

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas

**AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE FENÓLICOS, DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETOR DA TORTA DE SEMENTE
DE *Coffea arabica* L. (RUBIACEAE)**

ANA CAROLINA CONCEIÇÃO MONTEIRO DE CASTRO

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS
CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. VERA LUCIA BORGES ISAAC

ARARAQUARA-SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas

**AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE FENÓLICOS, DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETOR DA TORTA DE SEMENTE
DE *Coffea arabica* L. (RUBIACEAE)**

ANA CAROLINA CONCEIÇÃO MONTEIRO DE CASTRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS
CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. VERA LUCIA BORGES ISAAC

ARARAQUARA-SP

2014

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C355a

Castro, Ana Carolina Conceição Monteiro de
Avaliação do perfil químico de fenólicos, do potencial antioxidante e fotoprotetor da torta de semente de *Coffea arabica* L. (Rubiaceae) / Ana Carolina Conceição Monteiro de Castro. — Araraquara, 2014
101 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: André Gonzaga dos Santos
Coorientador: Vera Lucia Borges Isaac

1. *Coffea arabica* L. 2. Resíduo agroindustrial. 3. Antioxidante. 4. Metabólitos secundários. I. Santos, André Gonzaga dos, orient. II. Isaac, Vera Lucia Borges, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

“Se cheguei até aqui é porque me apoiei em ombros gigantes.”

Isaac Newton

DEDICATÓRIA

A Deus que me guiou para que hoje eu estivesse perto de completar mais essa jornada, pela dádiva da vida, pela sabedoria e conhecimento. “Poderoso para fazer infinitamente mais de tudo quanto pedimos ou pensamos no Seu poder que opera em nós.”

Ao meu marido Gabriel que me incentivou persistentemente para que eu trilhasse esse caminho. Por toda paciência, amor, dedicação, orações, companheirismo, você sem dúvida merece essa vitória junto comigo. Obrigada pelo que você é, por tudo que construímos e pelo presente maravilhoso que Deus nos deu. A você meu amor eterno e diário.

Ao meu pai Carlos e minha mãe Rose, que são responsáveis por tudo que sou e conquistei, por serem tão essenciais, importantes e presentes na minha vida. Meus exemplos!

Ao meu irmão Gabriel que mesmo estando longe torce sempre por mim. Melhor irmão eu não poderia ter!

Ao meu filho, minha dádiva de Deus, a minha maior alegria, indescritível ter você em minha vida. Mamãe te ama muito mais do achei que seria capaz!

A vocês meu amor e gratidão!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos que aceitou trabalhar comigo sem ao menos me conhecer e logo em seguida veio cheio de ideias e sugestões para o meu trabalho. Meus sinceros agradecimentos por sua disposição, paciência, auxílio, ensinamento, dedicação durante todo o trabalho. Obrigada por contribuir para o meu avanço profissional.

À Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac que me recebeu de braços abertos em seu laboratório desde o estágio. Obrigada pela confiança a mim investida, pela amizade nesses anos de trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa pela sua atenção e disposição em ajudar. Pelas contribuições essenciais para esse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

À cooperativa de cafeicultores Cooxupé localizada em Guaxupé-MG, pela doação da torta de sementes verdes de *C. arabica* L.

Aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Profa. Dra. Chung Man Chin, Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva (IQ), Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, Profa. Dra. Regina Maria Barreto Cicarelli, Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini por permitirem a utilização de seus laboratórios, cederem materiais, equipamentos ou ensinamentos que colaboraram para que este trabalho fosse desenvolvido. Em especial ao aluno de mestrado Marcelo Gomes Davanço por toda ajuda nos experimentos com CLUE.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Ilza, Caio, Mateus, Queila, Tirene, Valéria, Gabriela, Cláudia, Fátima, Márcia, Daniela, Joyce, Vinícius, Bete por estarem sempre prontos a ajudar.

A todos os amigos dos Laboratórios de Cosmetologia e de Farmacognosia: Ana Carolina, Gabi, Bruna, Carol, Daniele, Nathália, Danila, Juliana, Amanda, Helena, Isabela, Eláise, Natália, Josi, Gabriela, Helena Uchina, Fernando, Flávio, Juhan, Rogério, Erick, Alexandre, por toda a amizade, risadas, ajudas e companheirismo, muitos mesmo não estando mais presentes no laboratório. Em

especial Gabi, Carol, Bruna e Isabela por tudo que me ensinaram, ajudaram e incentivaram. Obrigada pela paciência e amizade! Também agradeço o Fernando, aluno de iniciação científica pelo auxílio para realização desse trabalho.

A todos os amigos que conheci na Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

A toda minha família, amigos do Corpo de Cristo, que sempre oraram e torceram por mim nesta etapa.

Obrigada a todos!

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química de alguns ácidos clorogênicos.	15
Figura 2 - Estrutura química dos ácidos que compõem os ácidos clorogênicos.	16
Figura 3 - Estrutura química da cafeína, teofilina e teobromina.	17
Figura 4 - Fluxograma das condições utilizadas na análise do EEtTr de <i>C. arabica</i>	26
Figura 5 - Desenho esquemático da placa de 96 poços contendo a disposição dos controles e concentrações de amostras teste.	32
Figura 6 - Esquema do procedimento utilizado para avaliar a citotoxicidade do EEtTr (Adaptado de Chiari et al, 2012).	33
Figura 7 - Cromatoplasmas do EEtTr. (a) – condição de análise para o ácido clorogênico. (b) - condição de análise para a cafeína.	40
Figura 8 - Curva analítica para quantificação de ácido clorogênico.	42
Figura 9 - Curva analítica para quantificação da cafeína.	43
Figura 10 - Cromatograma do EEtTr	45
Figura 11 - Cromatograma do EEtSm.	46
Figura 12 - Cromatograma do padrão de ácido clorogênico.	47
Figura 13 - Cromatograma do padrão de cafeína.	48
Figura 14 - Cromatograma do padrão de ácido cafeico, ácido clorogênico, cafeína, rutina e quercetina.	49
Figura 15 - Curva analítica do ácido gálico.	50
Figura 16 - Curva analítica do ácido clorogênico.	52
Figura 17 - Curva analítica da quercetina.	53

Figura 18 - Gráfico da porcentagem de inibição do radical DPPH <i>versus</i> concentração do ácido ascórbico.....	55
Figura 19 - Gráfico da porcentagem de inibição do DPPH <i>versus</i> concentração de EEtTr.....	56
Figura 20 - Gráfico da porcentagem de inibição do DPPH <i>versus</i> concentração de EEtSm.....	56
Figura 21 - Gráfico da porcentagem de inibição do ABTS <i>versus</i> concentração de ácido ascórbico.	57
Figura 22 - Gráfico da porcentagem de inibição do ABTS <i>versus</i> concentração de EEtTr.....	58
Figura 23 - Gráfico da porcentagem de inibição do ABTS <i>versus</i> concentração de EEtSm.....	59
Figura 24 - Gráfico com perfil cinético do decaimento da fluorescência da piranina com o trolox.....	60
Figura 25 - Gráfico com perfil cinético do decaimento da fluorescência da piranina com o EEtTr.	61
Figura 26 - Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem HepG2, a partir da média de experimentos independentes (média \pm desvio padrão). Tratamento realizado com o EEtTr de <i>C. arabica</i> L.. Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$	62
Figura 27 - Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem HDFa, a partir da média de experimentos independentes (média \pm desvio padrão). Tratamento realizado com o EEtTr. Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$	63

Figura 28 - Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem HaCat, a partir da média de experimentos independentes (média \pm desvio padrão). Tratamento realizado com o EEtTr. Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$	64
Figura 29 - FPM (Fator de Proteção Máximo) em função do comprimento de onda das formulações.	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Composição percentual das formulações.	34
Tabela 2 - Área média (triplicata) dos picos dos cromatogramas em função da concentração de ácido clorogênico (mg/mL).....	42
Tabela 3 - Área média (triplicata) dos picos dos cromatogramas em função da concentração de ácido cafeína (mg/mL).	43
Tabela 4 - Valores de absorvância obtidos para o EEtTr e EEtSm na determinação de compostos fenólicos totais.	50
Tabela 5 - Valores de absorvância obtidos para o EEtTr e EEtSm na determinação de compostos fenólicos totais.	52
Tabela 6 - Avaliação da atividade antioxidante frente à ação redutora do radical peroxila (TEAC).....	61
Tabela 7 - Valores de CI50 ($\mu\text{g/mL}$) para as linhagens celulares tratadas com o EEtTr.....	65
Tabela 8 - Valores de FPS obtidos pela metodologia de espectrofotometria de reflectância no Optometrics SPF 290.....	67

ABREVIATURAS

- AAPH**- dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)
- ABTS**- radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), sal de diamônio
- ABTS⁺**- cátion radicalar 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
- CI₅₀**- concentração inibitória para inibir a atividade em 50 %
- CCD**- cromatografia em camada delgada
- CLAE**- cromatografia líquida de alta eficiência
- CLUE**- cromatografia líquida de ultra eficiência
- DMSO**- dimetilsulfóxido
- DNA**- ácido desoxirribonucleico
- DPPH**- 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
- DPPH[·]**- radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
- EFS**- extração em fase sólida
- EDTA**- ácido etilenodiamino tetra-acético
- EETr**- extrato etanólico 70 % da torta *Coffea arabica* L.
- EESm**- extrato etanólico 70 % das sementes de *Coffea arabica* L.
- ERN**- espécies reativas de nitrogênio
- ERO**- espécies reativas de oxigênio
- FPM**- fator de proteção máximo
- MEM**- minimal essential medium
- MTT**- brometo de 3-(4,5-dimetiltazo-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
- NP-PEG**- difenilboriloxietilamina 1,0% em metanol, seguida de solução de polietilenoglicol 4000 5,0% em etanol
- OIC**- Organização Internacional do Café
- PBS**- tampão fosfato salino
- pH**- potencial hidrogeniônico
- PVDF**- fluoreto de polivinilideno
- OIC**- Organização Internacional do Café
- TEAC**- atividade antioxidante equivalente ao Trolox
- UPLC**- ultra performance liquid chromatography
- UV**- ultravioleta
- V_{eluyente}**- volume de eluente

