiota intestinal.

Sabe-se que o trato intestinal possui uma microbiota composta por mais de 800 espécies bacterianas diferentes, as quais possuem grande impacto na saúde e no estado nutricional do hospedeiro (Laparra e Sanz, 2010) e exerce funções fundamentais como produção de vitaminas, metabolização ou descomplexação de nutrientes e compostos bioativos para facilitar sua absorção ou reabsorção, produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como acetato, butirato e propionato, entre outras funções. Os AGCC são importantes para a nutrição das células intestinais e redução do pH colônico, regulando a composição da microbiota intestinal por inibir a multiplicação de bactérias patogênicas (Gibson, 2004; Meier, 2009; Scott *et al.*, 2013; Macia *et al.*, 2012; Abdollahi-Roodsaz *et al.*, 2016). Qualquer desequilíbrio que leve à disbiose, caracterizada pela redução da diversidade microbiana e aumento de patógenos oportunistas (Walker e Lawley, 2013), é considerado facilitador para o início e/ou agravo de doenças, incluindo doenças autoimunes e alérgicas, câncer coloretal,

doenças metabólicas e infecções bacterianas (Milani *et al.*, 2016). Além disso, alterações na microbiota nos primeiros anos de vida principalmente, tem sido associadas com desfechos negativos tardios na saúde. Alguns destes desfechos estão relacionados com o sistema nervoso central e incluem depressão e ansiedade, síndrome do cólon irritável, autismo e transtorno de déficit de atenção com hiperatividade (Felice e O'Mahony, 2017). Para reestabelecer a homeostase intestinal, uma alternativa é a administração de probióticos (Reid *et al.*, 2011).

Probióticos são microrganismos, incluindo bactérias e leveduras, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2006). Após ingeridas, colonizam a microbiota intestinal e inibem a atividade/multiplicação de bactérias ou outros microrganismos adversos à saúde humana (Gibson e Roberfroid, 1995; Blaut, 2002, Reid *et al*., 2003), sendo os gêneros de bactérias *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* os mais utilizados para esta finalidade (Allsopp *et al.*, 2013; Saha *et al.*, 2014). Além disso, sua atividade pode ser potencializada na presença de compostosprebióticos, que são compostos não-digeríveis que modificam ou estimulam a multiplicação e/ou atividade de bactérias probióticas e daquelas presentes na microbiota intestinal, aumentando a resistência do hospedeiro contra patógenos por meio da sua metabolização, favorecendo a multiplicação de microbiota benéfica, sendo o produto da sua metabolização os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (Gibson e Roberfroid, 1995; Blaut, 2002; Reid *et al*., 2003; Bindels *et al.*, 2015).

A despeito do potencial prebiótico do café e de seus compostos bioativos, a maioria dos estudos publicados sobre tal efeito não avaliaramos compostos sistemática e isoladamente o que torna difícil a obtenção de resultados conclusivos.Estas questões foram abordadas na presente dissertação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Café: importância econômica, composição química e benefícios à saúde

O grão de café é obtido a partir do fruto da planta pertencente à família *Rubiaceae* (Briandet *et al.*, 1996) e ao gênero *Coffea*, que compreende 124 espécies (Razafinarivo *et al.*, 2013), sendo as mais populares *Coffea arabica, C.canephora*, *C. liberica* e *C. excelsa* (Cagliani *et al.*, 2013).Evidênciasindicam que na região central do continente africano foram originadas as principais espécies do gênero *Coffea*, incluindo as duas espécies mais importantes comercialmente e mundialmente: *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (conhecida como conilon no Brasil e robusta no exterior) (Cagliani *et al.*, 2013; Herrera e Lambot, 2017). O café é o segundo *commoditie* no mundo pelo ponto de vista econômico, estando atrás somente do petróleo. Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador no mundo (ICO, 2016). Em 2015/2016, a produção total de café no Brasil foi de 2,6 milhões de toneladas, sendo o consumo no país equivalente a 1,2 milhão de toneladas, com per capita de 5,9kg (ICO, 2016).

Os primeiros registros de consumo da bebida de café são em meados do século XV, quando religiosos Sufi começaram a ingerir uma bebida para ajudar a mantê-los acordados durante vigílias religiosas (Hattox, 1985 *apud* Morris *et al.*, 2017). Tratava-se de uma infusão produzida com água fervente a partir da polpa dessecada das cerejas de café (Morris *et al.*, 2017). Desde a abertura da primeira cafeteria em Meca no final do século XV, a bebida passou a ser uma das mais consumidas no mundo (Farah, 2009). Este consumo vem crescendo continuamente devido à melhora da qualidade da bebida por meio de seleção de variedades de café, melhora das práticas agrícolas, abertura de grande número de cafeterias e a mudança na imagem do café pela disseminação da informação sobre seus benefícios à saúde (Farah, 2012).

Áreas geográficas específicas na América Central e do Sul, África e Sudoeste Oriental da Ásia, entre o Trópico de Câncer e o Trópico de Capricórnio, constituem o chamado "cinturão do grão de café", onde todas as plantações de café comerciais são produzidas. O solo rico, clima tropical úmido, altas altitudes e temperaturas adequadas influenciam o sabor e o aroma dos grãos produzindo café de melhor qualidade (Consonni *et al.*, 2012).

O grão de café arábica é cultivado em regiões com altitude acima de 700m, possui um sabor doce e floral/frutado, sendo de melhor qualidade, mais aromático e complexo (Jaiswal *et al.*, 2010; Cagliani *et al.*, 2013). O grão de café robusta é mais resistente a pragas, cresce

em terrenos planos, em baixa altitude em locais onde o café arábica não desenvolve bem, o que facilita a produção mecanizada. Em geral, estes grãos são menos aromáticos e de menor valor comercial. No entanto quando o processo de colheita e pós-colheita é adequado, estes grãos resultam em uma bebida de boa qualidade, e realçam o aroma dos grãos da espécie arábica quando misturados (Farah, 2012). Os cafés de diferentes variedades e origens tem características sensoriais distintas e misturas balanceadas de diferentes origens geográficas da mesma espécie podem modular o sabor final e as percepções organolépticas (Consonni *et al.*, 2012), já que as bebidas de café são produzidas por grãos torrados das espécies arábica ou robusta ou por mistura dos dois grãos. (Martín *et al.*, 1999).

Apesar do conhecimento de que a qualidade é importante no processo agrícola como um todo, o grau de maturação da fruta do café e o cuidado para evitar contaminação durante a colheita, secagem e armazenamento das sementes são processos críticos (Farah, 2012). Desta forma, os métodos adequados de colheita são importantes para a produção do café de boa qualidade. A torrefação também é crucial na produção do café, pois envolve o desenvolvimento da coloração do grão, aroma e sabor, os quais são essenciais para a caracterização do café de qualidade a partir dos grãos verdes, estando diretamente relacionado com a composição química do grão torrado (Schenker e Rothgeb, 2017). Os graus de torrefação podem variar de muito claro a muito escuro, de acordo com preferências nacionais e individuais (Farah, 2012).

A composição química do café verde pode ser dividida em compostos não-voláteis, como cafeína, trigonelina, ácidos clorogênicos, cafestol e kahweol, fibras solúveis, água, carboidratos, proteínas, peptídeos e aminoácidos livres, minerais, lipídeos, e compostos voláteis, que é relativamente pobre com predominância de álcoois (Farah, 2012). A torrefação altera consideravelmente a composição química do café, que ao final pode variar com a composição original dos grãos verdes, o grau e método de torrefação para obtenção dos grãos torrados e osmétodos empregados para a análise (Farah, 2012). A tabela 1 mostra a composição química de grãos de café verdes e torrados de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*.

Tabela 1. Composição química de grãos de café arábica (*Coffea arabica*) e robusta (*Coffea canephora*) verdes e torrados (g/100g).

	Grão de café verde		**Grão de café torrado**	
Carboidratos/fibras	*Coffea arabica*	*Coffea canephora*	*Coffea arabica*	*Cofiacanephora*
Sacarose	6,0-9,0	0,9-4,0	4,2	1,6
Açúcares redutores	0,1	0,4	0,3	0,3
Polissacarídeos	50-60	48-56	31-33	37
Lignina	3,0	3,0	3,0	3,0
Pectina	2,0	2,0	2,0	2,0
Compostos nitrogenados				
Proteínas/peptídeos	10,0-11,0	11,0-15,0	7,5-10,0	7,5-10,0
Aminoácidos livres	0,5	0,8-1,0	-	-
Cafeína	0,9-1,3	1,5-2,5	1,1-1,3	2,4-2,5
Trigonelina	0,6-2,0	0,6-0,7	1,2-0,2	0,7-0,3
Ácido nicotínico	-	-	0,016-0,026	0,014-0,025
Lipídeos				
Triglicerídeos com esteróis insaponificados/tocoferóis	15-17,0	7,0-10,0	17,0	11,0
Diterpenos	0,5-1,2	0,2-0,8	0,9	0,2
Outros compostos relevantes				
Minerais	3,0-4,2	4,4-4,5	4,5	4,7
Ácidos clorogênicos	0,7-7,9	1,1-11,3	0,3-2,5	0,1-3,8
Ácidos alifáticos	1,0	1,0	1,6	1,6
Ácido quínico	0,4	0,4	0,8	1,0
Melanoidinas	-	-	14,4-25	18,5-27,3

Adaptado de: Farah, 2012; Wolfrom *et al*., 1960; Bradburry e Halliday, 1990; Fischer *et al*., 2000; Vignoli *et al.*, 2014

A bebida de café é um extrato aquoso derivado da infusão ou percolação do pó de café torrado, utilizando água quente ou fria. Sua composição química pode ser variável devido às muitas possibilidades de variação na produção de café verde, processamento e método de preparo da bebida. As variáveis são as diferentes porcentagens de grãos de café (*blend*), com composições químicas distintas devido a aspectos genéticos, origem e graus de maturação,

cultivo em diferentes condições e processado por diversos métodos pós-colheita, além das diferenças nos perfis e graus de torrefação (Farah, 2017).

Alguns compostos presentes no café verde e torrado têm sido estudados devido a propriedades específicas, e inúmeros produtos contendo café são elaborados na intenção de combinar seu sabor e aroma com suas propriedades biológicas (Farah, 2009). Dentre os compostos presentes no café, aqueles que possuem maior relevância nestes aspectos são os ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina (Farah, 2009).

Os ácidos clorogênicos são os principais compostos antioxidantes do café (Moura-Nunes *et al.*, 2009; Torres e Farah, 2016), e por este e outros mecanismos, estudos epidemiológicos indicam a associação do seu consumo com um menor risco de diabetes melitus tipo 2, o que foi confirmado em estudos *in vivo* e *in vitro* (Lee *et al.*, 2016; Santos e Lima, 2015). Outras propriedades atribuídas a esses compostos são: melhora da função endotelial e controle da pressão arterial (Cano-Marquina *et al.*, 2013), proteção de neurônios contra efeitos tóxicos induzidos por diferentes substâncias, como por exemplo, o glutamato (Mikami e Yamazawa, 2015), possui atividade anticarcinogênica e antiviral (Wang *et al.*, 2009) e potencial prebiótico por favorecerem a multiplicação de *Bifidobacterium* spp. presentes nas fezes humanas ou em estirpes isoladas em laboratório (Parkar *et al.*, 2013; Raimondi *et al.*, 2014; Mills *et al.*, 2015).

A cafeína, em quantidades moderadas, possui ação estimulante e broncodilatadora (Astrup *et al.*, 1990; Cano-Marquina *et al.*, 2013), efeitos diuréticos (Astrup *et al.*, 1990; Cano-Marquina *et al.*, 2013), cardiotônicos (Astrup *et al.*, 1990), auxilia na prevenção e na redução dos sintomas associados à doença de Parkinson (Ludwig *et al.*, 2014) e seu consumo diário moderado possui propriedade termogênica (Astrup *et al.*, 1990; Belza *et al.*, 2009).

A trigonelina possui propriedade hipoglicemiante, neuroprotetora, estrogênica, anticancerígena e anticariogênica (Ashihara *et al.*, 2015), e quando submetida a altas temperaturas, no caso da torrefação dos grãos de café, é convertida a ácido nicotínico ou niacina, uma vitamina do complexo B. Em humanos, estavitamina atua como coenzima de processos metabólicos e sua deficiência causa Pelagra, doença caracterizada por lesões na pele (Farah, 2009).

Recentemente, as fibras solúveis presentes na bebida de café e em seus subprodutos, galactomanana e arabinogalactana tipo 2, vem ganhando importância por não serem digeridas pelo trato gastrointestinal, podendo ser utilizadas como substrato por bactérias intestinais e

assim gerarbenefícios como a multiplicação de bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* (Asano *et al.*, 2004a; Asano *et al.*, 2004b; Umemura *et al.*, 2004a; Umemura *et al.*, 2004b; Borrelli *et al.*, 2004; Jaquet *et al.*, 2009; Nakayama e Oishi, 2013; Jímenez-Zamora *et al.*, 2014) e produção de AGCC (Asano *et al.*, 2003; Gniechwitz *et al.*, 2007b), demonstrando que estas fibras possuem potencial prebiótico. Outra classe de compostos biologicamente ativos presentes na bebida de café são as melanoidinas, produtos da reação de Maillard produzidos a partir de proteínas e carboidratos durante o processo de torrefação dos grãos de café.Sua bioatividade depende dos compostos incorporados à sua estrutura, destacando-se os ácidos clorogênicos (Farah, 2009). Principalmente por isso, as melanoidinas possuem atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-hipertensiva (Rufián-Henares e Morales, 2007; Jiménez-Zamora *et al.*, 2014). Além disso, as fibras solúveis também estão presentes em sua estrutura (Silván *et al.*, 2010) e por isso apresentam potencial prebiótico por aumentarem o número de lactobacilos e bifidobactérias presentes em fezes humanas (Jiménez-Zamora *et al.*, 2014).

Durante o processo de torrefação dos grãos verdes, para posterior obtenção da bebida, ocorre também formação de acrilamida durante a reação de Maillard através da condensação do aminoácido asparagina com açúcares redutores em temperaturas acima de 120 ºC (Soares *et al*., 2015), sendo considerado um composto indesejável (Farah, 2017). A acrilamida pode causar danos genéticos hereditários eé considerada pela International Agency for Research on Cancer (IARC) um composto possivelmente cancerígeno por pertencer ao grupo 2A de evidência (WHO, 2002; IARC, 1994). Sua ingestão através do café pode ser influenciada por diversos fatores, como o *blend* para elaboração da bebida já que cafés robusta possuem maiores níveis de acrilamida que cafés arábica devido ao alto teor inicial de asparagina livre. Além disso, o tempo de torrefação também está relacionado com seus teores, pois é formada nos estágios iniciais deste processo e seu conteúdo diminui de acordo com o aumento da temperatura e tempo. Pode-se incluir também as condições de armazenamento, o método de preparo da bebida, e quanto maior a porção, maior a quantidade de acrilamida ingerida (Soares *et al*., 2015).

A tabela 2 apresenta os principais compostos bioativos, nutrientes e outros compostos encontrados na bebida.

Tabela 2. Composição química média da bebida de café

Nutrientes e não-nutrientes	**Teores (média de *blends* de *Coffea arabica* ou *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (mg/100mL)**
Água	1,5% a 6%
Açúcares simples	0 - 100
Proteína	120-400
Lipídeos	180-400
Fibras solúveis	200-700
Ácidos alifáticos e ácido quínico	692-2140
Vitaminas	
Tiamina	0,001
Riboflavina	0,177
Niacina	0,8-10
Piridoxina	0,002
Folato	1
Vitamina C (ácido ascórbico total)	0,2
Vitamina E (α-tocoferol)	0,01
Vitamina K (filoquinona)	0,1
Minerais: cinzas totais	150-500
Potássio	115-320
Cálcio	2-4
Sódio	1-14
Fósforo	3-7
Ferro	0,02-0,13
Zinco	0,01-0,05
Manganês	0,02-0,05
Compostos bioativos	
Cafeína	50-380
Trigonelina	12-50
N-metilpiridina	2,9-8,7
Diterpenos (cafestol e kahweol)	0,2-1,5 em café filtrado 2,6-10 em café fervido

Tabela 2. continuação

Nutrientes e não-nutrientes	**Teores (média de *blends* de *Coffea arabica* ou *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (mg/100mL)**
Ácidos clorogênicos	32-500
Outros compostos fenólicos	0,1-0,2
Melanoidinas	500-1500
Compostos indesejáveis	
Acrilamida	3,9-7,7

Adaptado de: Farah, 2017

2.2. Caracterização da microbiota intestinal humana

A microbiota intestinal humana é estabelecida nos primeiros dias de vida e inicialmente colonizada logo após o nascimento e durante exposição ambiental (Koropatkin *et al.*, 2012), podendo ser observadas maiores proporções de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em crianças em aleitamento materno exclusivo (Koropatkin *et al.*, 2012), sendo *Bifidobacterium* o gênero dominante (Laparra e Sanz, 2010). Em crianças em aleitamento artificial (fórmulas infantis), observa-se aumento dos gêneros *Clostridium* spp. e *Bacteroides* spp. em relação às crianças em aleitamento materno (Koropatkin *et al.*, 2012).

Em adultos, a microbiota intestinal é composta pelas famílias Lactobacillaceae e Enterobacteriaceae, presentes no intestino delgado, e Bacteroidaceae, Prevotellaceae, Rikenellaceae, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, localizadas no cólon (Donadson *et al.*, 2015), caracterizando os filos Firmicutes, Bacteroidetes, sendo estes doisos mais abundantes, seguido por Proteobacteria e Actinobacteria (Sun e Chang, 2014) e Verrucomicrobia (Tojo *et al.*, 2014). Os gêneros mais abundantes são *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Streptococcus* e *Ruminococcus* (Conlon e Bird, 2015), estando presentes 10^2 a 10^9 bactérias no jejuno e no íleo, e 10^{11} a 10^{12} no cólon (Donadson *et al.*, 2015; Marietta *et al.*, 2015). Porém, a composição da microbiota de cada indivíduo deve-se a fatores que incluem disponibilidade de nutrientes, pH, presença de oxigênio, exposição a antimicrobianos, ácidos biliares e enzimas digestivas e integridade da mucosa (Belcheva *et al.*, 2015), sendo alguns desses fatores regulados geneticamente. Esses fatores podem também ser alterados por desordens metabólicas do hospedeiro, incluindo síndrome metabólica, diabetes melitus tipo 2, obesidade, e por fatores ambientais como ingestão de compostos

antimicrobianos, xenobióticos e alimentação, sendo este último fator devido à produção de nitrosaminas provenientes do metabolismo de lipídeos dietéticos e proteínas (Laparra e Sanz, 2010; Scott *et al.,* 2013; Sun e Chang, 2014).Tais desordens estão associadas à disbiose (Belcheva *et al.*, 2015), que se traduz por anormalidades na composição da microbiota devido ao desequilíbrio na proporção de bactérias benéficas e aumento de microorganismos patogênicos, ou através da ativação de vias metabólicas prejudiciais (Koropatkin *et al.,* 2012).

A microbiota intestinal humana desempenha um importante papel na regulação da homeostase do organismo. Entre eles: auxilia no amadurecimento do sistema imune intestinal, que ajuda a proteger contra patógenos; fornece suporte nutricional ao hospedeiro por sintetizar vitaminas, como vitamina K e a maioria das vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina, ácido pantôtenico, piridoxina, folato, biotina, cobalamina) e aminoácidos essenciais; e possui função metabólica vital, como a degradação de polissacarídeos complexos (não-digeríveis), fibras resistentes e oligossacarídeos provenientes da dieta (Said e Mohammed, 2006; LeBlanc *et al.*, 2012; Scott *et al.*, 2013; Abdollahi-Roodsaz *et al.,* 2016), que geram AGCC como acetato, butirato e propionato. Estes são fonte de energia para colonócitos e estimulam a produção de muco, o fluxo sanguíneo da mucosa eaproliferação celular, mantendo desta forma a integridade da mucosa (Meier, 2009; Macia *et al.*, 2012; Scott *et al.,* 2013). Os AGCC também reduzem o pH colônico, impedindo a multiplicação de bactérias patogênicas e estimulam a multiplicação de bifidobactérias e bactérias ácido lácticas (Gibson, 2004). Desta forma, as bactérias intestinais aproveitam nutrientes dos alimentos, gerando subprodutos que mantêm a homeostase intestinal local e previnem respostas inflamatórias sistêmicas (Abdollahi-Roodsaz *et al.*, 2016), ocorrendo uma relação simbiótica do indivíduo com sua microbiota intestinal (Marietta *et al.*, 2015).

Recentemente, a importância da microbiota intestinal para a saúde humana tem sido reconhecida devido a conectividade bilateral da comunidade bacteriana com o restante do organismo, e notavelmente, com o cérebro. Sabe-se que o trato gastrointestinal e o sistema nervoso central estão intrínsecamente ligados por um complexo de vias de sinalização conhecido como eixo cérebro-microbiota. A microbiota intestinal transmite sinais sobre a ingestão de nutrientes para o sistema nervoso central, o qual emite sinais sobre o estado energético e nutricional. Na presença de disbiose, as mensagens propagadas para o cérebro podem manifestar sinais de inflamação, aumento do estresse oxidativo, desequilíbrio da homeostase energética e aumento generalizado da degeneração celular (Westfall *et al.*, 2017).

Dentro do filo Firmicutes, destacam-se as bactérias lácticas, as quais constituem um grupo amplo e heterogêneo de microrganismos Gram-positivos com baixo teor das bases nitrogenadas guanina e citosina (G+C), representados principalmente por bactérias do gênero *Lactobacillus*. Estes são microrganismos anaeróbios facultativos que metabolizam monossacarídeos pela via de Embden-Meyerhof, pela via da fosfoquetolase, ou por ambas. As bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são exigentes nutricionalmente, e se multiplicam na maioria dos ambientes ricos em carboidratos, incluindo leite, cereais, plantas e superfícies mucosas (trato gastrointestinal, oral e reprodutivo) de animais e humanos, e a maioria daqueles considerados probióticos e espécies associadas ao intestino residem no trato gastrointestinal superior do hospedeiro (Goh e Klaenhammer, 2014). Outro filo que merece destaque na microbiota intestinal é o Actinobacteria, que tem como principal representante as bactérias do gênero *Bifidobacterium*, que possuem alto teor das bases nitrogenadas G+C, são anaeróbios obrigatórios,quebram polissacarídeos a monossacarídeosque são convertidos para intermediários da via de fermentação de hexoses, também conhecida como via frutose-6-fosfato ou *bifid shunt*, e são encontrados exclusivamente no trato gastrointestinal inferior de mamíferos (Goh e Klaenhammer, 2014; Van Den Broek *et al.*, 2008). Este gênero não possui as enzimas aldolase, fosfofrutoquinase, e glicose-6-fosfato dehidrogenase, as quais são as principais enzimas de bactérias ácido lácticas homofermentativas e heterofermentativas (De Vuyst *et al.*, 2013).

Os gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus*, são os microrganismos probióticos comumente utilizados na formulação de produtos probióticos, sendo utilizados no tratamento de condições clínicas que impactam e saúde animal e humana (Khurshid *et al.*, 2015), podendocolonizar mesmo que temporariamente e reestabelecer a simbiose da microbiota intestinal. A maioria dos probióticos são similares às bactérias encontradas na microbiota humana, principalmente de bebês em aleitamento materno, pois são conhecidas por promoverem proteção natural contra doenças (Iannitti e Palmieri, 2010).

O consumo de ingredientes dietéticos específicos, como fibras e prebióticos, também é uma alternativa pela qual a microbiota intestinal pode ser modulada (Holscher, 2017). As fibras dietéticas são polímeros de carboidratos não-digeríveis e não absorvidos, fermentados por bactérias presentes no trato gastrointestinal e que impactam a composição das comunidades bacterianas, assim como as atividades metabólicas microbianas, incluindo produção de produtos finais de fermentação (Holscher, 2017). Prebióticos são componentes

alimentares resistentes à digestão, absorção e adsorção, e fermentados pela microbiota intestinal, estimulando o crescimento e/ou atividade de bactérias benéficas específicas, e levando à produção de AGCC. Normalmente, são selecionados baseados na sua capacidade de promover o crescimento de bactérias produtoras de ácido láctico (Nazarro *et al.*, 2012).

2.3. Caracterização de probióticos: estratégias para modulação da microbiota intestinal e benefícios à saúde

A palavra probiótico é derivada do grego que significa "para a vida" e utilizada pela primeira vez em 1965 por Lilly e Stillwell, como o oposto da palavra antibiótico para qualificar uma substância microbiana capaz de estimular a multiplicação de outros microrganismos (Lilly e Stillwell, 1965; Quigley, 2010; Butel, 2014). Estas são bactérias que geram benefícios à saúde e, após ingeridas, colonizam a microbiota intestinal e inibem a atividade/multiplicaçãode bactérias ou outros microrganismosprejudiciais à saúde humana (Gibson e Roberfroid, 1995; Blaut, 2002, Reid *et al.*, 2003). Para sua utilização em alimentos, os microrganismos probióticos devem não apenas sobreviver à passagem pelo trato digestório, mas também ter capacidade de proliferação no intestino. Isto significa que devem ser resistentes ao suco gástrico e se multiplicar na presença de bile em condições intestinais, ou ser consumidos em um alimento-veículo que permita sua sobrevivência durante a passagem pelo estômago e liberação de bile (FAO, 2008).

Os estudos sobre probióticos iniciaram-se no início do século XX com Elie Metchnikoff, correlacionando a longevidade de búlgaros ao consumo de leite fermentado. No mesmo período, o pediatra francês Henry Tissier observou que crianças com diarréia apresentavam poucas bactérias Gram-positivas em formato de ípsilon (Y) nas fezes, pois estas bactérias em formato "bífido" eram dominantes em fezes de crianças saudáveis. Enquanto o pediatra sugeriu que crianças com diarreia deveriam ingerir um a dois copos de cultura pura de *Bacteroides acidiparalactici*, ou uma simbiose desta espécie com *Bacteroides bifidus*, a constatação de Metchnikoff sobre o benefício de leite fermentado à saúde e as bactérias como seu ingrediente ativo, o levou a sugerir que nem todas as bactérias são maléficas a saúde, e que isto poderia ser benéfico para substituir a "microbiota sem vida", através do enriquecimento da microbiota com bactérias fracamente proteolíticas capazes de fermentar glicose, como as bactérias lácticas (Butel, 2014). Alguns exemplos de estirpes classificadas e estudadas como probióticas estão listadas na tabela 3.

Tabela 3. Exemplos de microrganismos estudados como agentes probióticos

Probiótico	Local de isolamento	Referência
***Lactobacillus rhamnosus* GG**	Fezes de adultos saudáveis	Tripathi e Giri, 2014; Seegers e Leeber, 2014
***L. rhamnosus* GR1**	Uretra distal de mulheres saudáveis	Reid e Bruce, 2009
***L. rhamnosus* HN001**	Queijo tipo *cheddar*	FDA, 2006; Ouwehand *et al.*, 2009; Tripathi e Giri, 2014
***L. reuteri* LC-14**	Vagina de mulheres saudáveis	Reid e Bruce, 2009
***L. acidophilus* LA1 e LA5**	Estirpes comerciais para elaboração de produtos lácteos	Tripathi e Giri, 2014; Hoppe e Larsen, 2009
***L. acidophilus* NCDO 1748**	Faringe humana	Fondén e Svensson, 2009
***L. acidophilus* NCFM**	Fezes humans	Ouwehand e Lahtinen, 2009
***L. casei* Shirota**	Fezes humanas	Gueimonde e de Los Reyes Gavilán, 2009; Tripathi e Giri, 2014
***L. casei* 431**	Fezes de crianças saudáveis	Eskesen e Larsen, 2009
***L. johnsonii* La1**	Fezes humanas	Gueimonde e de Los Reyes Gavilán, 2009; Tripathi e Giri, 2014
***L. plantarum* 299v**	Fezes humanas	Gueimonde e de Los Reyes Gavilán, 2009; Gareau *et al.*, 2010
***L. paracasei* CRL431**	Fezes humanas	Tripathi e Giri, 2014
***L. paracasei* B21060**	Fezes humanas	Gueimonde e de Los Reyes Gavilán, 2009
***L. gasseri* OLL2716 (LG21)**	Humanos saudáveis	Kimura, 2009; Fujimura *et al.*, 2012
***L. paracasei* subesp. *paracasei* F19**	Mucosa colônica de humanos saudáveis	Svensson e Fondén, 2009
L. delbrueckii*subesp. *bulgaricus	Produtos lácteos	EFSA, 2010; Tripathi e Giri, 2014; Uriot *et al.*, 2016
***Bifidobacterium aminalis* subesp. *lactis* BB-12**	Fezes humanas	Gueimonde e de Los Reyes Gavilán, 2009
***B. aminalis* DN- 173010**	Fezes humanas	Gueimonde e de Los Reyes Gavilán, 2009
***B. adolescentis* 22L**	Leite materno	Duranti *et al.*, 2016; Kwak *et al.*, 2016
***B. adolescentis* ATCC 15703**	Intestino humano	Duranti *et al.*, 2016; Kwak *et al.*, 2016
***B. longum* subesp. *infantis* CBT BT1**	Fezes de bebês	Kwak *et al.*, 2016
***B. bifidum* CBT BF3**	Fezes de crianças	Kwak *et al.*, 2016
***B. breve* CBT BR3**	Fezes de crianças	Kwak *et al.*, 2015; Kwak *et al.*, 2016
***B. longum* BB536**	Trato intestinal de crianças saudáveis	Xiao, 2009
***B. longum* BL2C e BL46**	Trato gastrointestinal de humanos saudáveis	Lathinen e Salminen, 2009
***B. thermophilum* RBL67**	Fezes de bebês	Jans *et al.*, 2013; Tripathi e Giri, 2014
Lactococcus lactis* subesp. *lactis	Grãos de kefir	Macfarlane e Cummings, 1999; Gareau *et al.*, 2010; Leite *et al.*, 2015; Tripathi e Giri, 2014

Tabela 3. continuação

Probióticos	Local de isolamento	Referência
Lactococcus lactis* subesp. *cremoris	Grãos de kefir	Macfarlane e Cummings, 1999; Leite *et al.*, 2015
Leuconstoc mesenteroides	Grãos de kefir	Leite *et al.*, 2015
Pediococcus acidilactici	Vegetais e produtos lácteos	Ruoff *et al.*, 1988; Attri *et al.*, 2015
***Sporolactobacillus inulinus* BCRC14647**	Trato intestinal de humanos	Huang *et al.*, 2007
Streptococcus thermophilus	Produtos lácteos	EFSA, 2010; Gareau *et al.*, 2010; Uriot *et al.*, 2016
S. cremoris	Produtos lácteos	Bridge e Sneath, 1983; Tripathi e Giri, 2014
S. salivarius	Superfície da mucosa oral humana	Tripathi e Giri, 2014; Zupancic *et al.*, 2017
Bacillus polyfermenticus	Ar	Im *et al.*, 2009, Gareau *et al.*, 2010
***Enterococcus faecalis* NM815 e NM915**	Fezes de bebês em aleitamento materno	Mansour *et al.*, 2017
***E. faecium* NM1015**	Fezes de bebês em aleitamento materno	Mansour *et al.*, 2017
Propionibacterium freudenreichii	Queijo tipo emental	Falentin *et al.*, 2010; Cousin *et al.*, 2012
Saccharomyces boulardii	Fezes humanas	Macfarlane e Cummings, 1999; Gareau *et al.*, 2010; Seshapane *et al.*, 2013
S. cerevisiae	Grãos de kefir	De Lima *et al.*, 2017
***Escherichia coli* Nissle 1917**	Trato intestinal de humanos	Gareau *et al.*, 2010; Grozdanov *et al.*, 2004

É importante ressaltar que diferentes estirpes bacterianas do mesmo gênero e espécie podem exercer diferentes efeitos no hospedeiro. Por isso, propriedades e características específicas de estirpes individuais devem ser consideradas (Collado *et al.*, 2012). Dentre estas estirpes, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. acidophillus*, *Bifidobacterium animalis*, *B. animalis* subesp. *lactis* serão destacadas abaixo pois foram estudadas na presente dissertação.

Lactobacillus rhamnosus GG foi isolado originalmente de amostras fecais de indivíduos adultos saudáveis por Sherwood Gorbach e Barry Goldwin, responsáveis pela atribuição da sigla GG ao final do nome da estirpe (Gorbach, 1996). É um dos probióticosmais estudados e utilizados em uma gama de produtos disponíveis comercialmente (Segers e Lebeer, 2014). Além de possuir as características de um microrganismo probiótico, esta estirpe é capaz de se aderir às células epiteliais do intestino e produzir diversas substâncias antimicrobianas contra bactérias comensais e patogênicas (Doron *et al.*, 2005). *L. acidophilus* foi isolado pela primeira vez em fezes de bebês em 1900 por Moro, nomeadas como "*Bacillus acidophilus*", sendo incluído no gênero *Lactobacillus* em 1929 por Holland

(Fujisawa *et al.*, 1992). Devido à sua atividade probiótica associada com o equilíbrio da microbiota intestinal, esta estirpe é a mais recomendada para fins dietéticos (Gomes e Alcata, 1999), sendo amplamente utilizada em produtos lácteos (Arihara *et al.*, 1998).

O gênero *Bifidobacterium* está presente no intestino humano e possui crescente interesse devido às possíveis propriedades de promoção à saúde relacionadas ao seu potencial probiótico (Ventura *et al.*, 2013). Foi isolado pela primeira fez em 1899 por Tissier em fezes de crianças em aleitamento materno, denominando *Bacillus bifidus*, associando-as a uma microbiota intestinal saudável (Gomes e Malcata, 1999; Klijn *et al.*, 2005). A estirpe *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12 é muito encontrada em fórmulas infantis comercializadas nos Estados Unidos (Holscher *et al.*, 2015) e utilizada como cultura inicial para a elaboração de iogurtes (Zarrati *et al.*, 2013; Ziar *et al.*, 2013), enquanto a estirpe *B. animalis* DN-173010 é a mais popular e consumida em produtos lácteos na Espanha (Collado *et al.*, 2006).

