



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

INGRYDT DE ALCÂNTARA ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA CAFEÍNA NO CONTROLE DE INFECÇÃO
EXPERIMENTAL DE MACRÓFAGOS POR *Salmonella Typhimurium***

Recife, 2019

INGRYDT DE ALCÂNTARA ALMEIDA

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho

Co-orientadora: Me. Lethicia Souza Tavares

Recife, 2019

INGRYDT DE ALCÂNTARA ALMEIDA

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho
Depto. de Biologia
Orientador

Me. Lethicia Souza Tavares
Mestre em Biociência Animal
Co-orientadora

Prof. Dr. Cláudio Augusto Gomes da Câmara
Deptº de Química - UFRPE
Examinador

Profª Drª. Jaqueline Bianque de Oliveira
Deptº de Biologia
Examinadora

Me. Renata Valença Vaz
Mestre em Ciência Animal Tropical
Suplente

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

A447a Almeida, Ingridt de Alcântara
Avaliação da cafeína no controle da infecção experimental de
macrófago por *Salmonella Typhimurium* / Ingridt de Alcântara Almeida
– Recife, 2019.
39 f.: il.

Orientador: José Vitor Moreira Lima Filho.

Coorientadora: Lethicia Souza Tavares.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Ciências
Biológicas, Recife, BR-PE, 2019.

Inclui referências e apêndice(s).

1. Imunomodulador 2. Salmonelose 3. Macrófagos peritoneais
I. Lima Filho, José Vitor Moreira, orient. II. Tavares, Lethicia Souza,
coorient. III. Título

CDD 574

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Nivaldo Almeida e Eneide Macêdo pelo apoio incondicional em todo e qualquer momento. Este título é para vocês.

A universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Departamento de Biologia da mesma pelos recursos disponibilizados para minha formação.

Aos meus professores desta longa jornada, pelo conhecimento e atenção prestados. Irei levar um pouco de cada um em minha bagagem.

Ao meu professor e orientador, Dr. José Vitor Moreira Lima Filho, pela confiança, paciência e investimento. Obrigada pela experiência proporcionada durante meu estágio no Laboratório de Microbiologia e Imunologia (LAMIM) e por toda que ainda virá. Espero ter uma parte do seu conhecimento e dedicação à pesquisa um dia. Obrigada por tudo!

A minha co-orientadora, Lethicia Souza Tavares por não ter medido esforços para me ajudar durante todo meu tempo no LAMIM. Agradeço por sua dedicação, ensinamentos, sugestões, orientações e muitas outras coisas. Esse trabalho tem o nosso suor. Serei eternamente grata.

Aos integrantes e amigos de laboratório. A Betty pelos auxílios nos experimentos e dúvidas. Lucas e Rafael pela amizade e troca de conhecimentos. A Renata por está sempre presente com seus conselhos e paciência em ensinar. Vocês tornaram meus dias mais felizes. Muito obrigada!

Ao PET-Biologia por ter sido essencial no meu crescimento acadêmico e pessoal. Aos seus integrantes e amigos Carlos, Rayssa, Jaiane e todos os demais, e a minha eterna tutora Prof^a Dr^a. Jaqueline Bianque ao qual eu tenho a honra de ter na banca avaliadora deste presente trabalho, por ser um ser excepcional. Minha admiração por ti é imensa. Obrigada aos meus amigos de graduação por estarem sempre comigo, em especial a Fernanda Guedes e Luís Ricardo.

Meu muito obrigada a todos.

Ingrydt de Alcântara Almeida

RESUMO

A Salmonelose é uma doença infecciosa transmitida principalmente por alimentos contaminados por bactérias do gênero *Salmonella*, dentre elas a *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium, que pode causar gastroenterites até sepse e choque séptico em grupos de risco. Compostos orgânicos com fins farmacológicos estão sendo cada vez mais testados. Dentre estes compostos, a cafeína (1,3,7 trimetilxantina), uma das substâncias de cunho farmacológico e psicoestimulante mais consumida no mundo. Vários estudos demonstram seu papel como adjuvante terapêutico, imunomodulador e antagonista dos receptores de adenosina (ARs). Diante disto, objetivou-se avaliar o potencial imunomodulatório da cafeína em macrófagos peritoneais infectados com *Salmonella enterica* Sor. Typhimurium. Para isto, foram realizados testes *in vitro* com culturas de macrófagos expostos a concentrações de cafeína para determinar o grau de citotoxicidade do composto; testes curativos e preventivos de viabilidade celular, a fim de avaliar a sobrevivência celular e quantificação de bactérias intracelulares, visando analisar a depuração do patógeno do meio intracelular. Também foi realizado o teste atividade antibacteriana direto com o intuito de avaliar a eficácia da cafeína em inviabilizar o desenvolvimento de *S. Typhimurium*. Os resultados demonstraram que a cafeína não produziu um efeito tóxico aos macrófagos não infectados nas concentrações utilizadas, promoveu uma maior viabilidade dos macrófagos infectados, mas não foi capaz de atuar como bactericida direto. A cafeína contribuiu na sobrevivência dos macrófagos infectados com *S. Typhimurium*, tendo potencial para o controle de infecções bacterianas.

Palavras-chave: Imunomodulador; Salmonelose; Macrófagos peritoneais

ABSTRACT

Salmonellosis is an infectious disease transmitted mainly by foods contaminated with bacteria of the genus *Salmonella*, among them *Salmonella enterica* serotype Typhimurium, which can cause gastroenteritis until sepsis and septic shock in groups at risk. Organic compounds for pharmacological purposes are being increasingly tested. Among these compounds, caffeine (1,3,7-trimethylxanthine), one of the most used pharmacological and psychostimulant substances in the world. Several studies have demonstrated its role as a therapeutic adjunct, immunomodulator and adenosine receptor antagonist (ARs). In view of this, the objective was to evaluate the immunomodulatory potential of caffeine in peritoneal macrophages infected with *Salmonella enterica* Sor. Typhimurium. For this, *in vitro* tests were performed with cultures of macrophages exposed to caffeine concentrations to determine the degree of cytotoxicity of the compound; curative and preventive tests of cell viability, in order to evaluate cellular survival and quantification of intracellular bacteria, aiming to analyze the clearance of the pathogen from the intracellular medium. A direct antibacterial activity test was also carried out to evaluate the efficacy of caffeine in preventing the development of *S. typhimurium*. The results demonstrated that caffeine did not produce a toxic effect on the uninfected macrophages at the concentrations used, promoted a greater viability of the infected macrophages, but was not able to act as a direct bactericide. Caffeine contributed to the survival of macrophages infected with *S. Typhimurium*, having potential for the control of bacterial infections.

Keywords: Immunomodulator; Salmonellosis; Peritoneal macrophages

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Visão geral da *Coffea arabica* 12
- Figura 2: Fórmula química das metilxantinas 13
- Figura 3: Estrutura química da cafeína (1,3,7 trimetilxantina) 14
- Figura 4: Viabilidade celular após a exposição de macrófagos peritoneais à cafeína. Todos os valores são apresentados como média de triplicata técnica, (ANOVA, Teste de Bonferroni)..... 26
- Figura 5: Efeito da cafeína no controle de infecção por *S. Typhimurium* no tratamento curativo. (A) Carga bacteriana intracelular. (B) Viabilidade celular de macrófagos. *P< 0,05 por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Comparação com o controle infectado e não tratado. 28
- Figura 6: Efeito da cafeína no controle de infecção por *S. Typhimurium* no tratamento preventivo. (A) Carga bacteriana intracelular. (B) Viabilidade celular de macrófagos. *P< 0,05 por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Comparado com o grupo infectado não tratado..... 29
- Figura 7: Teste de atividade bacteriana direta com cafeína frente à *S. Typhimurium* após 24 horas de tratamento. Todos os valores são apresentados como média \pm EE. *(P<0,05), (ANOVA, Teste de Bonferroni). 31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	Produção e consumo de café no Brasil e no mundo	11
2.2	Gênero <i>Coffea</i>	11
2.3	Metilxantinas	12
2.3.1	Cafeína	14
2.1.1.1	Ações imunológicas da cafeína.....	15
2.4	O gênero <i>Salmonella</i>	16
2.5	Antibióticos e adjuvantes terapêuticos	18
3	OBJETIVOS.....	20
3.1	Objetivo geral	20
3.2	Objetivos específicos	20
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	Obtenção da cafeína (1,3,7 trimetilxantina).....	21
4.2	O micro-organismo.....	21
4.3	Os animais	21
4.4	Obtenção dos macrófagos	21
4.5	Ensaio de citotoxicidade.....	22
4.6	Infecção e tratamento de Møp.....	22
4.7	Teste de atividade antibacteriana direta.....	24
4.8	Análise estatística	24
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5	CONCLUSÃO	32
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas assolam a humanidade há séculos e já mataram mais pessoas do que as grandes guerras. Várias dessas doenças são causadas por bactérias e consideradas problema de saúde pública, adquiridas por falta de saneamento básico. Em 2015, a Organização Mundial da Saúde (OMS) alertou que as doenças adquiridas pela ingestão de alimentos contaminados produzem 351 mil vítimas por ano e, dentre os principais agentes etiológicos, estão bactérias do gênero *Salmonella*. A *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium é uma espécie encontrada principalmente em carne de aves, ovos e leite não pasteurizado, causando a Salmonelose.