V_{inj} - volume de injeção

$\lambda_{m\acute{a}x}$ - comprimento de onda máximo

RESUMO

O café, por muitos anos foi o maior destaque da economia brasileira, uma das bebidas mais comercializadas no mundo, encantando a todos, de diversas raças e etnias, pelo seu sabor e aroma agradáveis. Ao passar das décadas, o interesse não foi só pelo paladar, mas também pelas ações benéficas fisiológicas por ele apresentadas, atraindo o interesse dos pesquisadores para um estudo mais detalhado a respeito de sua composição, visto que é rico em compostos bioativos. A cosmetologia por sua vez se encantou com os possíveis benefícios desse produto, de grande importância comercial, para estudar a sua atuação na prevenção de danos que acometem a pele. Por conter compostos bioativos, o café apresenta ações fisiológicas benéficas antioxidantes e um potencial na prevenção do envelhecimento. Dentre os compostos bioativos, a classe dos fenólicos se destaca por sua atividade antioxidante, sendo os ácidos clorogênicos, metabólitos secundários, os responsáveis de maior destaque, que agem sequestrando os radicais livres e impedindo a propagação do processo oxidativo. Outro composto amplamente estudado é a cafeína, uma metilxantina, encontrada em grande quantidade na semente do café. Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o perfil químico de compostos fenólicos, o potencial antioxidante, fotoprotetor e a toxicidade do extrato etanólico 70% da torta de sementes verdes de *Coffea arabica* L., com aplicação no desenvolvimento de um fitocosmético. Foram utilizados métodos de análise cromatográficos e espectrométricos para a obtenção do perfil químico, identificação e quantificação de ácido clorogênico e da cafeína. O extrato apresentou considerável atividade antioxidante, teores de fenólicos e flavonoides significativos, e é seguro levando em consideração o ensaio de citotoxicidade. A adição do extrato etanólico 70% da torta de sementes verdes de *Coffea arabica* L. na formulação levou a um aumento no fator de proteção solar, demonstrando uma influência do extrato na formulação, um sinergismo do extrato com os filtros químicos utilizados. Em sintonia com a sustentabilidade, esse estudo visou o aproveitamento dos resíduos produzidos na extração do óleo de café verde, agregando uma finalidade para esses resíduos.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L., resíduo agroindustrial, antioxidante, metabólitos secundários.

ABSTRACT

Coffee was for many years the most prominent commodity of the Brazilian economy and one of the most commercialized beverages in the world, delighting all of different races and ethnicities for its pleasant taste and aroma. Through decades the interest was not only for the taste but also for the benefits presented by him, attracting the eyes of researchers for a more detailed study about their composition, since it is rich in bioactive compounds. So cosmetology tilted eyes for this product of great commercial importance to study its role in preventing damage that affect the skin. Since coffee contains bioactive compounds it has beneficial physiological actions and potential as antioxidant to prevent photoaging. Among its secondary metabolites, phenolics stands out for its antioxidant activity and chlorogenic acids are mainly responsible for this activity by sequestering free radicals and preventing the propagation of the oxidative process. Another widely studied compound is caffeine, a methylxanthine, found in large quantities in coffee seed. In this context, this work aimed to assessing the chemical profile of phenolic compounds, antioxidant, sunscreen and toxicity potentials of the ethanol extract 70% of the green seeds pie of *Coffea arabica* L. with application in the development of phytocosmetic. Chromatographic and spectroscopic methods were used for obtaining the chemical profile, identification and quantification of secondary metabolites. The extract showed significant antioxidant activity, and significant levels of phenolic compounds and flavonoids, and is safe considering the cytotoxicity assay. The addition of the ethanol extract 70% of the green seeds pie of *Coffea arabica* L. in the formulation led to a increase in sun protection factor, showcasing an influence in the formulation of the extract, a synergism of the extract with chemical filters. In line with sustainability, this study aimed to the recovery of waste produced in the extraction of green coffee oil, adding a purpose for those wastes.

Keywords: *Coffea arabica* L., agroindustrial residue, antioxidant, secondary metabolites.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABELAS	iv
ABREVIATURAS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	2
2 REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1 Pele.....	7
2.2 Envelhecimento cutâneo	8
2.3 Cosméticos antioxidantes.....	9
2.4 Radiação solar	11
2.5 Segurança de Cosméticos	12
2.6 O Café.....	12
2.7 Composição química do café	13
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Materiais.....	23
4.2 Métodos	24
4.2.1 Obtenção da matéria-prima vegetal	24
4.2.2 Determinação da perda por dessecação da torta da semente seca e da semente seca de <i>C. arabica</i>	24
4.2.3 Obtenção dos extratos	25
4.2.4 Análise de EEtTr por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	25
4.2.5 Desenvolvimento de método analítico por CLUE para identificação e quantificação de ácido clorogênico e cafeína no EEtTr e no EEtSm.....	26
4.2.5.1 Pré-tratamento	26
4.2.5.2 Sistema Cromatográfico	27

4.2.5.3 Identificação e quantificação de substâncias no EEtTr e no EEtSm	27
4.2.6 Determinação do teor de fenólicos totais do EEtTr e do EEtSm.....	28
4.2.7 Determinação do teor de flavonoides totais do EEtTr e do EEtSm.....	28
4.2.8 Determinação do potencial antioxidante do EEtTr e do EEtSm.....	29
4.2.8.1 Método de inibição do radical DPPH	29
4.2.8.2 Método de inibição do cátion radicalar ABTS ⁺	30
4.2.8.3 Efeito supressor sobre radicais peroxila (AAPH/Piranina)	30
4.2.9 Avaliação do potencial citotóxico do EEtTr.....	31
4.2.10 Incorporação do EEtTr na formulação cosmética.....	33
4.2.11 Determinação do FPS.....	35
4.3 Análise estatística	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 Determinação da perda por dessecação da torta da semente verde seca e da semente verde seca de <i>C. arabica</i>	37
5.2 Obtenção dos extratos	38
5.3 Análise do EEtTr de <i>C. arabica</i> por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	39
5.4 Desenvolvimento de método analítico por CLUE para identificação e quantificação de cafeína e ácido clorogênico no EEtTr e no EEtSm	40
5.5 Determinação do teor de fenólicos totais do EEtTr e do EEtSm	49
5.6 Determinação do teor de flavonoides totais do EEtTr e do EEtSm	53
5.7 Determinação do potencial antioxidante	54
5.7.1 Ensaio do radical DPPH do EEtTr e do EEtSm.....	54
5.7.2 Ensaio do cátion radicalar ABTS ⁺ com o EEtTr e o EEtSm	57
5.7.3 Efeito supressor sobre radicais peroxila (AAPH/Piranina).....	60
5.8 Avaliação do potencial citotóxico.....	62
5.9 Preparo das formulações	65
5.10 Avaliação “ <i>in vitro</i> ” do Fator de Proteção Solar das formulações base e fitocosmética	66
6 CONCLUSÕES	70
7 REFERÊNCIAS	73



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O café é umas das “commodities” mais comercializadas no mundo, sendo o Brasil em 2012, segundo a Organização Internacional do Café (OIC), o responsável por um terço da produção mundial, o que faz de nosso país o maior produtor e exportador desse produto (EMBRAPA, 2012).

O café pertence ao gênero *Coffea* da família Rubiaceae e dentre as diversas espécies existentes, as principais do ponto de vista agroeconômico, são o *Coffea arabica* L. (café arábica) e o *Coffea canephora* Pierri (café robusta). O *Coffea arabica* L. é o que apresenta melhor qualidade e é a espécie eleita pelos apreciadores de café. Sabe-se que a composição química do grão de café varia com inúmeros fatores, dentre eles a espécie, fatores genéticos, a colheita, processamento e armazenamento dos grãos (ABRAHÃO et al., 2008; MONTEIRO e TRUGO, 2005).

Inúmeros estudos são desenvolvidos com café, devido a sua relevância no cenário mundial, a sua importância econômica e por conter compostos bioativos de suma importância. Dentre os compostos bioativos, a classe dos fenólicos se destaca por sua atividade antioxidante.

Os compostos fenólicos presentes no café variam de acordo com a espécie, sendo que *C. canephora* Pierri apresenta maior teor de compostos fenólicos do que *C. arabica* L. (MOREIRA et al., 2000). Os ácidos clorogênicos são gerados a partir da esterificação do ácido quínico com um ou mais derivados do ácido *trans*-cinâmico. Esses compostos formados podem ser divididos pelo tipo, número e posição dos resíduos acila. Baseado nessa classificação os mais encontrados são os mono ésteres do ácido cafeoilquínico, especialmente o ácido 5-cafeoilquínico, sendo o café a principal fonte de ácidos clorogênicos (DE MARIA e MOREIRA, 2004). Além dos compostos fenólicos, outros metabólitos secundários encontrados no café são os diterpenos (ex. caveol e cafestol), triterpenos, metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina) e trigonelina (MONTEIRO e TRUGO, 2005; PARRAS et al., 2007). Além das propriedades estimulantes já bem conhecidas da cafeína, estudos também têm apontado um potencial antioxidante, essa substância inibiria a peroxidação lipídica induzida por radicais livres (PERIM, 2004). Outra função descoberta foi a adição de cafeína nas formulações cosméticas de proteção solar pois estudos recentes

mostram que a cafeína aumenta seu efeito protetor contra a radiação ultravioleta (UV), reduzindo a produção dos radicais livres nas células da pele chegando a atuar na prevenção de câncer de pele induzido por radiação UV (KOO et al., 2007; KERZENDORFER; O'DRISCOLL, 2009).