Apesar de múltiplos mecanismos serem frequentemente representados em uma estirpe isolada, não é esperado que os efeitos dos probióticos sejam individuais. Dessa forma, os mecanismos amplamente estudados dos probióticos são a resistência à colonização, produção de ácidos e AGCC, reduzindo, dessa forma, o pH intestinal, regulação do trânsito intestinal, normalização de alterações na microbiota por modular sua composição, aumentoda renovação dos enterócitos e exclusão competitiva de patógenos através da produção de bacteriocinas inibitórias. Aqueles que são frequentemente observados entre a maioria das estirpes são a síntese de vitaminas, reforço da barreira intestinal, metabolismo de sais biliares, atividade enzimática e neutralização de carcinógenos. Efeitos benéficos raros e presentes em apenas algumas estirpes são efeitos neurológicos, imunológicos, endócrinos e bioatividade específica (Butel, 2014; Hill *et al.*, 2014).

O aumento da permeabilidade e perda da integridade epitelial são os gatilhos para diversas desordens gastrointestinais, incluindo a competição por patógenos intestinais, doenças inflamatórias intestinais, síndrome do cólon irritável, obesidade e síndrome metabólica, e enterocolite necrotizante, sendo estas doenças alvo de estudos sobre a ação dos probióticos (Bron *et al.*, 2017). Aplicações clínicas dos probióticos são para melhora de diarreia (infantil, associada a antibiótico e *Clostridium difficile*, e do viajante), doença diverticular, erradicação de *Helicobacter pylori*, alergias, dermatite atópica, infecções urogenitais, doenças hepáticas e redução de complicações no pós-operatório de cirurgias do

trato gastrointestinal (Iannitti e Palmieri, 2010; Butel, 2014; Floch *et al.*, 2015; Islam, 2016). Em indivíduos obesos, a administração de diferentes estirpes probióticas de lactobacilos reduziu a massa adiposa, o risco de diabetes mellitus tipo 2 e a resistência à insulina (Delzennne *et al.*, 2011). Os probióticos podem produzir diversos compostos biologicamente ativos, como peptídeos e mediadores normalmente associados a neurotransmissores. Diversas moléculas com funções neuronais como ácido gama-aminobutírico, serotonina, catecolaminas e acetilcolina sãorelatadas como derivados da metabolização microbiana. Dessa forma, as bactérias probióticas podem ser uma estratégia terapêutica na prevenção e/ou tratamento de certas condições neurológicas e neuropsicológicas (Wall *et al.*, 2014). Devido a esta relevância na psiquiatria, os probióticos que geram benefícios em pacientes com doenças psiquiátricas quando ingeridos em quantidades adequadas são denominados psicobióticos (Dinan *et al.*, 2013).

Pelo fato do consumo de probióticos ser considerado seguro, alimentos com alegações funcionais são elaborados, como as fórmulas infantis e outros alimentos contendo probióticos que podem ser administrados por longo período. A prevenção de infecções intestinais agudas em crianças saudáveis e em risco é uma estratégia comum de utilização destes microrganismos (Guarino *et al.*, 2015). Estes microrganismos também podem modular a função de barreira intestinal, que quando comprometida está associada a diversas doenças, como doenças inflamatórias intestinais, enterocolite necrotizante e inflamação de baixo grau associada à síndrome metabólica (Bron *et al.*, 2017). Outra estratégia de utilização dos probióticos para modulação da microbiota intestinal é através da regulação da proliferação de células colônicas e inativação de toxinas (Vitali *et al.*, 2012).

Apesar da relativa abundância e prevalência de espécies probióticas intestinais, estirpes podem se adaptar para a utilização de carboidratos, e o entendimento destas diferenças é necessário quando se utiliza uma abordagem racional para a formulaçao de alimentos funcionais, incluindo substratos prebióticos (McLaughlin *et al.*, 2015).Sabe-se que atividade dos probióticos pode ser potencializada na presença de prebióticos, que quando consumidos, não são digeridos pelo trato gastrointestinal superior e através da metabolização destes compostos, modificam ou estimulam a composição e/ou atividade de bactérias probióticas ou presentes na microbiota intestinal, aumentando a resistência contra patógenos (Gibson e Roberfroid, 1995; Blaut, 2002; Reid *et al.*, 2003; Bindels *et al.*, 2015).

2.4. Caracterização de prebióticos: estratégias para modulação da microbiota intestinal, benefícios à saúde e fontes alimentares

Em 1995, Gibson e Roberfroid publicaram o primeiro conceito de prebiótico, que foi definido como ingrediente alimentar não digerível que gera efeitos benéficos ao hospedeiro pela estimulação seletiva da multiplicação e/ou atividade de um ou de um limitado número de bactérias no cólon, promovendo entãoa saúde do hospedeiro. Além disso, para ser classificado como prebiótico, o ingrediente alimentar não deve ser hidrolisado nem absorvido no trato gastrointestinal superior, masser substrato seletivo para um ou limitado número de bactérias benéficas comensais presentes no cólon.Estas bactérias teriam sua multiplicação estimulada ou ativada metabolicamente, sendo capazes de alterar a microbiota intestinal para uma composição saudável ao organismo e, por fim, induzir efeitos luminais ou sistêmicos que poderiam ser benéficos ao hospedeiro (Gibson e Roberfroid, 1995).

Estudos sobre prebióticos iniciaram-se em 1921 com Rettger e Cheplin, que após experimentos com humanos, descreveram que a microbiota desteseram colonizadas com lactobacilos após o consumo de certos carboidratos (Rettger e Cheplin, 1921 *apud* Gibson *et al.*, 2017). O conceito de prebiótico foi exaustivamente pesquisado desde sua primeira publicação (Gibson e Roberfroid, 1995; Reid *et al.*, 2003; Gibson *et al.*, 2004; Roberfroid, 2007; FAO, 2008; Gibson *et al.*, 2010; Bindels *et al.*, 2015), e diversas definições foram elaboradas, além das atualizações dos compostos que poderiam ser considerados prebióticos apesar do pouco consenso de quais eram ou não prebióticos (Bindels *et al.*, 2015). A última atualização deste conceito foi publicada por Gibson *et al.* (2017), que definiram prebióticos como substratos utilizados seletivamente por microrganismos presentes no hospedeiro, conferindo benefícios à saúde.

Lactobacilos e bifidobactérias são os principais microorganismos-alvo para os prebióticos; mudanças em bifidobactérias são mais comuns que em lactobacilos. Isto é devido ao fato do maior número de bifidobactérias presente no colon humano que lactobacilos, e possuirem preferência por oligossacarídeos (Slavin, 2013). Seus efeitos biológicos dependem principalmente da composição da microbiota intestinal e derivados metabólicos, apesar de algumas funções serem devido à sua estrutura e ação direta, como por exemplo, inibindo a adesão de patógenos por receptores homólogos àqueles presentes em bactérias (Laparra e Sanz, 2010) e podem reduzir a produção de metabólicos tóxicos através da supressão da atividade de enzimas específicas presentes no cólon (Meyer e Stasse-Wolthuis, 2009). Além

disso, sua fermentação gera AGCC como acetato, propionato e butirato, os quais reduzem o pH luminal, estimulam a multiplicação de bactérias benéficas intestinais,inibem as bactérias patogênicas (Allsopp *et al.*, 2013), estimulam o sistema imunológico (Kelly-Quagliana *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2015), previnem câncer de cólon (Munjal *et al.*, 2009), aumentam a absorção de cálcio (Griffin *et al.*, 2003), controlam o peso corporal e reduzem o risco dediabetesmelittus tipo 2 (Fernandes *et al.*, 2015; Cluny *et al.*, 2015; Abrams *et al.*, 2007;. Delzenne *et al.*, 2015). Bindels *et al.* (2015) apresentaram o termo efeito prebiótico, caracterizado como o desfecho fisiológico benéfico que resulta da modulação da composição e/ou atividade da microbiota intestinal através da metabolização de um composto não-digerível.

Em geral, todos os compostos prebióticos descritos na literatura são carboidratos não digeríveis (fibras dietéticas), embora não só eles possam exercer efeito prebiótico (Holscher, 2017). Entretanto, uma fibra dietética pode ser prebiótica para um hospedeiro, mas não para outro (Gibson *et al.*, 2017). É importante ressaltar que a fermentação de carboidratos não-digeríveis por bactérias depende das propriedades físico-químicas dos carboidratos, assim como a quantidade de fibra ingerida e da composição da comunidade bacteriana no consumo individual de fibras (Holscher, 2017).

Os prebióticos apresentam propriedades tecnológicas próprias, e a inclusão destas substâncias em alimentos é uma maneira natural de fornecer alimentos com valor nutricional adequado (Yasmin *et al.*, 2015). O ambiente gastrointestinal possui variabilidade entre os indivíduos, resultando em diferentes respostas nas intervenções com prebióticos (Krumbeck *et al.*, 2016). Uma das estratégias de utilização de prebióticos é para aumentar os números de *Bifidobacterium* spp. presentes na microbiota intestinal, conhecido como efeito bifidogênico (Meyer e Stasse-Wolthuis, 2009; Yasmin *et al.*, 2015), sendo um processo-chave nos efeitos imunomodulares dos prebióticos (Meyer e Stasse-Wolthuis, 2009).

Os prebióticos clássicos e mais estudados nos alimentos são inulina, fruto-oligossacarídeos (FOS), como frutanos presentes em grãos, produtos de panificação, cereais e biscoito (Biesiekierski *et al.*, 2011) e centeio (Andersson *et al.*, 2009), galactooligossacarídeos (GOS), oligossacarídeos ouα-galactosídeos da soja tais como, rafinose e estaquiose também presentes no feijão (Trugo *et al.*, 1993) e outras leguminosas (Biesiekierski *et al.*, 2011), xilooligossacarídeos, pirodextrinas, isomalto-oligossacarídeos e lactulose (FAO, 2008).

Inulina, oligofrutose e os frutooligossacarídeos (FOS), são β(2-1)-frutanos especificamente bifidogênicos bastante estudados. A natureza bifidogênica dos frutanos deve-se ao fato da vantagem nutricional que a maioria das estirpes de bifidobactériaspossuemem comparação com outros grupos microbianos do trato intestinal. Entre estes compostos é importante considerar o grau de polimerização. A inulina possui grau de polimerização entre 3 e 60, e sua degradação ou hidrólise enzimática controlada resulta em oligossacarídeos, com grau de polimerização entre 2 e 20. O FOS é produzido pela transfructosilação da sacarose e normalmente possui 2 e 4 unidades de β(2-1)-frutosil ligados (Van de Wiele *et al.,* 2006). Dessa forma, o comprimento da cadeia dos frutanos é crucial na determinação da sua fermentabilidade, pois poucas bactérias são capazes de utilizar frutanos de cadeia longa para sua multiplicação (Scott *et al.,* 2014).

Bindels *et al.* (2015) incluíram oligossacarídeos do leite materno como prebióticos. Eles também indicaram como candidatos a prebióticos que necessitam de pesquisas adicionais amido resistente, pectina, arabinoxilano presente em pão de centeio (Andersson *et al.,* 2009), fibras de cereais integrais, e outros compostos não-carboidratos que exercem a sua ação por meio da modulação da microbiota intestinal, como os polifenóis (Tomás-Barberan *et al.*, 2016). Estes são metabólitos secundários de plantas, frequentemente associados com a coloração, sabor e mecanismos de defesa de frutas e vegetais (Marchesi *et al.,* 2016). Os polifenóis dietéticos são capazes de modular a atividade da microbiota intestinal. Por outro lado, diferenças na composição da microbiota intestinal determinam o metabolismo de polifenóis, produzindo diferentes tipos de metabólitos que poderiam gerar efeitos benéficos à saúde (Tomás-Barberan *et al.*, 2016).

2.5. O café como um alimento potencialmente prebiótico

2.5.1. Polissacarídeos presentes no café e seu potencial prebiótico

No café, as fibras solúveissão caracterizadas pelos polissacarídeos galactomanana e arabinogalactana tipo 2, predominantes em grãos e bebidas de café, dos quais 68-70% são galactomananas (Díaz-Rubio e Saura-Calixto, 2007; Simões *et al.*, 2009). A celulose, considerada como fibra dietética insolúvel, é encontrada em grãos de café verde e torrado, embebidas numa matriz de galactomanana e arabinogalactana, compreendendo de 8% a 15% dos polissacarídeos da parede celular do grão de café (Bradburry e Halliday, 1990; Redgwell *et al.,* 2002). As estruturas destes compostos são formadas pelos monossacarídeos presentes

na parede celular dos grãos de café verdes e torrados, sendo os principais constituintes manose, galactose, glicose e arabinose. (Fischer *et al.*, 2000, Thaler, 1978, Redgwell *et al.*, 2002).

Galactomananas (Figura 1) são compostas por resíduos de ligação β-(1→4)-D-manopiranosil substituídas por C-6 por um único resíduo de α-D-galactopiranosil. Possuem baixo peso molecular e baixo grau de substituíção da cadeia ramificada (Bradburry and Halliday, 1990; Nunes et al, 2005).

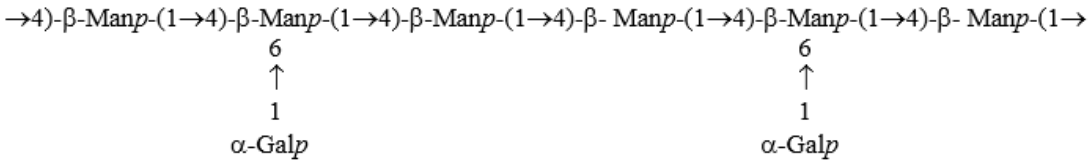


Figura 1. Estrutura de uma galactomanana (Coimbra *et al.*, 2004)

Arabinogalactanas tipo 2 (Figura 2) são caracterizadas por terem ligação β (1→3) na cadeia principal de galactana com ramificações de duas unidades (Araβ1→3-Gal1-), e são modificadas por arabinose e outros açúcares menos abundantes (Bradburry e Halliday, 1990; Showalter, 2001).

Devido às diferenças nos métodos de análise e entre as espécies, uma ampla faixa de valores de polissacarídeos foi relatada para o café. O teor de polissacarídeos no café arábica verde varia de 50 a 60g/100g (Wolfrom *et al.*, 1960; Fischer *et al.*, 2000), e para robusta, 48 a 56g/100g (Bradburry e Halliday, 1990; Fischer *et al.*, 2000). Destes valores, 5,0 a 22g/100g correspondem à galactomanana em café arábica, enquanto 8,5 a 14g / 100g correspondem à arabinogalactana tipo 2 (Wolfrom e Patin, 1965; Wolfrom *et al.*, 1960; Bradbury e Halliday, 1990). No café robusta verde, esses polissacarídeos representam cerca de 22% e 17% do peso seco, respectivamente (Bradbury e Halliday, 1990).

O processo de torrefação diminui o teor de mono e polissacarídeos presentes no grão de café. Em um estudo realizado por Oosterveld *et al.* (2003), perdas de 20% e 37% em matéria seca foram observadas em grãos arábica de torra clara e escura, respectivamente. A composição das arabinogalactanas nos grãos de café altera consideravelmente com o aumento do grau de torrefação, uma vez que a arabinose é um dos açúcares mais sensíveis a degradação durante a torrefação, enquanto a manose é o açúcar menos sensível.

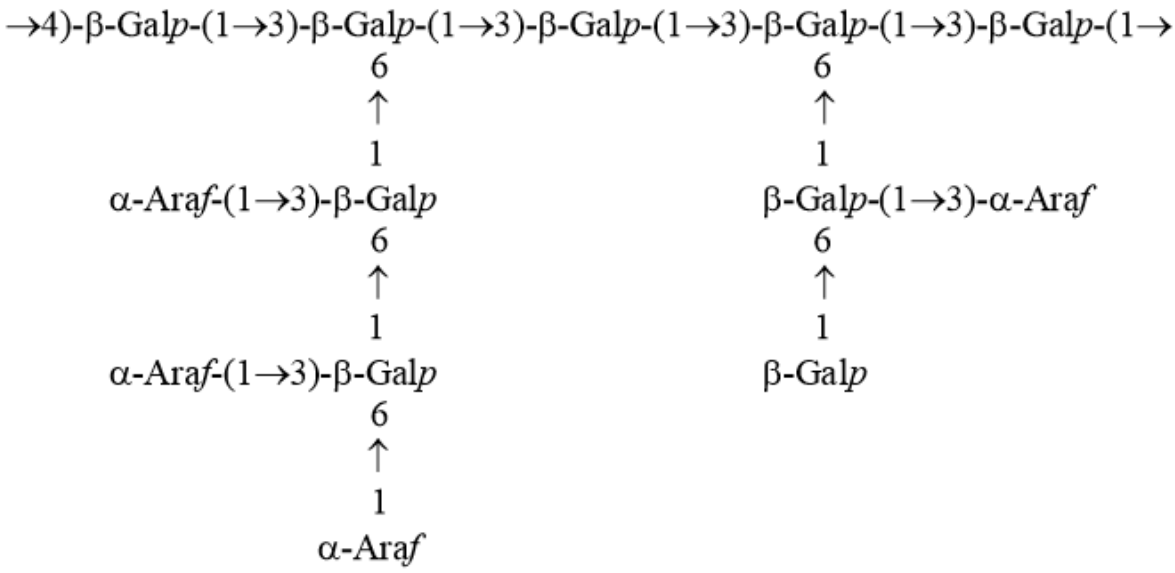


Figura 2. Estrutura de uma arabinogalactana tipo 2 (Coimbra *et al.*, 2004).

O teor de fibra solúvel dietética, que inclui principalmente estes dois polissacarídeos, em grãos torradosfoi estimado em aproximadamente 2g/100g (López-Barrera *et al.*, 2016). Na bebida, o teor defibra solúvel pode variar consideravelmente de acordo com a espécie, método de preparo da bebida e método analítico, além de outros fatores. Segundo Gniechwitz *et al.* (2007a), valores de 139 a 654 mg/100 ml para bebida de grão de café arábica e 302 mg/100 ml para a bebida de grão de café robusta foram encontrados.

Estudos que investigaram o potencial efeito prebiótico das fibras solúveis do café são escassos. Um estudo *ex vivo* (Gniechwitz *et al.*, 2007b) investigou a fermentação de fibras solúveis isoladas a partir de pó de café liofilizado, pela microbiota fecal humana utilizando inulina como controle positivo. Foi encontrado que, tal como a inulina, as fibras solúveis do café estimularam a produção de AGCC e aumentou a contagem de células de bactérias pertencentes ao grupo *Bacteroides-Prevotella*. O gênero *Bacteroides* é capaz de exercer intensa atividade enzimática favorecendo a despolimerização de glicosídeos (Salyers *et al.*, 1997), por estarem localizadas na superfície da célula (Blatch *et al.*, 1993). Neste estudo, ambas as fibras de café e inulina não estimularam o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos. O fato do controle positivo ser um composto prebiótico conhecido e não ocorrermultiplicação deve ser considerado ao interpretar o resultado obtido com fibras solúveis do café. No entanto, de acordo com os autores, uma possível explicação para o resultado negativo com inulina foi a utilização de inulina de cadeia longa, ao passo que o crescimento de bifidobactéria diz respeito principalmente a inulina ou oligofrutose com baixo

grau de polimerização. Eles também alegaram que o resultado negativo pode ser devido às enzimas que degradam polissacarídeos estarem presentes no citoplasma de bifidobactéria e isto pode ser uma desvantagem na competição por nutrientes. O fato da composição da microbiota intestinal diferir entre as pessoas, e que apenas algumas amostras foram utilizadas para este estudo, sem caracterização qualitativa anterior, também pode ter levado àcontagem reduzida de bifidobactérias e lactobacilos.

Recentemente, McLaughlin *et al.* (2015) utilizaram polissacarídeos comerciais conhecidos como prebióticos e estirpes de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* de origem humana. Eles observaram que arabinogalactana estimulou a multiplicação de *Bifidobacterium longum* subesp. *longum*, enquanto galactomanana estimulou apenas a multiplicação de *Bifidobacterium dentium* NCFB 2843 e não foi substrato adequado para as estirpess de lactobacilos testadas neste estudo.

O potecial prebiótico da arabinogalactana também foi estudado por Terpend *et al.* em um simulador do ambiente da microbiota intestinal humana, e observaram que a arabinogalactana exerceu efeito principalmente na região distal do cólon, levando ao aumento seletivo das bactérias pertencentes ao filo Bacteroidetes e ao gênero *Bifidobacterium* presentes na região distal do cólon. Além disso, também foi capaz de aumentar a contagem de *Faecalibacterium prausnitzii* e reduzir a contagem de *Clostridium perfringens*.

2.5.2. Melanoidinas e seu potencial prebiótico

Melanoidinas são pigmentos escuros heterogêneos com nitrogênio em sua composição produzidos durante a reação de Maillard, reação de escurecimento não enzimático que ocorre entre os grupos carbonila de açúcares redutores e o grupo amino de aminoácidos, peptídeos ou proteínas durante o preparo de alimentos que sofrem processamento térmico (Silván *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2011). As principais fontes alimentares de melanoidinas são produtos de café e de panificação (Fogliano e Morales, 2011).

As melanoidinas presentes no café são formadas durante a torrefação por uma diversidade de componentes químicos presentes nos grãos verdes covalentemente ligados uns aos outros (Figura 3), como sacarose (após inversão), polissacarídeos (galactomananas e arabinogalactanas), aminoácidos livres (predominantemente ácido glutâmico e glicina), proteínas (proteína de armazenamento 11S e de parede celular) (Nunes *et al.*, 2007), ácidos clorogênicos e outros polifenóis (ácido cafeico, ácido dihidrocafeico, etc) (Perrone *et al.*,

2012). O grau de torrefação aumenta a sua complexidade, ligando novos compostos de baixo peso molecular para a cadeia polimérica. Quanto mais escuro o grau de torrefação, maior a quantidade de melanoidinas presentes na bebida e sua complexidade estrutural (Vitaglione *et al.*, 2012). Devido ao elevadoteor de fibra dietética presentes em sua estrutura, estes compostos também são considerados como uma fração das fibras dietéticas presentes no café (Silván *et al.*, 2010).

São responsáveis por cerca de 25% da composição do café torrado moído (Belitz *et al.*, 2009). Comparando as espécies, o conteúdo de melanoidina varia na literatura de 14,4g a 25g/100 g para café arábica e 18,5g a 27,3g/100g para café robusta (Farah, 2012; Vignoli *et al.*, 2014). Durante a torrefação, a baixa atividade de água e alta temperatura favorecem o desenvolvimento da reação de Maillard, revelando níveis semelhantes de melanoidinas para o mesmo grau de torrefação (Vignoli *et al.*, 2014). Durante o preparo da bebida, uma vez que a fração insolúvel das melanoidinas permanece em filtros, apenas a fração solúvel deve ser considerada para avaliação do efeito prebiótico deste composto. Diferentes fatores podem influenciar o teor de melanoidinas na bebida de café, tais como o tipo de extração, o encorpamento da bebida (quanto maior a relação pó/água durante o preparo, maior será a concentração de melanoidina), pressão aplicada e porção, sendo este último fator determinante para ingestão de melanoidinas, variando cerca de 7,2g/100g para o café espresso, filtrado e cafés do tipo italiano e 22,8g/100g para café solúvel antes de ser dissolvido em água (Fogliano e Morales, 2011). Na bebida de café, 25% das melanoidinas são de alto peso molecular, 23% de peso molecular intermediário e 52% de baixo peso molecular (Adams *et al.*, 2005).

Estudos que relatam a capacidade das bactérias presentes no cólon para fermentar melanoidinas do café são escassos, o que torna difícil concluir sobre seu efeito prebiótico. Um dos primeiros estudos realizados avaliou a capacidade de fermentação da fração de café de elevado peso molecular solúvel em etanol obtido por ultrafiltração, por fermentação *ex vivo* utilizando bactérias fecais humanas (Gniechwitz *et al.*, 2008). As proporções de três grupos bacterianos dominantes em relação às contagens de células totais após 0, 24 e 48 horas foram comparadas. Enquanto a contagem do grupo *Clostridium coccoides* - *Eubacterium rectale* e de bifidobactéria diminuiu após a fermentação, a dospertencentes ao grupo *Bacteroides* - *Prevotella* permaneceu relativamente estável ao longo de 48 horas de incubação.

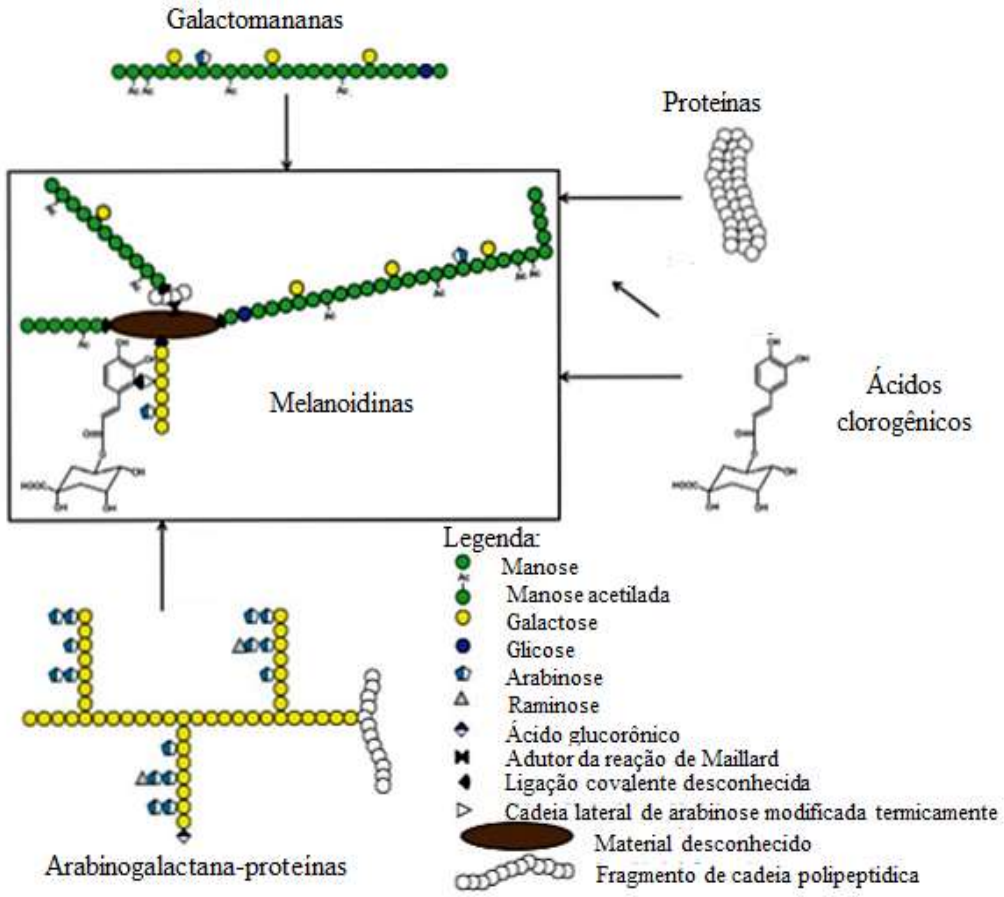


Figura 3. Processo de formação de melanoidinas (Adaptado de Moreira *et al.*, 2012).

Sobre as diferenças no grau de torrefação, Reichardt *et al.* (2009) avaliaram a fermentação pela microbiota fecal humana de diferentes frações de café de alto peso molecular obtidas por ultrafiltração da bebida de café obtida a partir de grãos de café de torra clara, média e escura. As alterações na proporção de bactérias pertencentes ao cluster *Clostridium coccoides* - *Eubacterium rectale* e gênero *Bifidobacterium* foram mínimas. Porém, a proporção do grupo *Bacteroides* - *Prevotella* aumentou em todas as frações de café testadas. No que diz respeito à produção de AGCC, acetato, propionato, butirato foram identificados como produtos de fermentação bacteriana.

Recentemente, um estudo *ex vivo*, investigou o efeito prebiótico de melanoidinas do café, obtidos por ultrafiltração e subsequente liofilização, quando incubadas com material fecal humano. As melanoidinas exerceram efeito prebiótico, aumentando os níveis de bifidobactéria e lactobacilos, comparado como controle utilizado, glicose. Além disso, o

número de clostridia e *Bacteroides* reduziram de forma não significativa (Jiménez-Zamora *et al.*, 2014).

2.5.3. Ácidos clorogênicos e seu potencial prebiótico

Os ácidos clorogênicos (Figura 4) são os principais componentes da fração fenólica dos grãos de café verde, sendo formados pela esterificação de uma molécula de (-)-ácido quínico e uma a três moléculas de um ou mais ácidos trans-hidroxicinâmico (Figura 3). Representam cerca de 4 a 9% da composição do café, dependendo da espécie, além de outros fatores. Eles incluem ácidos cafeoilquínicos, dicafeoilquínicos, feruloilquínicos, ácidos p-cumaroilquínicos e diésteres mistos de ácidos cafeoilferuloil-quínico (Farah e Donangelo, 2006; Farah *et al.*, 2005; Farah *et al.*, 2006). Os teores de ácidos clorogênicos em grãos verdes integrais de café arábica e robusta variam consideravelmente, de cerca de 0,7 a 7,9g/100g para café arábica e 1,1 a 11,3g /100gpara café robusta em base seca (Ky *et al.*, 2001; Perrone *et al.*, 2008; Farah, 2012). Grãos pós-maduros (passados) apresentam teores menores, enquanto grãos imaturos apresentam teores maiores. Nos grãos torrados, os teores podem variar de 0,1 a 2,5g/100g e 0,1 a 3,8g/100g para os grãos arábica e robusta respectivamente (Perrone *et al.*, 2008; Farah; 2012).

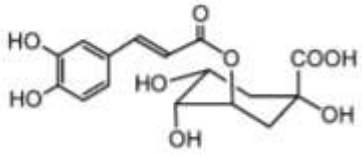


Figura 4. Estrutura do ácido clorogênico (5-cafeoilquínico), o composto majoritário entre os ácidos clorogênicos do café (Farah *et al.*, 2005).

Estes compostos são parcialmente absorvidos e a parte não-absorvida é degradada por enzimas presentes na microbiota intestinal humana. A ação destas enzimas e a degradação dos polifenóis depende da concentração e diferenças estruturais dos compostos e composição da microbiota intestinal do indivíduo. Um grande número de metabólitos oriundos da microbiota intestinal foi identificado *in vitro* (Gonthier *et al.*, 2006; Rechner *et al.*, 2004) e *in vivo* (Gonthier *et al.*, 2003; Farah *et al.*, 2008, Duarte e Farah, 2011, Felberg *et al.*, 2015). Exemplos de metabólitos importantes dos ácidos clorogênicos de origem microbiana são o ácido hipúrico, ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, ácido dihidrocafeico, ácido 3-hidroxifenilpropiônico, ácido m-cumárico, ácido caféico, ácidos gálico, vanílico, benzóico, p-

hidroxibenzóico, siríngico, sinápico, ácido trans-3-hidroxicinâmico, 3-(4-hidroxifenil) propiônico e 2,4-di-hidroxibenzóico (Gonthier *et al.*, 2003, Rechner *et al.*, 2004, Duarte e Farah, 2011, Felberg *et al.*, 2015).

A metabolização de polifenóis é benéfica para a microbiota intestinal (Parkar *et al.*, 2013), mas poucos estudos investigaram *in vitro*ou *ex vivo*os efeitos dos ácidos clorogênicos e do ácido cafeico (o principal produto de degradação primária de ácidos clorogênicos) tal microbiota. Um modelo anaeróbico de simulação da fermentação colônica utilizou microbiota fecal humana para investigar o metabolismo de polifenóis, tendo como controle um meio livre de polifenóis. O ácido clorogênico e o ácido cafeico (10µg/mL e 30µg/ml) aumentaram o número de *Bifidobacterium* spp., quando incubadas durante 24-48h, mas a incubação com 100µg/mL aumentou o número de *Bifidobacterium* spp. em 24 horas e diminuiusua multiplicação em 48 horas. Ambos polifenóis também promoveram a multiplicação de *Firmicutes* e *Bacteroides* e aumento na produção de AGCC, mas o maior aumento resultou da incubação com ácido cafeico a 10µg/ml (Parkar *et al.*, 2013).

A multiplicação e o metabolismo de bactérias fecais humanas foram avaliados *ex vivo* usando como substrato padrão uma solução de ácido clorogênico (~54mg/100mL), café solúvel rico em ácido clorogênico (mistura de café torrado e verde), duas amostras de café solúvel comercial integral e FOS, este último utilizado como controle positivo. Tanto a solução de ácido clorogênico e a mistura de café torrado e verde promoveram aumento significativo na multiplicação de *Bifidobacterium* spp. de forma similar ao observado com FOS. Este, por sua vez, não promoveu o crescimento do grupo *Clostridium coccoides* - *Eubacterium rectale*, enquanto a solução de ácido clorogênico e as três amostras de café promoveram a multiplicação deste grupo. A multiplicação de *Bacteroides* spp. aumentouna mesma proporção em todas as três incubações com café, e não alterou quando incubado com FOS. No entanto, não houve alterações significativas na multiplicação de bactérias totais, *Lactobacillus*/*Enterococcus* spp., *Bacteroides* spp. ou do grupo *Clostridium histolyticum*, embora não tenham reduzido a multiplicação deste último (Mills *et al.*, 2015).