Esta infecção pode causar uma simples gastroenterite, levando a episódios diarreicos e regredindo espontaneamente em alguns dias, mas pode ser mais grave quando acomete crianças, idosos ou indivíduos imunocomprometidos, produzindo alto grau de desidratação ou sepse. Após a ingestão de alimento contaminado, a bactéria adere e prolifera na parte distal do intestino delgado, invadindo as células do epitélio intestinal, causando uma cascata de reações inflamatórias locais. Eventualmente, a bactéria transloca do lúmen intestinal alcançando a corrente sanguínea e se disseminando em diferentes órgãos.

O tratamento das salmoneloses envolve essencialmente a utilização de antibióticos. Vacinas estão disponíveis apenas para prevenção da febre tifóide, causada pelo sorotipo Typhi. O presente estudo propõe a investigação de compostos com propriedades imunoterapêuticas – metilxantinas – para utilização como adjuvantes terapêuticos na prevenção e/ou controle da salmonelose. As metilxantinas são conhecidas por seu alto poder estimulante do sistema nervoso central. A 1,3,7 trimetilxantina (cafeína), em particular, tem sido investigada por atuar como antagonista de receptores de adenosina (ARs), tendo como consequência a ativação destes receptores nas células do sistema imunológico.

Considerando que a ativação de ARs poderia levar à supressão de citocinas pró-inflamatórias (HORRIGAN *et al.*, 2006), no presente estudo, modelos de infecção *in vitro* com *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium foram utilizados a fim de avaliar a influência da cafeína em macrófagos infectados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção e consumo de café no Brasil e no mundo

O Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo, tendo movimentado cerca de US\$ 5,2 bilhões em 2017. Devido à sua diversidade de clima e relevo, o país oferece uma grande variedade de grãos, atendendo ao paladar e preços dos consumidores brasileiros e estrangeiros. Ainda no Brasil, o plantio do café ocupa uma área de 2 milhões de hectares, distribuídos em mais de 11 estados. A espécie mais cultivada é a do tipo arábica (*Coffea arabica* L.), representando cerca de 80% dos cultivares, tendo o plantio concentrado no estado de Minas Gerais (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2017). Mundialmente, há previsão de uma produção mundial de 104,01 milhões de sacas de café arábica para o ano de 2019, intitulado como ano cafeeiro, sendo a segunda temporada consecutiva de superávit (Organização Mundial do Café, 2018; EMBRAPA, 2019).

Segundo a Embrapa (2017), os brasileiros ocupam a segunda colocação no ranking mundial de consumidores de café, correspondendo, em 2017, a 21,5 milhões de sacas. Deste modo, estima-se que até o ano de 2021, o Brasil consuma 25 milhões de sacas anuais, aproximando-se dos Estados Unidos, ocupante do primeiro lugar de consumidores mundiais de café. Conforme o relatório da ABIC (Associação Brasileira da Indústria de Café), no ano de 2017, a ingestão de café pelos brasileiros aumentou 3,5% em relação ao ano anterior, relacionando este fato por ser uma bebida tradicional e de consumo diário.

2.2 Gênero *Coffea*

O cafeeiro é uma planta pertencente à família Rubiaceae, com cerca de 500 gêneros e 6.000 espécies. O Gênero *Coffea* foi descrito por Lineu em 1753, mas até hoje há uma imprecisão na classificação sistemática deste gênero (International Coffee Organization, 2018). É caracterizada por ser uma planta perene, dicotiledônea, com porte arbustivo ou arbóreo, caule lenhoso, folhas persistentes e flores hermafroditas; tem uma altura média de 3 a 5 metros, com tronco de 8 a 10 centímetros e raízes de até 1 metro de profundidade (CLARKE E MACRAE, 1989). As duas espécies economicamente mais importantes são *Coffea arabica* (Figura 1),

com 60% da produção mundial, e *C. canephora* (International Coffee Organization, 2018).

Figura 1: Visão geral da *Coffea arabica*



Fonte: http://florawww.eeb.uconn.edu/images/byspecies/Coffea_arabica03.jpg. Acesso em: 21 jan 2019.

A espécie de maior valor comercial é *C. arabica*, originária da Etiópia e amplamente cultivada no Brasil e Colômbia. Possui caule ereto e delgado, folhas verde-escuras e ovais, as flores são estreladas na cor branca, e os frutos são em forma de bagas vermelhas ou amarelas contendo cada uma com duas sementes (CARVALHO *et al.*, 1991).

2.3 Metilxantinas

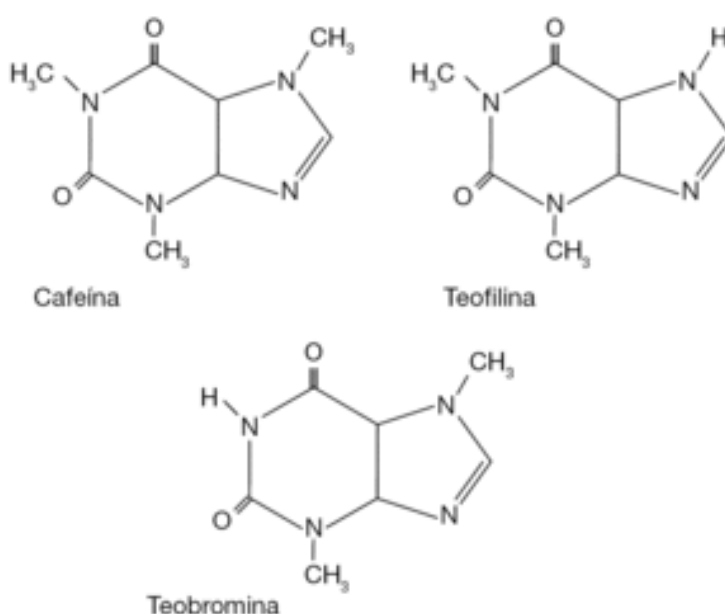
As metilxantinas são alcalóides purínicos encontradas em várias fontes vegetais como o guaraná, café, chá-preto, erva-mate, cacau e noz de cola. Apresentam bastante importância na indústria alimentícia e farmacêutica, sendo a cafeína (1,3,7 trimetilxantina), teofilina (1,3 trimetilxantina) e teobromina (3,7 dimetilxantina) as mais numerosas neste grupo (ARAGÃO *et al.*, 2009). O mais comum dentre os três é a cafeína, encontrada em chás, cafés, produtos de cacau e bebidas à base de cola. Estudos mostram que a cafeína produz efeitos na fisiologia humana, tais como:

estimulação do SNC, do músculo cardíaco, do sistema respiratório e da secreção do suco gástrico (JAMES, 1991.; ALVES E BRAGAGNOLO, 2002). A teofilina, por sua vez, é encontrada em produtos de cacau e tem ação diurética, enquanto a teobromina é encontrada em variedades de chás, tendo principalmente o efeito broncodilatador (HARKINS *et al*, 1998.; ALVES E BRAGAGNOLO, 2002).O registro mais antigo do consumo de bebidas contendo xantinas data 2.737 a.C., quando o imperador chinês Seng Nung consumia o chá-da-índia. Já o uso do café como bebida quente veio surgir na Arábia em 1.000 d.C.

O conhecimento científico das metilxantinas iniciou em 1776, quando Carl Wihelm von Scheele isolou ácido úrico de cálculos biliares e da urina humana. Após 100 anos, Hermann Fischer sugeriu que os isolados da pesquisa de von Scheele seriam compostos quimicamente parecidos chamados “purinas”, incluindo compostos biologicamente ativos como as metilxantinas (NABAS, 2019).

Por terem formas estruturais semelhantes (Figura 2), as ações farmacológicas das xantinas são bem parecidas entre elas. Os mecanismos biológicos estudados para estes compostos são a inibição da fosfodiesterase aumentando o AMPc intracelular, influência na concentração de cálcio dentro da célula, desacoplamento de cálcio intracelular favorecendo elementos contráteis musculares, atuando como antagonista dos receptores de adenosina (BUENO, 2003).