Os radicais livres são átomos ou moléculas instáveis que possuem um elétron desemparelhado e buscam se estabilizar no organismo (BERGER, 2005). Quando a capacidade das células de suprimir os radicais livres é inferior à concentração deles, quantidades excessivas de espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ou nitrogênio (ERN), supera o antioxidante endógeno acontece o estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio são produzidas pelo metabolismo humano tendo importante função biológica e fisiológica, dentre elas participam como mediadores através do deslocamento de elétrons nas reações bioquímicas, atuam no processo inflamatório, na fagocitose de patógenos (VASCONCELOS et al., 2007; BARBOSA et al., 2010) . As células elaboraram mecanismos antioxidantes para protegê-las contra esses radicais livres (FINKEL e HOLBROOK, 2000; SCHAFER e BUETTNER, 2001). Da mesma maneira como acontece em todo o organismo, na pele não seria diferente, ações exógenas levam a geração de radicais livres e assim a um envelhecimento precoce ou o aparecimento de doenças como o câncer que pode se desenvolver por esse estresse oxidativo.

Neste cenário, os extratos de plantas que possuem um potencial antioxidante vêm sendo cada vez mais investigados para o desenvolvimento de cosméticos antienvhecimento para o combate aos radicais livres, à prevenção de efeitos por eles causados, ajudando a amenizar os efeitos do tempo sobre a pele, as rugas e linhas de expressão (RODRIGUES, 2003). É sabido que a radiação UV é capaz de aumentar a formação de radicais livres levando a danos celulares.

A pele é o maior órgão do corpo humano, exercendo inúmeras funções que contribuem para a defesa do organismo, sendo que é o único órgão exposto ao ambiente; por isso, os cuidados devem ser extremos (SASSAKI e CUNHA, 2010). Para a Cosmetologia, o conhecimento das estruturas e funcionamento da pele é essencial, pois tem como objetivo melhorar sua aparência com a utilização de ativos ou prevenir possíveis danos (WILKINSON e MOORE, 1990). Atualmente, o uso de plantas em cosméticos tem ganhado espaço na indústria, em que as substâncias de origem vegetal são utilizadas para conservação e promoção da beleza da pele (SANTOS et al., 2011).

Os flavonoides e a vitamina C são substâncias presentes em frutas e extratos vegetais que atuam na prevenção da ação de radicais livres em nosso organismo e, portanto, com capacidade de prevenir o câncer e auxiliar na prevenção do envelhecimento cutâneo (MARTIN et al., 1996; MARTÍNEZ et al., 1999). Hubinger (2010) analisou o potencial antioxidante dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae), o faveiro. O extrato rico nos flavonoides rutina e quercetina, substâncias com grande atividade antioxidante, foi utilizado no desenvolvimento de um fitocosmético. Foram utilizados os ensaios dos radicais DPPH e ABTS e foi verificado um elevado potencial do extrato com ação antioxidante e antirradicalar.

Os flavonoides fazem parte do grupo de polifenólicos naturais e juntamente com os ácidos clorogênicos apresentam sua enorme importância, pois são capazes de sequestrar os radicais livres exercendo a atividade antioxidante (PRIOR; CAO, 2000). Também são eficientes em quelar metais capazes de catalisar a peroxidação de lipídeos (SILVA et al., 1998; TERAQ; PISKULA, 1999; ZISHEN et al., 1999), e além disso os flavonoides podem inibir enzimas responsáveis pela formação do ânion superóxido, como por exemplo a xantina oxidase (NIJVELDT et al., 2001). A capacidade antioxidante é definida pela estrutura do flavonoide, a capacidade eletrodadora, depende do número e da posição das hidroxilas e sua conjugação (NIJVELDT et al., 2001). Assim sendo, extratos das plantas que os contém são utilizados em cosméticos para retardar o envelhecimento da pele (CUNHA et al., 2004). Os flavonoides estão presentes em diversas plantas e frutas, utilizadas como alimentos e, além da propriedade antioxidante, tem sido demonstrado que podem ter a capacidade de reduzir a toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade de diversos produtos químicos (AMES e GOLD, 1991; AGARWAL et al., 1993).

Além dos compostos fenólicos presentes no café, a indústria cosmética despertou o interesse para o óleo de café verde, uma matéria insaponificável, constituída principalmente por esteróis. Essa classe de esteroides possui propriedades cosméticas almejadas, entre elas a retenção de umidade, hidratação, potencial ação na prevenção do fotoenvelhecimento, etc (TURATTI, 2001; PEREDA et al., 2008). O teor de óleo do grão de café é de 15% para *C. arabica* L. e 10% para *C. canefora* Pierri (SPEER e KÖLLING-SPEER, 2001).

A Cooperativa Regional de Cafeicultores (Cooxupé) localizada em Guaxupé-MG é uma das produtoras do o óleo de café verde, esse óleo é obtido através de pressagem a frio a fim de conservar as propriedades do produto. A Cooxupé gera

por mês 500 quilos do óleo de café verde, 100 quilos de café originam 8 quilos de óleo, e cada quilo é vendido em média por US\$100 -150, sendo um valor agregado alto visto que o quilo do café é vendido por US\$4 (FERREIRA, 2014).

O objeto de estudo desse trabalho é obtido após a extração do óleo através de prensagem a frio das sementes verdes de *C. arabica*. Do processo de extração do óleo é obtido uma massa residual rica quimicamente que é usualmente desprezada pela indústria cafeeira. Visto que não existe até o presente momento um estudo a respeito deste material residual e de suas aplicações, este trabalho buscou um estudo do perfil químico qualitativo e quantitativo de compostos fenólicos no extrato etanólico 70 % da torta de sementes verdes de *Coffea arabica* L. Além disso, foram avaliadas as atividades do extrato relacionadas a estes metabólitos secundários, com importância para aplicação em cosméticos – atividade antioxidante, citotóxica e fotoprotetora da formulação em que o extrato foi incorporado. Ao mesmo tempo avaliamos também os compostos fenólicos e a atividade antioxidante do extrato etanólico 70 % de sementes verdes de *Coffea arabica* L. com finalidade comparativa.

Esse trabalho também apresenta grande relevância do ponto de vista ambiental, podendo ser incluído nos princípios da química verde quando se pensa na reutilização de subprodutos gerados pela indústria (PRADO, 2003; FARIAS e FÁVARO, 2011). O ideal segundo o proposto pela química verde é a não geração de subprodutos, porém como nesse caso o material residual já foi produzido então o importante é agregar uma finalidade a esse resíduo, minimizando o descarte no meio ambiente.

A black and white photograph of coffee beans on a branch, used as a background for the title. The beans are dark and clustered together, with some leaves visible at the bottom left. The text is centered over the image.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Pele

A pele é o manto de revestimento do organismo que funciona protegendo o organismo do meio externo (FISHER et al., 2008). A sua principal função é a homeostasia, sendo de vital importância para o perfeito funcionamento do corpo. A percepção sensorial possibilita o registro dos sintomas de dor, calor, frio, tato alertando o organismo para produzir uma resposta. Atua também como defesa física, química e imunológica, proteção contra radiação ultravioleta, barreira contra perda de água, e apresenta uma excelente capacidade regenerativa e de recuperação (WOLK et al., 2010; CORRÊA, 2012).

A pele é dividida em duas camadas principais: a epiderme (a camada exterior, formada pelo epitélio estratificado e tem origem ectodermal) e derme (camada interior, formada de tecido conjuntivo e de origem mesodermal), além do tecido subcutâneo, a hipoderme (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

A epiderme apresenta como principal função a produção de estrato córneo, uma camada fina da pele que recobre a maior parte do corpo, atua protegendo contra agentes agressores externos e evitando a perda de fluidos orgânicos (MADISON, 2003). Na epiderme ocorre diferenciação celular que mantém a barreira. Pode ser subdividida em camada basal ou germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida e camada córnea. A penetração de cosméticos na pele está associada a proteínas e lipídeos do estrato córneo, e depende de sua composição. Na remoção de células mortas da epiderme (esfoliação) há uma renovação celular, acelerando a mitose da camada basal.

Na composição da superfície cutânea está a emulsão epicutânea (mistura de suor e sebo, essa emulsão mantém a pele hidratada e mantém o pH da pele entre 5 e 6), flora bacteriana (previne a proliferação de micro-organismos patogênicos) e capa gasosa (responsável pela formação de microclima cutâneo).

Além dos queratinócitos, células epiteliais estratificadas presentes em todas as camadas da epiderme, outros tipos de células também constituem a epiderme. Outras células da epiderme são os melanócitos, as células de Langerhans, as células de Merkel, os linfócitos T e os queratinócitos (WILKINSON e MOORE, 1990;

HERNANDEZ e MERCIER-FRESNEL, 1999). Os melanócitos produzem melanina, seu papel fisiológico é a pigmentação epidérmica e fotoproteção, através da absorção da radiação. A melanina produzida pelos seus melanócitos protege contra a radiação, principalmente UV.

A epiderme possui membrana carregada negativamente; essencialmente impermeável aos eletrólitos. Alguns fatores podem atuar na absorção cutânea, a pele, a natureza das substâncias e o veículo dessas substâncias. A penetração de ativos na pele pode ser pelo folículo pilosebáceo ou através de substâncias lipofílicas capazes de penetrar na camada córnea (CAMPOS, 2010). A baixa viscosidade e o tamanho reduzido das partículas aumentam a absorção.

A derme é formada por tecido conjuntivo denso a qual a epiderme está ligada. Suas principais funções são de sustentação, elasticidade, preenchimento, defesa contra micro-organismos e nutrição da epiderme. A derme é abundante em vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e suas terminações, nela também estão presentes as glândulas sebáceas e sudoríparas e elementos celulares (WOLK et al., 2010; CORRÊA, 2012). Os fibroblastos (responsáveis pela síntese das macromoléculas que compõem a matriz extracelular) e os mastócitos são os tipos celulares predominante na derme (CAMPOS, 2010).

Por fim a hipoderme, um tecido subcutâneo que não faz parte da pele. É um tecido de natureza adiposa, importante na ligação com os tecidos mais profundos. Funciona como absorvedor de impacto, atua como isolante térmico, e apresenta capacidade energética já que através da lipólise libera ácidos graxos (SPELLBERG, 2000).