Em um estudo realizado por Raimondi *et al.* (2014), trinta e duas estirpes pertencentes a oito espécies de *Bifidobacterium* de isolados de fezes humanas ou obtidas a partir de ATCC (American Type Culture Collection) foram analisadas quanto à sua capacidade para multiplicar-se na presença de diferentes concentrações (0; 0,5; 2; 10mmol/L) de ácido clorogênico ou ácido cafeico. Como controles, meio de cultura sem ácido clorogênico e meio

não inoculado contendo 0,5 mol/L de ácido clorogênico foram utilizados. Todas as estirpes apresentaram grande multiplicação com 0,5 mmol /L de ácido clorogênico ou ácido cafeico, sem diferenças significativas na turbidez final. Também ocorreu multiplicação de bifidobactéria na presença de 2 mmol/L de ácido clorogênico ou ácido cafeico, com exceções do grupo *Bifidobacterium catenulatum*/*Bifidobacterium pseudocatenulatum* e espécies *Bifidobacteirum longum*. Um maior número de estirpes pertencentes a *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium catenulatum*/*Bifidobacterium pseudocatenulatum* não se multiplicaram na presença de 10 mmol/L de ácido clorogênico, enquanto *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*tiveram sua multiplicação inibida. A maioria das estirpes foi inibida com 10 mmol/L de ácido cafeico, com exceções de *Bifidobacterium animalis* subespécie *lactis* e *Bifidobacterium animalis* subesp.*animalis*. De acordo com os autores, *Bifidobacterium animalis* hidrolisou os ácidos clorogênicos devido à presença de uma esterase (Balat_0669) peculiar a esta espécie.

2.6. Outros compostos bioativos relevantes na bebida de café

Além dos compostos já citados, a bebida de café apresenta outros compostos considerados bioativos. Entre eles destacam-se a cafeína e a trigonelina, os quais apresentam atividade antimicrobiana comprovada.

2.6.1.Cafeína

Cafeína (1,3,7- trimetilxantina) (Figura 5) é um alcalóide purínico, componente de bebidas e alimentos como chás, café, bebidas à base de cola, cacau, chocolate, erva mate e bebidas energéticas (Ashihara e Crozier, 2001; Astrup *et al.*, 1990; Martinéz-López *et al.*,2014). Entre os alimentos, sua concentração é maior no café e seu teor pode variar de 0,9g/100g a 1,62g/100g em grãos de café arábica verde, e em grão de café robusta verde o conteúdo de cafeína varia de 1,5g a 2,5g/100g (Ky *et al.*, 2001; Farah, 2012), enquanto nos grãos torrados seus teores variam de 1,1g a 1,3g/100g e 2,4 a 2,5g/100g para grãos de café arábica e robusta, respectivamente (Farah, 2012). A cafeína está entre os compostos responsáveis pelo amargor da bebida de café (Farah *et al.*, 2006).

A principal ação da cafeína no organismo humano é como antagonista de receptores de adenosina (Cano-Marquina *et al.*, 2013), e pelo fato dela estar presente em diversos alimentos amplamente consumidos, pesquisas relacionadas aos seus benefícios ao organismo

vêm sendo realizadas, porém, não há estudos sobre efeitos deste composto bioativo na microbiota intestinal humana. Pelo fato da cafeína proveniente do café e de outras bebidas serem absorvidas pelo estômago e intestino delgado dentro de 45 minutos após a ingestão, e atravessar as membranas celulares com a mesma eficiência com a qual é absorvida e circula entre os tecidos do organismo (Burdan, 2014; Huang *et al.*, 2014), seu potencial prebiótico pode ser questionado pela alta absorção deste composto. Sabe-se que a cafeína pode exercer efeito antimicrobiano em enterobacteria como *Salmonella enterica* e *Escherichia coli*na concentração de 2mg/mL (Almeida *et al.*, 2006), e em patógenos alimentares como *Escherichia coli* O157:H7 em concentrações acima de 0,5g/mL de cafeína (Ibrahim *et al.*, 2006).

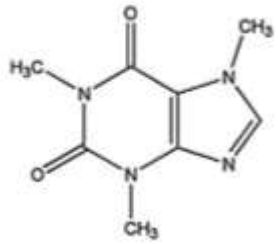


Figura 5. Estrutura da cafeína (Cano-Marquina *et al.*, 2013).

2.6.2.Trigonelina

Trigonelina (ácido N-metilnicotínico) (Figura 6) é um alcaloide biologicamente derivado da metilação enzimática do ácido nicotínico, através da adição do grupo metil no átomo de nitrogênio (Allred *et al.*, 2009; Caprioli *et al.*, 2014; Farah, 2012), e é precursora de compostos do aroma na bebida de café (Ky *et al.*, 2001). Sua composição varia de 0,6g/100g a 2g/100g em grãos de café arábica verde e 0,6 a 1g/100g em grãos de café robusta verde (Farah, 2012; Ky *et al.*, 2001). Em grãos torrados, varia de 0,2 a 1,2g/100g e 0,3 a 0,7g/100g para grãos arábica e robusta, respectivamente (Farah, 2012). Dos teores de trigonelina, 10 a 20% é convertida a niacina, uma vitamina do complexo B (Farah, 2017). Em humanos, foi relatado que a absorção de trigonelina ocorre logo após a ingestão de café, atingindo níveis máximos no plasma após 2,5 horas de ingestão (Lang *et al.*, 2013).

Não há estudos a respeito do efeito da trigonelina sobre a modulação da microbiota intestinal. Porém, segundo Da Silva *et al.*, (2014) este composto exerce efeito antimicrobiano sobre asbactérias patogênicas envolvidas no processo de formação da cárie (*Streptococcus parasanguinis* ATCC 903 e *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595) e de doenças periodontais

(*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Prevotella intermedia* ATCC 49046 *e Prevotella nigrescens* ATCC 33563), em quantidades variando de 2 a 5mg/mL.

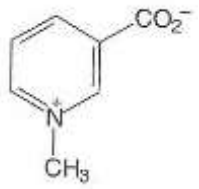


Figura 6. Estrutura da trigonelina (Farah, 2012).

2.7. A bebida de café e seu potencial prebiótico

Considerando que o café é tradicionalmente consumido em forma de um extrato aquoso, ou seja, da bebida faz-se necessária a avaliação do seu efeito sobre o crescimento de probióticos. No entanto, até o presente momento poucos artigos avaliaram tal efeito (Nakayama e Oishi, 2013; Jaquet *et al*. 2009; Cowan *et al.*, 2014) e de forma incompleta e superficial. Além disso, não há até o presente evidências clarasque possam indicar o café como um alimento prebiótico.

Um estudo longitudinal (Jaquet *et al.*, 2009) foi realizado para investigar a modulação da microbiota intestinal através do consumo de café por humanos. Ele consistiu de um período de pré-tratamento de três semanas, no qual os voluntários foram instruídos a seguir uma dieta restrita, sem consumo de iogurtes ou leites fermentados contendo bifidobactéria, lactobacilos, ou prebióticos em geral, e sem grãos ou pães integrais. O tratamento foi seguido por um período de três semanas durante a qual foram consumidas três xícaras de bebida de café por dia, contendo 3,4 g de café solúvel. As fezes dos voluntários foram coletadas antes e após o período de três semanas do consumo de café. O café não causou diferenças no número total de bactérias, e pouca ou nenhuma diferença significativa foram observadas nos números do grupo *Clostridium*/*Eubacterium*, família *Enterobacteriaceae*, grupo *Bacteroides*/*Prevotella*, e grupo *Lactobacillus*/*Enterococcus*. Em contrapartida, foi observado um aumento significativo na multiplicação de *Bifidobacterium* spp. O estudo concluiu que o consumo moderado de café influencia a multiplicação de determinados membros da microbiota intestinal, em especial de bifidobactéria, sem grande impacto sobre os grupos de bactérias dominantes. Não foi discriminado quais componentes da bebida de café foi ou foram responsáveis por este efeito.

Em um estudo realizado em camundongos A/J (n = 7) (Nakayama e Oishi, 2013), café (500µl/dia), galactooligossacarídeo (GOS - controle positivo, 2000mg/kg/dia) ou água estéril (controle) foram administrados porgavagem, no mesmo horário, durante três dias consecutivos. Partes proximal, média e distais do intestino delgado e partes proximal e distais do cólon foram retirados de cada camundongo. A contagem total de bactérias no intestino delgado proximal e distal diminuiu significativamente após o consumo de café em comparação com as contagens em camundongos que consumiram GOS ou água. Tanto no intestino delgado distal quanto no cólon proximal, a contagem de *Escherichia coli* diminuiu significativamente após consumo de café e GOS em comparação com as contagens do grupo que recebeu água. No cólon proximal, o consumo de café e de GOS também diminuiu a contagem de *Enterococcus* spp. em comparação com o grupo controle. Por fim, as espécies *Bacteroides* spp. e *Clostridium* spp. reduziram no cólon proximal após o consumo de café e de GOS em comparação com o grupo controle. Além disso, a multiplicação de *Bifidobacterium* spp. aumentou significativamente após o consumo de café e GOS comparados com aqueles no grupo controle. A contagem de *Lactobacillus* spp. também aumentou no cólon proximal, após o consumo de café e de GOS em comparação com o grupo controle.

Em um estudo randomizado, com ratos Sprague-Dawley foi avaliado a influência do café (2% peso/volume), com consumo *ad libitum* (n = 10) associado a uma dieta normal durante oito semanas, em comparação com o consumo de água (controle, n = 10), na microbiota intestinal. Um decréscimo de 4% na multiplicação de *Bacteroides*/*Prevotella* spp. e aumento de 12% na multiplicação de *Clostridium leptum* foram observados no grupo que recebeu café. Não foram observadas diferenças em *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. (Cowan *et al.*, 2014).

3. JUSTIFICATIVA

Uma vez que o café é o alimento mais consumido no mundo depois da água e que bactérias como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* exercem papel importante na regulação e promoção da saúde do organismo humano, é necessário esclarecer se o consumo desta bebida e de seus compostos exerce efeito benéfico nestes microrganismos. Diversos estudos têm sido conduzidos neste sentido, mas a maioria avaliou os efeitos da bebida ou de alguns de seus compostos diretamente na microbiota fecal, que possui grande variabilidade entre os indivíduos. Até o momento, poucos avaliaram os efeitos de compostos do café com potencial atividade funcional sobre multiplicação de culturas puras de bactérias ou naquelas classificadas como probióticas, e não foram encontrados estudos que atribuindo a cafeína e trigonelina tal atividade funcional. Portanto, torna-se necessário um estudo sistemático dos compostos com potencial prebióticopresentes em extratos e compostos bioativos do café de modo que avalie isoladamente seus efeitos em microrganismos intestinais de importância para a saúde.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial prebiótico de extratos de café arábica, integral e descafeinado, em graus de torrefação distintos e de seus principais compostos bioativos.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os teores de compostos bioativos (ácido clorogênicos, cafeína e trigonelina) em extratos aquosos de *Coffea arabica* integrais e descafeinados;
- Avaliar o efeito de extratos aquosos de *Coffea arabica* integrais e descafeinado torradosna multiplicação de bactérias probióticas;
- Avaliar o efeito de compostos bioativos isolados (ácido clorogênico, trigonelina, cafeína, galactomanana, arabinogalactana tipo 2) sobre a multiplicação de bactérias probióticas;
- Avaliar o efeito de extratos aquosos de *Coffea arabica* integrais e descafeinado, torrados e de compostos bioativos na multiplicação de *Escherichia coli*.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Obtenção das amostras de café solúvel e compostos bioativos

Para avaliação do efeito prebiótico dos extratos de café, amostras de café solúvel do tipo arábica integral com graus de torrefação médio e escuro, e descafeinado com grau de torrefação médio foram fornecidas pela COCAM Cia de Cafés Solúveis e Derivados, São Paulo, Brasil.

Os seguintes compostos bioativos na forma de padrão comercial foram utilizados: Ácidos clorogênicos (ácido clorogênico cristalino, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos), trigonelina (cloridrato de trigonelina, Sigma-Aldrich) e cafeína (Caffeine, Carl Roth, Karlsruhe, Alemanha). Os polissacarídeos também foram utilizados na forma de padrões comerciais, sendo galactomanana (galactomannan from carob, Sigma-Aldrich) e arabinogalactana ((+)-arabinogalactan, Sigma-Aldrich).

Como controles positivos utilizou-se inulina de cadeia longa (Inulin from dahlia tubers, Sigma-Aldrich) e frutooligossacarídeo (FOSVITA®, Vitafor, São Paulo, Brasil), uma vez que são compostos reconhecidamente prebióticos (Verspreet *et al.*, 2016).

6.2. Quantificação dos compostos bioativos nos extratos aquosos de café

As análises de oito ácidos clorogênicos (3 ácidos cafeoilquínicos, dois feruloilquínicos e 3 ácidos dicaffeoilquinicos) e duas lactonas foram realizadas por sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-DAD), de acordo com Farah *et al.* (2005) com adaptações, utilizando uma coluna com fase-reversa (Magic C30, 150 × 2mm × 5µm, 100Å, Michrom Bioresources inc, Auburn, CA, Estados Unidos), gradiente com ácido formico 0.3% e metanol e leitura a 325nm.

As análises de cafeína e trigonelina foram realizadas segundo o método adaptado de Farah *et al.* (2006), utilizando sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-DAD), operando a 272nm para cafeina e a 264nm para trigonelina, coluna de fase reversa (Magic C30, 150 × 2mm × 5µm, 100Å, Michrom Bioresources inc) com fase móvel constituída de metanol a 40% para cafeína e 5% para trigonelina.

6.3. Ativação das bactérias

Neste estudo foram utilizadas as seguintes estirpes criopreservadas em caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Lactobacilli MRS Broth, BD, Difco, Nova Jersey, Estados Unidos)

adicionado de glicerol a 20%, obtidas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro: *Lactobacillus rhamnosus* GG – American Type Culture Colection (ATCC) 53103 (GG) e *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* Danone (DN)-173010 (BA), *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (LA), *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12 (BB12). Foi utilizada também a estirpe *Escherichia coli* ATCC 25922. Esta era estocada em ágar Infusão de Cérebro e Coração - "Brain Heart Infusion" (BHI/BBL™ Brain Heart Infusion Agar, BD, Difco) sob refrigeração.

6.3.1. Ativação das bactérias probióticas

A partir dos tubos de criopreservação as estirpes foram inoculadas em caldo MRS (Lactobacilli MRS Broth, BD, Difco) adicionado de 0,25% de cisteína (esterililizada por filtração em membrana de polietersulfona/Syringe Driven Filters, Jet Biofil, Guangzhou, China) com poro de 0,22µm, e incubadas a 37ºC por 48 horas. Após este período, as estirpes foram inoculadas na superfície de placas de petri contendo agar MRS e incubados em anaerobiose gerada por velas ou kit de anaerobiose (Anaerobac®, Probac do Brasil, São Paulo, Brasil), a 37 ºC por 48 horas.

6.3.2. Ativação de *Escherichia coli* ATCC 25922

Através da técnica de esgotamento, parte do inóculo presente no meio agar BHI foi inoculado, com auxílio de alça bacteriológica, na superfície de placa de petri contendo agar BHI e incubada a 37 ºC por 24 horas.

6.4. Determinação da atividade potencialmente prebiótica dos compostos do café

6.4.1. Meio de cultura utilizado

A determinação da atividade prebiótica (efeitos na multiplicação de bactérias probióticas) dos extratos de café, fibras solúveis, ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina foi realizada utilizando-seo caldo MRS segundo De Man, Rogosa e Sharpe (1960) modificado obtendo-se a seguinte composição final para 1000mL de água destilada (Sánchez *et al.*, 2000): peptona (10g), extrato de levedura (5g), acetato de sódio (5g), polisorbato 80 (1g), fosfato de

potássio monobásico (2g), sulfato de magnésio (0,1g), sulfato de manganês (0,05g), com pH final de 6,3.

Observação. Ressalta-se que a composição original do caldo MRS segundo De Man, Rogosa e Sharpe (1960) possui a seguinte composição para 1000mL de água destilada: peptona (10g), extrato de carne (10g), extrato de levedura (5g), glicose (20g) acetato de sódio (5g), polisorbato 80 (1g), fosfato de potássio monobásico (2g), citrato de amônio (2g), sulfato de magnésio (0,1g), sulfato de manganês (0,05g). Esta composição foi modificada (MRSm) de modo que o meio de cultura tivesse restrições no fornecimento de energia para o microrganismo. Foram retirados glicose, extrato de carne e citrato de amônio.

6.4.2. Preparo das soluções

A escolha das concentrações dos extratos de café utilizado foi determinada com base nos diferentes padrões de consumo mundial (Farah, 2017). Foram utilizadas soluções com concentrações de 5, 10 e 15 mg/mL (café solúvel/água destilada). Cada solução foi homogeneizada e esterilizada por membrana de polietersulfona com poros de 0,22µm (Syringe Driven Filters, Jet Biofil), sendo transferida para frascos estéreis durante a filtração. As soluções de inulina e FOS foram preparadas da mesma maneira e nas mesmas concentrações dos extratos de café.

Da mesma forma que os extratos de café, as concentrações dos compostos bioativos (ácido clorogênico, cafeína, trigonelina, galactomanana e arabiogalactana) utilizados foram equivalentes àquelas encontradas em uma a três xícaras de café (Farah, 2012). Estas foram de: 50, 100, 200, 400 e 800 mg/mL. Os compostos foram dissolvidos diretamente em caldo MRSm nas concentrações desejáveis e esterilizados por filtração em membrana como previamente descrito. Inulina e FOS foram utilizados nas mesmas concentrações.

6.4.3. Preparo dos inóculos para determinação da atividade prebiótica

A partir do cultivo em ágar MRS em fase logarítimica de crescimento, foram preparadas suspensões em solução salina (NaCl a 0,85%) que foram inoculadas no meio de cultura de modo a se obter uma concentração inicial de 10^3 - 10^4 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Os experimentos com os compostos bioativos foram realizados em placas para cultura de células com 12 poços (capacidade máxima de

6,8mL/Cell and Tissue Culture Plates, Jet Biofil, China) com volume final de 3mL do meio cultivo com os compostos nas diferentes concentrações e o inóculo dos microrganismos. Os testes com os extratos de café foram realizados em tubos com volume final de 10mL, incluindo o extrato nas diferentes concentrações, o inóculo e o caldo MRSm. Os poços e tubos foram incubados a 37 ºC por até 48 horas, sendo os poços em anaerobiose. Como controles para avaliação comparativa da multiplicação dos microrganismos, foram utilizados o cultivo em caldo MRS convencional (MRSc) e em caldo MRSm não adicionado dos compostos do café ou de seus extratos. Imediatamente após o inóculo e após 24 e 48 horas de incubação, alíquotas dos cultivos foram diluídas em solução salina, semeadas na superfície de placas de agar MRS e incubadas em anaerobiose, gerada por velas ou kit de anaerobiose (Anaerobac®, Probac do Brasil, Brasil) a 37 ºC por até 48 horas para a contagem de células. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados expressos em Log UFC/mL.Como controle dos efeitos dos compostos em uma estirpe não probiótica, foi avaliada a multiplicação de *E. coli (*ATCC 25922), microrganismo comumente encontrado no trato intestinal humano. Para tal, foi utilizado o caldo Luria Bertani (LB) cuja composição para 1L de água destilada, triptona (10g), extrato de levedura (5g), cloreto de sódio (10g), com pH em torno de 7,0.

6.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Tukey no software GraphPad Prism®, versão 7.03 (San Diego, CA, USA). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e os resultados apresentados no formato de médias dos valores obtidos e desvio-padrão.

7. RESULTADOS

7.1. Análise dos compostos bioativos nos extratos de cafés solúveis utilizados

A composição, em relação à quantidade de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina, dos extratos de café utilizados está apresentada na tabela 4.

Tabela 4. Teores de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em extratos de café solúvel de *Coffea arabica* integrais e descafeinado (por mL de extratos de café)

Amostra	Concentrações (mg/mL)	Ácido clorogênicos totais*(mg)	Cafeína (mg)	Trigonelina (mg)
Café arábica torra média	5	21,6± 0,14	13,9± 0,21	16,5 ± 0,57
	10	43,2± 0,28	27,8± 0,42	33,0 ± 1,13
	15	64,8± 0,42	41,8± 0,64	49,5 ± 1,70
Café arábica torra escura	5	14,2 ± 0,28	13,3 ± 0,14	14,5 ± 0,74
	10	28,4 ± 0,57	26,5 ± 0,28	29,0 ± 1,56
	15	42,6 ± 0,85	39,8 ± 0,42	43,5 ± 2,33
Café arábica descafeinado torra média	5	18,0± 0,21	0,85± 0,007	13,0 ± 0,57
	10	35,9± 0,42	1,69± 0,01	26,0 ± 1,13
	15	53,9± 0,64	2,53± 0,02	39,0 ± 1,70

*Somatório dos teores de oito ácidos clorogênicos e duas lactonas

Os teores de ácidos clorogênicos dos extratos de café integrais com torra média foram superiores aos encontrados nos de torra escura, e no extrato de café descafeinado, o teor foi menor comparado aos extratos de café integrais. Estes resultados eram esperados e estão de acordo com a literatura (Toci *et al.*, 2006; Perrone *et al.*, 2012). Também eram esperados valores semelhantes de cafeína entre os cafés integrais nos dois graus de torrefação, além do valor mínimo para o extrato de café descafeinado. Para a trigonelina, observou-se redução gradual dos seus teores quando comparados com os graus de torrefação médio e escuro, o que está de acordo com Toci *et al*., (2006).

7.2. Avaliação do potencial prebiótico de extratos de café

Os resultados relativos à avaliação dos efeitos dos extratos de café sobre a multiplicação das bactérias probióticas e *Escherichia coli* estão apresentadas na tabela 5. As médias das contagens em placa após 48 horas estão apresentadas nas figuras 7 a 11. As curvas de multiplicação nos tempos 0, 24 e 48 horas das bactérias probióticas e *Escherichia coli*, encontram-se nos anexos 1 a 5.

Tabela 5. Multiplicação de bactérias lácticas probióticas e *Escherichia coli*, após 48 horas de incubação, em meio de cultivo contendo extratos de café integrais e descafeinadosnos diferentes graus de torrefação. Resultados expressos em log UFC/mL.

Tratamento	**Concentração (mg/mL)**	**Microrganismos** **Concentração de células após 48 horas - log UFC/mL[1] (Δ log$_{10}$)[2]**				
		Lactobacillus rhamnosus GG 53103	*Lactobacillus acidophilus* LA-5	*Bifidobacterium animalis* 173010	*Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12	*Escherichia coli* 25922
MRSm sem extrato de café		$7,38 \pm 0,11^{aA}$ (2,98)	$7,25 \pm 0,98^{a\ A}$ (2,94)	$7,17 \pm 0,13^{a\ A}$ (4,06)	$7,47 \pm 0,21^{aA}$ (4,32)	-
Meio de cultura convencional (MRSc para probióticos e LB para *E. coli*		$8,59 \pm 0,09^{bA}$ (4,50)	$7,53 \pm 0,09^{aB}$ (4,00)	$8,27 \pm 0,01^{bA}$ (4,16)	$9,39 \pm 0,08^{bC}$ (5,37)	$7,97 \pm 0,18^{aB}$ (3,72)
Inulina	5	$7,52 \pm 0,16^{aA}$ (4,02)	$7,37 \pm 0,13^{aA}$ (3,87)	$6,89 \pm 0,27^{aB}$ (3,39)	$7,52 \pm 0,16^{aA}$ (4,02)	-
	10	$7,55 \pm 0,01^{aA}$ (3,21)	$7,77 \pm 0,04^{aA}$ (4,27)	$7,05 \pm 0,38^{aA}$ (3,55)	$7,55 \pm 0,01^{aA}$ (4,05)	-
	15	$7,89 \pm 0,13^{aA}$ (7,29)	$7,55 \pm 0,04^{aA}$ (4,05)	$7,13 \pm 0,13^{aA}$ (3,63)	$7,89 \pm 0,13^{aA}$ (4,39)	-
FOS	5	$7,61 \pm 0,07^{aA}$ (4,11)	$7,44 \pm 0,06^{aA}$ (3,94)	$6,80 \pm 0,28^{aB}$ (3,30)	$7,61 \pm 0,07^{aA}$ (4,11)	-
	10	$7,72 \pm 0,02^{aA}$ (4,22)	$7,19 \pm 0,49^{aA}$ (3,69)	$7,06 \pm 0,30^{aA}$ (3,56)	$7,71 \pm 0,02^{aB}$ (4,21)	-
	15	$6,69 \pm 0,97^{aA}$ (3,19)	$7,70 \pm 0,07^{aB}$ (4,20)	$6,95 \pm 0,00^{aA}$ (3,45)	$6,69 \pm 0,97^{aA}$ (3,19)	-
Extratos de café integral torra média	5	$11,69 \pm 0,05^{cA}$ (7,41)	$11,54 \pm 0,28^{bA}$ (7,58)	$11,44 \pm 0,08^{cA}$ (6,24)	$11,69 \pm 0,05^{cA}$ (7,17)	$8,30 \pm 0,14^{aB}$ (3,97)
	10	$11,81 \pm 0,28^{cA}$ (7,57)	$11,63 \pm 0,28^{bA}$ (7,53)	$11,54 \pm 0,17^{cA}$ (7,06)	$11,81 \pm 0,28^{cA}$ (7,32)	$8,13 \pm 0,03^{aB}$ (3,80)
	15	$11,89 \pm 0,09^{cA}$ (7,69)	$11,50 \pm 0,13^{bA}$ (7,47)	$11,72 \pm 0,00^{cA}$ (7,34)	$11,89 \pm 0,09^{cA}$ (7,50)	$8,19 \pm 0,09^{aB}$ (3,86)

Tabela 5. continuação

Tratamento	Concentração (mg/mL)	Microrganismos Concentração de células após 48 horas - log UFC/mL[1] (Δ log_{10})[2]				
		Lactobacillus rhamnosus GG 53103	*Lactobacillus acidophilus* LA-5	*Bifidobacterium animalis* 173010	*Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12	*Escherichia coli* 25922
Extratos de café integral torra escura	5	$11,89 \pm 0,04^{cA}$ (7,52)	$11,80 \pm 0,03^{bA}$ (7,70)	$10,70 \pm 0,00^{cA}$ (6,75)	$11,89 \pm 0,04^{cA}$ (7,37)	$8,11 \pm 0,18^{aB}$ (3,86)
	10	$12,10 \pm 0,38^{cA}$ (7,65)	$11,66 \pm 0,18^{bB}$ (7,48)	$11,75 \pm 0,22^{cB}$ (7,70)	$12,10 \pm 0,38^{cA}$ (7,72)	$8,13 \pm 0,07^{aB}$ (3,83)
	15	$11,63 \pm 0,37^{cA}$ (7,40)	$11,75 \pm 0,16^{bA}$ (7,72)	$11,68 \pm 0,15^{cA}$ (7,13)	$11,63 \pm 0,37^{cA}$ (7,17)	$8,07 \pm 0,10^{aB}$ (3,83)
Extratos de café descafeinado torra média	5	$8,78 \pm 0,95^{bA}$ (4,56)	$7,74 \pm 0,03^{aB}$ (3,40)	$7,38 \pm 0,54^{aB}$ (2,97)	$8,78 \pm 0,94^{aA}$ (4,60)	$8,11 \pm 0,08^{aA}$ (3,54)
	10	$7,83 \pm 0,11^{aA}$ (3,49)	$7,68 \pm 0,14^{aA}$ (3,32)	$7,25 \pm 0,50^{aA}$ (2,89)	$7,83 \pm 0,11^{aA}$ (3,66)	$8,17 \pm 0,07^{aB}$ (3,63)
	15	$7,48 \pm 0,07^{aA}$ (2,80)	$7,69 \pm 0,25^{aA}$ (3,33)	$7,45 \pm 0,19^{aA}$ (3,19)	$7,48 \pm 0,07^{aA}$ (2,85)	$8,22 \pm 0,08^{aB}$ (3,85)

1- Média do log de unidades formadoras de colônia por mililitro e seu desvio padrão; 2- Diferença entre log de unidades formadoras de colônia do inóculo final e inicial; (-) – experimento não realizado; MRSc – meio de cultura convencional; MRSm – meio de cultura modificado; LB – caldo Luria-Bertani; FOS - frutooligossacarídeo;

Letras minúsculas indicam semelhança ou diferença estatistica em uma mesma coluna. Letras maiúsculas indicam semelhança ou diferença estatistica em uma mesma linha.

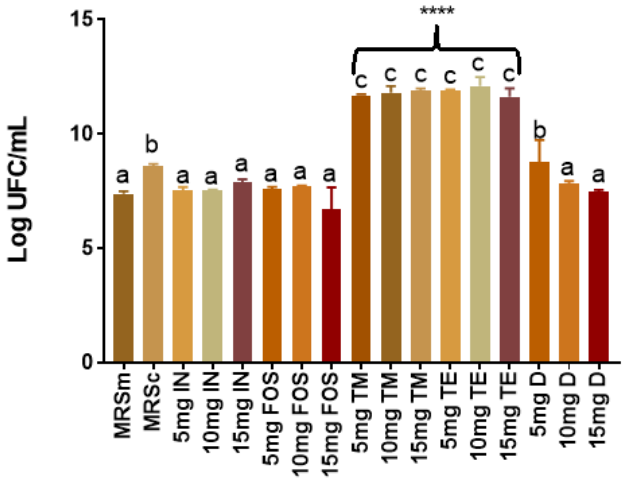


Figura 7. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 cultivado em meio MRSm com extratos de café como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; TM –

torra média; TE – torra escura; D – descafeinado; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo; * p < 0,05; ** p < 0,005; *** e **** p < 0,0005.

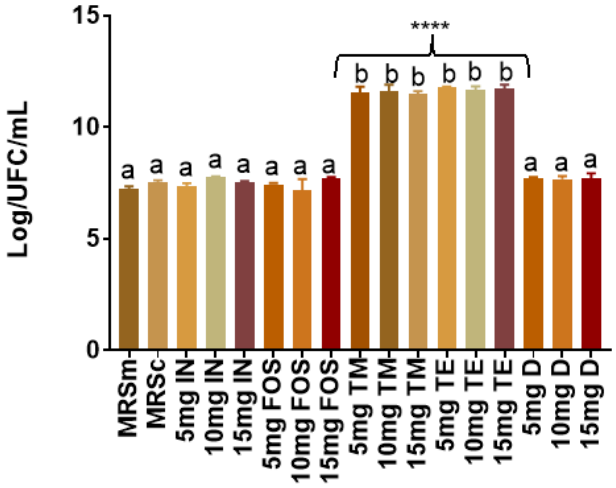


Figura 8. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 cultivado em meio MRSm com extratos de café como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; TM – torra média; TE – torra escura; D – descafeinado; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo; * p < 0,05; ** p < 0,005; *** e **** p < 0,0005.

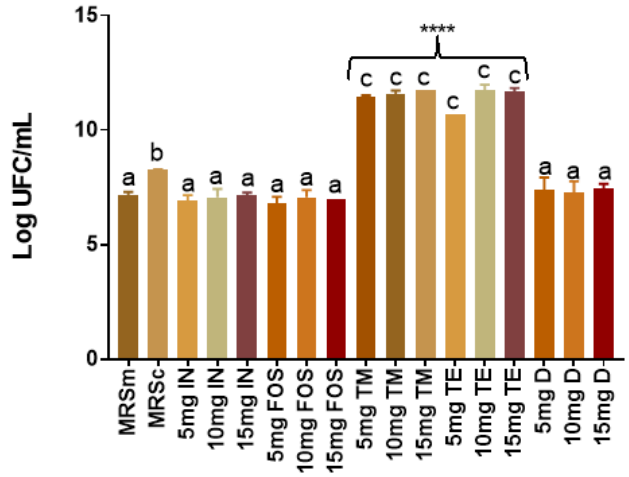


Figura 9. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* DN-173010 cultivada em meio MRSm com extratos de café como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; TM – torra média; TE – torra escura; D – descafeinado; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo; * p < 0,05; ** p < 0,005; *** e **** p < 0,0005.

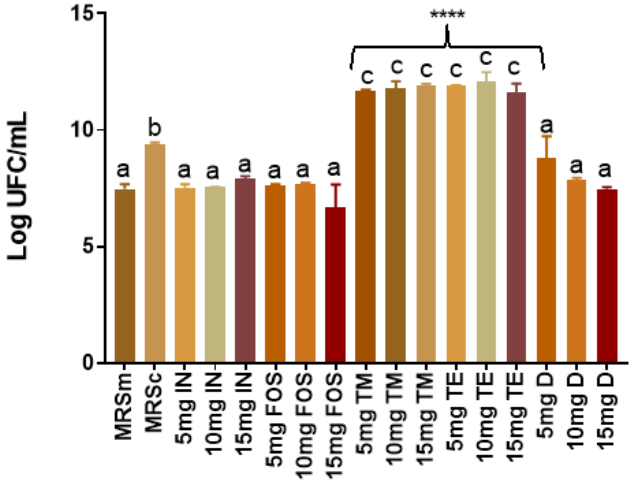


Figura 10. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12 cultivada em meio MRSm com extratos de café como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; TM – torra média; TE – torra escura; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo; * p < 0,05; ** p < 0,005; *** e **** p < 0,0005.

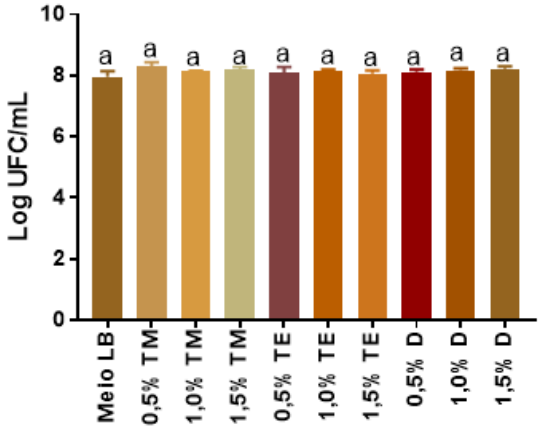


Figura 11. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Escherichia coli* ATCC 25922 cultivada em meio LB com adição de extratos de café. Nota: Meio LB – meio de cultura Luria-Bertani; TM – torra média; TE – torra escura; D – descafeinado.