Figura 2: Fórmula química das metilxantinas

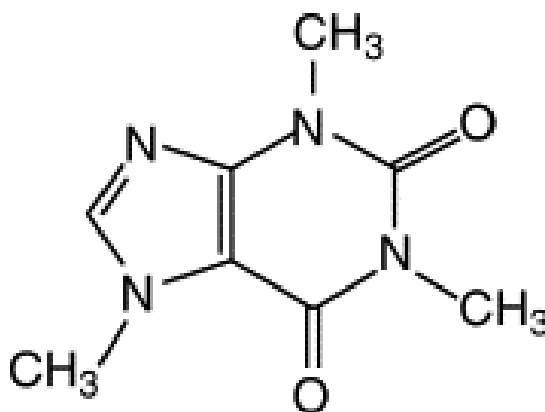


Fonte: Moratalla, 2008

2.3.1 Cafeína

De fórmula química $C_8H_{10}N_4O_2$, a cafeína (1,3,7-trimetilxantina) (Figura 3), presente no café, é um alcalóide xantínico que possui estrutura relacionada às bases purínicas do DNA. Por ser bastante difundida, é possível que seja a substância farmacologicamente ativa mais ingerida no mundo, pois constitui inúmeros medicamentos de venda livre. (MATIJASEVICH, 2005). A cafeína foi isolada a partir do chá (*C. sinensis*) e do café (*C. arabica*) por Friedlieb Runge em 1820 (ANAYA *et al.*, 2006).

Figura 3: Estrutura química da cafeína (1,3,7 trimetilxantina)



Fonte: Horrigan *et al.*, 2006

A cafeína é relatada como fármaco adjuvante, quando combinada a analgésicos e anti-inflamatórios no controle da dor tensional e enxaqueca. O efeito antinociceptivo da cafeína ocorre pelo bloqueio de receptores de adenosina, que são importantes para sensibilização dos nociceptores na transmissão do sinal doloroso. A cafeína também provoca alterações na síntese e atividade de enzimas ciclo-oxigenases, melhorando a ação analgésica de diversos fármacos indicados para o controle da dor aguda e crônica (VICENTINI *et al.*, 2013).

Recentemente vem sendo reconhecida a participação dos receptores de adenosina (AR's) nos processos cognitivos (PAGNUSSAT, 2015). A adenosina é um nucleosídeo endógeno que participa de várias funções biológicas, como biossíntese de nucleotídeos e metabolismo energético celular (ELTZSCHING, 2009).

A adenosina age a partir da ligação com receptores presentes na proteína G (PAGNUSSAT, 2015). Como exemplo desses receptores estão o A₁ e A_{2A}. Os receptores de adenosina A₁ estão presentes em áreas do sistema nervoso central (SNC), como córtex, cerebelo e medula espinhal (RIBEIRO *et al.*, 2003) e possuem um papel inibitório frente à liberação de glutamato, adenilato ciclase, transmissão excitatória do SNC e oferecem neuroproteção contra danos cerebrais (FREDHOLM *et al.*, 2005). Atua também no sistema imunológico, com ações anti e pró-inflamatórias (ANTONIOLI *et al.*, 2016). Já o receptor A_{2A}, encontra-se no bulbo olfatório e estriado, estimulando a adenilato ciclase (enzima que transforma ATP em AMPc) e atuando como antagonista aos efeitos inibitórios dos receptores A₁ frente a liberação de glutamato (ELTZSCHING, 2009). No sistema imune, A_{2A} é capaz de inibir a inflamação pela indução de AMPc (CRUZ, 2016) e desencadeia efeitos anti-inflamatórios em células específicas em diferentes modelos de infecção (HASKÓ E PACHER, 2008)

A cafeína é um antagonista não seletivo dos receptores de adenosina (CRUZ, 2016), bloqueando a atividade natural da adenosina naquele receptor. Com este efeito, a cafeína pode tanto antagonizar os efeitos da adenosina, podendo ser citoprotetor, bloqueando o receptor A_{2A}, quanto citotóxico, bloqueando A₁ (FREDHOLM *et al.*, 1999).

2.3.1.1 Ação imunológica da cafeína

Segundo Horrigan *et al.*(2006), existem várias evidências que a cafeína e seus metabólitos afetam o funcionamento do sistema imunológico, podendo modular aspectos da imunidade inata e adaptativa. Estudos mostram que a cafeína afeta a produção de citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-10 (VAN FURTH *et al.*, 1995), assim como a proliferação de linfócitos (HORRIGAN *et al.*, 2005). O trabalho de Horrigan *et al.* (2006), mostrou que a cafeína pode exercer papel tanto inflamatório quanto anti-inflamatório, dependendo da dose e concentração endógena da adenosina presente no local da inflamação. Brothers *et al.* (2010) demonstraram que o tratamento com

cafeína atenuou a inflamação induzida por LPS em modelos de neuroinflamação, comprovando a ação anti-inflamatória da cafeína. Em contrapartida, Montesinos *et al.*(2000) descreveram que metilxantinas como a cafeína, podem reverter a ação de um medicamento que impede a inflamação em casos de artrite inflamatória.

2.4 O gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae. É caracterizado por apresentar morfologia de bacilos gram-negativos, motilidade por flagelos peritríquios, anaeróbios facultativos, largura de 0,7 e 1,5 µm e comprimento de 2,0 a 5,0 µm. Possui temperatura ótima de crescimento em torno dos 37°C, podendo se desenvolver entre 5 e 45°C, sensível a altas temperaturas (SILVA, 2006, MENDONÇA, 2016). Podem ser encontrados como habitantes comuns do trato intestinal de vários animais, tais como aves domésticas, mamíferos, répteis, anfíbios e até mesmo insetos (DOUGAN *et al.*, 2011, TORTORA *et al.*, 2005).

Este gênero é constituído por duas espécies: *S. bongori* e *S. enterica*, sendo a última potencialmente infecciosa para aves e mamíferos (FORSYTHE, 2002). A espécie *S. enterica* é subdividida em seis sub-espécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp. *diarizoane*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae* e *S. enterica* subsp. *indica* (POPOFF E LE MINOR, 1997). *S. enterica* subsp. *enterica* possui mais de 2.500 sorotipos, classificados de acordo com fatores antigênicos e diferenciados com escrita maiúscula e não itálica, por exemplo: *S. enterica* subsp. *enterica* Sor. Typhimurium ou apenas *S. Typhimurium* (DOUGAN *et al.*, 2011).

Infecções por *Salmonella* são um sério problema de saúde pública devido ao fato de estarem presentes em diversos surtos infecciosos (LOURENÇO *et al.*, 2004). Bem distribuída mundialmente, sua constituição genética faz com que ela se adapte a vários ambientes (SÁNCHEZ-VARGAS *et al.*; ABU-EL-HAIJA; GÓMEZ-DUARTE, 2011). Podem estar presentes em água, solo e fezes, facilitando sua disseminação em condições sanitárias precárias (SCALLAN *et al.*, 2011). Encontradas normalmente em animais domésticos, qualquer alimento que venha desses animais ou que tenha entrado em contato com suas fezes, são considerados como uma das principais vias de infecção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). O primeiro caso conhecido de Salmonelose foi registrado em 1888, na Alemanha, quando 50

peças ficaram doentes após consumirem carne moída de uma mesma vaca contaminada (ABBAS *et al*, 2008).

Embora a *Salmonella* habitualmente seja relacionada a produtos de origem animal, água, legumes e frutas, quando contaminados, também transmitem a Salmonelose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Pele lesionada, conjuntiva e trato respiratório também podem representar importância na transmissão da doença (SCHWARTZ, 2000). O desenvolvimento da doença é variado e depende estritamente da resposta individual de cada hospedeiro. A gastroenterite é o quadro mais comum associado a indivíduos saudáveis, com sintomas que envolvem febre moderada, acompanhada de náuseas, dor abdominal, vômito e diarreia (TORTORA *et al*, 2005). Infecções mais graves acontecem em crianças, idosos e pessoas com o sistema imunológico comprometidos, considerados como grupos de risco, podendo ser fatal devido choque séptico, dado a sensibilidade do sistema imunológico (PINTO *et al*, 2004). Ainda é observado que o tipo de alimento ingerido e quantidade de células bacterianas são fatores agravantes dos sintomas (SHINOHARA *et al*, 2008). O número de células necessárias para infectar um adulto saudável no sorotipo Typhimurium pode variar entre 10^5 a 10^8 em alimento contaminado, sendo esta quantidade menor para hospedeiros pertencentes aos grupos de risco (MENDONÇA *et al.*, 2016).

O Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2019) estima que bactérias do gênero *Salmonella* causam cerca de 1 milhão de doenças, 23 mil hospitalizações e 450 mortes anualmente nos EUA. Conforme relatório epidemiológico do Brasil pelo Ministério da Saúde (2016), entre 2007 e 2016, mais de 90% das doenças transmitidas por alimentos foram causadas por bactérias, estando a *Salmonella* em primeiro lugar nas infecções.