2.2 Envelhecimento cutâneo

O envelhecimento é um processo natural. A pele por ser um órgão externo evidencia mais rápido esse envelhecimento muitas vezes aparente através das rugas, perda de elasticidade, hiper ou hipopigmentação. No processo de envelhecimento diminuem as células de colágeno e fibras elásticas, perdendo assim a elasticidade da pele. Outras células reduzem a reprodução como é o caso dos fibroblastos e dos queratinócitos. Uma das maiores causas do envelhecimento cutâneo é a desorganização do mecanismo de defesa antioxidante das células,

provocando alterações na pele. Considera-se didaticamente dois tipos de envelhecimento, o cronológico cutâneo, genético (intrínseco) e o extrínseco que é causado pela exposição a influências danosas devido a fatores ambientais, entre eles, o fumo, o álcool, a má nutrição e a exposição a radiação solar (DRAELOS, 1999; BERRA et al., 2006; MCCULLOUGH & KELLY, 2006).

A exposição à radiação solar é um dos principais fatores extrínsecos. Estudos revelam que essa radiação induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que são responsáveis pelos danos foto-oxidativos em ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (DEVARY et al., 1993).

Com o intuito de fortalecer e estimular a proteção natural utiliza-se compostos exógenos, pela ingestão de antioxidantes naturais encontrados na dieta e dentre eles estão as vitaminas, as frutas, legumes, verduras que possuem em sua composição compostos fenólicos onde estão incluídos os flavonoides e taninos (HIRATA et al., 2004). Muitos estudos revelam a importância dos cosméticos aplicados topicamente que apresentam em sua composição extratos de plantas que contêm esses compostos com ação antioxidante. A atual preocupação com a ação dos antioxidantes e a sua relação com os radicais livres tem se tornado essencial à compreensão do envelhecimento celular.

2.3 Cosméticos antioxidantes

As lesões oxidativas no DNA, RNA, proteínas e membranas celulares ocorrem quando a capacidade das células de suprimir os radicais livres é inferior a concentração deles, quantidades excessivas de espécies reativas de oxigênio e/ou de nitrogênio superaram o antioxidante endógeno, isso acontece em nosso organismo como também sobre o tecido cutâneo (DAI; MUMPER, 2010). A pele é suscetível aos danos provocados pelos radicais livres devido ao seu contato com o oxigênio e com outros estímulos ambientais como a radiação ultravioleta, poluição ambiental, produtos químicos tóxicos. A ingestão de alguns alimentos (ex. frutas) pode potencialmente auxiliar na modulação endógena no combate as espécies reativas de oxigênio (CALABRESE et al., 2000).

Inúmeros motivos conduzem as pesquisas aos cosméticos antioxidantes que têm sido amplamente estudados devido à ação dos radicais livres no tecido

subcutâneo, sendo principalmente formados pela ação exógena (SCHARFETTER-KOCHANNEK et al., 1997). Os cosméticos estão sendo desenvolvidos com o intuito de ser um instrumento para minimizar os efeitos deletérios dos radicais livres. São produtos com função de reproduzir a proteção natural e limitar as reações químicas oxidativas. Para esta finalidade, são utilizados em formulações cosméticas, substâncias antioxidantes como vitaminas (vitaminas E e C), extratos vegetais, flavonoides, entre outros que são vitais na defesa celular contra oxidantes endógenos e exógenos. A vitamina C age como agente redutor, reduzindo metais de transição (principalmente Fe^{3+} e Cu^{2+}), e por ser redutor pode ser oxidado pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN). A vitamina E atua sequestrando o radical peroxila, bloqueando a cadeia da peroxidação lipídica (BARREIROS et al., 2006).

Existem diversos testes para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias. Devido à variedade de radicais livres e a forma como eles atuam existem vários métodos para avaliar essa atividade. Para uma análise mais precisa da atividade antioxidante da substância em estudo seria necessário saber qual é o radical livre que foi gerado e o meio de atuação dele, que tipo de dano ele induz. Os métodos antioxidantes podem ser usados para analisar a peroxidação lipídica ou mensurar a capacidade das substâncias de sequestrar os radicais livres (ALVES et al., 2010). Dentre os métodos *in vitro* podemos citar o sequestro do radical DPPH, inibição do radical ABTS, sequestro do peróxido de hidrogênio, sequestro dos radicais peroxila, hidroxila (SOUZA et al., 2007; ALVES et al., 2010).

Kim et al. (1997) em seu trabalho testou cem extratos de plantas avaliando o potencial antioxidante de cada um deles utilizando diferentes metodologias, para emprego cosmético. Ao realizarem o ensaio do DPPH, os extratos com atividade antioxidante mais significativa demonstraram capacidade de sequestro do radical livre superior a 60% na concentração de 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e foram considerados extratos de grande potencial antioxidante.

Dudonné e colaboradores (2009) avaliaram o potencial antioxidante dos extratos aquosos de 30 plantas, utilizando métodos como radicais DPPH e ABTS. Eles também determinaram o teor de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu, e concluíram que houve grande diferença entre as plantas testadas no que se refere ao potencial antioxidante e ao teor de fenólicos totais. Dentre elas o

extrato aquoso da *Cinnamomum zeylanicum* (canela) poderia ser empregado como fonte natural de antioxidantes.

2.4 Radiação solar

A exposição solar requer proteção contra radiação. O sol é a principal fonte de energia do nosso planeta. Os efeitos biológicos da radiação solar a curto prazo são benéficos, como por exemplo o antirraquitismo, o bem estar físico e mental, o estímulo e a regulação a produção de melanina e posterior bronzeamento da pele, na terapêutica contra icterícia (excesso de bilirrubina que está presente no sangue e que o fígado não consegue metabolizar, leva a uma cor amarelada no recém nascido), etc. A luz solar age participando da síntese de vitamina D, auxiliando na produção dos hormônios, na regeneração celular, etc.

Os danos a médio e longo prazo causados pela luz do sol são: fotoenvelhecimento, câncer, inflamação, estimulação da síntese de DNA, produção de radicais livres, etc (DURASAIMY et al., 2011). Os raios solares são divididos em: UVA (320 a 400 nm), responsável pelo fotoenvelhecimento, assim como pela formação de radicais livres e lesões celulares do DNA; UVB (280 a 320 nm), responsável pelos eritemas, danos ao DNA, câncer de pele; e UVC (100 a 280 nm), altamente perigosa ao ser humano por ser muito mutagênica (COUTEAU et al., 2001).

Atualmente se sabe que tanto os raios UVA, quanto os raios UVB, contribuem para o desenvolvimento de diversos destes efeitos, devido, principalmente, à formação de radicais livres e lesões no DNA, esses são resultados de fenômenos cumulativos a longo prazo. Evidências sugerem que a exposição aos raios UV podem ter efeito imunossupressor, o qual compromete a habilidade do corpo de identificar e destruir células tumorais da pele (STREILEIN et al., 1994; FLOR et al., 2007; CORRÊA, 2012).

2.5 Segurança de Cosméticos

A ascensão dos cosméticos nos últimos anos tem levado a uma preocupação com a eficácia e a segurança dos mesmos, visto que os consumidores tem desejado produtos mais eficientes, que apresentem algum efeito biológico, como prevenção do envelhecimento cutâneo, impedir ou minimizar a ação dos radicais livres no material genético. Sendo assim esses produtos devem oferecer segurança ao consumidor.

O regulamento CE 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de novembro de 2009 proíbe os ensaios de produtos cosméticos acabados em animais, e sugere métodos alternativos de ensaios de toxicidade (AUGUSTIN et al., 1996). A indústria cosmética e os pesquisadores têm procurado alternativas aos testes com animais. (VIRAVADYA et al., 2004; LIVNY et al., 2003). O ensaio de citotoxicidade determina o potencial de degeneração ou morte celular provocado pela substância que está sendo testada. A citotoxicidade pode ser avaliada por diferentes métodos, dentre eles a citotoxicidade pela difusão em gel de agarose, citotoxicidade pelo método do Vermelho Neutro, citotoxicidade pelo método do MTT. O Vermelho Neutro e o MTT são os mais utilizados. O MTT é um sal amarelo solúvel metabolizado pela succinato desidrogenase presente na mitocôndria transformando em um produto violeta. O Vermelho Neutro em pH fisiológico atravessa a membrana plasmática e se aglomera no lisossomo. A saída desse gradiente de pH por mortalidade celular ou a perda da permeabilidade da membrana inibe a incorporação desses corantes (HARBELL et al., 1997). Esses são ensaios quantitativos, pois através deles é possível avaliar várias concentrações do produto testado e a quantidade de substância capaz de inviabilizar 50% das células (BABICH; BABICH, 1997).

2.6 O Café

O café surgiu na Etiópia, no centro da África. A Arábia foi a responsável pela propagação da cultura do café, e ele chegou ao norte do Brasil em 1727 trazido pela Guiana Francesa, sendo quenessa época o produto já tinha um alto valor comercial. As primeiras plantações foram iniciadas no Pará, em seguida no Maranhão, na

Bahia, e por toda a região nordeste. Porém o clima não era tão propício ao cultivo do café sendo levado para o sudeste onde as mudas foram cultivadas no Estado do Rio de Janeiro, assim os cafezais se espalharam, alcançando terras paulistas ao longo do vale do rio Paraíba, Minas Gerais e Paraná (ABIC, 2008).

A importância econômica do café refletiu-se na sua expansão geográfica em pouco tempo. O café estendeu-se, derrubando as matas, abrindo estradas, fixando povoações e criando riquezas, com a exploração do solo virgem, rico em nutrientes, e da mão-de-obra escrava a baixo custo. Por volta de 1840 o Brasil se tornou o maior produtor mundial de café (ABIC, 2008). O café foi se tornando um produto nobre do agronegócio e da exportação do Brasil, ocupando assim uma posição de destaque na história do desenvolvimento do país.