Quando as culturas foram testadas no MRSm sem os extratos de café a multiplicação foi em média 1,31 log UFC/mL, menor quando comparado com o MRSc, mostrando os efeitos da falta de fontes de carbono no meio de cultivo.

Quando os valores da multiplicação das estirpes cultivadas em MRSm sem extratos de café foram comparados com os obtidos no cultivo em MRSm contendo diferentes concentrações dos extratos de café, para os extratos com grau de torrefação médio e escuro, o

aumento médio foi de 4,42 e 4,49; 4,31 e 4,49; 4,40 e 4,21; e 4,33 e 4,40 log UFC/mL para GG, LA, BA e BB12 respectivamente, indicando que os extratos de café estimularam a multiplicação das estirpes. Além disso, a multiplicação na presença dos extratos integrais foi maior do que a obtida para o MRSc, com aumento em média, para os graus de torrefação médio e escuro: 3,30 e 3,28; 4,02 e 4,20; 3,29 e 3,10; e 2,40 e 2,48 log UFC/mL para GG, LA, BA e BB12 respectivamente, indicando que os microrganismos conseguiram se adaptar aos diferentes nutrientes presentes no MRSm. Entretanto, o extrato de café descafeinado foi o que apresentou o menor efeito na multiplicação dos microrganismos em relação ao MRSm com e sem adição de extratos de café e ao MRSc.

Nas concentrações utilizadas de inulina e FOS, utilizados como controle positivo por serem conhecidos como compostos prebióticos, não houve alteração na taxa de multiplicação. Dessa forma, o aumento na multiplicação dos microrganismos nos meios de cultura contendo extratos de café de torra média e escura em relação à inulina e FOS foi, em média: 4,30 e 4,38; 4,06 e 4,24; 4,60 e 4,42; e 4,31 e 4,38 log UFC/mL para GG, LA, BA e BB12, respectivamente. Não houve diferenças na multiplicação na presença de inulina e FOS ao comparar com os extratos de café descafeinado.

Diferenças estatísticas foram encontradas entre os microrganismos ao comparar os testes com extratos de cafés integrais nos diferentes graus de torrefação com o extrato de café descafeinado ($p < 0,0001$) com média de aumento na multiplicação de 3,76 e 3,84; 3,85 e 4,03; 4,20 e 4,01; e 3,76 e 3,84 log UFC/mL para GG, LA, BA e BB12 para torra média e escura respectivamente, mas sem diferenças entre as concentrações inoculadas para todos os extratos de café integrais e descafeinado nos diferentes graus de torrefação (variação no valor de p entre $p = 0,0582$ a $p > 0,9999$).

Os resultados observados com a estirpe *E. coli* evidenciaram que nenhum dos compostos estimularam a sua multiplicação comparado com o meio LB, meio de cultura adequado para a multiplicação deste microrganismo.

7.3. Avaliação do potencial prebiótico de compostos bioativos presentes na bebida de café

Os resultados relativos à avaliação dos efeitos dos ácidos clorogênicos, trigonelina e cafeína presentes em extratos de café sobre a multiplicação das bactérias probióticas e *Escherichia coli* estão apresentados na tabela 6. As médias das contagens em placa após 48

horas estão apresentadas nas figuras11 a 25. As curvas de multiplicação dos probióticos nos tempos 0, 24 e 48 horasestão no anexo 6 a 13, e de *Escherichia coli* está no anexo 9.

Para as comparações, foi testado novamente o comportamento dos microrganimos nos meios de cultura MRSm e MRSc, com o mesmo volume de meio de cultura utilizado para os experimentos com os compostos. A multiplicação das culturas inoculadas no meio MRSm sem os compostos foi, em média, 1,05 log UFC/mL menor quando comparado com o MRSc, também mostrando os efeitos da falta de fontes de carbono no meio de cultivo.

Tabela 6. Multiplicação de bactérias lácticas probióticas e *Escherichia coli*, após 48 horas de incubação, em meio de cultivo contendo ácidos clorogênicos, trigonelina e cafeína. Resultados expressos em log UFC/mL

Tratamento	**Concentração (mg/mL)**	**Microrganismos** **Concentração de células após 48 horas - Log UFC/mL[1]** **(Δ $\log_{10}$)[2]**				
		Lactobacillus rhamnosus GG 53103	*Lactobacillus acidophilus* LA-5	*Bifidobacterium animalis* 173010	*Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12	*Escherichia coli* 25922
MRSm sem extrato de café		$6,63 \pm 0,02^{aA}$ (3,13)	$7,20 \pm 0,06^{aB}$ (4,42)	$7,88 \pm 0,04^{aB}$ (5,40)	$7,66 \pm 0,04^{aB}$ (4,16)	-
Meio de cultura convencional (MRSc para probióticos e LB para *E. coli*)		$8,27 \pm 0,06^{bA}$ (5,02)	$8,43 \pm 0,19^{bA}$ (4,07)	$8,34 \pm 0,09^{bA}$ (4,80)	$8,53 \pm 0,15^{bA}$ (4,67)	$7,97 \pm 0,18^{aB}$ (3,72)
Inulina	50	$7,66 \pm 0,00^{cA}$ (4,16)	$7,18 \pm 0,00^{aA}$ (5,88)	$7,76 \pm 0,01^{aA}$ (5,76)	$7,25 \pm 0,03^{aA}$ (5,25)	-
	100	$7,39 \pm 0,16^{cA}$ (6,09)	$7,28 \pm 0,07^{aA}$ (5,06)	$7,43 \pm 0,03^{aA}$ (5,43)	$7,75 \pm 0,02^{aA}$ (5,27)	-
	200	$7,69 \pm 0,03^{cA}$ (4,19)	$7,09 \pm 0,07^{aA}$ (5,39)	$7,44 \pm 0,23^{aA}$ (3,94)	$7,62 \pm 0,03^{aA}$ (4,12)	-
	400	$7,76 \pm 0,00^{cA}$ (4,26)	$7,48 \pm 0,39^{aA}$ (5,18)	$7,39 \pm 0,07^{aA}$ (3,89)	$7,61 \pm 0,00^{aA}$ (4,11)	-
	800	$7,39 \pm 0,39^{cA}$ (5,09)	$7,45 \pm 0,12^{aA}$ (4,09)	$7,27 \pm 0,02^{aA}$ (3,80)	$7,45 \pm 0,12^{aA}$ (4,09)	-

Tabela 6. continuação

Tratamento	Concentração (mg/mL)	Microrganismos Concentração de células após 48 horas - Log UFC/mL[1] ($\Delta \log_{10}$)[2]				
		Lactobacillus rhamnosus GG 53103	*Lactobacillus acidophilus* LA-5	*Bifidobacterium animalis* 173010	*Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12	*Escherichia coli* 25922
FOS	50	$7,63 \pm 0,07^{cA}$ (5,63)	$7,70 \pm 0,26^{cA}$ (5,31)	$7,76 \pm 0,06^{bA}$ (5,31)	$7,92 \pm 0,15^{aA}$ (5,53)	-
	100	$7,69 \pm 0,09^{cA}$ (5,69)	$7,98 \pm 0,08^{cA}$ (4,48)	$7,97 \pm 0,03^{bA}$ (5,58)	$7,74 \pm 0,07^{aA}$ (5,74)	-
	200	$7,81 \pm 0,12^{cA}$ (4,31)	$7,78 \pm 0,00^{cA}$ (5,78)	$7,43 \pm 0,12^{aA}$ (5,28)	$7,76 \pm 0,16^{aA}$ (5,76)	-
	400	$7,87 \pm 0,06^{cA}$ (4,37)	$7,61 \pm 0,30^{cA}$ (5,61)	$7,92 \pm 0,16^{bA}$ (5,33)	$7,99 \pm 0,14^{aA}$ (5,69)	-
Ácidos clorogênicos	800	$7,77 \pm 0,07^{cA}$ (4,27)	$7,77 \pm 0,08^{cA}$ (5,77)	$7,88 \pm 0,10^{bA}$ (5,28)	$7,94 \pm 0,03^{aA}$ (5,64)	-
	100	$7,59 \pm 0,18^{cA}$ (5,29)	$7,55 \pm 0,33^{aA}$ (5,25)	$7,65 \pm 0,03^{aA}$ (4,15)	$7,61 \pm 0,04^{aA}$ (5,61)	$8,21 \pm 0,07^{aB}$ (3,91)
	200	$7,44 \pm 0,25^{cA}$ (5,44)	$7,83 \pm 0,00^{aA}$ (5,68)	$7,59 \pm 0,36^{aA}$ (4,09)	$9,57 \pm 0,01^{cB}$ (7,27)	$8,24 \pm 0,007^{aC}$ (3,97)
	400	$7,45 \pm 0,01^{cA}$ (3,95)	$7,75 \pm 0,03^{aA}$ (5,60)	$9,75 \pm 0,04^{cB}$ (7,75)	$9,71 \pm 0,20^{cB}$ (7,01)	$8,11 \pm 0,04^{aC}$ (3,97)
	800	$7,71 \pm 0,01^{cA}$ (5,11)	$7,37 \pm 0,04^{aA}$ (4,03)	$7,73 \pm 0,26^{aA}$ (4,39)	$7,09 \pm 0,10^{aA}$ (4,85)	$8,22 \pm 0,03^{aB}$ (4,06)
Trigonelina	50	$7,77 \pm 0,01^{cA}$ (4,27)	$7,67 \pm 0,03^{aA}$ (5,67)	$7,80 \pm 0,12^{aA}$ (5,41)	$7,53 \pm 0,02^{aA}$ (4,03)	$8,15 \pm 0,01^{aB}$ (3,84)
	100	$7,78 \pm 0,09^{cA}$ (5,78)	$7,77 \pm 0,01^{aA}$ (5,63)	$7,77 \pm 0,05^{aA}$ (5,29)	$7,66 \pm 0,01^{aA}$ (4,16)	$8,01 \pm 0,12^{aB}$ (3,65)
	200	$7,42 \pm 0,06^{cA}$ (3,92)	$7,75 \pm 0,08^{aA}$ (5,16)	$7,55 \pm 0,06^{aA}$ (5,25)	$7,52 \pm 0,09^{aA}$ (5,22)	$8,14 \pm 0,15^{aB}$ (3,91)
	400	$7,58 \pm 0,17^{cA}$ (4,08)	$7,65 \pm 0,06^{aA}$ (5,50)	$7,68 \pm 0,06^{aA}$ (5,20)	$7,33 \pm 0,21^{aA}$ (5,03)	$8,18 \pm 0,06^{aB}$ (4,15)
	800	$7,29 \pm 0,04^{cA}$ (4,99)	$7,57 \pm 0,01^{aA}$ (4,25)	$7,17 \pm 0,08^{cA}$ (3,84)	$7,44 \pm 0,05^{aA}$ (4,12)	$8,36 \pm 0,00^{bB}$ (4,42)

Tabela 6. continuação

Tratamento	Concentração (mg/mL)	Microrganismos Concentração de células após 48 horas - Log UFC/mL[1] ($\Delta \log_{10}$)[2]				
		Lactobacillus rhamnosus GG 53103	*Lactobacillus acidophilus* LA-5	*Bifidobacterium animalis* 173010	*Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12	*Escherichia coli* 25922
Cafeína	50	$8,27 \pm 0,06^{bA}$ (6,27)	$7,67 \pm 0,17^{aB}$ (4,17)	$7,89 \pm 0,15^{aB}$ (4,67)	$7,89 \pm 0,15^{aB}$ (5,59)	$8,10 \pm 0,02^{aA}$ (3,64)
	100	$7,79 \pm 0,00^{cA}$ (4,29)	$7,75 \pm 0,01^{aA}$ (4,25)	$7,96 \pm 0,16^{aA}$ (3,57)	$7,96 \pm 0,16^{aA}$ (5,26)	$8,04 \pm 0,08^{aA}$ (3,59)
	200	$7,47 \pm 0,02^{cA}$ (3,97)	$7,20 \pm 0,03^{aA}$ (3,70)	$7,69 \pm 0,04^{aA}$ (3,43)	$7,69 \pm 0,04^{aA}$ (5,39)	$8,13 \pm 0,01^{aB}$ (3,83)
	400	$7,39 \pm 0,04^{cA}$ (5,39)	$7,48 \pm 0,04^{aA}$ (5,48)	$7,73 \pm 0,12^{aA}$ (3,69)	$7,25 \pm 0,12^{aA}$ (4,77)	$8,16 \pm 0,02^{aB}$ (4,09)
	800	$7,41 \pm 0,07^{cA}$ (5,41)	$7,36 \pm 0,04^{aA}$ (4,04)	$7,67 \pm 0,12^{aA}$ (3,96)	$7,67 \pm 0,12^{aA}$ (5,22)	$8,32 \pm 0,007^{bB}$ (4,11)

1- Média do log de unidades formadoras de colônia por mililitro e seu desvio padrão; 2- Diferença entre log de unidades formadoras de colônia do inóculo final e inicial; (-) – experimento não realizado

MRSc – meio de cultura convencional; MRSm – meio de cultura modificado; LB – caldo Luria-Bertani; FOS - frutooligossacarídeo;

Letras minúsculas indicam semelhanças ou diferença estatistica em uma mesma coluna. Letras maiúsculas indicam semelhança ou diferença estatistica em uma mesma linha.

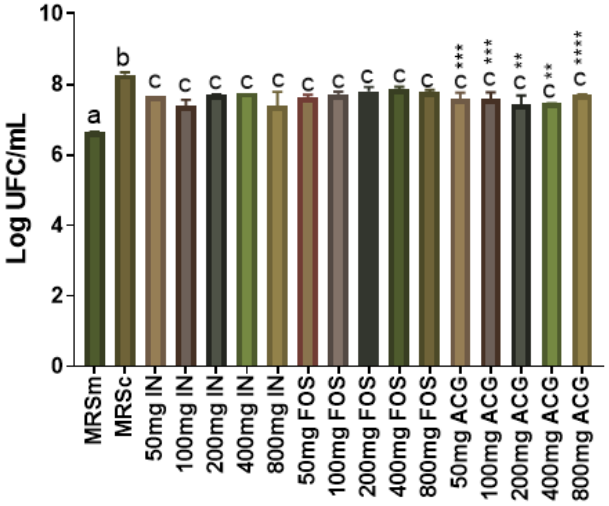


Figura 12. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 cultivado em meio MRSm com ácidos clorogênicos como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; ACG – ácidos clorogênicos; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** e **** $p < 0,0005$.

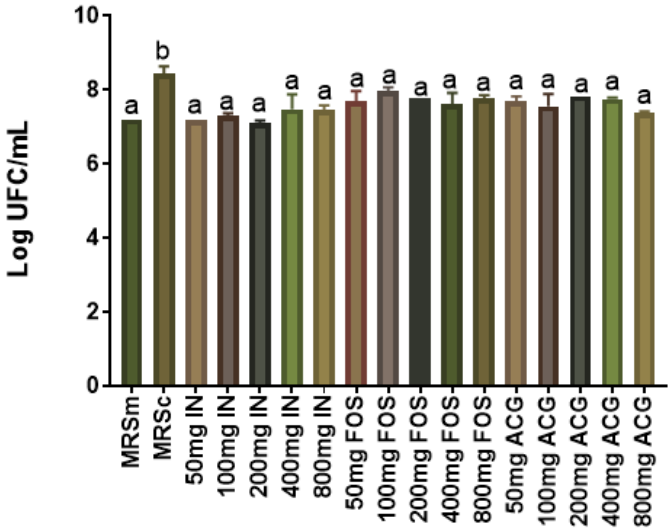


Figura 13. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 cultivado em meio MRSm com ácidos clorogênicos como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; ACG – ácidos clorogênicos; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo.

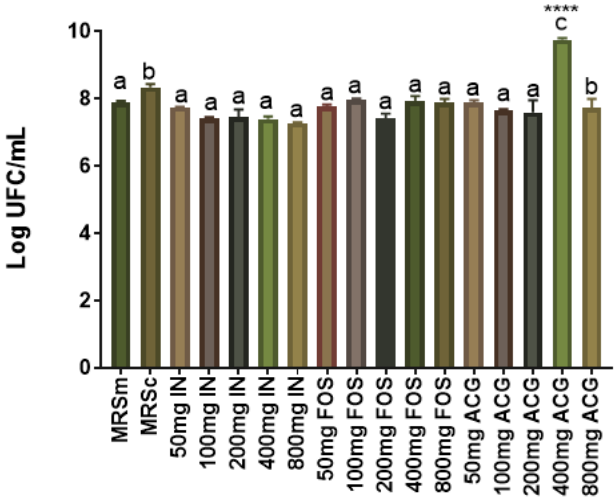


Figura 14. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* DN-173010 cultivada em meio MRSm com ácidos clorogênicos como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; ACG – ácidos clorogênicos; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** e **** $p < 0,0005$.

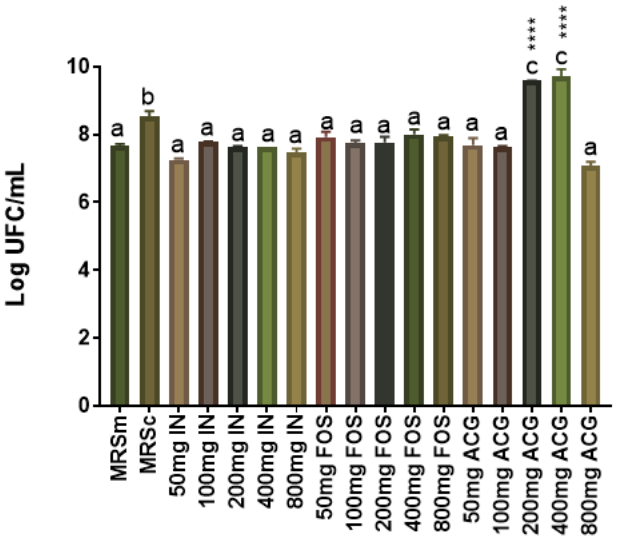


Figura 15. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12 cultivada em meio MRSm com ácidos clorogênicos como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; ACG – ácidos clorogênicos; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo; * p < 0,05; ** p < 0,005; *** e **** p < 0,0005.

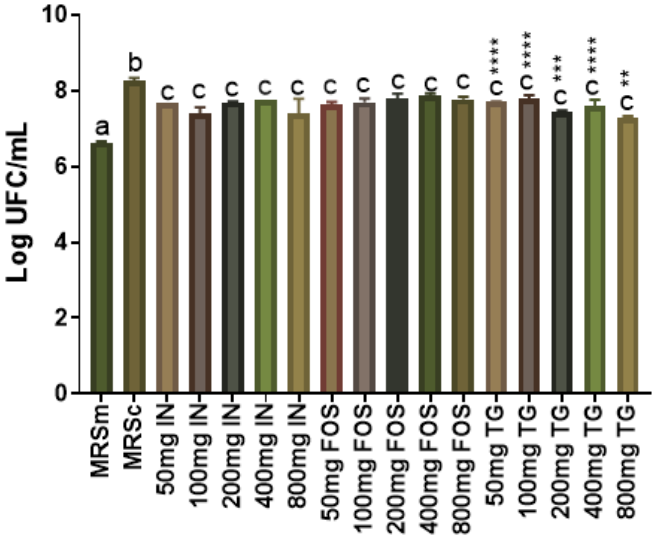


Figura 16. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 cultivado em meio MRSm com trigonelina como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; TG – trigonelina; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo; * p < 0,05; ** p < 0,005; *** e **** p < 0,0005.

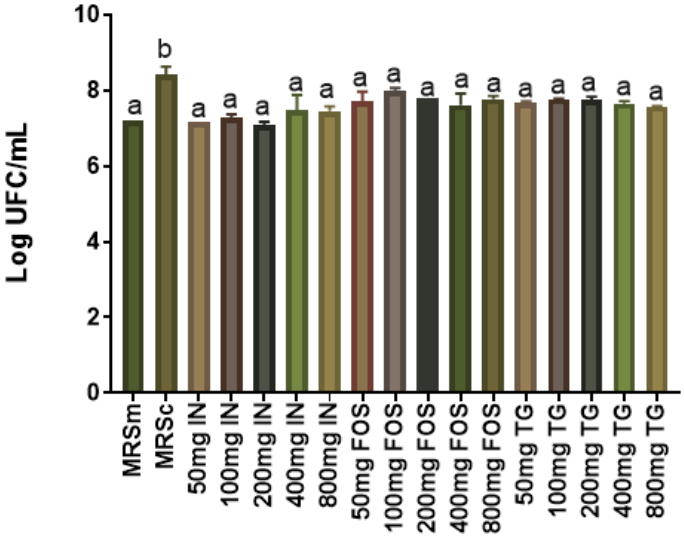


Figura 17. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 cultivado em meio MRSm com trigonelina como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; TG – trigonelina; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo.

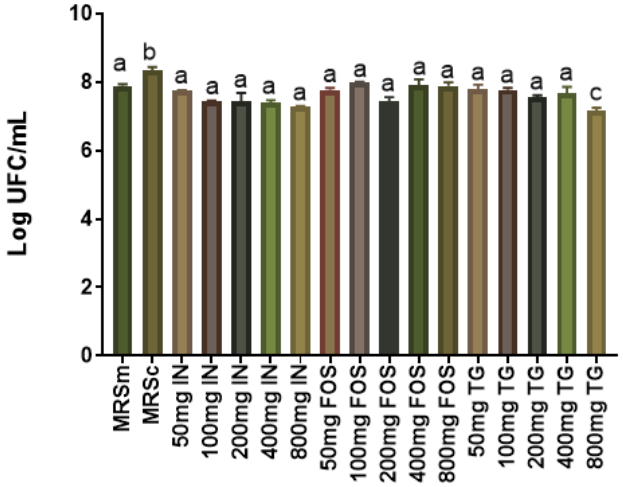


Figura 18. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* DN-173010 cultivada em meio MRSm com trigonelina como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; TG – trigonelina; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** e **** $p < 0,0005$.

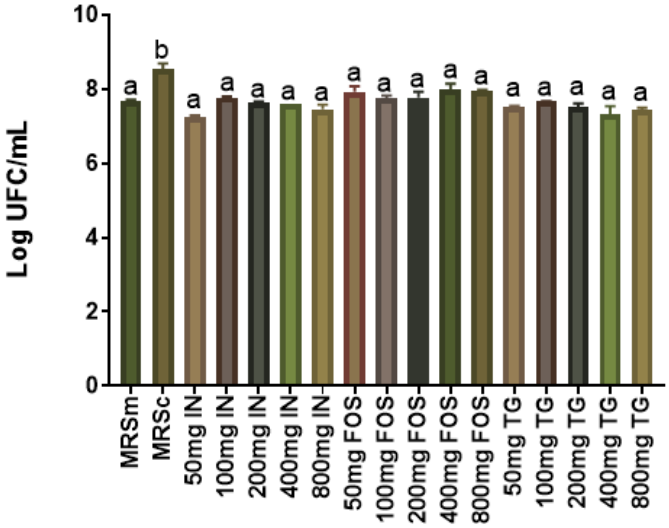


Figura 19. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12 cultivada em meio MRSm com trigonelina como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; TG – trigonelina; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo.

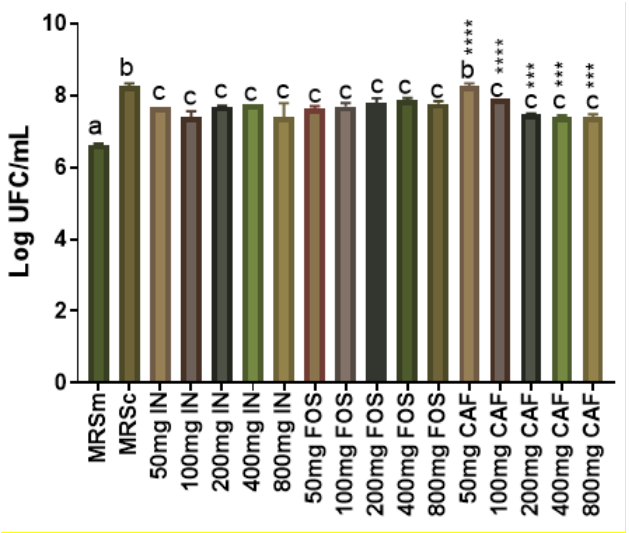


Figura 20. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 cultivado em meio MRSm com cafeína como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; CAF – cafeína; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** e **** $p < 0,0005$.

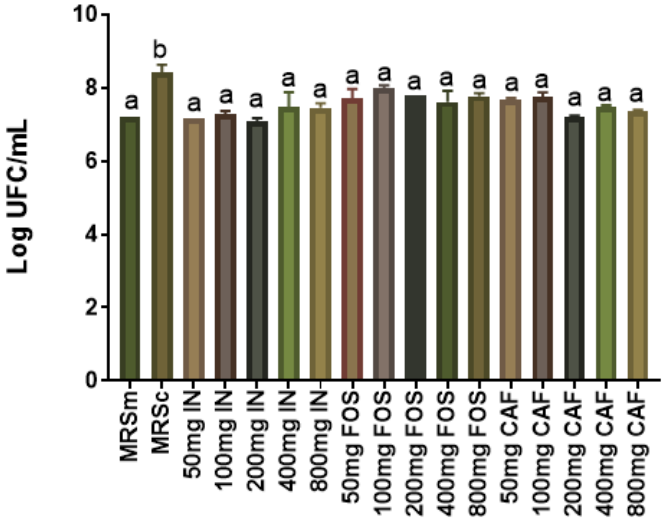


Figura 21. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 cultivado em meio MRSm com cafeína como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; CAF – cafeína; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo.

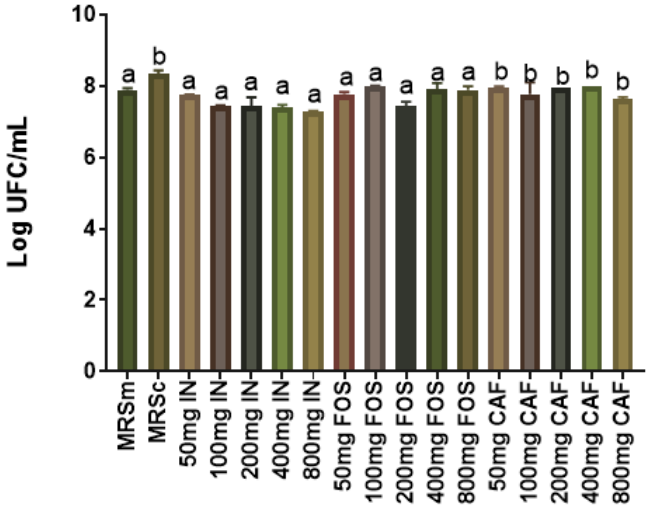


Figura 22. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* DN-173010 cultivada em meio MRSm com cafeína como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; CAF – cafeína; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo.

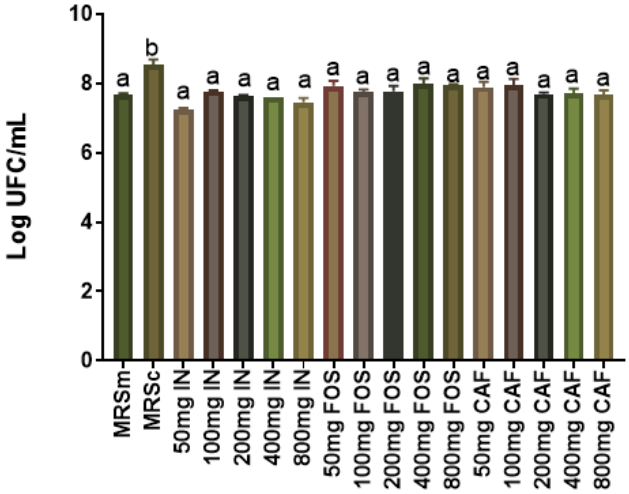


Figura 23. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12 cultivada em meio MRSm com cafeína como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; CAF – cafeína; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo.

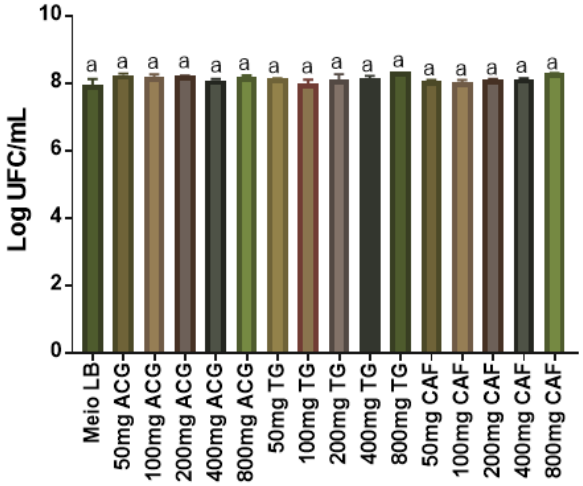


Figura 24. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Escherichia coli* ATCC 25922 cultivada em meio LB com ácidos clorogênicos, trigonelina e cafeína. Nota: Meio LB – meio de cultura Luria-Bertani; ACG – ácidos clorogênicos; TG – trigonelina; CAF – cafeína.

Todos os compostos bioativos não estimularam o crescimento dos microoganismos testados, em relação ao meio MRSc. Por outro lado, todos os compostos bioativos estimularam a multiplicação de GG, com aumento em relação ao MRSm puro, sem os compostos, em média, de 1,13 log UFC/mL para os ácidos clorogênicos, 0,93 log UFC/mL para trigonelina e 1,03 log UFC/mL para cafeína, mas sem diferenças para inulina e FOS.

Para a multiplicação na presença de cafeína, destaca-se a concentração de 50 mg/mL, na qual ocorreu o maior aumento em relação a todos os compostos, sendo 1,64 log UFC/mL a mais em relação ao MRSm (p = 0,0004), e em média 0,69 e 0,52 log UFC/mL a mais que inulina e FOS, respectivamente. Todas as concentrações dos compostos testados não ocasionaram diferença na multiplicação de LA em, em comparação com MRSc, MRSm, inulina e FOS.

Para BA, em relação ao MRSm, não houve diferença na multiplicação desses microorganismos na presença de trigonelina e cafeína. Porém um aumento significativo em relação à inulina, FOS, MRSm e MRSc foi observado na presença de 400mg de ácido clorogênico ($p < 0,0001$), cujo aumento foi de 2,29; 1,96, 1,87; e 1,41 log UFC/mL, respectivamente.

Entre os compostos incubados com BB12, a maior multiplicação foi observada com 200 e 400mg de ácido clorogênico, cujo aumento em relação ao MRSm ($p < 0,0001$) foi de 1,91 e 2,05 log UFC/mL, respectivamente, enquanto que em comparação com MRSc ($p < 0,0001$), o aumento foi de 1,04 e 1,18 log UFC/mL, respectivamente. O aumento quando comparado com inulina e FOS ($p< 0,0001$) foi de 2,03 e 2,05 log UFC/mL, respectivamente. Não houve diferenças para trigonelina e cafeína quando comparados com MRSm, inulina e FOS.

Para a estirpe *E. coli*, um aumento na taxa de multiplicação foi detectado quando esta foi cultivada na presença de 800mg de trigonelina (p = 0,0044) e 800mg de cafeína (p = 0,0135), quando comparado com o meio LB, meio de cultura adequado para a multiplicação deste microrganismo.

7.4. Avaliação do potencial prebiótico de polissacarídeos presentes na bebida de café

Os resultados relativos à avaliação dos efeitos de galactomanana e arabinogalactana presentes em extratos de café na multiplicação das bactérias probióticas e *Escherichia coli* estão apresentados na tabela 7. As médias das contagens em placa após 48 horas estão apresentadas nas figuras 26 a 35. As curvas de multiplicação dos microrganismos probióticos nos tempos 0, 24 e 48 horas estão nos anexos 9 e 10, e de *Escherichia coli* no anexo 12.