Após a ingestão de alimentos ou água contaminados, a salmonelose tem período de incubação que varia entre 12 e 36 horas. Para iniciar patogênese, é necessário que uma proporção de *S. enterica* sobreviva ao pH ácido do estômago (pH 2), muito embora respostas adaptativas de *Salmonella* podem contribuir para sua sobrevivência. No intestino, devem resistir ao muco espesso e competição com a microbiota endógena para desta forma iniciar sua multiplicação (MULLER *et al.*, 2009). Eventualmente, no íleo, invadem a mucosa intestinal através de células M, localizadas nas placas de Peyer, que carregam *Salmonella* do lúmen intestinal até a

lâmina própria, indo ao encontro a macrófagos e células dendríticas, facilitando sua disseminação, além de penetrar nos sistemas linfáticos e cardiovascular, para daí se disseminar e afetar outros órgãos, tais como baço e fígado (WORLEY *et al.*, 2006; HASE *et al.*, 2009; KNOOP *et al.*, 2009). Nestes órgãos, os microorganismos se multiplicam dentro de macrófagos ocasionando lise dessas células fagocíticas, onde há a liberação de *Salmonella* na corrente sanguínea. Altas quantidades de endotoxinas, lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede bacteriana de bactérias gram-negativas, induzem os macrófagos a produzir uma quantidade maciça de mediadores inflamatórios, provocando hipotensão arterial e falência de órgãos, caracterizado como choque séptico (CAVAILLON, 2006; MULLER *et al.*, 2009).

Respostas da imunidade inata e adaptativa são essenciais para o controle da salmonelose. A fim de preservar a integridade do organismo frente à infecção por *Salmonella*, macrófagos e células dendríticas atuam de forma fundamental na imunidade inata, com apresentação de antígenos, fagocitose e morte de patógenos (ABBAS *et al.*, 2008). *Salmonella* é capaz de escapar da atividade microbicida de macrófagos ao evitar a síntese de óxido nítrico (NO), garantindo desta forma sua sobrevivência, proliferação e proteção dentro dessas células (VAZQUEZ-TORRES, 2001; CHAKRAVORTTY *et al.*, 2002). Na imunidade adaptativa, anticorpos agem na opsonização de *Salmonella*, favorecendo a fagocitose e morte destes microorganismos por macrófagos (UNPINGTON *et al.*, 2006). Como mecanismo de escape, ocorre a expressão de antígeno Vi em *S. Typhimurium*, culminando na inibição do seu reconhecimento pelo receptor TLR4 em macrófagos, favorecendo a diminuição da produção de citocina IL-6 e de TNF- α , dificultando a morte da bactéria por célula fagocítica (WILSON *et al.*, 2008; WEISS *et al.*, 2004).

2.5 Antibióticos e Adjuvantes terapêuticos

A intervenção com antibióticos em casos leves ligados à Salmonelose não tifóide não é recomendada, visando evitar a seleção de cepas resistentes e tornar o tratamento ineficaz. Em ocorrências mais graves, na maioria das vezes relacionados aos grupos de risco, a antibioticoterapia pode ser necessária (MINISTÉRIO DA SAÚDE). É notado que o uso indevido e extensivo de agentes microbianos tem promovido o aparecimento de bactérias resistentes, tornando-se um grande

problema de saúde pública (HUR, *et al.*, 2012). Os antibióticos não só têm sido usados para tratar infecções humanas, mas também são ministrados a animais de produção para acelerar o crescimento e prevenir doenças, contribuindo para pontos críticos de resistência (MARTINEZ, 2009). Estudos mostraram que *S. Typhimurium* multi-resistentes a antibióticos podem ser encontrados em aves de capoeira e no ambiente (RAJASHEKARA *et al.*, 2000). Ainda, resistência de *S. Typhimurium* a múltiplos antibióticos, tais como ampicilina, estreptomicina e espectinomicina, cloranfenicol e flofenicol, sulfonamidas e tetraciclinas, também são relatados (BOYD, *et al.*, 2001; RAYAMAJHI *et al.*, 2008).

Salmonella ainda é um patógeno comum nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Devido à crescente problemática da resistência de bactérias patogênicas aos fármacos antimicrobianos, os cientistas buscam métodos alternativos que possam ser utilizados para o controle infecções entéricas. Adjuvantes terapêuticos aparecem como uma possibilidade para atender a essa preocupação, de forma a auxiliar na terapia antibiótica na Salmonelose (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013). Estudos que buscam elucidar o uso de novas moléculas bioativas para atuarem como adjuvantes terapêuticos capazes garantir um tratamento mais eficaz a patologias, dentre elas as doenças infecciosas, quando combinados a antibióticos. Relatos na literatura corrente sugerem o uso de cafeína como adjuvante em terapias ligadas à analgesia, onde demonstraram que sua combinação com aspirina tem eficácia na dor de garganta, além de controle geral da dor no tratamento contra o câncer (SCOTT E ORZANO., 2001; BRANT *et al.*, 2017). Suas atividades como adjuvante em infecções são promissoras, devido à atuação como antagonistas dos ARs, favorecendo os estudos relacionados às propriedades imunomoduladoras, por regularem funções do sistema imune inato e adaptativo, visando praticamente todos os tipos de células envolvidas na orquestração de uma resposta imunológica/inflamatória (HASCÓ e PASHER, 2008). Diante do exposto, o presente trabalho investigou as propriedades da cafeína no controle de infecções experimentais *in vitro* por *Salmonella*, visando a contribuição desta como adjuvante terapêutico no tratamento de infecções.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade da cafeína (1,3,7-Trimetilxantina) em modelos de infecção experimental de macrófagos peritoneais por *Salmonella enterica* sorotipoTyphimurium.

3.2 Objetivos específicos

- a. Avaliar a citotoxicidade da cafeína em cultura de macrófagos peritoneais;
- b. Analisar a viabilidade de macrófagos peritoneais infectados por S.Typhimurium em resposta ao tratamento com cafeína;
- c. Verificar a influência da cafeína no processo de depuração de S.Typhimurium intracelular em culturas de macrófagos peritoneais infectados;
- d. Testar a ação antibacteriana direta da cafeína no controle de crescimento *in vitro* da S. Typhimurium.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os testes experimentais envolvendo animais foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Ética Experimental Animal da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFRPE), em concordância com procedimentos adotados internacionalmente (Nº da licença: 056/2016 - UFRPE).

4.1 Obtenção da cafeína (1,3,7 trimetilxantina)

A cafeína (1,3,7-Trimetilxantina) comercial foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich com composição química ($C_8H_{10}N_4O_2$; 194,19 g/mol).

4.2 O micro-organismo

A cepa C5 de *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium utilizada neste trabalho foi cedida pelo Dr. Pietro Mastroeni, do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade de Cambridge-UK. As bactérias foram mantidas a -10 °C em meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) contendo 50% de glicerol. Para a utilização nos ensaios, as bactérias foram incubadas em estufa a 37°C *overnight* em caldo (BHI). Após centrifugação, as bactérias foram suspensas em meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) e quantificadas em espectrofotômetro 630 nm.

4.3 Os animais

Camundongos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas foram adquiridos do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco. Foram mantidos em gaiolas com temperatura controlada de 25 °C, com livre acesso à água e ração (Purina, Pauline, SP, Brasil). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Imunologia (LAMIM) da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

4.4 Obtenção dos macrófagos

Os macrófagos peritoneais (M_øp) foram obtidos, sob condições assépticas, após lavagem da cavidade peritoneal de camundongos com 10 mL de meio RPMI suplementado com 100U/mL de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. O fluido foi

retirado da cavidade com auxílio de ponteira estéril e armazenado em um tubo Falcon de 50 mL mantido em um béquer com gelo. Para quantificação, uma alíquota do fluido peritoneal foi corada com Azul de Trypan (0,4%) na proporção 1:1, e posterior contagem de células vivas em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico. As células totais foram ajustadas para conter 1×10^6 cél./mL. Posteriormente, 0,2 mL de células (2×10^5 cél./poço) foram cultivadas em placas de poliestireno de 96 poços e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ *overnight* para aderência dos M ϕ p. Antes dos experimentos, as placas foram lavadas com RPMI pré-aquecido para eliminação de células não aderidas, restando apenas os M ϕ p que foram submetidos aos ensaios.

4.5 Ensaio de citotoxicidade

Os M ϕ p foram expostos a diferentes concentrações de cafeína que variaram de 1,25 a 20 μ g/ml e incubadas em estufa de CO₂ a 5% e 37°C por 24h. O experimento foi realizado com triplicatas técnicas e células sem tratamento foram utilizadas como controle. Após o término das 24h, foram adicionados aos poços 40 μ l de rezasurina (0,15 mg/mL), sendo a placa incubada por mais 2h. A presença de células vivas foi mensurada com a atividade metabólica de redução de rezasurina (azul) em resorufina (rosa), por leitura em espectrofotômetro a 570 e 600 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem relativa à viabilidade celular de macrófagos não expostos a cafeína (RPMI - grupo controle).

4.6 Infecção e tratamento de M ϕ p

Para realização de ensaios referentes à viabilidade celular e quantificação bacteriana, M ϕ p aderentes em placas de 96 poços foram submetidos a tratamento preventivo e curativo nas concentrações de 1 μ g/mL e 10 μ g/mL de cafeína.

Para o teste curativo, M ϕ p foram infectados com *Salmonella* (2×10^7 UFC/poço) e após 4h de incubação (CO₂ 5%/ 37°C) os poços foram lavados com RPMI e, a seguir, adicionados de 0,2 mL de gentamicina a (100 μ g/mL em RPMI) por 1h para eliminação de bactérias extracelulares. Após esse tempo, cafeína a 1 μ g/mL e 10 μ g/mL, diluída em RPMI com gentamicina (10 μ g/mL), foi adicionada aos poços por 8h.