O café pertence ao gênero *Coffea* da família Rubiaceae. Dentre as várias espécies destacam-se as de maior importância agroeconômica, *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner (sinônimas: *Coffea canephora* var. *robusta* (L. Linden) A. Chev. e *Coffea robusta* L. Linden). Existe uma diferença genética entre as duas espécies: a *Coffea arabica* L. apresenta 44 genes, é tetraploide, se multiplica por autofecundação, enquanto a *C. canephora* possui 22 genes, é diploide e alógama (MENDES, 1956). A espécie *C arabica* L. apresenta melhor qualidade e é a eleita pelos consumidores por seu aroma mais fino e seu sabor mais intenso (PARRAS et al., 2007). O café arábica é melhor cultivado em altas altitudes, os grãos são mais lisos e mais alongados e possuem um teor de cafeína mais baixo que o café robusta. Em contra partida o café robusta apresenta grãos um pouco menores e mais redondos que o café arábica, e mais resistente a pragas e a variações climáticas, muito usado na indústria de café solúvel, em misturas ou *blends*, sendo mais rentável as indústrias (ILLY e VIANNI, 1996; ROSSETTI, 2007).

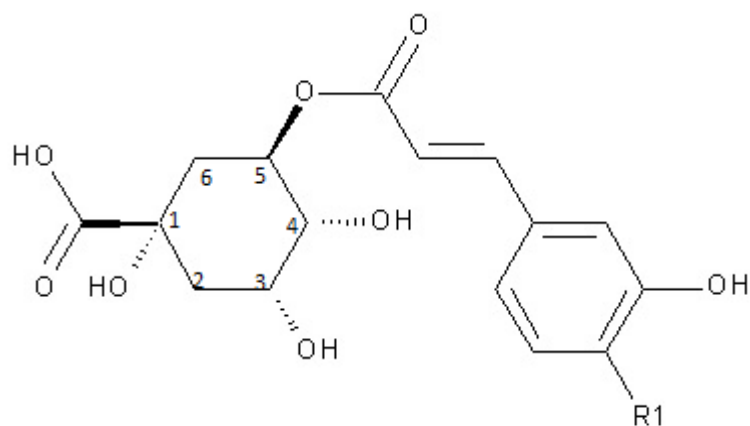
2.7 Composição química do café

O café é rico em substâncias bioativas por isso confere tantos benefícios. A composição química varia de acordo com as espécies, fatores genéticos, com a forma de plantio, colheita, graus de maturação, ambientais, de processamento e armazenamento (ABRAHÃO et al., 2008; MONTEIRO e TRUGO, 2005).

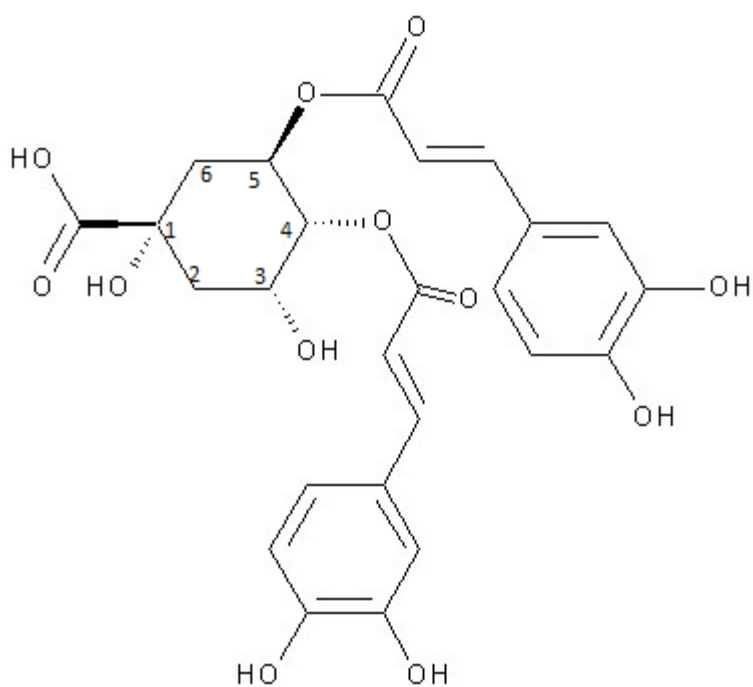
Os grãos verdes de *C. arabica* são compostos principalmente por água, monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos, lipídeos, ácidos graxos livres, terpenos, proteínas e aminoácidos, tocoferóis e tocotrienóis, xantinas (cafeína, teobromina e teofilina), trigonelina, os compostos fenólicos (polifenóis, ácidos clorogênicos e ácidos fenólicos livres) e sais minerais (PARRAS et al., 2007). Além dos compostos presentes no grão de café, através do processo da torrefação são gerados compostos voláteis. Dentro desse grupo estão incluídos os fenóis, ésteres, cetonas, aldeídos, hidrocarbonetos, éteres, ácidos orgânicos, anidridos, aminas e compostos que apresentam enxofre (MOREIRA et al., 2000).

Pesquisas mostram que, na composição do grão de café, estão presentes carboidratos que representam quase metade da massa do grão cru em base seca. A proporção de carboidratos assim como de outros constituintes varia de acordo com a espécie, local de plantio, estágio de maturação dos frutos assim como outros fatores. São encontrados carboidratos de baixa massa molar, sendo a sacarose o principal deles, com valores variando entre 2-5% para *C. canephora* e 5,0-8,5% para *C. arabica*. Frutose, glicose, manose, arabinose, ramnose, rafinose, galactose e ribose também estão presentes em quantidades inferiores a 1% da massa do grão seco. Os carboidratos de alta massa molar, presentes no café cru incluem, principalmente, três polissacarídeos: arabinogalactanos, mananos e celulose (ABRAHÃO et al., 2008; FERNANDES et al., 2001; MONTEIRO e TRUGO, 2005; MORAIS et al., 2008; PARRAS et al., 2007; VARMAN e SUTHERLAND, 1997).

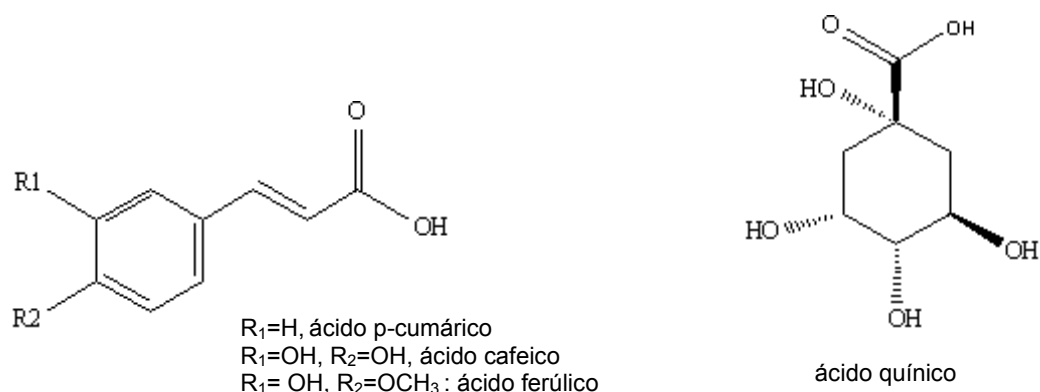
Os ácidos clorogênicos englobam uma importante classe dos compostos fenólicos e são os mais abundantes no café, sendo derivados principalmente da esterificação dos ácidos *trans*-cinâmicos (por exemplo os ácidos cafeico, ferúlico e *p*-cumárico) com o ácido quínico (PARRAS et al., 2007). As subclasses fundamentais de ácidos clorogênicos em café verde são ácidos cafeoilquínicos, dicafeoilquínicos e feruloilquínicos. Dentro dessas subclasses os ácidos cafeoilquínicos são os responsáveis por quase todo conteúdo de ácidos clorogênicos e o ácido 5-cafeoilquínico (Figura 1 e 2) é o principal representante e, por isso, é conhecido por ácido clorogênico, sendo o café sua principal fonte (DE MARIA e MOREIRA, 2004).

Figura 1 - Estrutura química de alguns ácidos clorogênicos.

R₁ = H, ácido 5-*p*-cumaroilquínico
R₁ = OH, ácido 5-cafeoilquínico
R₁ = OCH₃, ácido 5-feruloilquínico



ácido 4,5 dicafeoilquínico

Figura 2 - Estrutura química dos ácidos que compõem os ácidos clorogênicos.

Clifford (1985) apontou que algumas mudanças na estrutura do ácido clorogênico podem ser devido a migração de grupos fenólicos, fragmentação, hidrólise ou até polimerização durante o processo de torrefação dos grãos. Além dessas alterações também há perda de aminoácidos livres e formação de pigmento marrom através da reação de Maillard (reação caracterizada pela junção do grupo carbonila dos açúcares redutores com o grupo amínico das proteínas, de peptídios ou de aminoácidos).

Alguns métodos analíticos são descritos na literatura para compostos presentes no café. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido a técnica analítica mais utilizada na quantificação desses componentes. Trugo e Macrae (1984) desenvolveram um método de análise de ácidos clorogênicos em café solúvel utilizando CLAE-UV em fase reversa (C18) e gradiente de eluição com água adicionada de 0,01 M de citrato de potássio e metanol. A quantificação dos ácidos clorogênicos foi realizada a partir da curva analítica do ácido 5-cafeoilquínico e considerando-se o coeficiente de absorvidade molar dos demais ácidos clorogênicos.

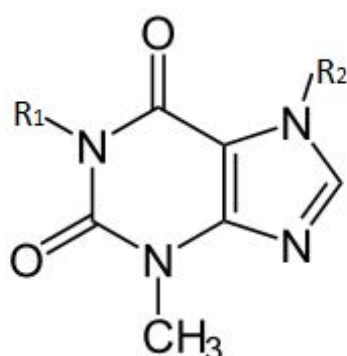
Monteiro e Trugo (2005) utilizaram coluna de fase reversa e como fase móvel tampão citrato trissódico 10 mM e metanol em sistema gradiente, com fluxo de 1,0 mL/min e comprimento de onda de detecção em 325 nm.