Tabela 7. Multiplicação de bactérias lácticas probióticas e *Escherichia coli*, após 48 horas de incubação, em meio de cultivo contendo galactomanana e arabinogalactana tipo 2. Resultados expressos em log UFC/mL

Tratamento	**Concentração (mg/mL)**	**Microrganismos** **Concentração de células após 48 horas - Log UFC/mL[1]** **(Δ log$_{10}$)[2]**				
		Lactobacillus rhamnosus GG 53103	*Lactobacillus acidophilus* LA-5	*Bifidobacterium animalis* 173010	*Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12	*Escherichia coli* 25922
MRSm sem extrato de café		$6,63 \pm 0,02^{aA}$ (3,13)	$7,20 \pm 0,06^{aB}$ (4,42)	$7,88 \pm 0,04^{aB}$ (5,40)	$7,66 \pm 0,04^{aB}$ (4,16)	-
Meio de cultura convencional (MRSc para probióticos e LB para *E. coli*)		$8,27 \pm 0,06^{bA}$ (5,02)	$8,43 \pm 0,19^{bA}$ (4,07)	$8,34 \pm 0,09^{bA}$ (4,80)	$8,53 \pm 0,15^{bA}$ (4,67)	$7,97 \pm 0,18^{aB}$ (3,72)
Inulina	50	$7,66 \pm 0,00^{cA}$ (4,16)	$7,18 \pm 0,00^{aA}$ (5,88)	$7,76 \pm 0,01^{aA}$ (5,76)	$7,25 \pm 0,03^{aA}$ (5,25)	-
	100	$7,39 \pm 0,16^{cA}$ (6,09)	$7,28 \pm 0,07^{aA}$ (5,06)	$7,43 \pm 0,03^{aA}$ (5,43)	$7,75 \pm 0,02^{aA}$ (5,27)	-
	200	$7,69 \pm 0,03^{cA}$ (4,19)	$7,09 \pm 0,07^{aA}$ (5,39)	$7,44 \pm 0,23^{aA}$ (3,94)	$7,62 \pm 0,03^{aA}$ (4,12)	-
	400	$7,76 \pm 0,00^{cA}$ (4,26)	$7,48 \pm 0,39^{aA}$ (5,18)	$7,39 \pm 0,07^{aA}$ (3,89)	$7,61 \pm 0,00^{aA}$ (4,11)	-
	800	$7,39 \pm 0,39^{cA}$ (5,09)	$7,45 \pm 0,12^{aA}$ (4,09)	$7,27 \pm 0,02^{aA}$ (3,80)	$7,45 \pm 0,12^{aA}$ (4,09)	-
FOS	50	$7,63 \pm 0,07^{cA}$ (5,63)	$7,70 \pm 0,26^{cA}$ (5,31)	$7,76 \pm 0,06^{bA}$ (5,31)	$7,92 \pm 0,15^{aA}$ (5,53)	-
	100	$7,69 \pm 0,09^{cA}$ (5,69)	$7,98 \pm 0,08^{cA}$ (4,48)	$7,97 \pm 0,03^{bA}$ (5,58)	$7,74 \pm 0,07^{aA}$ (5,74)	-
	200	$7,81 \pm 0,12^{cA}$ (4,31)	$7,78 \pm 0,00^{cA}$ (5,78)	$7,43 \pm 0,12^{aA}$ (5,28)	$7,76 \pm 0,16^{aA}$ (5,76)	-
	400	$7,87 \pm 0,06^{cA}$ (4,37)	$7,61 \pm 0,30^{cA}$ (5,61)	$7,92 \pm 0,16^{bA}$ (5,33)	$7,99 \pm 0,14^{aA}$ (5,69)	-
	800	$7,77 \pm 0,07^{cA}$ (4,27)	$7,77 \pm 0,08^{cA}$ (5,77)	$7,88 \pm 0,10^{bA}$ (5,28)	$7,94 \pm 0,03^{aA}$ (5,64)	-

Tabela 7. continuação

Tratamento	Concentração (mg/mL)	Microrganismos Concentração de células após 48 horas - Log UFC/mL[1] (Δ log_{10})[2]				
		Lactobacillus rhamnosus GG 53103	*Lactobacillus acidophilus* LA-5	*Bifidobacterium animalis* 173010	*Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12	*Escherichia coli* 25922
Galactomanana	50	$7,71 \pm 0,11^{cA}$ (4,63)	$7,74 \pm 0,02^{aA}$ (3,71)	$8,32 \pm 0,04^{bB}$ (4,58)	$7,76 \pm 0,21^{aA}$ (3,90)	$8,08 \pm 0,04^{aC}$ (3,91)
	100	$7,73 \pm 0,01^{cA}$ (4,67)	$7,95 \pm 0,09^{aA}$ (4,13)	$8,12 \pm 0,09^{bA}$ (4,39)	$7,75 \pm 0,09^{aA}$ (3,87)	$8,09 \pm 0,08^{aA}$ (3,89)
	200	$7,55 \pm 0,15^{cA}$ (4,40)	$7,38 \pm 0,03^{aA}$ (3,44)	$8,32 \pm 0,08^{bB}$ (4,66)	$8,15 \pm 0,07^{bB}$ (4,18)	$8,29 \pm 0,11^{aB}$ (4,05)
	400	$7,83 \pm 0,07^{cA}$ (4,64)	$7,38 \pm 0,49^{aA}$ (3,33)	$7,71 \pm 0,50^{aA}$ (4,05)	$8,12 \pm 0,16^{bB}$ (4,24)	$8,23 \pm 0,04^{aB}$ (3,95)
	800	$7,69 \pm 0,09^{cA}$ (4,59)	$7,43 \pm 0,03^{aA}$ (3,38)	$8,36 \pm 0,12^{bB}$ (4,73)	$8,51 \pm 0,13^{bB}$ (4,52)	$8,39 \pm 0,06^{bB}$ (3,99)
Arabinogalactana tipo 2	50	$7,57 \pm 0,43^{cA}$ (4,43)	$7,77 \pm 0,09^{aA}$ (3,79)	$8,49 \pm 0,12^{bB}$ (4,86)	$8,41 \pm 0,02^{bB}$ (4,48)	$8,41 \pm 0,02^{aB}$ (3,89)
	100	$7,90 \pm 0,25^{cA}$ (4,92)	$8,57 \pm 0,20^{bB}$ (4,60)	$7,95 \pm 0,14^{aA}$ (4,35)	$8,39 \pm 0,09^{bB}$ (4,41)	$8,39 \pm 0,09^{aB}$ (4,17)
	200	$7,94 \pm 0,02^{cA}$ (4,76)	$7,54 \pm 0,03^{aA}$ (3,87)	$7,67 \pm 0,18^{aA}$ (4,15)	$8,47 \pm 0,11^{bB}$ (4,57)	$8,47 \pm 0,11^{aB}$ (3,98)
	400	$7,89 \pm 0,07^{cA}$ (4,78)	$7,63 \pm 0,01^{aA}$ (3,66)	$8,04 \pm 0,08^{aA}$ (4,62)	$8,45 \pm 0,00^{bB}$ (4,53)	$8,45 \pm 0,00^{aB}$ (3,98)
	800	$7,71 \pm 0,09^{cA}$ (4,66)	$7,57 \pm 0,01^{aA}$ (4,15)	$7,82 \pm 0,28^{aA}$ (4,20)	$8,38 \pm 0,01^{bB}$ (4,43)	$8,38 \pm 0,01^{aB}$ (4,10)

1- Média do log de unidades formadoras de colônia por mililitro e seu desvio padrão; 2- Diferença entre log de unidades formadoras de colônia do inóculo final e inicial; (-) – experimento não realizado;

MRSc – meio de cultura convencional; MRSm – meio de cultura modificado; LB – caldo Luria-Bertani; FOS - frutooligossacarídeo;

Letras minúsculas indicam semelhanças ou diferença estatistica em uma mesma coluna. Letras maiúsculas indicam semelhança ou diferença estatistica em uma mesma linha.

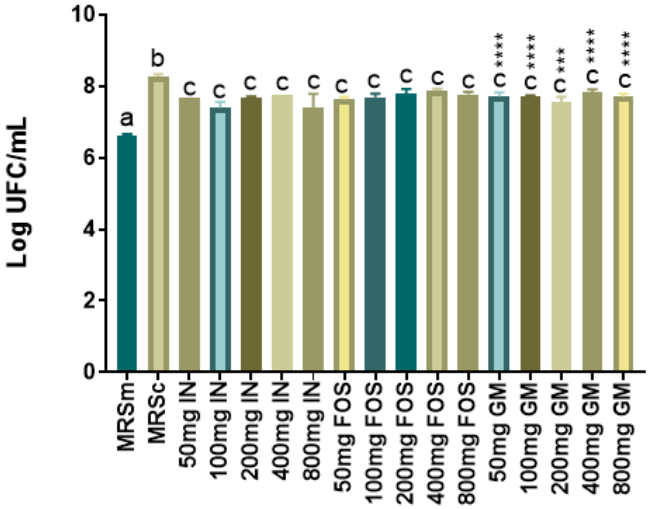


Figura 25. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 cultivado em meio MRSm com galactomanana como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; GM – galactomanana; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** e **** $p < 0,0005$.

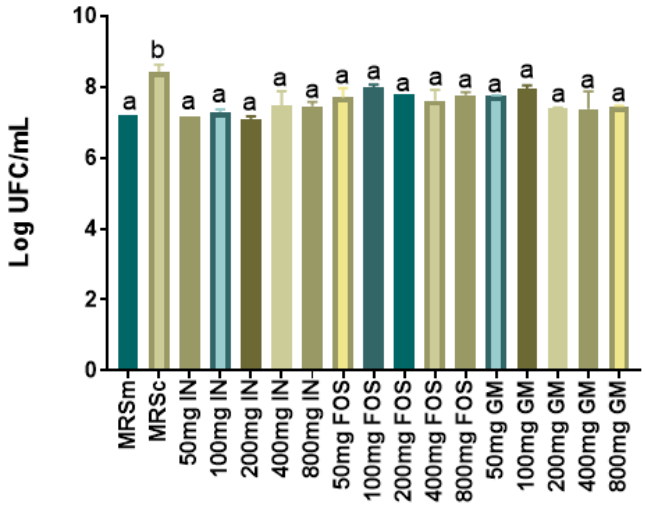


Figura 26. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 cultivado em meio MRSm com galactomanana como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; GM – galactomanana; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo.

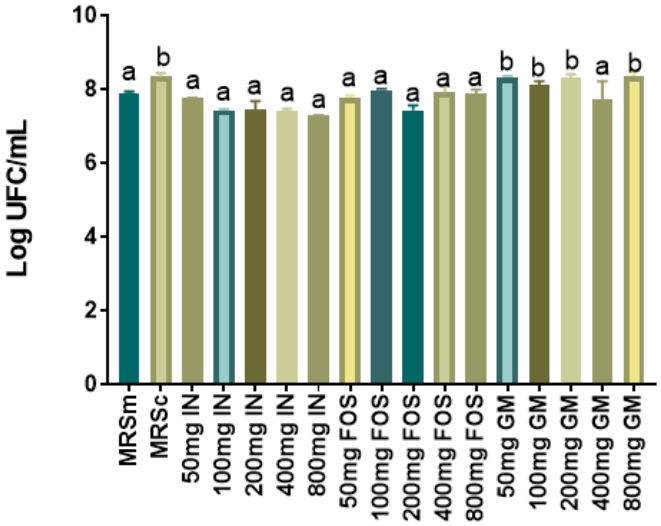


Figura 27. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* DN-173010 cultivada em meio MRSm com galactomanana como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; GM – galactomanana; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo.

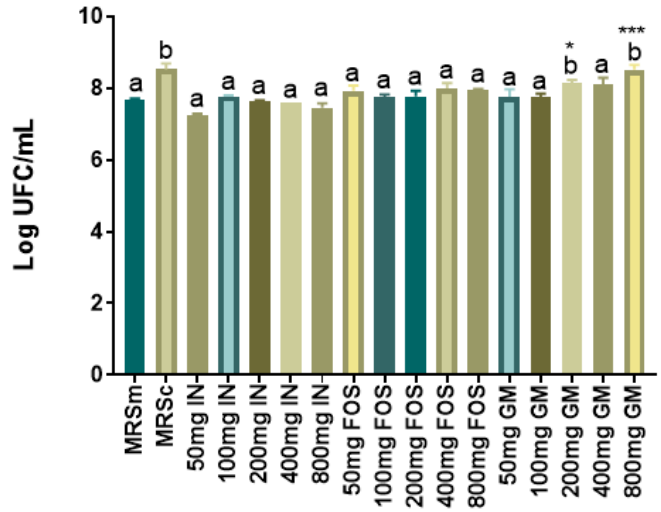


Figura 28. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12 cultivada em meio MRSm com galactomanana como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; GM – galactomanana; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** e **** $p < 0,0005$.

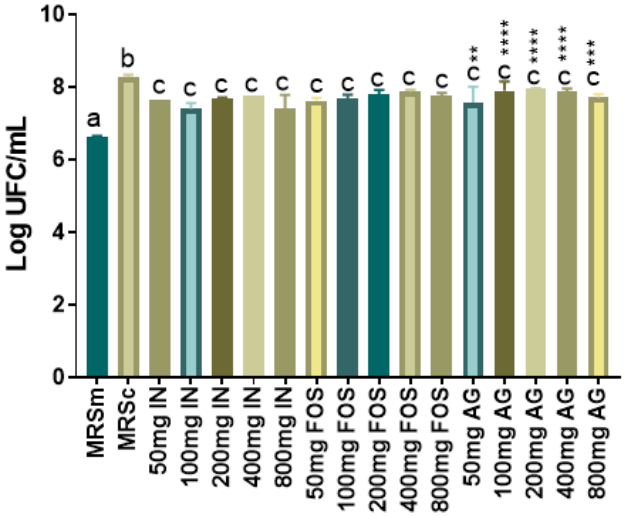


Figura 29. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 cultivado em meio MRSm com arabinogalactana tipo 2 como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; AG – arabinogalactana tipo 2, IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo; * p < 0,05; ** p < 0,005; *** e **** p < 0,0005.

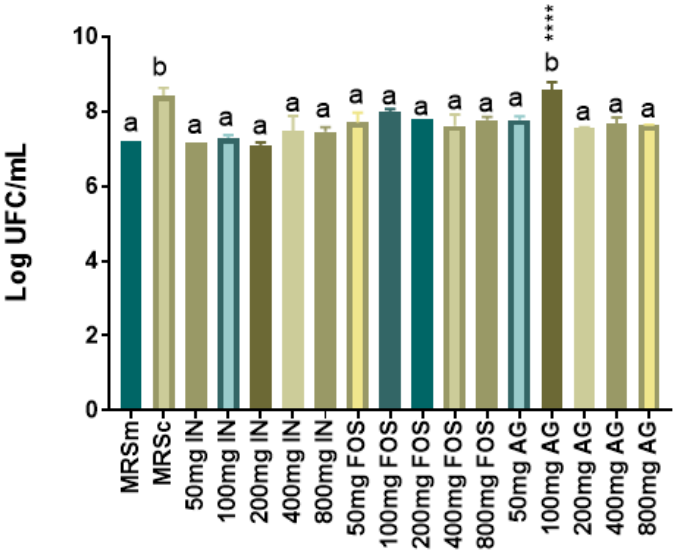


Figura 30. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 cultivado em meio MRSm com arabinogalactana tipo 2 como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; AG – arabinogalactana tipo 2, IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo; * p < 0,05; ** p < 0,005; *** e **** p < 0,0005.

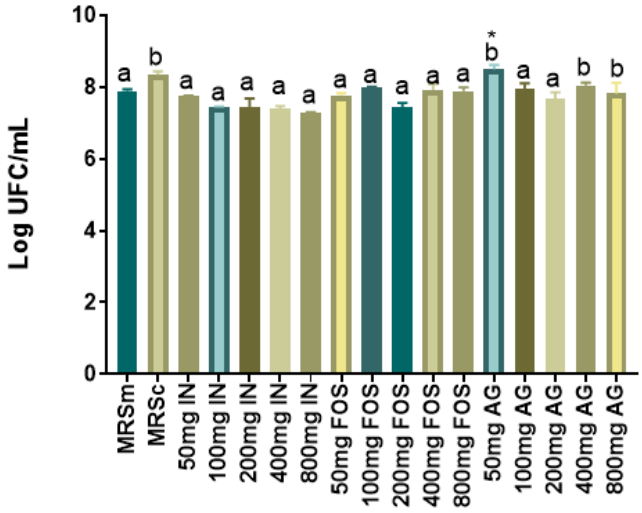


Figura 31. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* DN-173010 cultivado em meio MRSm com arabinogalactana tipo 2 como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; AG – arabinogalactana tipo 2, IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo; * p < 0,05; ** p < 0,005; *** e **** p < 0,0005.

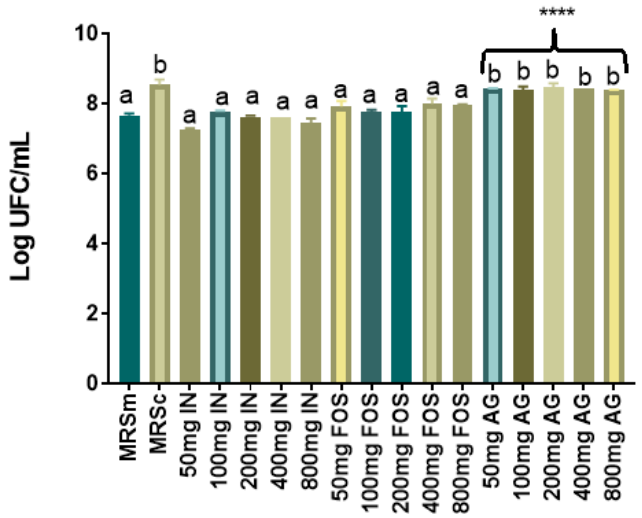


Figura 32. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12 cultivado em meio MRSm com arabinogalactana tipo 2 como principal fonte de carbono, inulina e frutooligossacarídeo. Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; AG – arabinogalactana tipo 2, IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo; * p < 0,05; ** p < 0,005; *** e **** p < 0,0005.

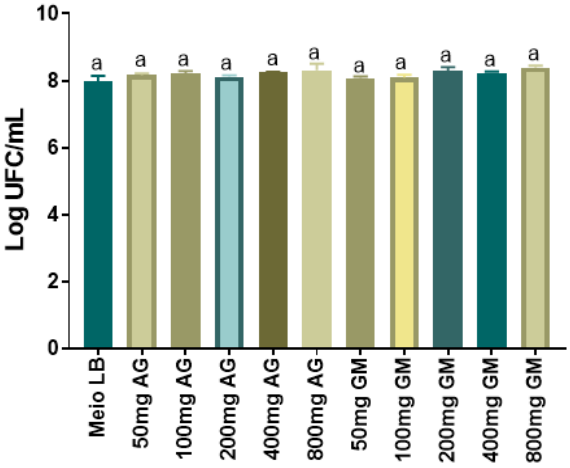


Figura 33. Média de unidades formadoras de colônias, após 48 horas, de *Escherichia coli* ATCC 25922cultivado em meio MRSm com arabinogalactana tipo 2e galactomanana como principal fonte de carbono. Nota: Meio LB – meio de cultura Luria-Bertani; AG – arabinogalactana tipo 2; GM – galactomanana.

Para GG, não houve diferenças em relação à inulina e FOS. Os polissacarídeos presentes em extratos de café testados promoveram a multiplicação de GG quando comparados com o MRSm, sem a adição dos polissacarídeos ($p < 0,0001$), com aumento de 1,07 log UFC/mL para galactomanana e 1,17 log UFC/mL para arabinogalactana. A multiplicação de LA também aumentou na presença dos polissacarídeos, com destaque para a concentração de 100mg de arabinogalactana, quando comparado com inulina e FOS (1,28 e 0,81 log UFC/mL, respectivamente) e MRSm ($p < 0,0001$), cujo aumento foi de 1,37 log UFC/mL.

Em relação a BA, quando comparado com inulina e FOS, o aumento médio na multiplicação na presença de galactomanana foi de 0,72 e 0,38 log UFC/mL, respectivamente. Para arabinogalactana, o aumento foi, em média, 0,54 log UFC/mL e 0,20 log UFC/mL, quando comparado à inulina e FOS, respectivamente. Não houve diferenças significativas na sua multiplicação na presença de galactomanana e arabinogalactana quando comparado com MRSm, destacando pequenas diferenças na sua multiplicação, sendo 0,44 log UFC/mL para 50 e 200mg de galactomanana, 0,24 log UFC/mL para 800mg de galactomanana, e 0,16 log UFC/mL em 400mg de arabinogalactana.

A maior multiplicação de BB12 foi observada em 200, 400 e 800mg de galactomanana, que em comparação com MRSm, o aumento foi de 0,49; 0,46; e 0,85 log UFC/mL, respectivamente. Em relação à inulina e FOS, o aumento em média para cada

concentração foi de 0,61; 0,58 e 0,97 log UFC/mL para inulina e 0,28; 0,25 e 0,64 log UFC/mL para FOS. Todas as concentrações de arabinogalactana estimularam sua multiplicação, sendo o aumento de 0,76 log UFC/mL quando comparado com MRSm ($p < 0,0001$) e 0,88 e 0,55 log UFC/mL em relação a inulina e FOS.

Para *E.coli* na presença dos polissacarídeos, houve aumento significativo na presença de 800mg de galactomanana ($p = 0,0291$), quando comparado com o meio LB.

8. DISCUSSÃO

Até o momento, este foi o primeiro trabalho que avaliou sistematicamente o efeito benéfico de extratos de café integral e descafeinado em diferentes graus de torrefação e seus principais compostos bioativos, em condições fisiológicas, na multiplicação de microrganismos probióticos.

Uma vez que os estudos realizados com a bebida de café não quantificaram os teores de compostos bioativos e utilizaram amostras comerciais, torna-se difícil estabelecer comparações sobre as quantidades administradas em cada extrato. Por este motivo, as comparações foram baseadas em cálculos e estimativasa partir das informações contidas nos estudos.

Para os extratos de café integrais, os valores obtidos de ácidos clorogênicos nas concentrações de 5mg e 10mg/mL estão de acordo com as quantidades fornecidas por Mills *et al.* (2015) nas torras média e escura, sendo o valor 22,6 mg/mL. Os mesmos autores utilizaram uma amostra rica em café verde, cujo valor de ácidos clorogênicos foi de 53,9mg/mL, equivalente ao valor obtido para as concentrações de 15mg/mL nos dois graus de torrefação utilizados. Em relação à cafeína, a quantidade que estes autores administraram foi o equivalente a obtida para a concentração de 15mg/mL dos extratos de café integrais para ambas as torras, sendo o valor de 35,3mg/mL. Jaquet *et al.* (2009) utilizaram uma amostra de café solúvel contendo grãos de café verdes e torrados na concentração de 12mg/mL, porém não forneceu os valores de compostos bioativos presentes na amostra. Assumiu-se que as quantidades são comparáveis com Mills *et al.* (2015), os quais ofereceram a mesma quantidade de café solúvel a voluntários. Cowan *et al.* (2015) administraram para ratos a quantidade de 20mg/mL de café solúvel, com possibilidade dos teores de compostos bioativos deste extrato serem equivalentes aos encontrados para 15mg/mL. Não há estudos sobre o

efeito de café descafeinado sobre a multiplicação de bactérias presentes na microbiota intestinal ou probióticas.

O conteúdo de ácido clorogênico no café solúvel depende das espécies e variedades utilizadas na formulação de "*blends*" e condições de processamento. Em cafés solúveis comerciais, o teor total de ácido clorogênicos pode variar, principalmente devido ao *blend* e ao processo de torrefação. Entretanto, possuem quantidades significativas deste composto devido sua solubilidade em água quente (Trugo e Macrae, 1984; Rostagno *et al.*, 2014). Além disso, devido aos "*blends*", sabe-se que no grão de café robusta o teor de ácidos clorogênicos pode exceder em cerca de 70% o teor no café arábica (Farah, 2012; Farah, 2017), o que pode justificar valores altos em alguns estudos com café solúvel comercial de alguns países devido à possível presença das duas espécies na sua elaboração, com maior percentual de café robusta. As concentrações de cafeína obtidas nas amostras de café arábica integral solúvel utilizadas não tiveram grandes variações entre os graus de torrefação, o que confirma o fato da cafeína ser um composto estável ao calor (Farah, 2012).

Nenhum estudo que utilizou a bebida de café para avaliação do potencial prebiótico forneceu dados sobre a quantidade de trigonelina das amostras. Seus valores estão relacionados com a diversidade dos processos empregados para a torrefação e método analítico empregado (Marcucci *et al.*, 2013). Além disso, nos extratos de café descafeinado no Brasil, o método de extração de cafeína é principalmente por diclorometano, ocorrendo perdas de outros compostos solúveis neste solvente ou dos açúcares na água delavagem por lixiviação, ocasionando aumento relativo nos teores de trigonelina (Toci *et al.*, 2006, Farah *et al.*, 2006). Além disso, quanto maior o grau de torrefação, maior será sua degradação, aumentando a concentrações de produtos de degradação, como o N-metilpiridinium, ácido nicotínico, e compostos voláteis (Wei e Tanokura, 2015).

Para efeito de discussão, foi estimado um valor para os polissacarídeos solúveis nos extratos de café utilizados. Segundo Gnitchwitz *et al.* (2007), o teor destes componentes em café solúvel é de 27,6mg/mL, enquanto Mills *et al*. (2015) encontraram valores de 33,3 a 66,6mg/mL de fibras totais. Díaz-Rúbio e Saura-Calixto (2000) encontraram 75mg/mL de fibras solúveis. Considerando que o preparo da bebida nos estudos citados foi com 18mg/mL, 12mg/mL e 20mg/mL respectivamente, de café solúvel, este valor pode se assemelhar ao teor dos extratos de café na concentração de 15mg/mL. Diferenças nos valores encontrados podem ser atribuídas aos diferentes métodos analíticos utilizados. É importante ressaltar que para a

produção de café solúvel, o pó de café torrado passa por um tratamento com água quente a 175 ºC ou vapor, em condições pressurizadas (Ballesteros *et al.*, 2014; Mussato, 2014). Além disso, sua produção gera como subproduto a borra de café, a qual pode reter parcialmente alguns compostos bioativos e consequentemente suas propriedades relacionadas à saúde (Ballesteros *et al.*, 2014; Monente *et al.*, 2015). Por este motivo, estudos já foram conduzidos com o intuito de avaliar o potencial prebiótico deste subproduto (Asano *et al.*, 2004a; Asano *et al.*, 2004b; Umemura *et al.*, 2004a; Umemura *et al.*, 2004b; Jímenez-Zamora *et al.*, 2014).

Ainda que o meio MRS represente o padrão para o cultivo de bactérias lácticas, sua modificação pela remoção dos principais compostos responsáveis pelo fornecimento de energia aos micrornismos ainda resultou em uma multiplicação expressiva dos microrganismos neste meio (MRSm), quando comparados com o meio MRSc. Resultados semelhantes foram obtidos por Watson *et al.*, (2012); Rodríguez-Costa *et al.* (2017); Valdés-Varela *et al.* (2017). Estes resultados podem estar associados a reservas nutricionais nas células cultivadas, bem como à presença de fontes de energia como contaminantes nos componentes do meio de cultura formulado. A presença do extrato de levedura na composição do meio de cultura formulado também pode justificar a alta multiplicação, pois sua composição é uma mistura de aminoácidos, peptídeos, vitaminas e carboidratos, variando de acordo com o fabricante (Sørensen e Sondergaard, 2014). Além disso, a peptona proveniente da caseína, que foi utilizada neste trabalho, pode favorecer a multiplicação bacteriana e isto também depende do fabricante, já que o processo de purificação inadequado não remove substâncias antimicrobianas em sua totalidade (Gray *et al.*, 2008).

Apesar da restrição nutricional do MRSm, este meio quando adicionado dos extratos de café e seuscompostos demonstraram capacidade de estimular a multiplicação dos probióticos testados. Esta estratégia para investigar o efeito potencialmente prebiótico de compostos foi utilizada por Su *et al.* (2007); Grimoud *et al.* (2010); Hernandez-Hernandez *et al.* (2012); Sims *et al.* (2014) e McLaughlin *et al.* (2015) que adicionaram diferentes polissacarídeos ao MRS. Estes autores também modificaram a formula do meio removendo fontes de carbono e verificaram que os compostos incorporados ao meio estimulavam a multiplicação de lactobacilos e bifidobactérias.

Embora a inulina e o FOS sejam substâncias amplamente reconhecidas como prebióticos, neste estudo elas mostraram capacidade de estímulo da multiplicação dos compostos das estirpes probióticas testadas, porém não na mesma eficiência que os extratos

de café integrais edeterminadas concentrações dos compostos bioativos. Destacaram-se o ácido clorogênico, a galactomanana e arabinogalactana na multiplicação com as estirpes BA e BB12. Este resultado confirma aqueles obtidos por Scott *et al.* (2013), que também utilizaram inulina de raíz de dália em seu estudo, e não encontraram aumento na multiplicação de estirpes de *Bifidobacterium* devido à longa cadeia desta inulina, que possui grau de polimerização de 25. Outro fator que pode explicar o baixo estímulo da inulina na multiplicação dos probióticos estudados pode estar relacionado à quantidade de inulina e FOS administrada, pois efeitos benéficos na atividade metabólica, comunidade microbiana e efeitos bifidogênicosforam observados em concentrações de 2 a 10g/dia em estudos *in vivo* e *in vitro* (Rao, 2001; Van de Wiele *et al.*, 2006; Kelly, 2008). Ressalta-se que as quantidades administradas dos compostos prebióticos estavam na mesma concentração dos compostos bioativos do café, os quais foram utilizados em concentrações fisiológicas. Também deve-se levar em consideração que a utilização destes prebióticos pode variar entre estirpes da mesma espécie. Em estudo realizado por Valdés-Varela *et al.* (2017), que utilizaram seis estirpes de *Bifidobacterium*, incluindo *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12, nenhuma das estirpes testadas utilizou a inulina para sua multiplicação, mas todas utilizaram bem o FOS. Estes resultados mostram que nem todas as espécies de bifidobactérias podem ser beneficiadas com a presença destes compostos como fonte de energia no cólon (Falony *et al.*, 2009).

McLaughlin *et al.* (2015) observaram que a maioria das espécies de *Lactobacillus* analisadas utilizavam FOS como substrato. Sabe-se que a utilização de FOS por estirpes *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* se dá por hidrólise através da enzima β-fructofuranosidase localizada na região intracelular destas bactérias, principalmente para catabolismo de FOS com baixo grau de polimerização. (Goh e Klaenhammer, 2014).

Uma vez que os estudos relacionados aos efeitos bioativos do café não consideraram as concentrações disponíveis dos diferentes compostos, torna-se difícil a comparação dos resultados.Neste estudo, independente da concentração, grau de torrefação empregado e presença ou ausência de cafeína, houve o estímulo da multiplicação das bactérias probióticas. Isto indica que, ainda que alguns compostos do café sejam considerados por alguns autores como antimicrobianos quando utilizados em 0,5 a 5mg/mL, a bebida como um todo revelou capacidade de estimular a multiplicação de bactérias probióticas, mas não *E. coli*, o que sugere um potencial prebiótico. Como exemplo, o café integral estimulou a multiplicação das

bactérias probioticas em torno de 5 vezes mais que o café descafeinado. Sabe-se que no processo de descafeinação pode ocorrer perdas variadas de até 40% de ácidos clorogênicos dos grãos de café verdes, principalmente de ácido 5-cafeoilquínico, o mais abundante no grão de café (Farah, 2006; Toci *et al*., 2006; Farah, 2012; Rostagno *et al.*, 2014), bem como perdas significativas de polissacarídeos e açúcares simples (Farah, 2012).

Os polissacarídeos do café podem ser considerados fibras solúveis, não sendo depolimerizadas pelas enzimas intestinais (Petkowicz, 2014). Considerando a bebida de café como um todo, o polissacarídeo mais abundante é a galactomanana (68-70%), (Diáz-Rubio e Saura-Calixto, 2007) e quatro xícaras de café fornecem 2g de fibras solúveis (Gniechwitz *et al*. 2007). Quando foi testado o efeito destas fibras solúveis, isoladamente, em amostras de fezes humanas (Gniechwitz *et al.*, 2007), foi identificado que a microbiota colônica de diferentes sujeitos degradaram as fibras solúveis do café em extensões diferentes, porém de forma similar. A maior utilização foi de galactomanana do que arabinogalactana, tornando possível sua maior utilização e produção de AGCC.Estes autores indicaram também aumento no número de bactérias pertencentes aos gêneros *Bacteroides-Prevotella*, os quais são os principais gêneros de bactérias que compõe a microbiota intestinal (Donaldson *et al*., 2015; Gupta *et al*., 2017), porém, não foram observados efeito bifidogênico e aumento na multiplicação de lactobacilos. Tian *et al.* (2017) sugeriram que oligossacarídeos produtos de manose e galactose provenientes da quebra dos polissacarídeos presentes no grão de café durante a torrefação são também candidatos a compostos prebióticos. Como observado nos testes utilizando os compostos isolados, a presença de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina nos extratos de café também influenciou de forma positiva a multiplicação dos probióticos, indicando que a bebida de café pode modular a microbiota intestinal.

Também é importante ressaltar que no processo de torrefação dos grãos verdes a Reação de Maillard é dominante (Bekedam *et al.*, 2008) e tem como produto final as melanoidinas (Silvan *et al.*, 2010), cujo teor aumenta com o grau de torrefação. Seu teor em uma xícara da bebida pode variar de acordo com o grau de torrefação e método de preparo (Fogliano e Morales, 2011). Pelo fato de polissacarídeos e ácidos clorogênicos estarem presentes nas moléculas de melanoidinas (Nunes *et al.*, 2007; Perrone *et al.*, 2012), é possível sugerir que elas podem também se tornar substratos para a multiplicação de microrganismos presentes na microbiota intestinal por alcançarem o cólon (Coelho *et al*., 2014). A quantidade presente na bebida, como mostrado na tabela 2, pode ser suficiente para exercer efeito

antimicrobianos para determinados microrganismos como *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus mirabilis* ATCC 7002, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, *Escherichia coli* ATCC 35150, *Escherichia coli ATCC* 33475, pois sua concentração mínima inibitória pode variar de 1 a 8mg/100mL (Rufián-Henares e Morales, 2008; Rufián-Henares e de La Cueva, 2009). Portanto, podem agir contra bactérias patogênicas enquanto promovem a multiplicação seletiva de estirpes microbianas menos sensíveis, como as bifidobactérias (Rufián-Henares e Pastoriza, 2014), e os lactobacilos presentes em amostras fecais humanas (Jiménez-Zamora *et al.*, 2014). Contraditoriamente, foi também relatado que as melanoidinas, quando incubadas com material fecal humano, aumentaram somente a multiplicação de bactérias pertencentes ao grupo *Bacteroides-Prevotella*, com alterações mínimas no gênero *Bifidobacterium* (Reichardt *et al.*, 2009). No presente estudo, tanto as estirpes testadas do gênero *Lactobacillus* quanto as do gênero *Bifidobacterium* tiveram sua multiplicação estimulada na presença de café, sem diferenças entre os graus de torrefação. Esta resposta é razoável se consideramos que os polissacarídeos e ácidos clorogênicos estão presentes em maior concentração nas bebidas de cafés elaboradas com grãos de torra clara.

Em relação ao gênero *Lactobacillus*, Jaquet *et al.* (2009) verificaram baixa multiplicação de *Lactobacillus* spp. presentes em amostras fecais humanas após o consumo de café solúvel três vezes ao dia, durante 3 semanas. Mills *et al.* (2015), ao administrarem amostras de cafés comerciais com graus de torrefação distintos para voluntários para análise posterior na microbiota fecal, não encontraram alteração na multiplicação de *Lactobacillus*. É importante ressaltar que no presente estudo as estirpes utilizadas são amplamente utilizadas como probióticas, enquanto que nos estudoscitados foram utilizadas fezes frescas e que os resultados foram relativos a todas as espécies de lactobacilos presentes nas fezes. Vale também ressaltar que a dieta possui importante relação com as diferenças inter-individuais, o que influencia a composição da microbiota humana, ocorrendo variações nos grupos bacterianos presentes em fezes humanas (Walker *et al.*, 2011), o que leva a diferentes resultados nos estudos realizados com humanos.