Para o teste preventivo, M ϕ p foram incubados com cafeína (1 μ g/mL e 10 μ g/mL) em RPMI com antibióticos (CO₂ 5%/ 37°C) por 8 horas. Após este tempo o

sobrenadante foi removido e 0,2 mL de *Salmonella* (2×10^7 UFC/poço) foi adicionada aos poços por 4h. A seguir, RPMI contendo gentamicina (100µg/mL) foi adicionado aos poços por 1h. Os ensaios foram realizados em triplicata técnica e os grupos controles e experimentais foram divididos conforme ilustrado a seguir:

Grupos:

Møp com RPMI – Grupo controle

Møp + 1µg/mL de cafeína – Grupo Controle

Møp + 10µg/mL de cafeína – Grupo Controle

Møp + *Salmonella* – Grupo Controle

Møp + *Salmonella* + 1µg/mL de cafeína - Grupo Experimental

Møp + *Salmonella* + 10µg/mL de cafeína – Grupo Experimental

4. 7. Viabilidade de macrófagos infectados

A fim de mensurar a sobrevivência dos macrófagos submetidos aos ensaios curativo e preventivo, foi adicionado em cada poço 20 µl de resazurina (0,15mg/mL) em PBS estéril, sendo as placas incubadas por 2h/ 37 C°. Após esse tempo, a fluorescência produzida foi analisada em leitora de microplaca (570nm e 600nm). Os resultados foram expressos em porcentagens relativas a viabilidade celular de macrófagos não infectados e não tratados (RPMI- grupo controle).

4. 8. Quantificação de bactérias intracelulares

Para determinar a depuração bacteriana, foi realizada a quantificação de bactérias intracelulares em macrófagos submetidos aos testes curativo e preventivo. O tempo determinado para infecção e tratamento, o sobrenadante foi retirado, e 0,2 mL de Triton x-100 (0,5%) foi adicionado aos poços, sendo a placa mantida a 10°C por 20 minutos para lise dos macrófagos e exposição das bactérias intracelulares. O produto do lisado celular sofreu diluição seriada em PBS estéril e uma alíquota de 15µL plaqueada em Ágar Müeller Hinton. As placas foram incubadas em estufa de crescimento *overnight* a 37°C para posterior contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).

4.7 Teste de atividade antibacteriana direta

Diferentes concentrações de cafeína foram testadas com o propósito de analisar se a mesma possui efeito bactericida direto sobre *S. Typhimurium*. A *S. Typhimurium* foi crescida em caldo Mueller Hinton por 24h e ajustada para conter 1×10^7 cél./mL. Em placas de 96 poços foi adicionado 0,2 mL de cafeína em concentrações que variaram de 100 µg/mL a 0,78 µg/mL, diluída em caldo Müller Hinton. A seguir, foi adicionado 5 µl *S. Typhimurium*. Como controle, foram utilizados poços contendo *Salmonella* em caldo M.H sem presença de cafeína, ou com adição de gentamicina (100 µg/mL). A placa foi incubada em estufa de crescimento a 37°C por 24h. A seguir foi feita leitura em espectrofotômetro com densidade óptica de 630 nm.

4.8 Análise estatística

A análise estatística entre os grupos experimentais e controle foi obtida por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. Para análises e elaboração dos gráficos foi utilizado o programa Graphpad Prism versão 5.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A exploração de novas moléculas bioativas possui um grande potencial e serve como uma fonte alternativa para melhorar a terapêutica contra infecções (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013). Este estudo foi focado na avaliação da potencial atividade da 1,3,7-trimetilxantina – cafeína como adjuvante terapêutico no controle de infecções *in vitro* por *S. Typhimurium*. As atividades da cafeína vêm sendo analisadas devido ao seu potencial como modulador inflamatório nas respostas imunes, tais como supressão da quimiotaxia de neutrófilos e de monócitos, diminuição de citocinas pró-inflamatórias e supressão da proliferação linfocitária (HORRIGAN, *et al.*, 2006).

Devido ao potencial farmacológico relacionado à cafeína, a avaliação da toxicidade dessas moléculas torna-se importante. Deste modo, extensivas revisões sobre os efeitos tóxicos da cafeína em animais e humanos, demonstrando que estas podem estar relacionadas à dose, mas também quando utilizada simultaneamente com outra metilxantina (NAWROT *et al.*, 2003; WIKOFF *et al.*, 2017). Ainda, Jafari e Rabbani (2000) avaliaram os efeitos tóxicos da cafeína na taxa de sobrevivência de macrófagos alveolares de pulmão de ratos, observando que em baixas concentrações de cafeína, 5mM, macrófagos sobreviveram com uma viabilidade de 90-97% após 3 dias. Em concentrações moderadas, um pouco abaixo de 20mM, as células mantiveram a viabilidade até 24h, e em concentrações superiores a 20mM, a cafeína inibiu a sobrevivência celular, estabelecendo um efeito tóxico dependente de dose.

O presente estudo demonstrou através de análise de citotoxicidade em macrófagos peritoneais, que as concentrações de 1, 25 a 20 µg/mL de cafeína no tempo de 24 horas não reduziu significativamente a viabilidade das células, quando comparado ao controle sem tratamento ($P < 0,05$), sugerindo que baixas concentrações de cafeína impedem a apoptose de macrófagos (FIGURA 4). Portanto, não foi possível estimar a DL50, uma vez que todas as concentrações testadas não diminuíram em mais de 50% a viabilidade celular.

CITOTOXIDADE 24 HORAS

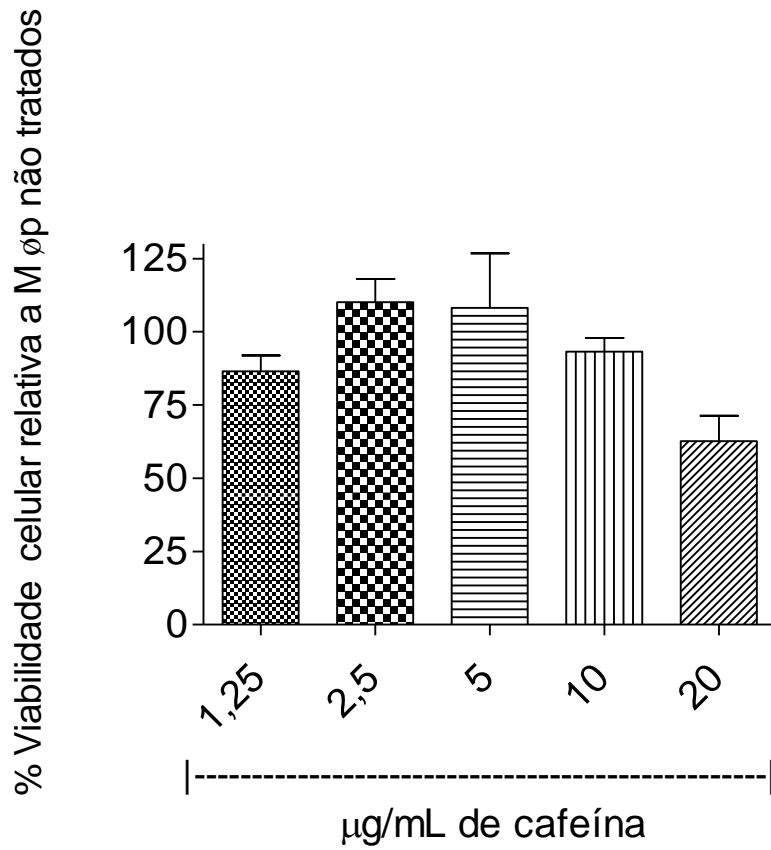


Figura 4: Viabilidade celular após a exposição de macrófagos peritoneais à cafeína. Todos os valores são apresentados como média de triplicata técnica. (ANOVA, Teste de Bonferroni).