Os compostos fenólicos encontrados no grão de café são os principais responsáveis pela atividade antioxidante (CASTILLO; AMES; GORDON, 2002) e dentre eles os de maior destaque são os ácidos clorogênicos. Essa atividade é justificada pela capacidade dos compostos fenólicos em sequestrar os radicais livres

(PRIOR; CAO, 2000) e agir como quelantes de metais de transição, agindo tanto no início do processo oxidativo como na propagação dele. Compostos fenólicos e polifenólicos apresentam grande ação *in vitro* sobre espécies reativas de oxigênio, sendo também pró-oxidantes em determinadas situações (FARAH; DONANGELO, 2006) e atuando na proteção de processos oxidativos. Sabe-se também que a atividade antioxidante do grão de café por sua vez, varia de acordo com a espécie, com o processo de extração, de armazenamento e torrefação ao qual o café é submetido (ANDUEZA ET AL., 2004).

Além dos compostos fenólicos, outros metabólitos secundários são encontrados no café dentre eles os diterpenos (ex. caveol e cafestol), triterpenos, metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina; figura 3) e trigonelina (MONTEIRO; TRUGO, 2005; PARRAS et al., 2007). Os compostos nitrogenados representam uma fração importante da composição do café. Dentro desta classe de compostos encontram-se a cafeína (e outras metilxantinas), a trigonelina, os aminoácidos e as proteínas. Durante o processo de torrefação a trigonelina sofre degradação térmica e gera alguns compostos voláteis como os pirróis e piridinas, que ajudam a contribuir para o aroma do café. Também ocorre a desmetilação da trigonelina formando o ácido nicotínico que só é formado após a torra do café (DE MARIA et al., 1999).

Figura 3 - Estrutura química da cafeína, teofilina e teobromina.



R₁ e R₂ = CH₃ = cafeína
 R₁ = CH₃ e R₂ = H = teofilina
 R₁ = H e R₂ = CH₃ = teobromina

A cafeína é um pseudoalcaloide, encontrada em grande quantidade na semente do café, derivada de bases púricas, farmacologicamente ativa, fazendo parte do grupo das metilxantinas, sendo a substância responsável pelos efeitos

estimulantes do sistema nervoso central, do músculo cardíaco e alterações na homeostase do cálcio (DE MARIA; MOREIRA, 2007). No fígado a cafeína é metabolizada pelo citocromo P450 em três derivados das dimetilxantinas, a paraxantina, a teobromina e a teofilina.

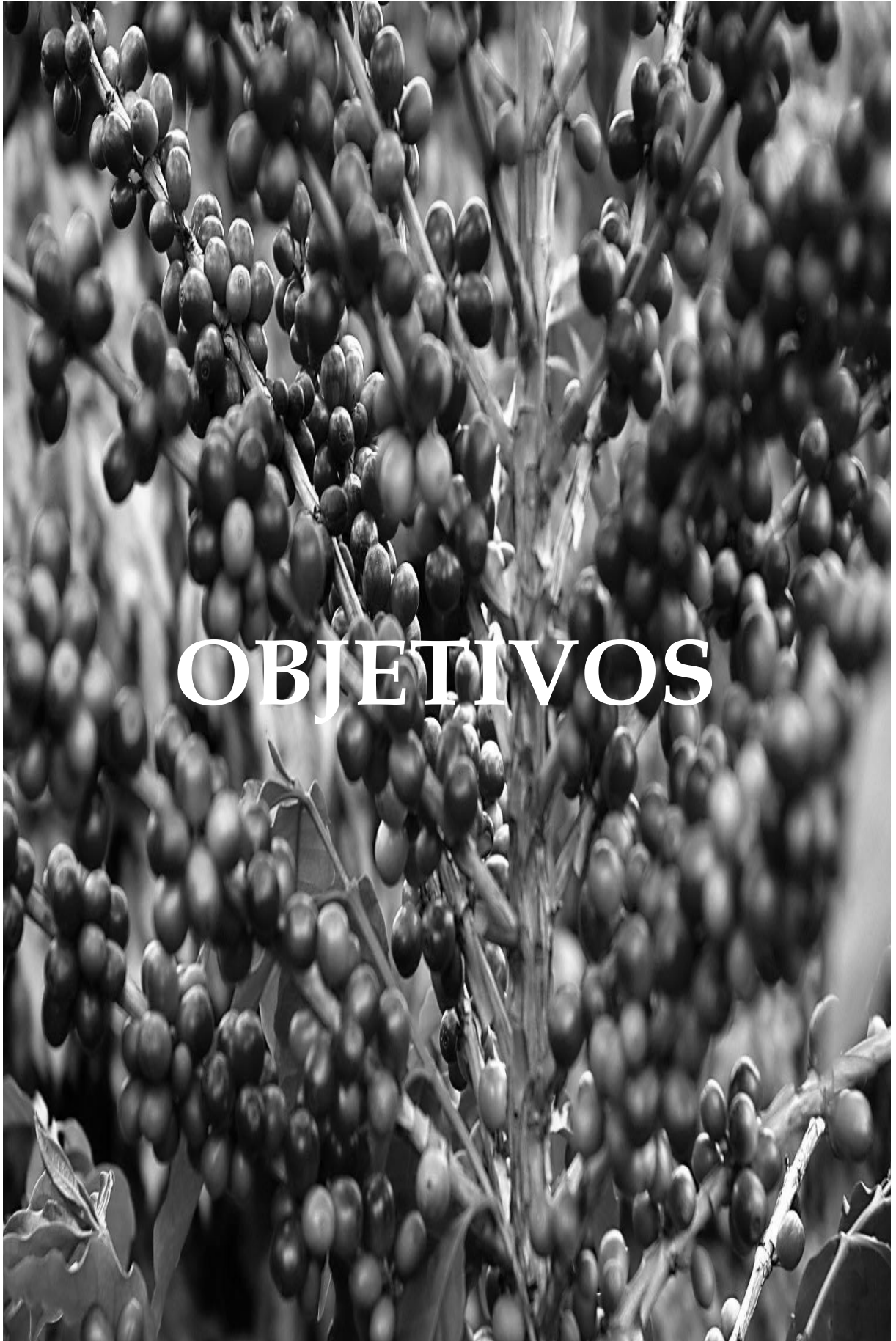
A ação da cafeína no organismo do ser humano é vastamente estudada e bem compreendida, porém o mecanismo de ação cosmética ainda não foi muito bem elucidado. Em cosméticos a cafeína é considerada um ativo anti-celulite, capaz de evitar o acúmulo de gorduras e estimular a lipólise através da inibição da fosfodiesterase (HERMAN; HERMAN, 2012). Estudos mostram que extratos de plantas e derivados da xantina poderiam reduzir as rugas e proteger a pele contra efeitos deletérios causados pela radiação UV, pois promove a diminuição de danos no DNA dos queratinócitos podendo reduzir o fotodano (MITANI et al., 2007). O potencial antioxidante da cafeína vem sendo estudado devido a essa substância inibir a peroxidação lipídica induzida por radicais livres (PERIM, 2004). Shi e colaboradores (1991) mostraram através da Ressonância de Spin Eletrônico (RSE) que a cafeína sequestra eficazmente o OH^\cdot gerado por reação de Fenton e reação de cromo (V) com H_2O_2 .

Lu e colaboradores (2002) fizeram aplicação tópica de cafeína e epigalocatequina galato em camundongos com o objetivo de induzir a proteção a radiação UVB. Esse estudo apontou um potencial quimiopreventivo e também uma inibição do crescimento do tumor e aumento da apoptose. O estudo foi realizado em camundongos saudáveis expostos a radiação UVB, e esses animais tratados com cafeína apresentaram uma redução de 44% em tumores não malignos e 72% em tumores malignos. Assim também Koo e colaboradores (2007) submeteram camundongos sem pêlo a radiação UVB, e após a exposição fizeram aplicação tópica de cafeína ou veículo três vezes por semana durante 11 semanas. Os resultados mostraram que a cafeína aplicada topicamente reduziu a rigidez e aspereza da pele causada pela radiação. Histologicamente a aplicação tópica de cafeína na pele do rato após exposição à radiação UVB promoveu a eliminação dos queratinócitos com DNA danificado e pode reduzir o fotodano e a fotocarcinogênese.

Para quantificação de cafeína, vários métodos cromatográficos são empregados. Abrahão e colaboradores (2010) desenvolveram um método de análise para cafeína e ácido 5-cafeoilquínico utilizando CLAE-UV em fase reversa (C18), como fase móvel metanol, água e ácido acético (20:80:1), comprimento de onda 272

nm, fluxo 1 mL/min, e o tempo de retenção da cafeína foi de 17 min. Monteiro e Trugo (2005) utilizaram também CLAE-UV em fase reversa (C18), com fase móvel composta por metanol e água (60:40), comprimento de onda de detecção 272 nm, fluxo de 1 mL/min, e o tempo de retenção da cafeína foi de 17 min. Mazzafera e Silvarolla (2010) empregaram como fase móvel metanol: água com 0.5% de ácido acético (50:50) , vazão de 0,8 mL/min e o comprimento de onda de 280 nm.

O óleo de café verde, presente substancialmente na semente, é rico em matéria insaponificável (substâncias dispersas em óleos e gorduras que posteriormente ao processo de saponificação não se solubilizam em solução aquosa), principalmente os esteroides, sendo muito usado na indústria cosmética, por apresentar propriedades desejáveis para esse fim. O teor de óleo do grão de café é de 15% para *Coffea arabica* L. e 10% para *Coffea canephora* (SPEER e KÖLLING-SPEER, 2001). O óleo da semente de café (*Coffea arabica* L.) apresenta metabólitos secundários bioativos com capacidade antioxidante importante, e potencial ação na prevenção do fotoenvelhecimento (PEREDA et al., 2008).



OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o perfil químico de compostos fenólicos, o potencial antioxidante, fotoprotetor e a citotoxicidade do extrato etanólico 70% da torta de sementes verdes de *Coffea arabica* L., com aplicação no desenvolvimento de um fitocosmético.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Obter extrato etanólico 70% da torta de sementes verdes de *Coffea arabica* L. (EEtTr) e extrato etanólico 70% das sementes verdes de *Coffea arabica* L. (EEtSm);
- ✓ Desenvolver e aplicar métodos analíticos cromatográficos e fotométricos para a identificação e quantificação de compostos fenólicos e outras substâncias em EEtTr e EEtSm;
- ✓ Avaliar o potencial antioxidante de EEtTr e EEtSm;
- ✓ Avaliar citotoxicidade de EEtTr em diferentes linhagens celulares;
- ✓ Incorporar EEtTr em formulação cosmética;
- ✓ Avaliar o potencial fotoprotetor de formulação cosmética contendo EEtTr;



MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Materiais e reagentes: AAPH [dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)], ácido clorogênico (Sigma[®]); ácido gálico (Sigma[®]); álcool isopropílico (Merck[®]); antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL; Sigma[®]); cafeína (Audaz[®]); carbonato de sódio (Reagen[®]); capelas de exaustão de ar; cartucho para extração em fase sólida (*clean-up*): Phenomenex[®] modelo StrataTM C18 - E (15 x 10 mm; 55 µm); cloreto de alumínio; dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich[®]); coluna HSS SB C₁₈ (2,1 x 100 mm; 1,8 µm) Waters; etanol (Chemys[®] e TecLab[®]); filtro de seringa com membrana PVDF 0,22 µm; fita Transpore[®]; garrafas de cultura celular de 25 e 75 cm² (TPP); hidróxido de sódio; meio de cultura MEM (*minimal essential medium*) (Cultilab[®]); metanol (Chemys[®]); NP-PEG; picnômetro; placa de 96 poços para cultura celular (TPP); placas em alumínio cobertas com sílica gel (Sigma-Aldrich[®]) (20 x 20 cm) com indicador de fluorescência em 254 nm; quercetina (Sigma[®]); radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazina (DPPH, Sigma[®]); 2,2'-azinobis-(3-etilbenzothiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio (ABTS, Sigma[®]); reagente Folin-Ciocalteu (Imbralab[®]); solução tampão fosfato pH 6,8; brometo de 3-(4,5-dimetiltazo-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio bromide (MTT, Sigma[®]); seringa de plástico 10 mL; seringa de vidro 10 mL; soro fetal bovino (Cultilab[®]); tripsina (Gibco[®]); Tampão Salina Fosfato (PBS); tubos de 15 mL (TPP);

Solventes:

- a) Extração e CCD: solventes grau P.A. marcas Qhemis[®] e Synth[®];
- b) Análises por CLUE (incluindo pré-tratamento da amostra) e fotométricas: solventes grau cromatográfico (J. T. Baker[®]);
- c) Água ultrapura: obtida a partir de purificador Milli Q Synergy[®];

Equipamentos: agitador (Labor Technik[®] RW20DZM.n); balança analítica (Marte[®] modelo AY220- máx 220g; min 0,01g; d = 0,0001g); balança com radiação infravermelha (LP11 - METTLER[®]); balança semi-analítica (Gehaka[®] modelo BG 200 - máx 200 g; min 0,025 g; d= 0,001g); espectrofotômetro UV/Vis (Hitachi U-2001);

espectrofotômetro UV/Vis (Beckman DU.530); estufa de CO₂ (Shel Lab[®]); estufa de secagem e esterilização (modelo 320 SE - Fanem[®]); estufa de secagem (Quimis[®]); geladeira; leitor de placas (Bio-rad[®] Model 550); liofilizador (Edwards E-C Micromodulyo[®]) microscópio de luz polarizada (Leica Leitz DM RXE) com capturador de imagens (Moticam[®] 2000); moinho de facas (modelo TE 148 - Tecnal[®]); optometrics (SPF-290S[®]); peagômetro (GeHaka[®] PG 1800); pipetadores automáticos com volume variável (Agipette); rota evaporador (IKA-DEST modelo KV 05S3), com banho de aquecimento e banho ultratermostatizado -refrigeração (Quimis[®] modelo Q214M3); sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência Waters Acquity UPLC[®].

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção da matéria-prima vegetal

A torta de semente verde de *C. arabica* foi fornecida pela cooperativa de cafeicultores Cooxupé localizada em Guaxupé-MG, assim como a semente verde de *C. arabica*. Da extração do óleo por meio de prensagem a frio das sementes de *C. arabica*, a Cooxupé obtém uma massa residual (torta), e esse material é o objeto de estudo. A torta (massa total: 300g) e a semente (massa total: 250 g) foram secas em estufa com circulação de ar à 40°C por 24 h e pulverizadas em moinho de facas e depois em liquidificador.

4.2.2 Determinação da perda por dessecação da torta da semente seca e da semente seca de *C. arabica*

A determinação da perda por dessecação foi realizada através do método gravimétrico e do método em balança com aquecimento por radiação infravermelha. Para o método gravimétrico (BRASIL, 2010) três amostras da torta e das sementes secas foram pesadas (2,0 g), após a moagem em gral com pistilo. Foram colocadas em estufa com a temperatura entre 105-110° C durante 3 h; em seguida, foram deixadas em dessecador contendo sílica gel até atingirem aproximadamente a temperatura ambiente e então pesadas novamente. Esse procedimento foi realizado

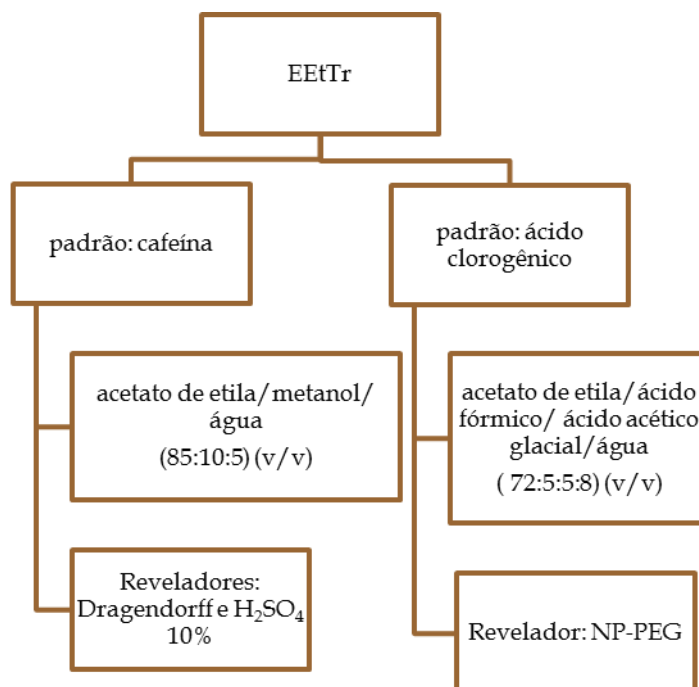
até atingir peso constante. No método por radiação infravermelha também foram pesados cerca de 2,0 g do material vegetal (torta e sementes), sendo submetidos a temperatura de 105° C pelo período de 90 minutos. Esse método foi realizado em balança infravermelha (INFRATEST®). Os resultados de ambos ensaios foram expressos através da relação entre a massa inicial e final do material vegetal em porcentagem (% , m/m), através da média de três determinações.

4.2.3 Obtenção dos extratos

A extração foi realizada com etanol 70% e o método utilizado foi a maceração com aquecimento (40° C), com troca de solvente extrator e agitação ocasional. Foram 3 etapas de extração de 24, 48 e 48 h, com troca de solvente extrator em cada etapa (volume total de solvente para a torta: 4500 mL, volume total de solvente para a semente: 3750 mL). A relação material vegetal/solvente total foi de 1:15 (g/mL), sendo 1:5 em cada etapa. As soluções extrativas obtidas foram filtradas em papel de filtro, reunidas, concentradas em evaporador rotativo para eliminação do etanol e, em seguida, liofilizadas. Os extratos brutos secos tanto da torta (EEtTr) como da semente (EEtSm) foram armazenados em frascos de vidro fechados em geladeira.

4.2.4 Análise de EEtTr por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para análise do extrato (EEtTr) foram utilizadas placas de alumínio cobertas com sílica gel (Sigma-Aldrich®) e como fase móvel, solventes ou misturas de solventes PA. As condições cromatográficas gerais foram: sílica gel 60G (20 x 20 cm x 0,25 mm); ativação: 110° C por 1 h. Para as análises, os padrões escolhidos foram cafeína e ácido clorogênico na concentração de 15 mg/mL, e a solução do EEtTr na concentração de 20 mg/mL. A figura 4 resume as condições empregadas na CCD. Após visualização sob luz UV (254 e 365 nm), e foram utilizados os reagentes Drangendorff e ácido sulfúrico 10% para cafeína e NP-PEG para fenólicos (WAGNER; BLADT, 1996).

Figura 4 - Fluxograma das condições utilizadas na análise do EEtTr de *C. arabica*.

4.2.5 Desenvolvimento de método analítico por CLUE para identificação e quantificação de ácido clorogênico e cafeína no EEtTr e no EEtSm

4.2.5.1 Pré-tratamento

O pré-tratamento das amostras incluiu uma extração em fase sólida com sílica de fase reversa (Phenomenex® Strata™ C18-E; 15 x 10 mm; 55 µm), solubilizando-se as amostras, EEtTr e EEtSm (15 mg) em 1,0 mL do eluente utilizado - metanol: água 90:10 (v/v). O cartucho de C18 foi ativado com 10 mL de metanol, e depois foi condicionado com a fase móvel (10 mL). As amostras foram aplicadas e, em seguida, eluídas 4,0 mL do eluente. A secagem das amostras foi realizada sob fluxo de ar em capela; após, foram solubilizadas em 1 mL de metanol e filtradas em membrana (0,22 µm, PVDF Millipore®) diretamente para *vials*.