Resultados semelhantes foram encontrados quando estirpes de *Bifidobacterium* foram incubadas com bebidas de cafés de diferentes graus de torrefação. Estudos anteriores realizados com a bebida de café revelaram estimulo da multiplicação de *Bifidobacterium* em

fezes humanas (Jaquet *et al.*, 2009; Mills *et al.*, 2015) e intestino de camundongos (Nakayama e Oishi, 2013). No estudo de Mills *et al.* (2015), um crescimento significativo desta espécie ocorreu na presença de uma bebida de grãos verdes e torrados. Sabe-se que o grão de café verde possui maior teor de ácido clorogênico, açúcares simples e polissacarídeos (Farah e Donangelo, 2006), o que pode ter influenciado o resultado.

Todas as concentrações de ácido clorogênico testadas estimularam a multiplicação de GG em comparação com MRSm, inulina e FOS. Sabe-se que algumas espécies de *Lactobacillus* (Tomás-Barberan *et al.*, 2014; Couteau *et al.*, 2001; Fritsch *et al.*, 2016) possuem atividade enzimática que hidrolisa ácido clorogênico para sua utilização, sendo esta enzima chamada de cinamoil-esterase, a qual atrai a atenção para as bactérias presentes na microbiota intestinal humana, tanto as residentes quanto as probióticas (Frisch *et al.*, 2016), mas não há estudos na literatura indicando que as estirpes testadas possuem esta enzima. Resultados discordantes foram observados no estudo de Mills *et al.*, 2015, no qual ácido clorogênico foi incubado com amostrais fecais humanas na concentração de 53,9mg/100mL, o equivalente ao encontrado em uma bebida de café com alta quantidade de ácidos clorogênicos, e as mesmas não estimularam a multiplicação de *Lactobacillus*

Em relação às espécies de *Bifidobacterium*, todas as concentrações de ácido clorogênico estimularam sua multiplicação, com destaque para as concentrações de 400mg para BA e 200 e 400mg para BB12. Este resultado confirma o que foi encontrado em outros estudos sobre o aumento da multiplicação de *Bifidobacterium* na presença deste composto (Parkar *et al.*, 2013; Mills *et al.*, 2015, Raimondi *et al.*, 2014). A presença daenzima cinamoil-esterase em uma estirpe de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* já foi relatada (Fritsch *et al.*, 2016), porém não é a mesma utilizada no presente estudo. Raimondi *et al.* (2014), ao analisarem genomas de 32 estirpes de *Bifidobacterium*, identificaram uma esterase chamada Balat_0669 peculiar à estirpe *Bifidobacterium animalis*, permitindo que esta estirpe hidrolisasse ácido clorogênico e liberasse ácido cafeico, que podetambém favorecer a multiplicação de *Bifidobacterium* (Parkar *et al.*, 2013; Raimondi *et al.*, 2014). É importante ressaltar que uma grande porção dos ácidos clorogênicos ingeridos não é absorvida pelo intestino delgado e então alcança o colon, local que exerce papel principal no metabolismo e absorção deste composto (Monteiro *et al.*, 2007; Farah *et al.*, 2008; Tomás-Barberan *et al.*, 2014).

Os resultados do presente estudo mostraram que a trigonelina e a cafeína também estimularam a multiplicação das estirpes probióticas. Uma vez que grande parte da trigonelina e cafeína ingeridas são absorvidas no intestino delgado (Yuyama, 1999; Burdan, 2014), é importante ressaltar que nesta área do intestinohá predominância de bactérias anaeróbicas facultativas pertencentes às famílias Lactobacillaceae e Enterobacteriaceae quetoleram a presença de sais biliares e peptídios antimicrobianos, e competem com outras bactérias e com o hospedeiro para a utilização de carboidratos simples disponíveis nesta região do trato gastrointestinal (Donaldson *et al.*, 2015). Assim, outros compostos como a cafeína e trigonelina podem provavelmente ser utilizados pelas estirpes de lactobacilos presentes nesta área do intestino.É importante ressaltar que a trigonelina e a cafeína podem exercer atividade antimicrobiana para algumas estirpes de bactérias patogênicas, mas em concentrações elevadas (Almeida *et al.*, 2006; Ibrahim *et al.*, 2006; da Silva *et al.*, 2014), e neste trabalho utilizou-se concentrações normalmente consumidas na bebida de café.

No presente estudo, galactomanana e arabinogalactana promoveram a multiplicação de todos os probióticos testados, em comparação com MRSm, inulina e FOS, sendo estes últimos compostos prebióticos bem elucidados na literatura (Verspreet *et al.*, 2016). Além disso, as maiores multiplicações foram encontradas nas estirpes de *Bifidobacterium*, em especial BB12. Porém, os resultados da literatura são controversos. No estudo de Gniechwitz *et al.* (2007) realizado com galactomanana e arabinogalactana isoladas da bebida de café e amostras de fezes humanas, foi encontrado aumento na multiplicação de bactérias pertencentes ao grupo *Bacteroides-Prevotella*. Não houve efeito bifidogênico e alteração na multiplicação de lactobacilos, sendo encontrado este resultado provavelmente, segundo os autores, pelo fato do gênero *Bacteroides* competir com outros grupos bacterianos para utilização de substratos. McLaughlin *et al.* (2015), observaram que galactomanana e arabinogalactana não foram substratos adequados para a multiplicação das espécies de *Lactobacillus* isoladas de humanos, enquanto galactomanana foi utilizada para a multiplicação de uma estirpe de bifidobactéria (*Bifidobacterium dentium* NCFB 2843) e arabinogalactana favoreceu, principalmente, a multiplicação de estirpes de *Bifidobacterium longum* subesp. *longum*. Terpend *et al.* (2013), ao analisarem a utilização de arabinogalactana em um simulador do ambiente intestinal humano, observaram aumentodos números de bactérias pertencentes ao filo *Bacteroidetes* e gênero *Bifidobacterium* no colón distal, sendo o efeito bifidogênico associado principalmente à multiplicação de *B. longum*. É importante considerar a diversidade bacteriana presente no trato gastrointestinal, e asespecificidades de fermentação de carboidratos por estirpes de

bifidobactéria e lactobacilos, pois variam entre as estirpes do mesmo gênero (McLaughlin *et al.*, 2015).

Em relação à estirpe *E.coli*, a bebida de café, os compostos bioativos e os polissacarídeos não estimularam sua multiplicação, em relação ao meio de cultivo convencional. Se por um lado não foi detectado um aumento na multiplicação desta estirpe, também não foi evidenciada atividade antimicrobiana associada à cafeína sobre a estirpe utilizada neste estudo, conforme observado por Almeida *et al.*, (2006), que utilizou uma concentração de extrato de café 4 vezes maior que o mínimo utilizado no presente estudo. Efeitos antimicrobianos relativos à cafeína mostraram que concentrações de 0,5g e 2mg/mL foram capazes de inibir a multiplicação de *Escherichia coli* O157:H7 (Ibrahim *et al.*, 2006), *Escherichia coli* ATCC 25922 e outras enterobactérias (Almeida *et al.*, 2006).

O presente trabalho de dissertação avaliou *in vitro* o comportamento de cada microrganismo probiótico e não-probiótico na presença de extratos de café e seus compostos bioativos. Vale ressaltar que, após ingeridos, os microrganismos probióticos podem se fixar no trato gastrointestinal dependendo da composição da sua membrana celular e de fatores inerentes ao hospedeiro como sistema imunológico, genótipo do hospedeiro, hábitos alimentares e enterotipos microbianos (Bron *et al.*, 2012). No entanto, é importante considerar que no meio intestinal outros microrganismos co-existem com estas estirpes, levando `a competição pelo substrato e afetando sua multiplicação. Por este motivo, posteriormente, experimentos poderão ser realizados simulando o trato gastrointestinal para avaliar as interações entre as estirpes testadas e seus potenciais de utilização neste ambiente.

Uma das limitações do estudo foi a utilização de inulina de cadeia longa como controle de crescimento, além da baixa concentração utilizada deste composto. Porém, cabe ressaltar que, para comparações, foi necessário que este composto estivesse nas mesmas concentrações fisiológicas dos compostos bioativos do café. Outras limitações foram a não avaliação da competição dos microrganismos pelos substratos, a utilização de apenas um grau de torrefação para o café descafeinado, e a não quantificação dos polissacarídeos presentes nos extratos de café, para então avaliar sua influência na multiplicação destes microrganimos.

Para o futuro, além de complementar os experiementos mencionados acima espera-se avaliar o efeito de extratos aquosos de *Coffea canephora*, dos subprodutos da indústria do café (película prateada e borra de café) e dos fitoquímicos presentes em suas folhas sobre a

multiplicação destes microrganismos, além de determinação a concentração de metabólitos produzidos por estes microrganismos na presença de ácidos clorogênicos.

9. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- A bebida de café, independente da concentração, pode aumentar a multiplicação das seguintes bactérias probióticas: *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103, *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* DN-173010 e *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12;
- O café integral exerceu maior efeito sobre a multiplicação destas bactérias do que o descafeinado, independente da concentração utilizada;
- O grau de torrefação dos cafés solúveis utilizados para elaboração dos extratos não influenciou a multiplicação das estirpes probióticas testadas;
- Os polissacarídeos galactomanana e arabinogalactana tipo 2, os compostos bioativos ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogênico), a cafeína, e a trigonelina presentes no café foram capazes de estimular a multiplicação das culturas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103, *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacteriumanimalis* DN-173010, *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12 sendo que os estímulos foram dependentes das concentrações dos compostos e variável entre as estirpes do mesmo gênero;
- Os ácidos clorogênicos, galactomanana e arabinogalactana tipo 2 estimularam a multiplicação das estirpes probióticas mais intensamente do que a inulina e o frutooligossacarídeo, conhecidos como compostos prebióticos;
- A multiplicação dos microrganismos na presença de inulina de raíz de Dália e frutooligossacarídeo foi dependente da concentração utilizada e estirpe-dependente;
- Nenhuma substância testada estimulou a multiplicação de *Escherichia coli* ATCC 25922;
- Os resultados do presente estudo sugerem um potencial efeito prebiótico da bebida de café e seus compostos bioativos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdollahi-Roodsaz, S., Abramson, S., Scher, J. U., The metabolic role of the gut microbiota in health and rheumatic disease: mechanisms and interventions, *Nature Reviews - Rheumatology*, 12(8), 446-455, 2016

Abrams, S.A., Griffin, I.J., Hawthorne, K.M., Ellis, K.J., Effect of prebiotic supplementation and calcium intake on Body Mass Index, *Journal of Pediatrics*, 151(3), 293-298, 2007

Adams, A., Borrelli, R. C., Fogliano, V., De Kimpe, N., Thermal degradation studies of food melanoidins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4136-4142, 2005

Allsopp, P., Possemiers, S., Campbell, D., Oyarzábal, I.S., Gill, C., Rowland, I., An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from Agave angustifolia and the associated anticancer activity, *Anaerobe*, 22, 38 – 44, 2013

Almeida, A.A.P., Farah, A., Silva, D.A.M., Nunam, E.A., Glória, B.A., Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against *Enterobacteria*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8738-873, 2006

Alves, R.C., Casal, S., Oliveira, M.B.P.P.Tocopherols in coffee brews: Influence of coffee species, roast degree and brewing procedure, *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(8), 802-808, 2010

Andersson, R., Fransson, G., Tietjen, M., Åman, P., Content and molecular-weight distribution of dietary fiber components in whole-grain rye flour and bread, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 2009, 2004-2008

Arihara, K., Ota, H., Itoh, M., Kondo, Y., Sameshima, T., Yamanaka, H., Akimoto, M., Kanai, S., Miki, T. *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation, *Journal of Food Science*, 63(3), 544-547, 1998

Asano, I., Hamaguchi, K., Fujii, S., Iino, H., In vitro digestibility and fermentation of mannooligosaccharides from coffee mannan, *Food Science and Technology Research*, 9(1), 62 – 66, 2003

Asano, I., Ikeda, Y., Fujii, S., Iino, H.,Effects of mannooligosaccharides from coffee on microbiota and short chain fatty acids in rat cecum,*Food Science and Technology Research*, 10(3), 273 – 277, 2004 (A)

Asano, I., Umemura, M., Fujii, S., Hoshino, H., Iino, H., Effects of mannooligosaccharides from coffee mannan on fecal microflora and defecation in healthy volunteers,*Food Science and Technology Research*, 10(1), 93–97, 2004 (B)

Ashihara, H., Crozier, A., Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science, *Trends in Plant Science*, 6(9), 2001

Ashihara, H., Ludwig, I.A., Katahira, R., Yokota, T., Fujimura, T., Crozier, A., Trigonelline and related nicotinic acid metabolites: occurrence, biosynthesis, taxonomic considerations, and their roles *in planta* and in human health, *Phytochemistry Reviews*, 14(5), 765-798, 2015

Astrup, A., Toubro, S., Cannon, S., Hein, P., Breum, L., Madsen, J., Caffeine: a double-blind, placebo-controlled study of its thermogenic, metabolic, and cardiovascular effects in healthy volunteers, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 51, 759-767, 1990

Attri, P., Jodha, D., Gandhi, D., Chanalia, P., Dhanda, S. In vitro evaluation of *Pediococcus acidilactici* NCDC 252 for its probiotic attributes, *International Journal of Dairy Technology*, 48(4), 533-542, 2015

Ballesteros, L.F., Teixeira, J.A., Mussatto, S.I., Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin, *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3493-3503, 2014

Belcheva, A., Irrazabal, T., Martin, A., Gut microbial metabolism and colon cancer: Can manipulations of the microbiota be useful in the management of gastrointestinal health?, *Bioessays*, 37(4), 403–412, 2015

Belza, A., Toubro, S., Astrup, A., - The effect of caffeine, green tea and tyrosine on thermogenesis and energy intake, *European Journal of Clinical Nutrition*, 63(1), 57-64, 2009

Biesiekierski, J. R., Rosella, O., Rose, R., Liels, K., Barrett, J. S., Shepherd, S. J., Gibson, P. R., Muir, J. G., Quantification of fructans, galacto-oligosacharides and other short-chain carbohydrates in processed grains and cereals, *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 24(2), 154–176 2011

Bindels, L.B., Delzenne, N.M., Cani, P.D., Walter, J., Towards a more comprehensive concept for prebiotics, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12(5), 303-310, 2015

Blaut, M., Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora, *European Journal of Nutrition*, 41(Suppl 1), 11-16, 2002

Borrelli, R. C., Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A., Fogliano, V., Characterization of a new potential functional ingredient: coffee silverskin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1338-1343, 2004

Bradbury, A.G.W., Halliday, D. J., Chemical structures of green coffee bean polysaccharides, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(2), 1990

Bridge, P.D.; Sneath, P.H.A. Numerical taxonomy of *Strepcoccus*, *Journal of Genral Microbiology*, 129(3), 565-597, 1983

Bron, P.A., Kleerebezem, M., Brummer, R.J., Cani, P.D., Mercenier, A., MacDonald, T.T., Garcia-Ródenas, C.L., Wells, J.M. Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function?, *British Journal of Nutrition*, 117(1), 93-107, 2017

Bron, P.A., Van Baarlen, P., Kleerebezem, M. Emerging molecular insights into the interation between probiotics and the host intestinal mucosa, *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 66-78, 2011

Burdan, F. Pharmacology of caffeine: the main active compound of coffee, Em: Preedy, V.R. Coffee in health and disease prevention, *Academic Press*, 2014, p. 823-828

Butel, M. Probiotics, gut microbiota and health, *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44(1), 1-8, 2014

Cagliani, L.R., Pellegrino, G., Giugno, G., Consonnia, R., Quantification of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* var. robusta in roasted and ground coffee blends, *Talanta*, 106, 169–173, 2013

Cano-Marquina, A., Tarín, J.J., Cano, A., The impact of coffee on health, *Maturitas*, 75, 7–21, 2013

Caprioli *et al.*, The influence of different types of preparation (espresso and brew) on coffee aroma and main bioactive constituents, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(5), 505-5013, 2015

Cluny, N. L., Eller, L. K., Keenan, C. M., Reimer, R. A., Sharkey, K. A., Interactive effects of oligofructose and obesity predisposition on gut hormones and microbiota in diet-induced obese rats, *Obesity*, 23(4), 769–778, 2015

Coelho, C., Ribeiro, M., Cruz, A.C.S., Domingues, M.R.M., Coimbra, M.A., Bunzel, M., Nunes, F.M. Nature of phenolic compounds in coffee melanoidins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(31) 7843-7853, 2014

Coimbra, M. A., Mafra, I., Ferreira, D., Cardoso, S., Domingues, M. R., Nunes, F., Barros, A., Delgadillo, I., *Química de Polímeros*, Estrutura de Polissacarídeos – os polissacarídeos das paredes celulares dos frutos e as propriedades que estes conferem aos alimentos. Em: Melo, J. S. S.; Coimbra; Imprensa da Universidade de Coimbra, 2004 - V.3, 495-519

Collado, M.C., Moreno, Y., Cobo, J.M., Mateos, J.A., Hernández, M. Molecular detection of *Bifidobacterium animalis* DN-173010 in human feces during fermented milk administration,*Food Research International*, 39(5), 530-535, 2006

Conlon, M. A., Bird, A. R., The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human Health, *Nutrients*, 7(1), 17-44, 2015

Consonni, R., Cagliani, L.R., Cogliati, C., NMR based geografical characterization of roasted coffee, *Talanta*, 88, 420-426, 2012

Cousin, F., Louesdon, S., Maillard, M.B., Parayre, S., Falentin, H., Deutsch, S.M., Boudry, G., Jan, G. The first dairy product exclusively fermented by *Propionibacterium freudenreichii*: a new vector to study probiotic potentialities in vivo, *Food Microbiology*, 32(1), 135-146, 2012

Couteau, D., McCartney, A.L., Gibson, G.R., Williamson, G., Faulds, C.B. Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid, *Journal of Applied Microbiology*, 90(6), p.873-881, 2001

Cowan, T. E., Palmnäs, M. S. A., Yang, J., Bomhof, M. R., Ardell, K. L., Reimer, R. A., Vogel, H. J., Shearer, J., Chronic coffee consumption in the diet-induced obese rat: impact on intestinal microbiota and serum metabolomics, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(4), 489 – 495, 2014

Crippa, A., Discacciati, A., Larsson, S.C., Wolk, A., Orsini, N. Coffee consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: a dose-response meta-analysis, *American Journal of Epidemiology*, 180(8), 763-775, 2014

Da Silva, F.M., Iorio, N.L.P., Lobo, L.A., Dos Santos, K.R.N., Farah, A., Maia, L., Antonio, A.G., Antibacterial effect of aqueous extracts and bioactive chemical compounds of *Coffea canephora* against microorganisms involved in dental caries and periodontal disease, *Advances in Microbiology*, 4(14), 978-985, 2014

De Lima, M.D.S.F. *et al.*, *Saccharomyces cerevisiae* from Brazilian kefir-fermented milk: An in vitro evaluation of probiotic properties, *Microbial Pathogenesis*, doi:10.1016/j.micpath.2017.05.010, 2017

De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E., A medium for the cultivation of Lactobacilli, *Journal of Applied Microbiology*, 23(l), 130-135, 1960

De Vuyst, L., Moens, F., Selak, M., Rivière, A., Leroy, F. Summer Meeting 2013: growth and physiology of bifidobactéria, *Journal of Applied Microbiology*, 116(3), 477-491, 2013

Delzenne, N. M., Cani, P. D., Everard, A., Neyrinck, A. M., Bindels, L. B., Gut microorganisms as promising targets for the management of type 2 diabetes, *Diabetologia*, 58(10), 2206–2217, 2015

Diáz-Rubio, M.E., Saura-Calixto, F., Dietary fiber in brewed coffee, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1999-2003, 2007

Dinan, T.G., Stanton, C., Cryan, J.F. Psychobiotics: a novel class of psychotropic, *Biological Psychiatry*, 74(10), 720-726, 2013

Ding, M., Shilpa, N., Bhupathiraju, S.N., Chen, M., van Dam, R.M., Hu, F.B. Caffeinated and Decaffeinated coffee consumption and risk of type 2 diabetes: a systematic review and a dose-response meta-analysis, *Diabetes Care*, 37(2), 569-586, 2014

Donaldson, G.P., Lee, S.M., Mazmanian, S.K. Gut biogeography of the bacterial microbiota, *Nature Reviews Microbiology*, 14(1), 20-32, 2016

Dórea J.G; da Costa, T.H.M., Is coffee a functional food?, *British Journal of Nutrition*, 93(6), 773-782, 2005

Doron, S., Snydman, D.R., Gorbach, S.L. *Lactobacillus* GG: bacteriology and clinical applications, *Gastroenterology Clinics of North America*, 34(3), 483-498, 2005

Duarte, G.S., Farah, A., Effect of simultaneous consumption of milk and coffee on chlorogenic acids' bioavailability in humans, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7925-7931, 2011

Duranti, S., Milani, C., Lugli, G.A., Macabelli, L., Turroni, F., Ferrario, C., Mangifesta, M., Viappiani, A., Sánchez, B., Margolles, A., Van Sinderen, D., Ventura, M. Evaluation of genetic diversity among strains of the human gut commensal *Bifidobacterium adolescentis*, *Scientific Reports*, 6(23971), 1-10, 2016

EFSA - European Food Safety Autority, Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to live yoghurt cultures and improved lactose digestion (ID 1143, 2976) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006, EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), v.8, n.10, p.1763, 2010

Falentin, H., Deutsch, S-M., Jan, G., Thierry, A., Parayne, S., Maillard, M-B., Dherbécourt, J.*et al.* The complete genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1 T, a hardy *Actinobacterium* with food and probiotic applications (Propionibacterium genome) *PLoS One*, v.5, n.7, p.e11748, 2010

Falony, G., Lazidou, K., Verschaeren, A., Weckx, S., Maes, D., De Vuyst, L. In vitro kinetic of fermentation of prebiotic inulin-type fructans by *Bifidobacterium* species reveals four different phenotypes, *Applied and Environmental Microbiology*, 75(2), 454-461, 2008

FAO, Technical Meeting on Prebiotics, Food Quality and Standards Service, 2008

FAO/WHO. Probiotic in foods. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Rome: FAO Food and Nutrition Paper. 85, 2006

Farah, A. Chapter 14 - Nutritional and health effects of coffee, Em: Lashermes, P. Achieving sustainable cultivation of coffee, Burleigh Dodds Science Publishing, United States, *In Press*

Farah, A., Coffee as a functional beverage, *Agro Food Industry Hi-Tech*, 20(6), 60-63, 2009

Farah, A., Coffee Constitutents, Em: *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention*, 1ª edição, 2012, John Wiley & Sons, 21 – 58

Farah, A., de Paulis, T., Moreira, D.P., Trugo, L.C., Martin, P.R. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2),374-381, 2006

Farah, A., de Paulis, T., Trugo, L. C., Martin, P. R., Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1505-1513, 2005

Farah, A., Donangelo, C. M., Phenolic compounds in coffee, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 23-36, 2006

Farah, A., Monteiro, M., Donangelo, C.M., Lafay, S. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavaliable in humans, *The Journal of Nutrition*, 138(12), 2309-2315, 2008

Farah, A., Monteiro, M., Donangelo, C.M., Lafay, S. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans, *The Journal of Nutrition*, 138(12),2309-2315, 2008

Farah, A., Monteiro, M.C., Calado, V., Franca, A.S., Trugo, L.C., Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee, *Food Chemistry*, 98(2), 373–380, 2006

FDA - Food and Agriculture Administration, Generally Recognized as Safe (GRAS) determination for the use of *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001 (DR20) in infant formula, Fonterra Co-operative Group, New Zealand, disponível em: https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm269249.pdf, acessado em 09/07/2017

Felberg, I., Farah, A., Monteiro, M.C., Godoy, R.L. de O., Pacheco, S., Calado, V., Effect of simultaneous consumption of soymilk and coffee on the urinary excretion of isoflavones, chlorogenic acids and metabolites in healthy adults, *Jounal of Functional Foods*, 19(A), 688-699, 2015

Felice, V.D., O'Mahony, S.M. The microbiome and disorders of the central nervous system, *Pharmacology Biochemistry Behavior*, 2017, doi: 10.1016/j.pbb.2017.06.016

Fernandes, R., Beserra, B. T. S., Mocellin, M. C., Kuntz, M. G. F., da Rosa, J. S., de Miranda, R. C. D.,*et al*.Effects of prebiotic and synbiotic supplementation on inflammatory markers and anthropometric indices after roux-en-y gastric bypass: a randomized, Triple-blind, Placebo-controlled Pilot Study, *Journal of Clinical Gastroenterology*, 50(3), 208-217, 2016

Fischer, M., Reimann, S., Trovato, V., Redgwell, R. J., Polysaccharides of green Arabica and Robusta coffee beans, *Carbohydrate Research*, 330(1), 93–101, 2001

Floch, M.H., Walker, W.A., Sanders, M.E., Nieuwdorp, M., Kim, A.S., Brenner, D.A.*et al.*, Recommendations for probiotic use - 2015 update, *Journal of Clinical Gastroenterology*, 49(S1), S69-S73, 2015

Fogliano, V., Morales, F.J., Estimation of dietary intake of melanoidins from coffee and bread, *Food & Function*, 2(2), 117-123, 2011

Fondén, R., Svensson, U., Commercially Available human Probiotic Microorganisms, Lactobacillus acidophilus NCDO 1748, Em: Lee, Y.K., Salminen, S. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, 2º edição, Wiley, 2009

Fristch, C., Jänsch, A., Ehrmann, M.A., Toelstede, S., Vogel, R.F. Characterization of cinnamoyl esterases from different lactobacilli and bifidobactéria, *Current Microbiology*, 74(2), 247-256, 2017

Fujimura, S., Kato, S., Oda, M., Miyahara, M. Ito, Y.,*et al.*Detection of *Lactobacillus gasseri* OLL2716 strain administered with yogurt drink in gastric mucus layer in humans, *Letters in Applied Microbiology*, 43(5),578-581, 2006

Fujimura, S., Watanabe, A., Kimura, K., Kaji, M.Probiotic mechanism of *Lactobacillus gasseri* OLL2716 strain against *Helicobacter pylori*, *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), 1134-1136, 2012

Fujisawa, T., Benno, Y., Yaeshima, T., Mitsuoka, T. Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus*

johnsonii sp. nov. and synonumy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson *et al.*, 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981), *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(3), 487-491, 1992

Gareau, M., Sherman, P. M., Walker, W. A., Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 7(9), 503–514, 2010

Gibson, G.R, Hutkins, R., Sanders, M.E., Prescott, S.L., Reimer, R.A., Salminen, S.J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K.S., Cani, P.D., Verbeke, K., Reid, G. The International Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, doi: 10.1038/nrgastro.2017.75, 2017

Gibson, G.R., Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept), *Clinical Nutrition Supplements*, 1(2), 25-31, 2004

Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics, *Journal of Nutrition*, 125(6), 1401-1412, 1995

Gniechwitz, D., Brueckel, B., Reichardt, N., Blaut, M., Steinhart, H., Bunzel, M. Coffee dietary fiber contents and structural characteristics as influenced by coffee type and technological and brewing procedures, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55(26), 11027–11034, 2007 (A)

Gniechwitz, D., Reichardt, N., Blaut, M., Steinhart, H., Bunzel, M. Dietary fiber from coffee beverage: degradation by human fecal microbiota, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55(17), 6989-6996, 2007 (B)

Gniechwitz, D., Reichardt, N., Meiss, E., Ralph, J., Steinhart, H., Blaut, M., Bunzel, M., Characterization and fermentability of an ethanol soluble high molecular weight coffee fraction, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56(14), 5960 – 5969, 2008 (A)

Gniechwitz, D., Reichardt, N., Ralph, J., Blaut, M., Steinhart, H., Bunzel, M., Isolation and characterisation of a coffee melanoidin fraction, *Journal of Science and Food Agriculture*, 88(12), 2153–2160, 2008 (B)

Goh, Y.J., Klaenhammer, T.R. Genetic mechanisms of prebiotic oligosaccharide metabolism in probiotic microbes, *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(6.1-6.2), 137-156, 2015

Gomes, A.M.P., Malcata, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics, *Trends in Food Science & Technology*, 10(4-5), 139-157, 1999

Gonthier, M.-P., Remesy, C., Scalbert, A., Cheynier, V., Souquet, J-M., Poutanen, K., Aura, A.-M. Microbial metabolism of caffeic acid and its esters chlorogenic and caftaric acids by human faecal microbiota in vitro, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60(9), p.536-540, 2006

Gonthier, M-P., Verny, M-A., Besson, C., Rémésy, C., Scalbert, A. - Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats, *Journal of Nutrition*, 133(6), 1853–1859, 2003

Gorbach, S.L. The discovery of *Lactobacillus* GG, *Nutrition Today*, 31(6), 2S-4S, 1996

Gray, V.L., Müller, C.T., Watkins, I.D., Lloyd, D. Peptones from diverse sources: pivotal determinants of bacterial growth dynamics, *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 554-565, 2008

Griffin, I.J., Hicks, P.M.D., Heaney, R.P., Abrams, S.A., Enriched chicory inulin increases calcium absorption mainly in girls with lower calcium absorption, *Nutrition Research*, 23(7), 901–909, 2003

Grimoud, J., Durand, H., Courtin, C., Monsan, P., Ouarné, F., Theodorou, V., Roques, C. In vitro screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics, *Anaerobe*, 16(5), 493-500, 2010

Grozdanov, L., Raasch, C., Schulze, J., Sonnerborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J., Dobrindt, U. Analysis of the genome stricture of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917, *Journal of Bacteriology*, 186(16), 5432-3441, 2004

Gueimonde, M., De Los Reyes-Gavilán, C. Detection and enumeration of gastrointestinal microorganisms, Em: Lee, Y.K., Salminen, S. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, 2º edição, Wiley, 2009

Gupta, V.K., Paul, S., Dutta, C. Geography, ethnicity or subsistence-specific variations in human microbiome composition and diversity, Frontiers in Microbiology, 8(1162), doi: 10.3389/fmicb.2017.01162, 2017

Heath, R.D., Brahmbhatt, M., Tahan, A.C., Ibdah, J.A., Tahan, V. Coffee: the magical bean for liver disease, *World Journal of Hepatology*, 9(15), 689-696, 2017

Hernandez-Hernandez, O., Muthaiyan, A., Moreno, F.J., Montilla, A., Sanz, M.L., Ricke, S.C. Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of Lactobacillus, *Food Microbiology*, 30(2), 355-361, 2012

Herrera, J.C., Lambot, C. The coffee tree - genetic diversity and origin, Em: Folmer, B., *The Craft and Science of Coffee*, Academic Press, 2017, p.1-14

Hill C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506-514, 2014

Holscher, H. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota, *Gut Microbes*, 8(2), p.172-184, 2017

Holscher, H., Czerkies, L.A., Cekola, P., Litov, R., Benbow, M.*et al.Bifidobacterium lactis* Bb12 enhances intestinal antibody response in formula-fed infants: a randomized, double-blind, controlled trial, *Journal of Parenteral and EnteralNutrition*, 36(S1), 106S-117S, 2012

Hoppe, C., Larsen, C.N. Commercially Available human Probiotic Microorganisms, *Lactobacillus acidophilus*, LA-5, Em: Lee, Y.K., Salminen, S. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, 2º edição, Wiley, 2009

Huang, H-Y., Huang, S.Y., Chen, P.Y., King, V.A., Lin, Y.P., Tsen, J.H. Basic characteristics of Sporolactobacillus inulinus BCRC 14647 for potential probiotic properties, *Current Microbiology*, 54(5), 396-404, 2007

Huang, Y.W., Xu, H.H., Wang, S.M., Zhao, Y., Huang, Y.M., Li, R.B., Wang, X.J, Hao, S.M., Sheng, J., Absorption of caffeine in fermented Pu-er tea in inhibited in mice, *Food & Function*, 5(7), 1520-1528, 2014

Iannitti, T., Palmieri, B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice, *Clinical Nutrition*, 29(6), 701-725, 2010

IARC – International Agency for Research on Cancer, Agents Classified by the IARC Monographs, volumes 1-119, List of classification volumes 1-119, disponível em: http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php, acessado em 22/08/2017

Ibrahim, S.A., Salameh, M.M., Phetsomphou, S., Yang, H., Seo, C.W., Application of caffeine, 1,3,7-trimethylxanthine, to control *Escherichia coli* O157:H7, *Food Chemistry*, 99(4), 645-650, 2006

ICO, International Coffee Organization, http://www.ico.org, acessada em agosto de 2016

Im, E., Choi, Y.J., Kim, C.H., Fiocchi, C., Pothoulakis, C., Rhee, S.H.The angiogenic effect of probiotic *Bacillus polyfermenticus* on human intestinal microvascular endothelial cells is mediated by IL-8, *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 297(5), G999-G1008, 2009

Islam, S.U. Clinical uses of probiotics, *Medicine*, 95(5), 1-5, 2016

Jaiswal, R., Patras, M.A., Eravuchira, P.J., Kuhnert, N., Profile and characterization of the chlorogenic acids in green Robusta coffee beans by LC-MSn: Identification of seven new classes of compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8722-8737, 2010

Jans, C., Lacroix, C., Follador, R., Stevens, M.J.A.Complete Genome Sequence of the Probiotic *Bifidobacterium thermophilum* Strain RBL67, *Genome Announcements*, 1(3), 191-1013, 2013

Jiménez-Zamora, A., Pastoriza, S., Rufián-Henares, J. A. Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties, *LWT – Food Science and Tecnnology*, 61(1), 12-18, 2015