Levando em consideração os resultados obtidos no teste de citotoxicidade, as concentrações de 1 e 10 µg/mL de cafeína foram utilizados nos ensaios com tempo de 8h. Como esperado, a cafeína utilizada nessas duas concentrações não diminuiu a sobrevivência dos macrófagos controles não submetidos à infecção em relação às células não infectadas e não tratadas (Figura 5 A). O tratamento curativo dos Møp com cafeína contribuiu positivamente para aumentar a viabilidade dos macrófagos infectados em relação aos não tratados (Figura 5 A). Pode ser observado que os macrófagos infectados e sem tratamento com cafeína não tiveram a viabilidade detectada. Já os macrófagos tratados com 1 µg/mL de cafeína tiveram viabilidade de 24% em relação aos macrófagos não tratados e não infectados (controle). A viabilidade aumentou com a dosagem 10 µg/mL e alcançou 55%, demonstrando uma diferença significativa em relação às células infectadas e não tratadas (Figura 5 A). Considerando a quantificação de *Salmonella* intracelular, não foram detectadas bactérias viáveis no interior dos macrófagos não tratados com cafeína (Figura 5 B). Tal dado justifica a inexistência de macrófagos viáveis albergando *Salmonella* intracelular. Devido a seus fatores de virulência, *S. Typhimurium* possui a capacidade de sobreviver e se replicar dentro de fagócitos. Uma vez ativados, macrófagos produzem espécies reativas de oxigênio produzindo uma diminuição na carga bacteriana intracelular (ROSENBERGER E FINLAY, 2002). Neste estudo, a sobrevivência dos macrófagos tratados com cafeína (1 e 10 µg/mL) pode estar atrelada à diminuição na carga bacteriana nos macrófagos que receberam tratamento. Ainda, a não sobrevivência no grupo infectado e não tratado pode estar relacionada ao aumento de bactérias, logo que lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano induzir apoptose de macrófagos (MALYSHEVA *et al.*, 2006). Contudo, a cafeína limitou a inflamação em células de macrófagos ativadas por LPS ao diminuir a expressão gênica de COX-2 e TNF-α, citocina responsável por reduzir a propagação bacteriana, favorecendo uma resposta anti-inflamatória (BABU *et al.*, 2018). Ainda SHUSHTARI e FROUSHANI (2017)., demonstraram que células tratadas com cafeína aumentaram significativamente a fagocitose, muito embora regrediu a expressão de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), reafirmando sua característica anti-inflamatória. STECK *et al.*, (2015), demonstraram que a cafeína suprime a fagocitose impulsionando às células para uma resposta anti-inflamatória. Ainda nos grupos submetidos aos tratamentos com cafeína (1 e 10

$\mu\text{g/mL}$) foi foram detectadas cerca de 2.098 e 17.260 UFC/poço, respectivamente (Figura 5 B).

TRATAMENTO CURATIVO

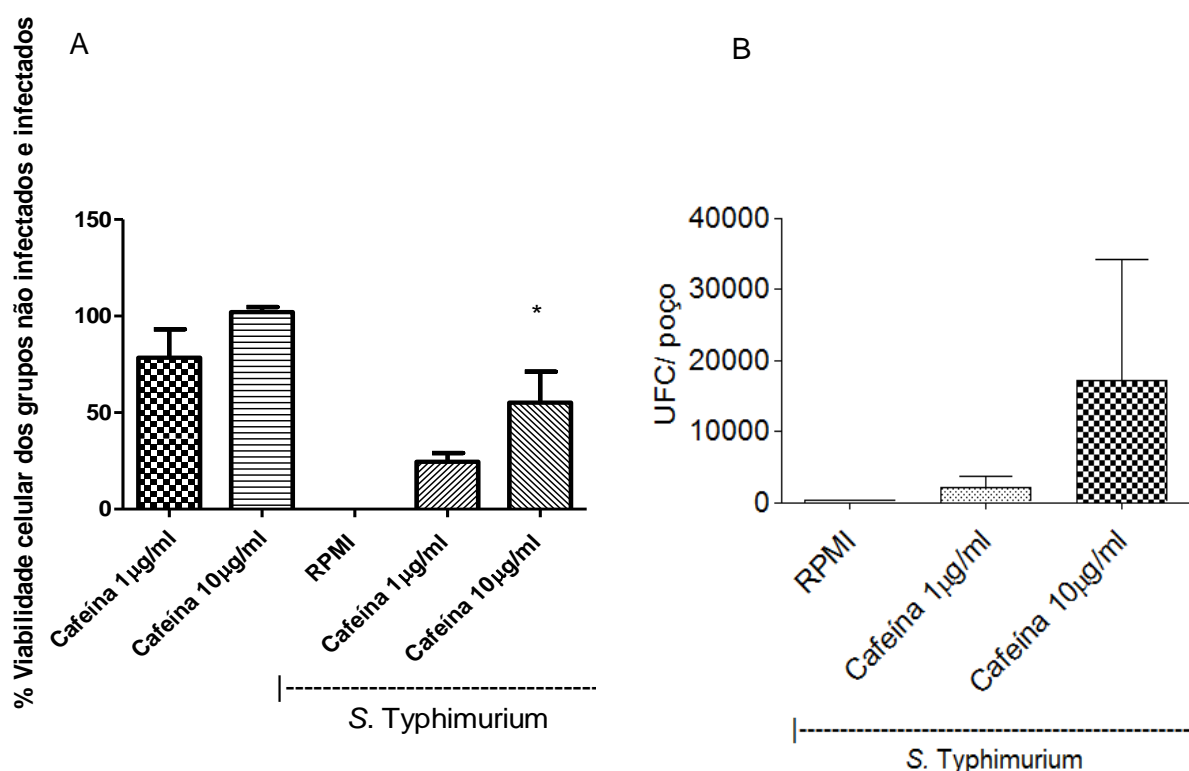


Figura 5: Efeito da cafeína no controle de infecção por *S. Typhimurium* no tratamento curativo. (A) Viabilidade celular de macrófagos. (B) Carga bacteriana intracelular. *P < 0,05 por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Comparação com o controle infectado e não tratado.

Os resultados do teste preventivo demonstraram que os tratamentos com cafeína, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$ tenderam a aumentar significativamente (P < 0,05) em 80 a 82%, respectivamente a sobrevivência dos macrófagos infectados, quando comparado ao grupo sem tratamento (Figura 6 A). Novamente, a quantificação de bactérias intracelulares foi menor nos grupos não tratados com cafeína, possivelmente devido à diminuição de macrófagos viáveis no grupo. Nos grupos

tratados com cafeína foi observado que a maior concentração de 10 µg/mL diminuiu de modo significativo o número de UFC intracelular, quando comparado ao tratamento com 1µg/mL (Figura 6 B). No estudo em tela foi possível perceber que a cafeína favoreceu o aumento da viabilidade do grupo tratado com cafeína em relação ao grupo sem tratamento.

TRATAMENTO PREVENTIVO

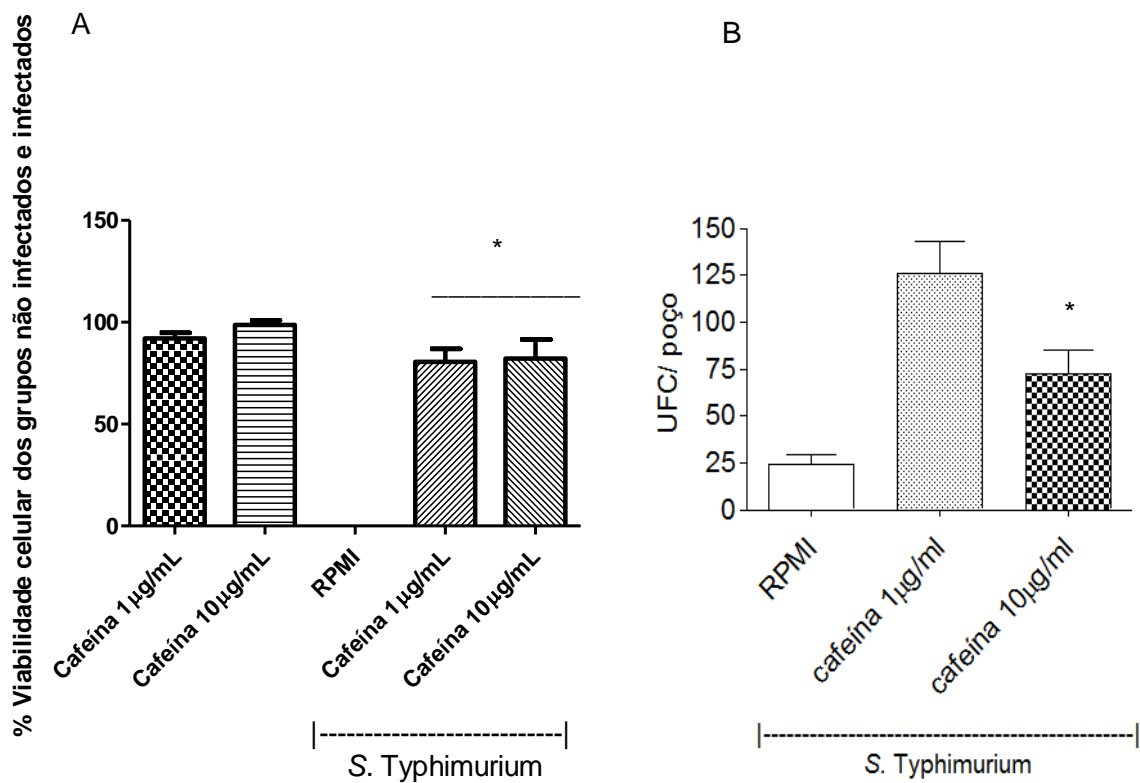


Figura 6: Efeito da cafeína no controle de infecção por *S. Typhimurium* no tratamento preventivo. (A) Viabilidade celular de macrófagos. Os Møp foram tratados com cafeína e então incubados por 8 horas. Posteriormente foram infectados com *S. Typhimurium* por 4 horas. Comparação com o grupo infectado não tratado. (B) Carga bacteriana intracelular de macrófagos. Comparado com o grupo infectado e tratado com 10 µg/mL * $P < 0,05$ por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

A fim de descartar possível ação direta da cafeína contra *Salmonella*, foram realizados testes de atividade antimicrobiana *in vitro*. A leitura em espectrofotômetro a 630 nm confirmou que não houve diminuição no crescimento bacteriano nos poços com tratamento, independente da concentração de cafeína, quando comparado ao controle sem tratamento (Figura 7). Assim, o mecanismo protetor da cafeína não parece ter relação com alguma ação direta sobre o micro-organismo nas condições testadas. No entanto, a atividade antibacteriana de cafeína foi demonstrada por GYAWALI *et al.*, (2014), onde observaram a inibição significativa no crescimento de *E. coli*, bactéria gram-negativa, em laboratório. Ainda, ALMEIDA *et al.*, (2006), confirmou efeito antimicrobiana da cafeína contra *Enterobacter cloacae* e *Serratia marcescens*, pertencentes à família Enterobacteriaceae, além de potencial agentes antimicrobianos naturais contra *Salmonella enterica*, pelo método da placa de microtitulação. Atestando esses dados, Malleta e Were, (2012) apontaram que compostos de café podem reduzir potencialmente a presença de *Salmonella* nos produtos de origem animal.

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *in vitro*

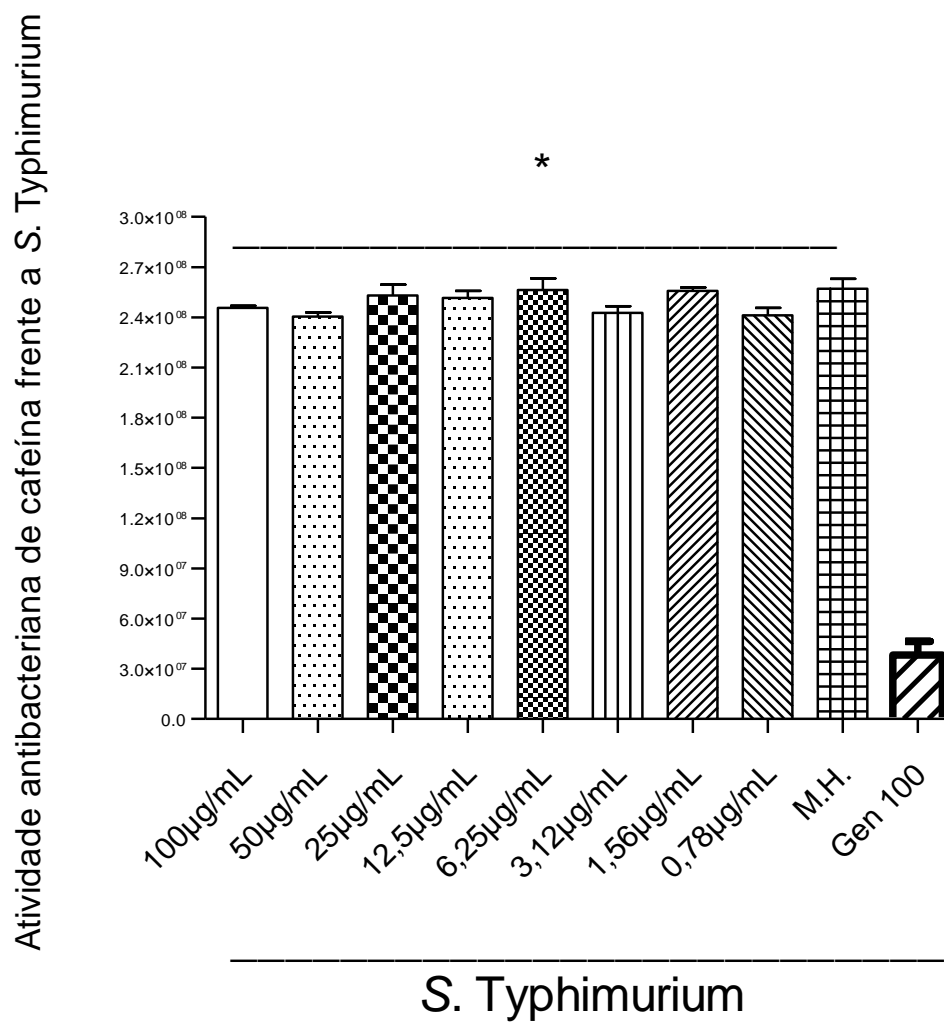


Figura 7: Teste de atividade bacteriana direta com cafeína frente a *S. Typhimurium* após 24 horas de tratamento. Todos os valores são apresentados como média ± EE. *($P < 0,05$), (ANOVA, Teste de Bonferroni).

5 CONCLUSÃO

A cafeína não apresentou citotoxicidade nos macrófagos peritoneais. Os tratamentos tanto curativos como preventivos demonstram aumento na sobrevivência de macrófagos infectados com *S. Typhimurium*, possivelmente pela depuração de bactérias intracelulares, conforme exibido pelos testes de quantificação. Ainda, foi descartada a ação antibacteriana direta da cafeína em *S. Typhimurium* nas condições observadas. Deste modo o estudo demonstrou a potencialidade da investigação da cafeína no controle de processos infecciosos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMANN, A.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 6. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ALVES, A. B.; BRAGAGNOLO, N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás de cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*.vol. 38, n. 2, 2002.

ANAYA, A.L., CRUZ-ORTEGA, R., WALLER, G.R. Metabolism and ecology of purine alkaloids. *Front Biosci* 11, 2354-2370. 2006.

ANTONIOLI, L.; CSÓKA, B.; FORNAI, M.; COLUCCI, R.; KÓKAI, E.; CORRADO, B.; HASKÓ, G. Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? *Drug Discovery Today*, p. 1051-1068, 2016.

ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J.B. validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (clae) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. *Química Nova* 2009; Vol.32: 2476-2481.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ, 2018. Consumo brasileiro de café cresce 3,5% revela pesquisa da Abic. Disponível em: <https://www.sna.agr.br/consumo-brasileiro-de-cafe-cresce-35-revela-pesquisa-da-abic/>. Acesso em: 28 jan 2019.

BABU, M.; JERARD. C.; MICHAEL, P. B.; SURESH, S.; RAMACHANDRAN, R. Mesoporous silica loaded caffeine inhibits inflammatory markers in lipopolysaccharide-activated rat macrophage cells. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 8: 124-131, 2018.

BOYD, D.; PETERS, G. A.; CLOECKAERT, A.; BOUMEDINE, K. S.; CHASLUS-DANCLA, E.; IMBERECHTS, H.; et al. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase

genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *Journal of Bacteriology*, 183: 5725–5732, 2001.

BRANT, J. M.; KELLER, L; MCLEOD, K. ; YEH, C.; EATON, L. H. Chronic and Refractory Pain: A systematic review of pharmacologic management in oncology. *Clinical Journal of Oncology Nursing*. 21:31–53, 2017.

BUENO, M. A . S. Papel atual das metilxantinas (aminofilina e teofilina) nas doenças respiratórias. *Research gate*. 2003.

CARVALHO, A.; MEDINA – FILHO, H. P.; FAZUOLI, L. C.; GUERREIRO – FILHO, O.; LIMA, M. M. A. Aspectos genéticos do cafeeiro. *Revista Brasileira de Genética*, 135-183, 1991.

CAVAILLON, J. M. et al. Cytokine cascade in sepsis. *Scand. J. Infect. Dis*, v.35, cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103: 17915-17920, 2006.

CHAKRAVORTTY, D. et al. *Salmonella* pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. *J Exp Med.*, vol. 195, p. 1155-1166, 2002.

CLARKE, R. J.; MACRAE, K. *Coffee chemistry*. London, Elsevier. p. 42-82, v.1, 1989.
CRUZ, F. F. Efeito da cafeína e dos receptores de adenosina na inflamação induzida por cobre em larvas de zebrafish (*Danio rerio*). *Dissertação de mestrado*, Porto Alegre. 2016.

DOUGAN, G.; JOHN, V.; PALMER, S.; MASTROENI. Immunity to salmonellosis. *Immun Rev*. 240, 196-210, 2011.

ELTZSCHIG, H. K. Adenosine: na old drug newly discovered. *Anesthesiology*, p. 904-915. 2009.

EMBRAPA. 2017. Brasil consome 21,5 milhões de sacas de café em 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/31768082/brasil-consome-215-milhoes-de-sacas-de-cafe-em-2017>. Acesso em: 28 jan 2019.

EMBRAPA. Consumo mundial de café atinge 165 milhões de sacas no ano cafeeiro 2018-2019. 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/40814481/consumo-mundial-de-cafe-atinge-165-milhoes-de-sacas-no-ano-cafeeiro-2018-2019>. Acesso em: 28 jan 2019.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da segurança alimentar. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FREDHOLM, B. B.; BATTIG, K.; HOLMEN, J.; NEHLIG, A.; ZVARTAU, E. E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev*, p. 83-133, 1999.