Kelly, G. Inulin-Type Fructans - A review: part 1, *Alternative Medicine Review*, 13(4), 315-329, 2015

Kelly-Quagliana, K.A., Nelson, P.D., Buddington, R.K., Dietary oligofructose and inulin modulate immune functions in mice, *Nutrition Research*, 23(2), 257–267, 2003

Khurshid, M., Aslam, B., Nisar, M.A., Akbar, R., Rahman, H., Khan, A.A., Rasool, M.H. Bacterial munch for infants: potential pediatric therapeutic interventions of probiotics, *Future Microbiology*, 10(11), 1881-1895, 2015

Kimura, K. Commercially Available human Probiotic Microorganisms, *Lactobacillus gasseri* OLL2716 (LG21), Em: Lee, Y.K., Salminen, S. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, 2º edição, Wiley, 2009

Klijn, A., Mercenier, A., Arigoni, F. Lessons from the genomes of bifidobactéria, FEMS *Microbiology Reviews*, 29(3), 491-509, 2005

Koropatkin, N.M., Cameron, E.A., Martens, E.C., How glycan metabolism shapes the human gut microbiota, *Nature Reviews Microbiology*, 10(5), 323-335, 2012

Krumbeck, J.A., Maldonado-Gomez, M.X., Ramer-Tait, A.E., Hutkins, R.W. Prebiotics and synbiotics: dietary strategies for improving gut health. Prebiotics and synbiotics: dietary strategies for improving gut health, *Current Opinion in Gastroenterology*, 32(2), 110-119, 2016

Kumar, V.P., Prashanth, K.V.H., Venkatesh, Y.P., Structural analyses and immunomodulatory properties of fructo-oligosaccharides from onion (*Allium cepa*), *Carbohydrate Polymers*, 117, 115–122, 2015

Kwak, M.J., Kwon, S.K., Yoon, J.K., Song, J.Y., Seo, J.G., Chung, M.J., Kim, J.F. Evolutionary architecture of the infant-adapted group of *Bifidobacterium* species associated with the probiotic function, *Systematic and Applied Microbiology*, 39(7), 429-439, 2016

Kwak, M.J., Prashanti, K.V., Venkatesh, Y.P. Complete genome sequence of the probiotic bacterium *Bifidobacterium breve* KCTC 12201BP isolated from a healthy infant, *Journal of Biotechnology*, 20(214), 156-157, 2015

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*, 75(2), 223-230, 2001

Lahtinen, S., Salminen, S. Commercially Available human Probiotic Microorganisms, *Bifidobacterium longum* STRAINS BL46 AND BL2C, Em: Lee, Y.K., Salminen, S. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, 2º edição, Wiley, 2009

Lang, R., Dieminger, N., Beusch, A., Lee, Y.M., Dunkel, A., Suess, B., Skurk, T., Wahl, A., Hauner, H., Hofmann, T., Bioappearance and pharmacokinetics of bioactives upon coffee consumption, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(26), 8487-8503, 2013

Laparra, J.M., Sanz, J., Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals, *Pharmacological Research*, 61(3), 219–225, 2010

LeBlanc, J.G., Milani, C., de Giori, G.S., Sesma, F., van Sinderen, D., Ventura, M. Bacteria as vitamin suppliers to thei host: a gut microbiota perspective, *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 160-168, 2013

Lee, A.H., Tan, L.B., Hiramatsu, N., Ishisaka, A., Alfonso, H., Tanaka, A., Uemura, N.,Fujiwara, Y., Takechi, R., Plasma concentrations of coffee polyphenols and plasma biomarkers of diabetes risk in healthy Japanese women, *Nutrition & Diabetes*, 6 (e212), 1-3, 2016

Leite, A.M., Miguel, M.A., Peixoto, R.S., Ruas-Madiedo, P., Pachoalin, V.M., Mayo, B., Delgado, S. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains, *Journal of Dairy Science*, 98(6), 3622-3632, 2015

Lilly, D.M., Stillwell, R.H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms, *Science*, 147(3659), 747-748, 1965

López-Barrera, D.M., Vázquez-Sánchez, K., Loarca-Piña, M.G.F., Campos-Vega, R., Spent coffee grounds, an innovativesource of colonic fermentable compunds, inhibit inflammatory mediators in vitro, *Food Chemistry*, 212, 282-290, 2016

Ludwig, I.A., Clifford, M.N., Lean, M.E.J., Ashihara, H., Crozier, A., Coffee: biochemistry and potential impact on health, *Food & Function*, 5(8), 1695-1717, 2014

Macfarlane, G.T. e Cummings, J.H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health?, *British Medical Jounal*, 318,999-1003, 1999

Macia, L., Thorbum, A.N., Binge, L.C., Marino, E., Rogers, K.E., Maslowski, K.M., Vieira, A.T., Kranich, J., Mackay, C.R., Microbial influences on epithelialintegrity and immune function as a basis for inflammatory diseases, *Immunological Reviews*, 245(1), 164-176, 2012

Mansour, M.M., Elkhatib, W.F., Aboshanad, K.M., Bahr, M.M.A. Inhibition of Clostridium difficile in Mice Using a Mixture of Potential Probiotic Strains Enterococcus faecalis NM815, E. faecalis NM915, and E. faecium NM1015: Novel Candidates to Control C. difficile Infection (CDI), *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10.1007/s12602-017-9285-7, 2017

Marcucci, C.T., Benassi, M.T., Almeida, M.B., Nixdorf, S.L. Teores de trigonelina, ácido 5-cafeoilquínico, cafeína e melanoidinas em cafés solúveis comerciais brasileiros, *Química Nova*, 36(4), 544-548, 2013

Marietta, E., Rishi, A., Taneja, V., Immunogenetic control of the intestinal microbiota, *Immunology*, 145(3), 313-322, 2015

Martín, M.J., Pablos, F., González, A.G., Characterization of arabica and robusta roasted coffee varieties and mixture resolution according to their metal content, *Food Chemistry*, 66(3), 365-370, 1999

McLaughlin, H.P., Motherway, M.O'C., Laksshminarayanan, B., Stanton, C., Ross, R.P., Brulc, J., Menon, R., O'Toole, P., van Sinderen, D. Carbohydrate catabolic diversity of bifidobactéria and lactobacilli of human origin, *International Journal of Food Microbiology*, 16(203), 109-121, 2015

Meier, R.F., Basics in clinical nutrition: Fibre and short chain fatty acids, *e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*, 4(2), e-69-e71, 2009

Meyer, D., Stasse Wolthuis, M. The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health, *European Journal of Clinical Nutrition*, 63(11), 1277-1289, 2009

Mikami, Y., Yamazawa, T., Chlorogenic acid, a polyphenol in coffee, protects neurons against glutamate neurotoxicity, *Life Sciences*, 139, 69-74, 2015

Milani, C. The human gut microbiota and its interactive connections to diet, *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 29(5), 539-546, 2016

Mills, C.E., Tzounis, X., Oruna-Concha, M. J., Mottram, D. S., Gibson, G. R., Spencer, J. P. E., In vitro colonic metabolism of coffee and chlorogenic acid results in selective changes in human faecal microbiota growth, *British Journal of Nutrition*, 113(8), 1220-1227, 2015

Monente, C. Bravo, J. Vitas, A.I., Arbillaga, L., Paz de Peña, M., Cid, C. Coffee and spent coffee extracts protect against cell mutagens and inhibit growth of food-borne pathogen microorganisms, *Journal of Functional Foods*, 12, 365-374, 2015

Monteiro, M., Farah, A., Perrone, D., Trugo, L.C., Donangelo, C. Chlorogenic acod compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans, *The Journal of Nutrition*, 137(10), 2196-2201, 2007

Moreira, A.S.P., Nunes, F.M., Domingues, M.R., Coimbra, M.A., Coffee Melanoidins: structures, mechanisms of formation and potential health impacts, *Food & Function*, 3(9), 903-915, 2012

Morris, J. We Consumers - tastes, rituals, and waves, Em: Folmer, B., *The Craft and Science of Coffee*, Academic Press, 2017, p. 460-488

Moura-Nunes, N., Perrone, D., Farah, A., Donangelo, C.M., The increase in human plasma antioxidant capacity after acute coffee intake is not associated with endogenous non-enzymatic antioxidant components, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(S6), 173-181, 2009

Munjal, U., Glei, M., Pool-Zobel, B.L., Scharlau, D. Fermentation products of inulin-type fructans reduce proliferation and induce apoptosis in human colon tumour cells of different stages of carcinogenesis, *British Journal of Nutrition*, 102(5), 663–671, 2009

Mussatto, S. Generating biomedical polyphenolic compounds from spent coffee or silverskin, Em: Preedy, V.R. *Coffee in health and disease prevention*, Academic Press, 2014, p.63-104

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*, 4, 661-672, 2011

Nakayama, T., Oishi, K., Influence of coffee (*Coffea arabica*) and galacto-oligosaccharide consumption on intestinal microbiota and the host responses, *FEMS Microbiology Letters*, 343(2), 161 – 168, 2013

Nazzaro, F., Fratianni, F., Nicolaus, B., Poli, A., Orlando, P. The prebiotic source influences the growth, biochemical features and survival under simulated gastrointestinal conditions of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Anaerobe*, 18(3), 280-285, 2012

Nehlig, A. Effects of coffee/caffeine on brain health and disease: what should I tell my patients?, *Practical Neurology*, 16(2), 89-85, 2015

Nogueira, M., Trugo, L.C. Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23(2), 296-299, 2003

Nunes, F.M., Coimbra, M. A., Melanoidins from coffee infusions: fractionation, chemical characterization, and effect of the degree of roast, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55(10), 3967-3977, 2007

Nunes, F.M., Domingues, M.R., Coimbra, M.A., Arabinosyl and glucosyl residues as structural features of acetylated galactomannans from green and roasted coffee infusions, *Carbohydrate Research*, 340(10), 1689–1698, 2005

Oosterveld, A., Voragen, A.G.J, Schols, H.A. Effect of roasting on the carbohydrate composition of *Coffea arabica* beans, *Carbohydrate Polymers*, 54(2), 183–192, 2003

Ouwehand, A., Lahtinen, S. Commercially Available human Probiotic Microorganisms, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, Em: Lee, Y.K., Salminen, S. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, 2º edição, Wiley, 2009

Ouwehand, A., Lahtinen, S., Nurminen, P. Commercially Available human Probiotic Microorganisms, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacteriumlactis* HN019, Em: Lee, Y.K., Salminen, S. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, 2º edição, Wiley, 2009

Parkar, S. G., Trower, T. M., Stevenson, D. E., Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human intestinal microbiota, *Anaerobe*, 23, 12 – 19, 2013

Perrone, D., Donangelo, C.M., Farah, A. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry, *Food Chemistry*, 110(4), 1030-1035, 2008

Perrone, D., Farah, A., Donangelo, C. M., Influence of coffee roasting on the incorporation of phenolic compounds into melanoidins and their relationship with antioxidant activity of the brew, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60, 4265−4275,2012

Perrone, D., Farah, A., Donangelo, C.M., de Paulis, T., Martin, P.R., Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars, *Food Chemistry*, 106, 859-867, 2008

Petkowicz, C.L.O. Polysaccharides in coffee and their relationship to health: an overview, Em: Preedy, V.R. *Coffee in health and disease prevention*, Academic Press, 2014, p.163-171

Quigley, E.M.M. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota, *Pharmacological Research*, 61(3), 213-218, 2010

Raimondi, S., Anighoro, A., Quartieri, A., Amaretti, A., Tomás-Barberan, F.A., Rastelli, G., Rossi, M., Role of bifidobactéria in the hydrolysis of chlorogenic acid, *Microbiology Open*, 4(1), 41-52, 2015

Rao, V.A. The prebiotic properties of oligofructose at low intake levels, *Nutrition Research*, 21(6), 2001

Razafinarivo, N.J., Guyot, R., Davis, A.P., Couturon, E., Hamon, S., et al. Genetic structure and diversity of coffee (*Coffea*) across Africa and the Indian Ocean islands revealed using microsatellites, *Annals of Botany*, 111(2), 229-248, 2013

Rechner, A. S., Smith, M. A., Kuhnle, G., Gibson, G. R., Debnam, E. S., Srai, K. S., Moore, K, P., Rice-Evans, C. A., Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products, *Free Radical Biology & Medicine*, 36(2), 212 – 225, 2004

Redgwell, R.J., Trovato, V., Curti, D., Fischer, M., Effect of roasting on degradation and structural features of polysaccharides in Arabica coffee beans, *Carbohydrate Research*, 337(5), 421–431, 2002

Reichardt, N., Gniechwitz, D., Steinhart, H., Bunzel, M., Blaut, M., Characterization of high molecular weight coffee fractions and their fermentation by human intestinal microbiota, *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(2), 287 – 299, 2009

Reid G., Sanders, M.E., Rex Gaskins, H., Gibson, G.R., Mercenier, A., Rastall, R., Roberfroid, M., Rowland, I., Cherbut, C., Klaenhammer, T.R., New scientific paradigms for probiotics and prebiotics, *Journal of Clinical Gastroenterology*, 37(2), 105–118,2003

Reid, G., Bruce, A.W. Commercially Available human Probiotic Microorganisms, *Lactobacillus rhamnosus*, GR-1, Em: Lee, Y.K., Salminen, S. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, 2º edição, Wiley, 2009

Reid, G., Younes, J.A., Van der Mei, H.C., Gloor, G.B., Knight, R., Busscher, H.J. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities,*Nature Reviews Microbiology*, 9(1),27-38, 2011

Roberfroid, M., Rowland, I., Cherbut, C., Klaenhammer, T.R., New scientific paradigms for probiotics and prebiotics, *Journal of Clinical Gastroenterology*, 37(2), 105–118, 2003

Rodríguez-Costa, S., Cardelle-Cobas, A., Roca-Saavedra, P., Porto-Arias, J.J., Miranda, J.M., Cepeda, A. In vitro evaluation of the prebiotic effect of red and white grape polyphenolic extracts, *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2017

Rufián-Henares, J.A., De La Cueva, S.P. Antimicrobial activity of coffee melanoidins - a study of their metal-chelating properties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(2), 432-438, 2009

Rufián-Henares, J.A., Morales, F.J. Antimicrobial activity of melanodins against *Escherichia coli* is mediated by a membrane-damage mechanism, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), 2357-2362, 2008

Rufián-Henares, J.A., Morales, F.J., Functional properties of melanoidins: In vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities, *Food Research International*, 40(8), 995-1002, 2007

Rufián-Henares, J.A., Pastoriza, S. Biological effects of coffee melanoidins, Em: Preedy, V.R. *Coffee in health and disease prevention*, Academic Press, 2014, p.853-858

Ruoff, K.L., Kuritzkes, D.R., Wolfson, J.S., Ferraro, M.J.Vancomycin-Resistant Gram-positive bacteria isolated from human sources, *Journal of Clinical Microbiology*, 26(10), 2064-2068, 1988

Saha, D.C., Reimer, R.A., Long-term intake of a high prebiotic fiber diet but not high protein reduces metabolic risk after a high fat challenge and uniquely alters intestinal microbiota and hepatic gene expression, *Nutrition Research*, 34(9), 789 – 796, 2014

Said, H.M., Mohammed, Z.M. Intestinal absorption of water-soluble vitamins: an uptade, *Current Opinion in Gastroenterology*, 22(2), 140-146, 2006

Sánchez, I., Palop, L., Ballesteros, C. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of 'Almagro' eggplants, *International Journal of Food Microbiology*, 59(1-2), 9-17, 2000

Santos, R.M.M., Lima, D.R.A., Coffee consumption, obesity and type 2 diabetes: a mini-review, *European Journal of Nutrition*, 55(4), 1345–1358, 2016

Schenker, S., Rothgeb, T. The roast - creating the beans's signature, Em: Folmer, B.*The Craft and Science of Coffee*, Academic Press, 2017, p.245-270

Scott, K.P., Gratz, S.W., Sheridan, P.O., Flint, H.J., Duncan, S.H., The influence of diet on the gut microbiota, *Pharmacological Research*, 69(1), 52-60, 2013

Segers, M.E., Lebber, S. Towards a better understanding of Lacobacillus rhamnosus GG - host interactions, *Microbial Cell Factories*, 13(S1:S7), 1-16, 2014

Showalter, A.M., Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function, *Cellular and Molecular Life Science*, 58(10), 1399–1417, 2001

Silván, J. M. S., Morales, F. J., Saura-Calixto, F. Conceptual study on maillardized dietary fiber in coffee, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12244–12249, 2010

Simões, J., Madureira, P., Nunes, F. M., Domingues, M. R., Vilanova, M., Coimbra, M. A., Immunostimulatory properties of coffee mannans, *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(8), 1036 – 1043, 2009

Sims, I.M., Ryan, J.L.J, Kim, S.H. In vitro fermentation of prebiotic oligosaccharides by *Bifidobacterium lactis* HN019 and *Lactobacillus* spp., *Anaerobe*, 25, 11-17, 2014

Soares, C.M.D., Alves, R.C., Oliveira, M.B.P.P. Factors affecting acrylamide levels in coffee beverages, Em: Preedy, V.R. *Coffee in health and disease prevention*, Academic Press, 2014, p. 217-224

Su, P., Henriksson, A., Mitchell, H. Selected prebiotics support the growth of probiotic mono-cultures in vitro, *Anaerobe*, 13(3-4), 134-139, 2007

Sun, J., Chang, E. B., Exploring gut microbes in human health and disease: Pushing the envelope, *Genes & Diseases*, 1(2), 132-139, 2014

Svensson, U., Fondén, R. Commercially Available human Probiotic Microorganisms, *Lactobacillus paracasei* ssp. paracasei, F19, Em: Lee, Y.K., Salminen, S. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, 2º edição, Wiley, 2009

Sørensen, J.L., Sondergaard, T.E. The effects of different yeast extracts on secondary metabolite production in *Fusarium*, *International Journal of Food Microbiology*, 170, 55-60, 2014

Thaler, H., The chemistry of coffee extraction in relation to polysaccharides, *Food Chemistry*, 4(1), 13-22, 1979

Toci, A., Farah, A., Trugo, L.C. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés arábica e robusta antes e após a torração, *Química Nova*, 29(5), 965-971, 2006

Tojo, R., Suárez, A., Clemente, M. G., Reyes-Gavilán, C. G. de los, Margolles, A., Gueimonde, M., Ruas-Madiedo, P., Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobactéria in gut homeostasis, *World Journal of Gastroenterology*, 20 (41): 15163-15176, 2014

Tomás-Barberan, F., García-Villalba, R., Quartieri, A., Raimondi, S., Amaretti, A., Leonardi, A., Rossi, M. In vitro transformation of chlorogenic acid by human gut microbiota, *Molecular Food and Food Research*, 58(5), 1122-1131, 2014

Torres, T., Farah, A., Coffee, maté, açaí and beans are the main contributors to the antioxidant capacity of Brazilian's diet, *European Journal of Nutrition*, 56(4), 1523-1533, 2016

Tripathi, M.K.; Giri, S.K. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage, *Journal of Functional Foods*, 9(1), 225-241, 2014

Trugo, L. C., Farah, A., Trugo, N. M. F., Germination and debittering of lupin seed reduce alpha-galactosidase and intestinal carbohydrate fermentation in human, *Journal of Food Science*, 58(3), 627-630, 1993

Trugo, L.C., Macrae, R. Chlorogenic acid composition of instant coffees, *Analyst*, 109(3), 263-266, 1984

Umemura, M., Fujii, S., Asano, I., Hoshino, H., Iino, H., Effect of small dose of mannooligosaccharidesfrom coffee mannan on defecating conditions and fecal microflora, *Food Science and Technology Research*, 10(2), 174-179, 2004 (A)

Umemura, M., Fujii, S., Asano, I., Hoshino, H., Iino, H., Effect of "Coffee Mix Drink" contaningmannooligosaccharides from coffee mannan on defecation and fecal microbiota in healthy volunteers, *Food Science and Technology Research*,10(2), 195-198, 2004 (B)

Uriot, O., Galia, W., Awussi, A.A., Perrin, C., Denis, S. Chalancon, S. et al. Use of the dynamic gastro-intestinal model TIM to explore the survival of the yogurt bacterium *Streptococcus thermophilus* and the metabolic activities induced in the simulated human gut, *Food Microbiology*, 53(A), 18-29, 2016

Uriot, O., Galia, W., Awussi, A.A., Perrin, C., Denis, S. et al. useo of the dynamic gastro-intestinal model TIM to explore the survival of the yogurt bacterium *Streptococcus thermophilus* and the metabolic activities induced in the simulated human gut, *Food Microbiology*, 53(A), 18-29, 2016

Valdés-Varela, L., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M. In vitro fermentation of different fructo-oligosaccharides by Bifidobacterium strains for the selection of synbiotic combinations, *International Journal of Food Microbiology*, 2(242), 19-23, 2017

Van de Wiele, T., Boon, N., Possemiers, S., Jacobs, H., Verstraete, W. Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects, *Journal of Applied Microbiology*, 102(2), p.452-460, 2007

Van den Broek, L.A.M., Hinz, S.W., Beldman, G., Vincken, J.P., Voragen, A.G. Bifidobacterium carbohydrases-their role in breakdown and synthesis of (potential) prebiotics, *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(1), 146-163, 2008

Ventura, M., Turroni, F., Lugli, G.A., van Sinderen, D. Bifidobactéria and humans: our special friends, from ecological to genomics perspectives, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(2), 163-168, 2014

Verspreet, J., Damen, B., Broekaert, W.F., Verneke, K., Delcour, J.A., Courtin, C.M. A critical look at prebiotics within the dietary fiber concept, *Annual Review of Food Science and Technology*, 7, 167-190, 2016

Vignoli, J.A, Viegas, M.C., Bassoli, D.G., Benassi, M. de T., Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees, *Food Research International*, 61, 279-285, 2014

Vitaglione, P., Fogliano, V., Pellegrini, N. Coffee, colon function and colorectal cancer, *Food & Function*, 3(9), 916-922, 2012

Vitali, B., Ndaqijmana, M., Maccaferri, S., Biagi, E., Guerzoni, M.E., Brigidi, P. An in vitro evaluation of the effect of probiotics and prebiotics on the metabolic profile of human microbiota, *Anaerobe*, 18(4), 386-391, 2012

Walker, A.W., Ince, J., Duncan, S.H., Webster, L.M., Holtrop, G. *et al.*Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota, *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 5(2), 220-230, 2011

Walker, A.W., Lawley, T.D. Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis, *Pharmacological Research*, 69(1), 75-86, 2013

Wall, R., Cryan, J.F., Ross, R.P., Ftizgerald, G.F., Dinan, T.G., Staton, C.Bacterial neuroactive compounds produced by psychobiotics, chapter 10, Em: Lyte, M.; Cryan, J.F. *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease*, Advances in Experimental Medicine and Biology 817, Springer New York 2014

Wang, G.F., Shi, L.P., Ren, Y.D., Liu, Q.F., Liu, H.F., Zhang, R.J., Li, Z., Zhu, F.H., He, P.L., Tang, W., Tao, P.Z., Li, C., Zhao, W.M., Zuo, J.P., Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid in vivo and in vitro, *Antiviral Research*, 83(2), 186-190, 2009

Wang, H. Y., Qian, H., Yao, W. R., Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity, *Food Chemistry*, 128(3), 573–584, 2011

Watson, D., Motherway, M.O'C., Schoterman, M.H.C., Joost van Neerven, R.J., Nauta, A., van Sinderen, D. Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobactéria, *Journal of Applied Microbiology*, 114(4), 1132-1146, 2013

Wei, F., Tanokura, M. Chemical changes in the components of coffee beans during roasting, Em: Preedy, V.R. *Coffee in health and disease prevention*, Academic Press, 2014, p.83-90

Westfall, S., Lomis, N., Kahouli, I., Dia, S.Y., Singh, S.P., Prakash, S.Microbiome,probiotics and neurodegenerative diseases: deciphering the gut brain axis, *Cellular and Molecular Life Sciences*, p.1-19, doi:10.1007/s00018-017-2550-9, 2017

WHO –World Health Organization, Consultations and workshops - Health implications of acrylamide in food, Report of a joint FAO/WHO headquarters, Geneva, Switzerland, 2002

Wolfrom, M .L., Patin, D. L., Carbohydrates of the Coffee Bean. IV. An Arabinogalactan, *The Journal of Organic Chemistry*, 30(12):4060-4063, 1965

Wolfrom, M. L., Lavex, M. L., Patin, D. L., Carbohydrates of the coffee bean. II. Isolation and characterization of a mannan, *The Journal of Organic Chemistry*, 26(11), 4533–4535, 1961

Wolfrom, M. L., Plunkett, R. A., Laver, M. L. Carbohydrates of the coffee bean., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 8(1), 58-65,1960

Xiao, J-Z. Commercially Available human Probiotic Microorganisms, *Bifidobacterium longum* BB536, Em: Lee, Y.K., Salminen, S. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, 2º edição, Wiley, 2009

Yasmin, A., Butt, M.S., Afzaal, M., van Baak, M., Nadeem, M.T., Shahid, M.Z. Prebiotics, gut microbiota and metabolic risks: unveiling the relationship, *Journal of Functional Foods*, 17, 189-201, 2015

Zarrati, M., Shidfar, F., Nourijelyani, K., Mofid, V., Hossein Zadeh-Attar, M.J., Bidad, K., Gheflati, Z., Chamari, M., Salehi, E. *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium* BB12, and *Lactobacillus casei* DN001 modulate gene expression of subset specific transcription

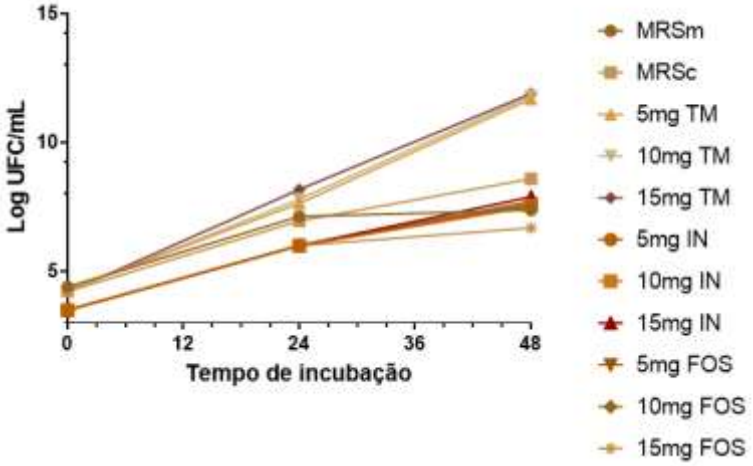
factors and cytokines in peripheral blood mononuclear cells of obese and overweight people, *Biofactors*, 39(6), 633-643, 2013

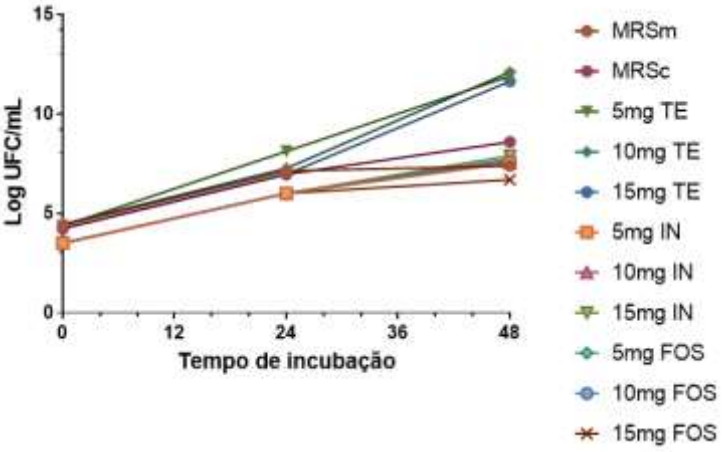
Ziar, H., Gérard, P., Riazi, A.Effect of prebiotic carbohydrates on growth, bile survival and cholesterol uptake abilities of dairy-related bacteria, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(6), 1184-1190, 2013

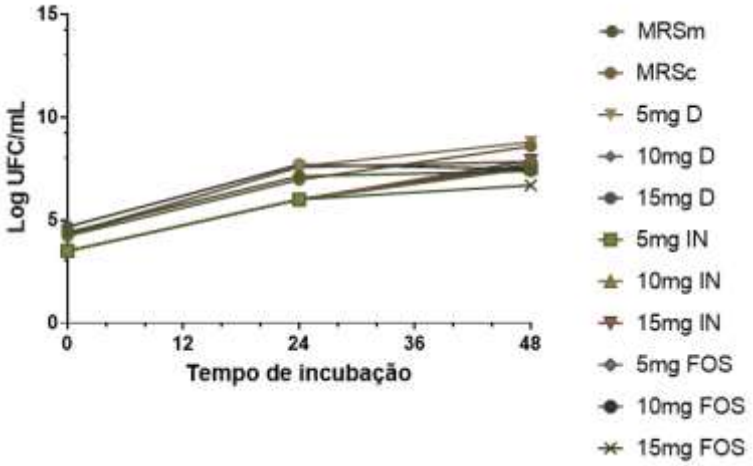
Zupancic, K., Kriksic, V., Kovacevic, I., Kovacevic, D.Influence of Oral Probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on Ear and Oral Cavity Health in Humans: Systematic Review, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 8(1), 53-59, 20

ANEXOS

Anexo 1: Figuras com as curvas da multiplicação obtidas com as médias de unidades formadoras de colônias de *Lactobacillus rhamnosus* GG na presença de extratos de cafés integrais e descafeinados, nos tempos 0, 24 e 48 horas.

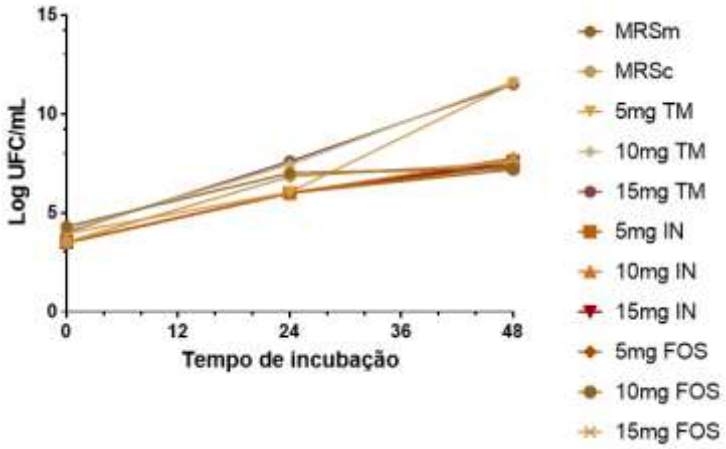


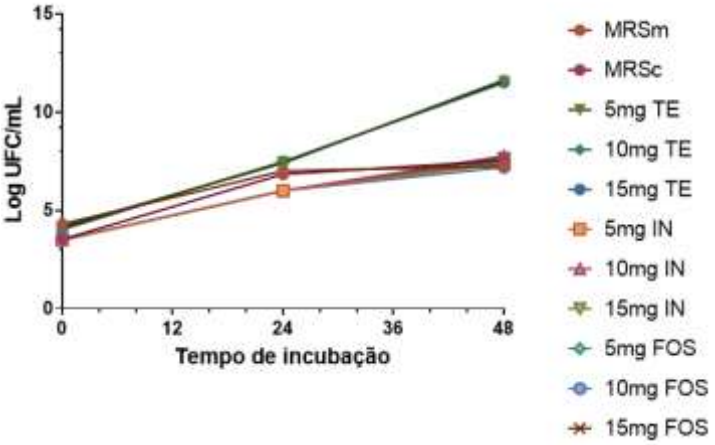


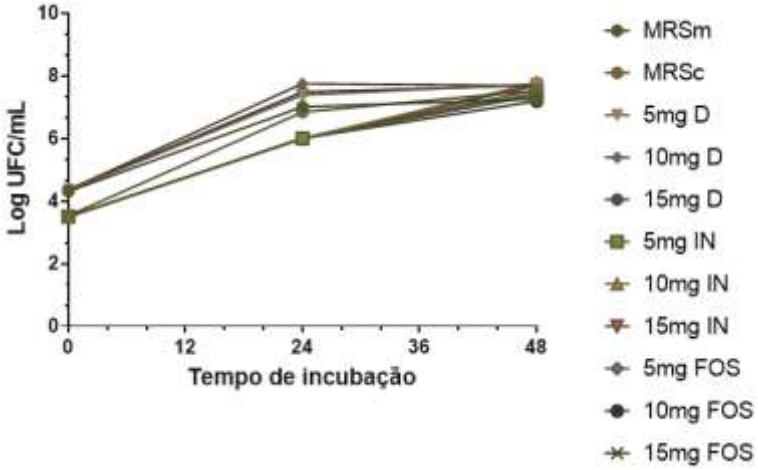


Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; TM – torra média; TE – torra escura; D – café descafeinado; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo.

Anexo 2: Figuras com as curvas da multiplicação obtidas com as médias de unidades formadoras de colônias de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 na presença de extratos de cafés integrais e descafeinados, nos tempos 0, 24 e 48 horas.