FREDHOLM, B. B.; CHEN, J. F.; CUNHA, R. A.; SVENNINGSSON, P.; VAUGEOIS, J. M. Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiology*, p. 191-270, 2005.

GYAWALI, R.; ADKINS, A.; MINOR, R. C.; IBRAHIM, S. A. Behavior and changes in cell morphology of *Escherichia coli* O157:H7 in liquid medium and skim milk in the presence of caffeine. *Journal of Food*. 12: 235-241, 2014.

HARKINS, J. D.; REES, W. A.; MUNDY, G. D.; STANLEY, S. D.; TOBIN, T. Na overview of the methylxanthines and their regulation in the horse. *Equine Practice*, p. 10-16, 1998.

HASE, K. et al. Uptake through glycoprotein 2 of FimH bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature Publishing Group*, v. 462, p. 226–230.2009.

HASKÓ, G.; PACHER, P. A_{2A} receptores in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *Jornal Leukocyte Biology*, p. 447-455, 2008.

HORRIGAN, L. A., KELLY, J. P., & CONNOR, T. J. Caffeine and its major metabolite paraxanthine suppress human lymphocyte function. *Med Sci*. 2005.

HORRIGAN, L.A.; KELLY J.P.; CONNOR T.J. Immunomodulatory effects of caffeine: friend or foe? *Pharmacol. Therapeut.*, vol. 111, p. 877-892, 2006.

HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J. H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. *Food Research International*. 45: 819-830, 2012.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION, 2018. Disponível em: <http://www.ico.org/>. Acesso em: 28 jan 2019.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. Disponível em: http://www.ico.org/pt/botanical_p.asp. Acesso em: 28 jan 2019.

JAFARI, M.; RABBANI, A. Dose and time dependent effects of caffeine on superoxide release, cell survival and DNA fragmentation of alveolar macrophages from rat lung *Toxicol*, 149, pp. 101-108. 2000.

JAMES, J. E. Caffeine & Health. San Diego: Academic Press Inc. p. 24-32 e p. 63-85. 1991.

KNOOP, K. A. et al. RANKL. Is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *Journal of Immunology*,

LOURENÇO, M.C.S.; Reis EFM, Valls R. *Salmonella entérica* subsp *houtenae* sorogrupo O:16 em um paciente HIV positivo: relato de caso. *Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2004; 46(3):169-170.

LAXMINARAYAN, R.; DUSE, A.; WATTAL, CH.; et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect. Dis*. 13: 1057-1098, 2013.

MALYSHEVA, E.V., KRUGLOV, S.V., KHOMENKO, I.P., BAKHTINA, L.Y., PSHENNIKOVA, M.G., MANUKHINA, E.B., MALYSHEV, I.Y. Role of extracellular and

intracellular nitric oxide in the regulation of macrophage responses. Bull. Exp. Biol. Med. 141, 404-406. 2006.

MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. Environmental Pollution.157: 2893-2902, 2009.

MENDONÇA, E.P. Característica de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frango de corte no Brasil. 2016.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Café no Brasil. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/cafe/cafeicultura_brasileira. 2017. Acesso em: 28 jan 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Salmonella* (Salmonelose): o que é, causas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Disponível em: <http://portalsms.saude.gov.br/saude-de-a-z/salmonella>. Acesso em 20 jan 2019.

MORATALLA, R. Neurobiología de las metilxantinas. Elsevier, p.141-220, 2008.

MULLER, C.; BANG, I., VELAYUDHAN, J.; KARLINSEY, J.; PAPENFORT, K.; VOGEL, J.; FANG, F. Acid stress activation of the σ E stress response in *Salmonella* entérica serovar Typhimurium. Mol Microbiol. 71:1228-1238, 2009.

NABAS, J. M. A. B. B. Metilxantinas: farmacognosia II. Disponível em: <https://slideplayer.com.br/slide/11694846/>. Acesso em: 12 jan. 2019.

NAWROT, P.; JORDAN, S.; EASTWOOD, J.; ROTSTEIS, A.; HUGENHOLTZ, A.; FEELEY., M. Effects of caffeine on human health. Food Addit. 20: 1-30, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Salmonella*. 2015. Disponível em:<https://news.un.org/pt/story/2015/04/1507221-oms-alerta> que doencastransmitidas-por-alimentos-matam-351-mil-por-ano Acesso em: 27 dez. 2018.

PAGNUSSAT, N. O envolvimento dos receptores de adenosina A₁ e A_{2A} na memória em camundongos machos adultos. Tese de doutorado, Porto Alegre. 2015.

PINTO UM, CARDOSO RR, VANETTI MCD. Detecção de *Listeria*, *Salmonella* e *Klebsiella* em serviço de alimentação hospitalar. *Revista de Nutrição* 2004; 17(3):319-326.

POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L. Taxonomy of the genus *Salmonella*. Changes in serovars nomenclature. In: M.Y. POPOFF; L. LE MINOR: Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7th revision. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, p. 5, 1997.

RAYAMAJHI, N., KANG, S. G., KANG, M. L., LEE, H. S., PARK, K. Y., & YOO, H. S. Assessment of antibiotic resistance phenotype and integrons in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from swine. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 70: 1133–1137, 2008.

RIBEIRO, J. A.; SEBASTIÃO, A. M.; MENDONÇA, A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog Neurobiology*, p. 377-392. 2003.

ROSENBERGER, C.M., FINLAY, B.B. Macrophages inhibit *Salmonella typhimurium* replication through MEK/ERK kinase and phagocyte NADPH oxidase activities. *J. Biol. Chem*. 24, 18753-18762, 2002.

SÁNCHEZ-VARGAS, F. M.; ABU-EL-HAIJA, M. A.; GÓMEZ-DUARTE, O. G. *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Medicine and Infectious Disease*, v. 9, n. 6, p. 263-277, 2011.

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States - Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011.

SCHWARTZ, K.J. Salmonellosis in: STRAW, B.E.; D'ALLAIRES, S.; MENGELING, W.L.; TAYLOR, D.J. Disease Swine. 8th ed. Ames: Iowa University Press, 2000.

SCHWARTZ, K.J. Salmonellosis in: STRAW, B.E.; D'ALLAIRES, S.; MENGELING, W.L.; TAYLOR, D.J. Disease Swine. 8th ed. Ames: Iowa University Press, 2000.

SCOTT, J; ORZANO, A. J. Evaluation and treatment of the patient with acute undifferentiated respiratory tract infection. J Fam Pract. 50:1070-7, 2001.

SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A . F.; LIMA-FILHO, J. L. *Salmonella* spp., importante agente patogênica veiculado em alimentos. Ciência saúde coletiva: Rio de Janeiro, 2008.

SILVA, E. Sepsis, a problem with the size of Brazil. RBTI. 18: 2006.

SHUSHTARI, N.; M, D. V.; FROUSHANI, S. M. A. Caffeine Augments The Instruction of anti-inflammatory macrophages by the conditioned médium of mesenchymal stem cells. Cell Journal. 19: 415-424, 2017.

TORTORA, G .J. et al. Microbiologia, 8a Ed. Porto Alegre. Artmed, 920 p. 2005.

UPPINGTON, H. et al. Effect of immune serum and role of individual Fcy receptors on the intracellular distribution and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in murine macrophages. Immunology, vol. 119, p. 147-158, 2006.

VAN FURTH, A. M., SEIJMONSBERGEN, E. M., LANGERMANS, J. A. M., VAN DER MEIDE, P., & VAN FURTH, R. Effect of xanthine derivatives and dexamethasone on *Streptococcus pneumoniae*-stimulated production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 β and IL-10 by human leukocytes. Clin Diagn Lab Immunol 2, 689–692, 1995.

VAZQUEZ-TORRES, A. et al. Defective localization of the NADPH phagocyte oxidase to Salmonella-containing phagosomes in tumor necrosis factor p55 receptor-deficient macrophages. *Proc Natl Acad Sci*, vol. 98, p. 2561–2565, 2001.

VICENTINI, C. B. Efeito comparativo entre a dipirona sódica e a dipirona sódica associada à cafeína no controle da dor pós-exodontia. *Rev. dor*, v. 14, n. 3, p. 174-178, 2013.

WEISS, D.S. et al. Toll-like receptors are temporally involved in host defense. *Jornal Immunol*, vol. 172, p. 4463-4469, 2004.

WIKOFF, D; WELSH, B.T.; , HENDERSON, R.; BRORBY, G. P.; BRITT; J.; MYERS; E.; GOLDBERGER, J.; et al. Systematic review of the potential adverse effects of caffeine consumption in healthy adults, pregnant women, adolescents, and children. *Food Chem Toxicol*. 109: 585-648, 2017.

WILSON, R.P. et al. The Vi-capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of Salmonella. *Cell Microbiol*, vol. 10, p. 876-890, 2008.

WORLEY, M. J.; NIEMAN, G. S.; GEDDES K.; HEFFRON, F. Salmonella Typhimurium disseminates within its host by manipulating the motility of infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103: 17915-17920, 2006.