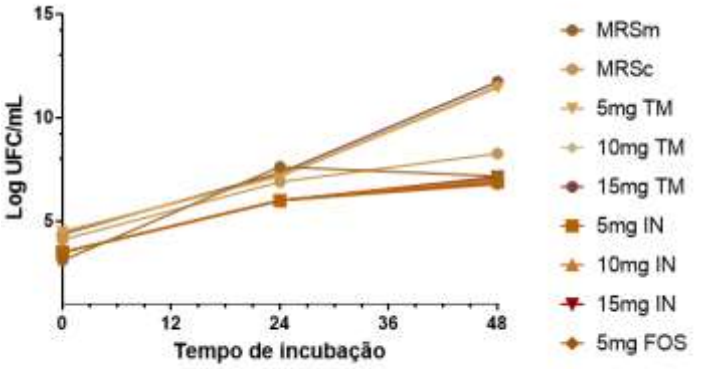


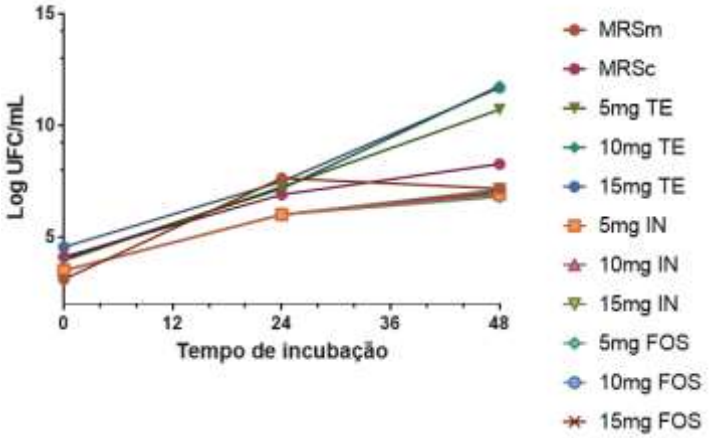


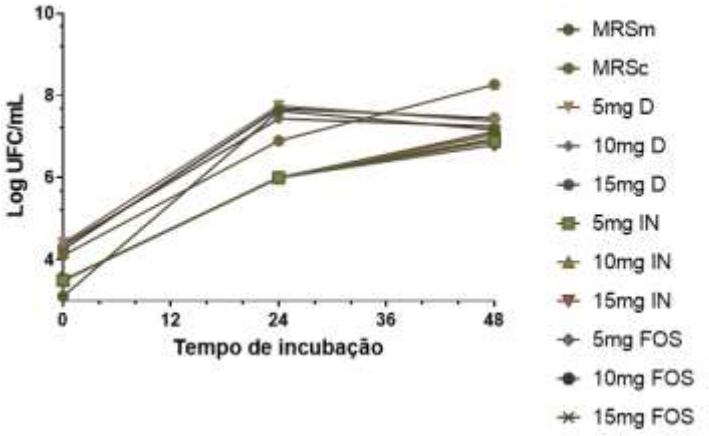


Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; TM – torra média; TE – torra escura; D – café descafeinado; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo.

Anexo 3: Figuras com as curvas de multiplicação obtidas com as médias de unidades formadoras de colônias de *Bifidobacterium animalis* DN-173010 na presença de extratos de cafés integrais e descafeinados, nos tempos 0, 24 e 48 horas.

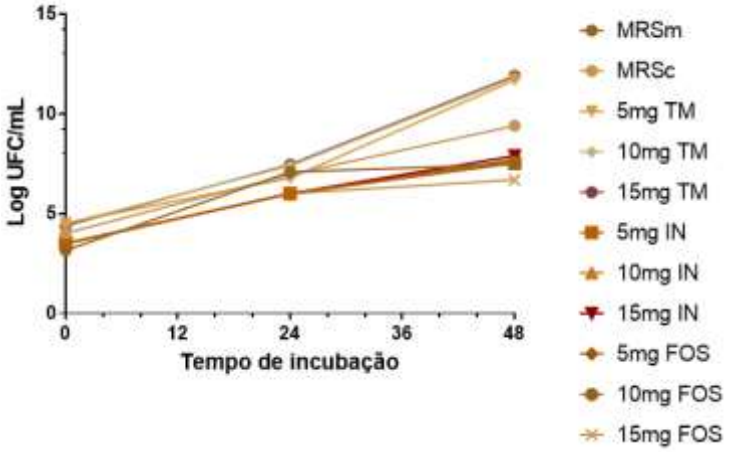


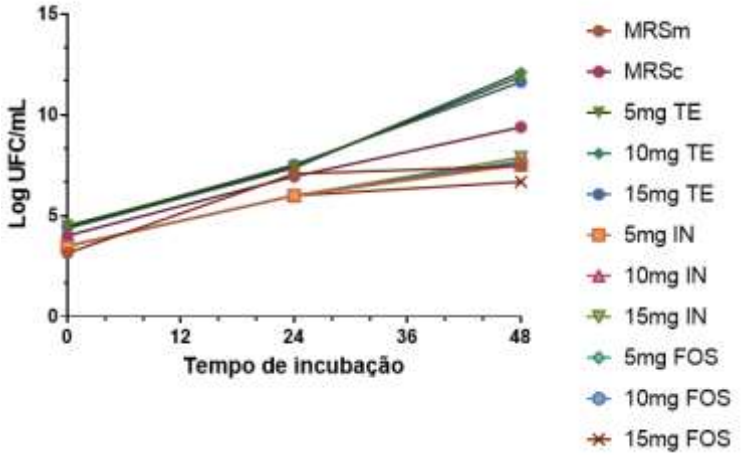


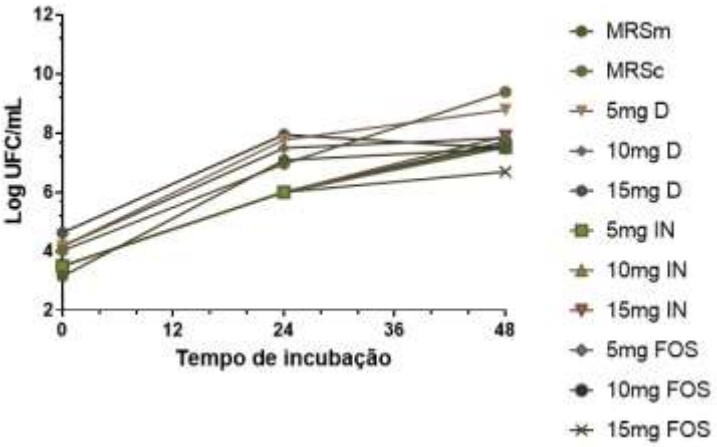


Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; TM – torra média; TE – torra escura; D – café descafeinado; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo.

Anexo 4: Figuras com as curvas da multiplicação obtidas com as médias de unidades formadoras de colônias de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12 na presença de extratos de cafés integrais e descafeinados, nos tempos 0, 24 e 48 horas.

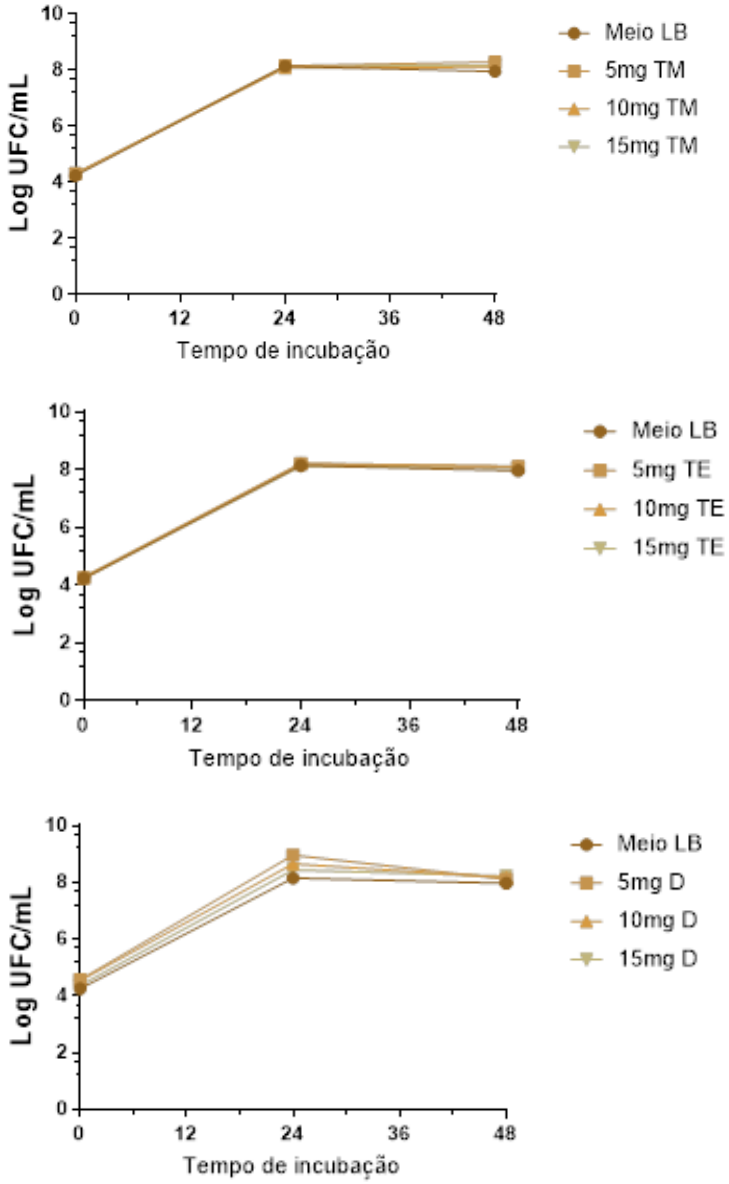






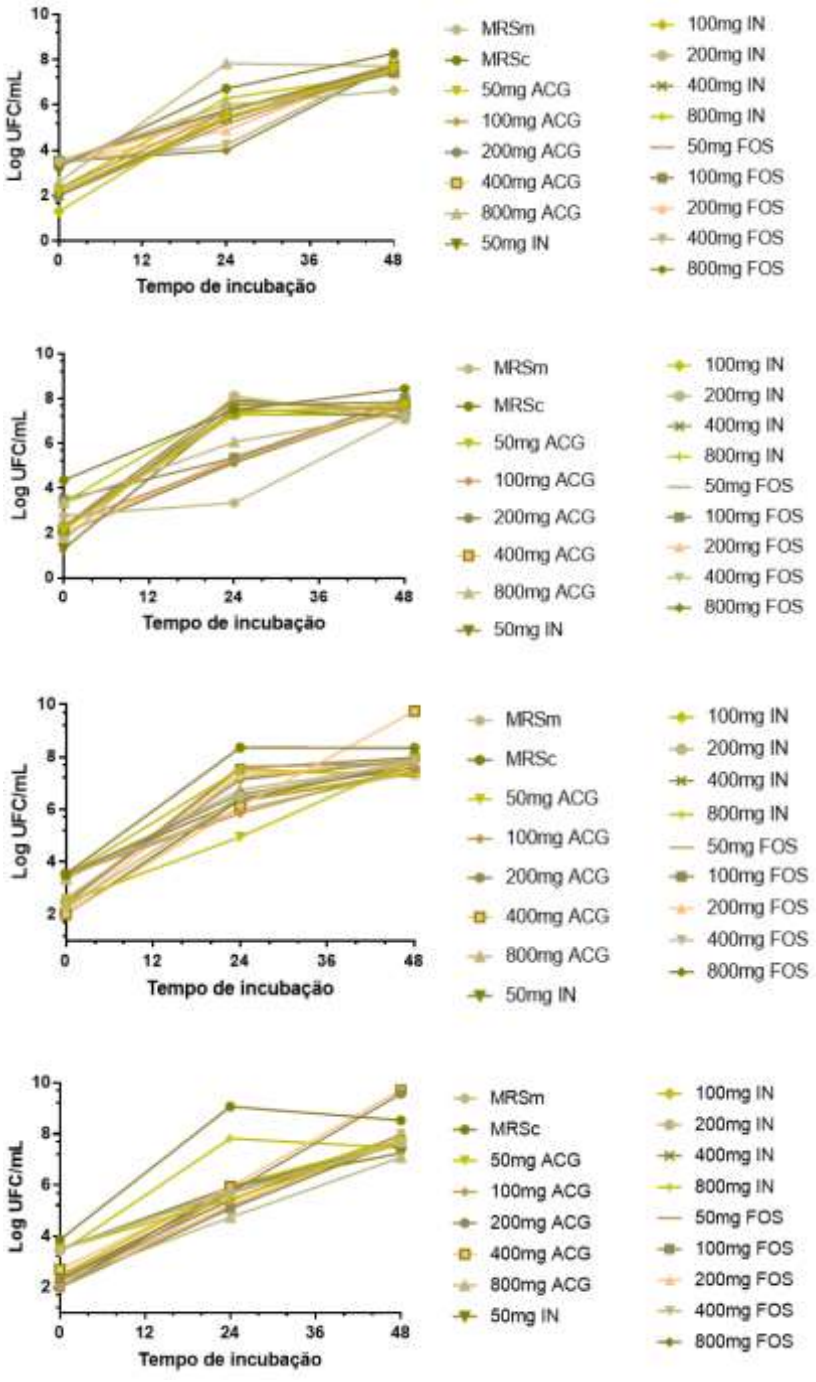
Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; TM – torra média; TE – torra escura; D – café descafeinado; IN – inulina; FOS – frutooligossacarídeo.

Anexo 5: Figuras com as curvas da multiplicação obtidas com as médias de unidades formadoras de colôniasde *Escherichia coli* na presença de extratos de cafés integrais e descafeinados, nos tempos 0, 24 e 48 horas.



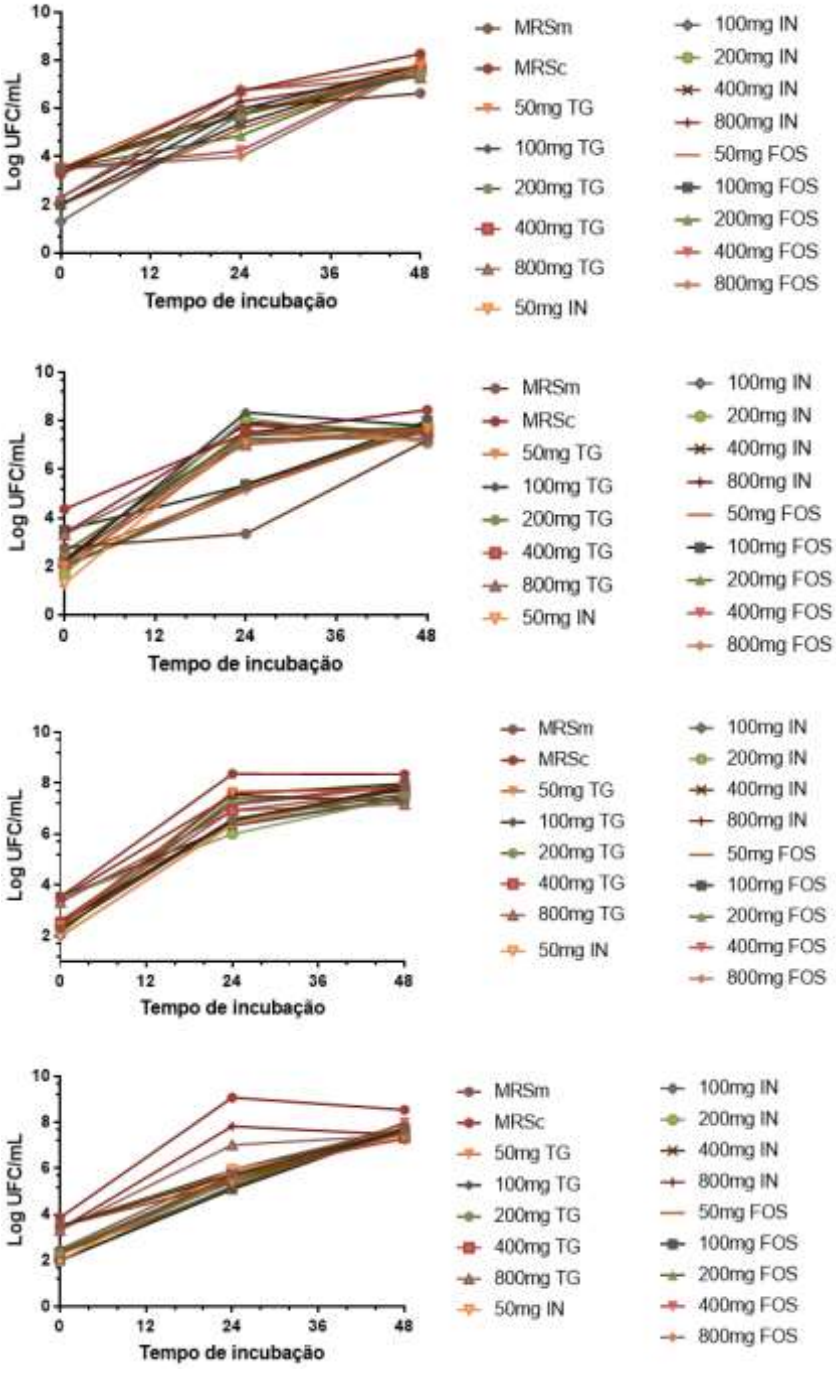
Nota: Meio LB – meio de cultura Luria-Bertani; TM – torra média; TE – torra escura; D – café descafeinado.

Anexo 6: Figuras com as curvas de multiplicação obtidas com as médias de unidades formadoras de colôniasde *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103, *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobcaterium animalis* DN-173010, *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12, respectivamente, na presença de ácidos clorogênicos, nos tempos 0, 24 e 48 horas.



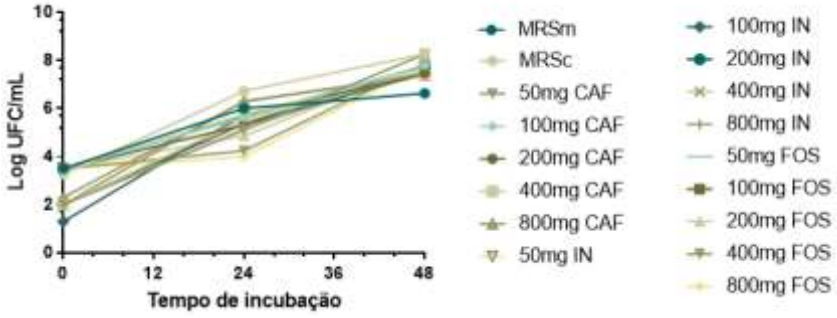
Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; ACG – ácidos clorogênicos; IN – inulina; FOS – fructooligossacarídeo.

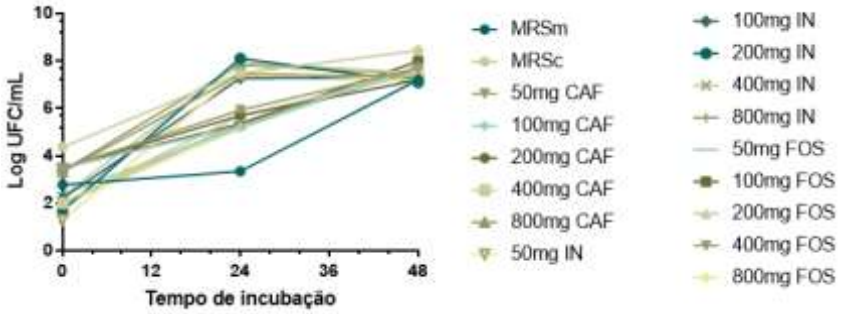
Anexo 7: Figuras com as curvas de multiplicação obtidas com as médias de unidades formadoras de colônias de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103, *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobcaterium animalis* DN-173010, *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12, respectivamente, na presença de trigonelina, nos tempos 0, 24 e 48 horas.

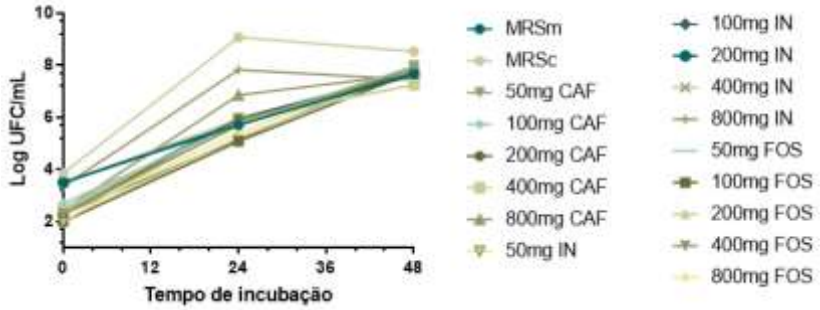


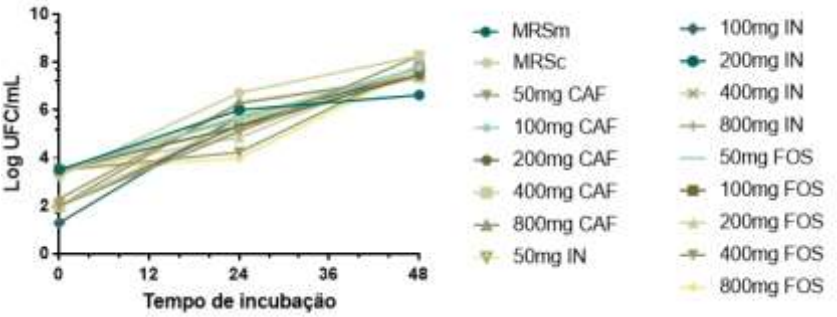
Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; TG - trigonelina; IN – inulina; FOS – fructooligossacarídeo.

Anexo 8: Figuras com as curvas de multiplicação obtidas com as médias de unidades formadoras de colônias de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103, *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobcaterium animalis* DN-173010, *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12, respectivamente, na presença de cafeína, nos tempos 0, 24 e 48 horas.



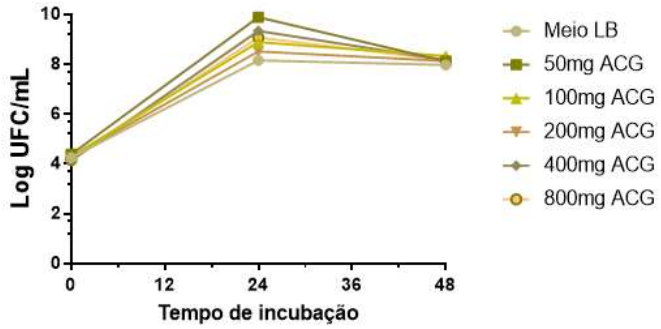


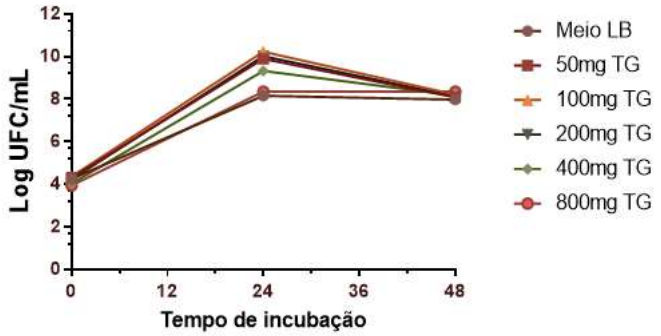


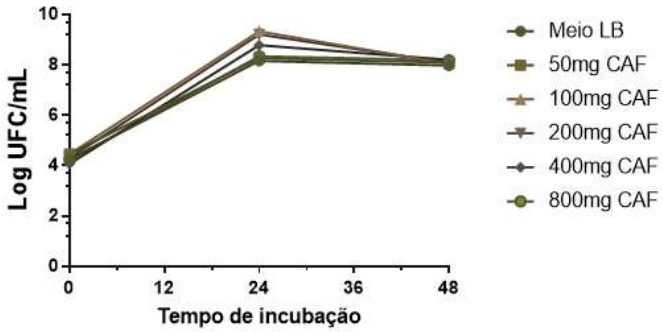


Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; CAF - cafeína; IN – inulina; FOS – fructooligossacarídeo.

Anexo 9: Figuras com as curvas da multiplicação obtidas com as médias de unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli* na presença de ácidos clorogênicos, trigonelina e cafeína, nos tempos 0, 24 e 48 horas.

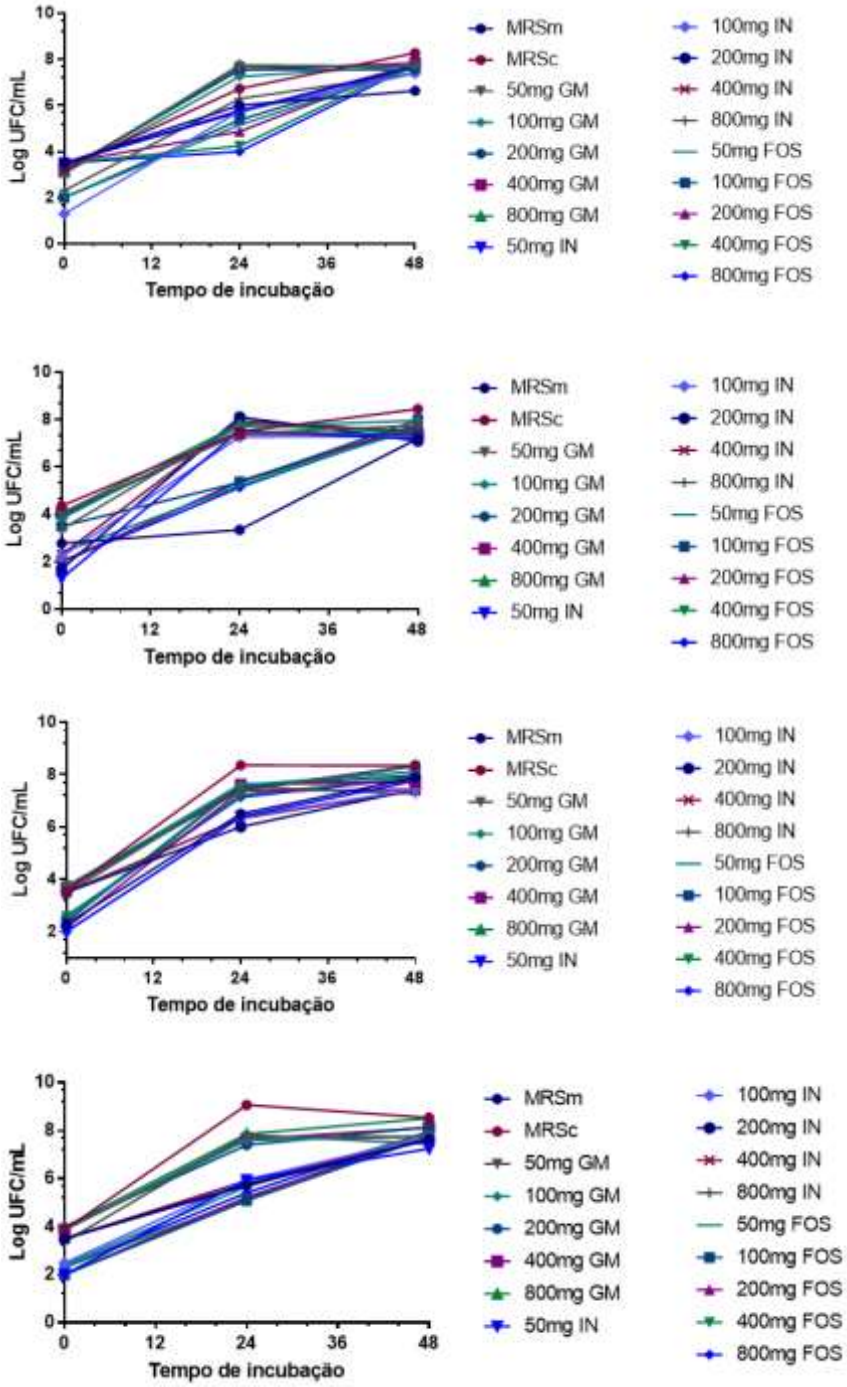






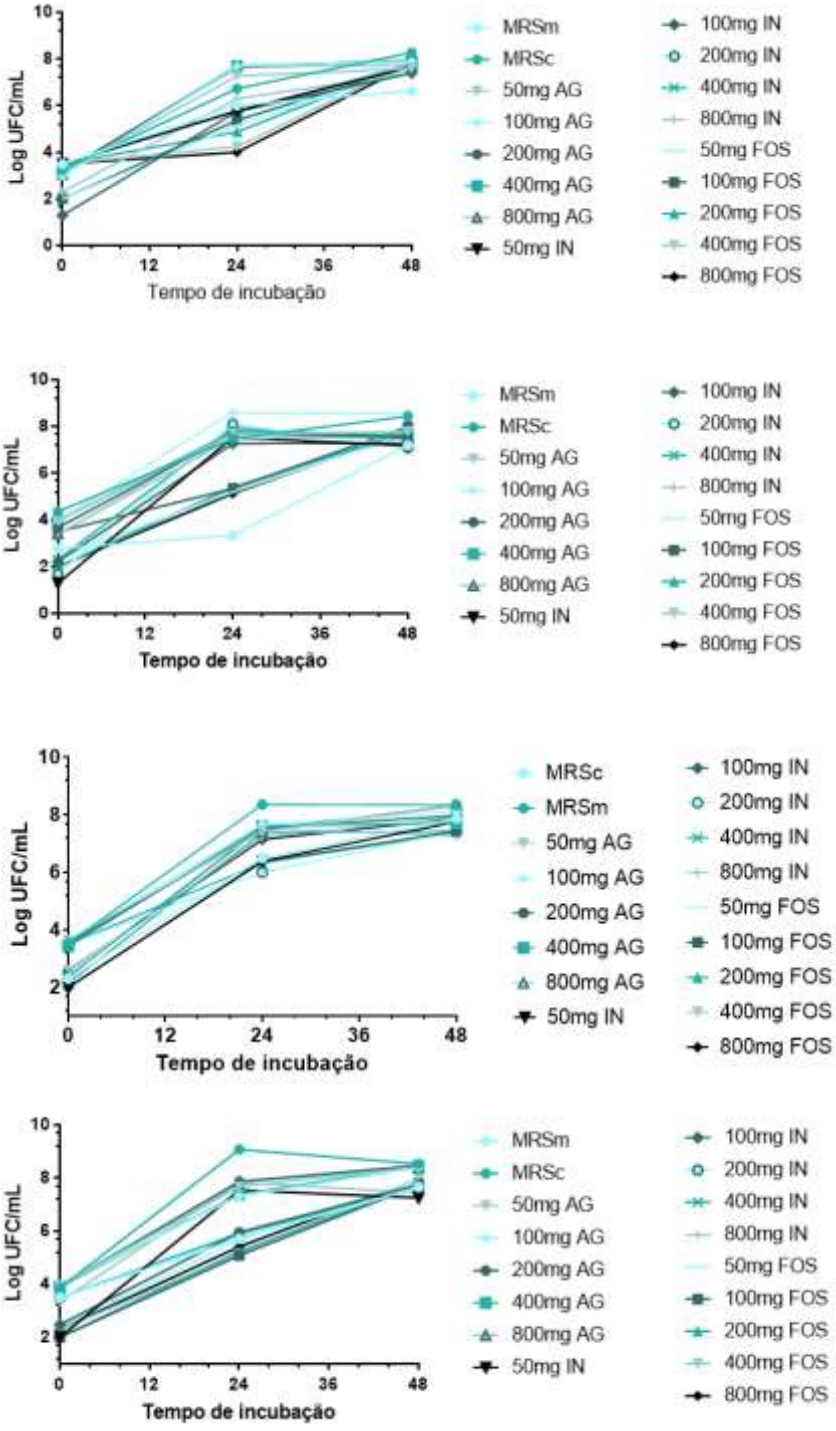
Nota: Meio LB – meio de cultura Luria-Bertani; ACG – ácidos clorogênicos; TG – trigonelina; CAF – cafeína

Anexo 10: Figuras com as curvas de multiplicação obtidas com as médias de unidades formadoras de colônias de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103, *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobcaterium animalis* DN-173010, *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12, respectivamente, na presença de galactomanana, nos tempos 0, 24 e 48 horas.



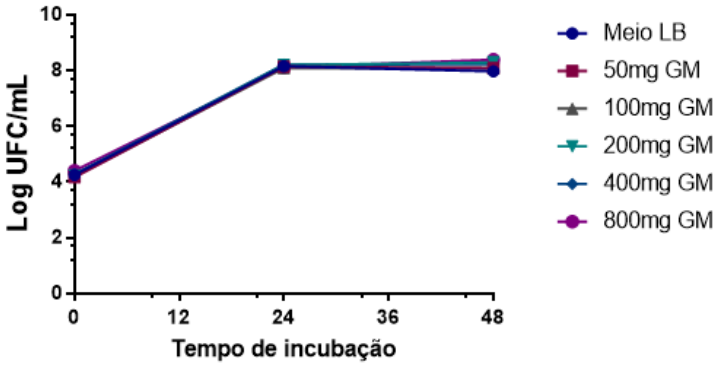
Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; GM - galactomanana; IN – inulina; FOS – fructooligossacarídeo.

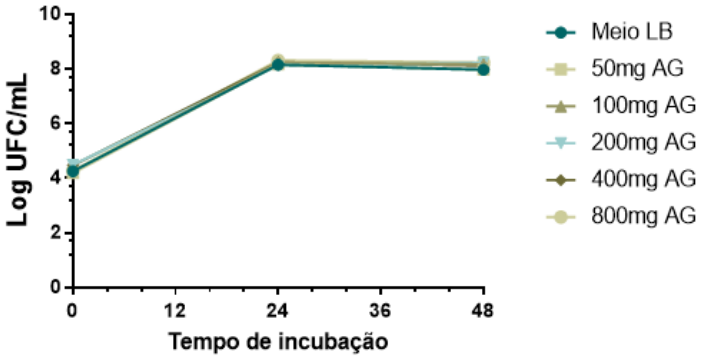
Anexo 11: Figuras com as curvas de multiplicação obtidas com as médias de unidades formadoras de colônias de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103, *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobcaterium animalis* DN-173010, *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* BB12, respectivamente, na presença de arabinogalactana, nos tempos 0, 24 e 48 horas.



Nota: MRSm – meio de cultura modificado; MRSc – meio de cultura convencional; AG – arabinogalactana tipo 2; IN – inulina; FOS – fructooligossacarídeo.

Anexo 12: Figuras com as curvas da multiplicação obtidas com as médias de unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli* na presença de galactomanana e arabinogalactana tipo 2, nos tempos 0, 24 e 48 horas.





Nota: Meio LB – meio de cultura Luria-Bertani; GM – galactomanana; AG – arabinogalactana tipo 2.