Foi realizado também um teste excluindo-se a etapa do EFS no pré-tratamento, solubilizando EEtTr e EEtSm (15 mg) em 1,0 mL de metanol e filtrando em seguida. Esse teste foi realizado como uma forma de validação da EFS, para

verificar se as condições do método forneceriam boa recuperação dos analitos dos extratos, especialmente ácido clorogênico e cafeína dos extratos.

4.2.5.2 Sistema Cromatográfico

Baseado em Schieber et. al. (2001) e com o auxílio da ferramenta Acquity® UPLC *Columns Calculator*, *software* de transferência de métodos analíticos, foi efetivada a transferência do método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para um método por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). As condições sugeridas pelo *software* foram testadas e otimizadas para escolher a mais adequada na separação dos analitos de interesse.

O método analítico desenvolvido para os extratos EEtTr e EEtSm utilizou o sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência Waters Acquity UPLC® , equipado com detector UV-Vis 2487. Condições de análise: coluna HSS SB C₁₈ (2,1 x 100 mm; 1,8µm) Waters; temperatura do forno de coluna 30 °C; comprimento de onda de 280 nm; volume de injeção de 1µL; vazão de 0,55 mL/min; fase móvel - solução aquosa de ácido acético 2% (v/v) (eluente A) e água e acetonitrila 50:50 (v/v) com 0,5% (v/v) de ácido acético (eluente B) (SCHIEBER et. al.,2001). Gradiente - 10% a 12% B (1,5 min), 12% B(1,5-3,5 min), 12% a 40% B (3,5-4,5 min), 40% B (4,5-7,5 min) , 40% a 100% B (7,5-8,5 min), 100% a 10% B (8,5-9,5 min), 10% B (9,5-11,5 min).

4.2.5.3 Identificação e quantificação de substâncias no EEtTr e no EEtSm

Primeiramente foi preparado uma solução 1,0 mg/mL de cada um dos padrões prováveis de serem encontrados nos extratos (ácido cafeico, ácido clorogênico, cafeína, rutina e quercetina). A seguir foi preparada uma mistura desses padrões, e na mistura a concentração de cada um deles foi de 0,17 mg/mL. Para a construção da curva analítica utilizamos como padrões externos soluções metanólicas de ácido clorogênico e cafeína em concentrações crescentes 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 mg/mL e 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0 mg/mL respectivamente. A identificação de ácido clorogênico e cafeína no EEtTr e no

EEtSm de *C. arabica* L baseou-se na comparação dos t_R . Para a quantificação foram consideradas as integrais das áreas sob as bandas (picos) cromatográficas. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.6 Determinação do teor de fenólicos totais do EEtTr e do EEtSm

O método empregado foi realizado de acordo com o proposto por Singleton & Rossi (1965) e Singleton (1999) utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e curva analítica de ácido gálico e ácido clorogênico. Para esta análise, 0,1 mL de amostra (extratos solubilizados em água deionizada na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionados a 6 mL de água, depois foi acrescentado 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:10 v/v, água) em tubos de ensaio. Após 8 min, foi adicionado 1,5 mL de solução de carbonato de sódio a 20%, e completado o volume com água, qsp 10 mL. Os tubos foram agitados, deixados em repouso e após 2 h foi realizada a leitura a 23° C. Foi utilizado 0,1 mL das soluções hidroalcoólicas padrão em diferentes concentrações (ácido gálico 1,25 a 20 $\mu\text{g/mL}$ e ácido clorogênico 2 a 30 $\mu\text{g/mL}$) no lugar das amostras seguindo o mesmo procedimento acima.

As absorbâncias das amostras e soluções dos padrões foram medidas em espectrofotômetro UV/Vis em 760 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em μg de compostos fenólicos equivalentes aos padrões testados (ácido gálico e ácido clorogênico) por 100 μg de EEtTr e de EEtSm.

4.2.7 Determinação do teor de flavonoides totais do EEtTr e do EEtSm

A partir dos extratos foi determinado o teor de flavonoides conforme o proposto por Ho et al. (2012), com modificações.

Em tubos de ensaio foram adicionados a 0,5 mL da solução do EEtTr e do EEtSm (150 $\mu\text{g/mL}$) e 1,5 mL de etanol 95%. Depois foi acrescentado 0,1 mL de solução aquosa de cloreto de alumínio 10% e 0,1 mL de solução aquosa de acetato de sódio (1 M). O volume final (5 mL) foi obtido com adição de água deionizada. Foi utilizado 0,5 mL das soluções padrão de quercetina em diferentes concentrações (0,3 a 10,2 $\mu\text{g/mL}$) no lugar das amostras seguindo o mesmo procedimento acima.

A solução foi incubada por 30 min. A absorbância foi mensurada em 415 nm em espectrofotômetro UV/Vis. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em μg de flavonoides equivalentes à quercetina por 100 μg de EEtTr e de EEtSm.

4.2.8 Determinação do potencial antioxidante do EEtTr e do EEtSm

A avaliação da atividade antioxidante do EEtTr e do EEtSm foi realizada através de dois métodos: dos radicais DPPH \cdot e ABTS \cdot . Já o método da ação redutora sobre radicais peroxila (AAPH/Piranina) foi feito somente com EEtTr.

4.2.8.1 Método de inibição do radical DPPH

O experimento realizado foi através da utilização do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH \cdot). O método utilizado foi descrito por Mensor et al. (2001), Falcão et al. (2006) e Chiari (2011).

As misturas reacionais foram constituídas pela combinação de 1 mL da solução aquosa de EEtTr em concentrações crescentes (0 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi adicionado a 2,5 mL de solução metanólica de DPPH \cdot (0,004%; m/v). O mesmo procedimento foi realizado com o EEtSm, porém em diferentes concentrações (0 a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Como branco foi utilizado 1 mL de água e 2,5 mL de solução metanólica de DPPH \cdot (0,004%; m/v). As reações foram incubadas em temperatura ambiente e mantidas ao abrigo da luz por 30 min e depois foi procedida a leitura em uma absorbância em 515 nm.

As leituras foram realizadas em triplicata e computadas a média das absorbâncias de cada amostra e, então foi calculada a porcentagem de inibição do DPPH \cdot (MOLYNEUX, 2004). O ensaio também foi realizado para a vitamina C, como padrão antioxidante, em diferentes concentrações (de 0,5 a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

$$\% \text{ Inibição} = \frac{A_{\text{máx}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{máx}}} \times 100 \text{ (equação 1)}$$

onde:

% inibição de DPPH[•] = porcentagem de inibição do radical DPPH;

$A_{m\acute{a}x}$ = absorbância do radical DPPH na ausência de amostra em 515 nm (branco);

$A_{amostra}$ = absorbância do radical DPPH na presença de amostra em 515 nm.

A partir dos valores obtidos no cálculo da % inibição de DPPH[•] foi obtida uma curva de inibição e então calculado a CI_{50} , significando a quantidade de extrato necessária para inibir 50 % do radical DPPH em solução.

4.2.8.2 Método de inibição do cátion radicalar ABTS^{•+}

O método seguido foi o de Rufino et al. (2007), com modificações. Para a preparação foi feita uma solução estoque aquosa a 7 mM do sal de diamônio de 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato). O preparo do ABTS^{•+} foi realizado da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS (7 mM) com 88 µL de persulfato de potássio (140 mM). Para formação do radical a reação transcorre 16 h e deve ser mantida no escuro e em temperatura ambiente.

Para avaliação da atividade antioxidante dos extratos o ABTS^{•+} foi diluído em álcool etílico até atingir uma absorbância $1,00 \pm 0,05$ em um comprimento de onda 734 nm. Em seguida, 2 mL de ABTS^{•+} foram adicionados a 1030 µL de solução do EEtTr em diferentes concentrações (de 0 a 27,18 µg/mL), o mesmo procedimento foi adotado para o EEtSm (concentrações de 0 a 27,18 µg/mL). Após 6 min, a absorbância das amostras foi determinada no espectrofotômetro a 734 nm.

A porcentagem de inibição do radical ABTS foi determinada pela mesma equação (equação 1) utilizada na atividade antioxidante do radical DPPH. O ensaio também foi realizado para a vitamina C, como padrão antioxidante, em diferentes concentrações (0 a 3,49 µg/mL).

4.2.8.3 Efeito supressor sobre radicais peroxila (AAPH/Piranina)

O teste foi realizado seguindo o método proposto por Campos et al. (2004). Esse ensaio se baseia na reação do radical peroxila (produzido a partir da reação do AAPH [dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)] com o oxigênio atmosférico) com

o indicador fluorescente, a piranina, resultando em um produto não fluorescente. A atividade antioxidante é avaliada através do atraso no decaimento da fluorescência da piranina provocado pela presença das substâncias em estudo.

Na placa, 125 μL de AAPH (concentração de 20mM) foram adicionados a 100 μL de piranina (concentração de 0,005 $\mu\text{g}/\text{mL}$), as duas soluções em PBS (Tampão Salina Fosfato). Juntamente foram adicionados 25 μL de EEtTr em diferentes concentrações (5 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Como referência de substância antioxidante foi utilizado o trolox (nas concentrações de 0,005 a 0,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O volume final de reação na placa foi de 250 μL . O decaimento de fluorescência da piranina foi monitorado utilizando os comprimentos de onda de excitação de 460 nm e de emissão de 510 nm em um leitor Spectramax M2 Microplate (Molecular Devices, EUA), a 37° C.

Os resultados deste ensaio foram expressos em TEAC (atividade antioxidante equivalente ao trolox), e os resultados foram comparados diretamente com o EEtTr.

4.2.9 Avaliação do potencial citotóxico do EEtTr

A avaliação do potencial citotóxico foi através do método com MTT, que apresenta o princípio da determinação da habilidade de células vivas em reduzir o brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio, formando cristais insolúveis de formazana de coloração violeta (CHIARI et al.,2012; SANTOS et al., 2010). Os ensaios foram realizados em queratinócitos humanos metabolicamente incompetentes (HaCat), em fibroblastos, e em células de hepatoma humano (HepG2) que possuem a capacidade de metabolização de xenobióticos. Essas células foram cultivadas em meio de cultura *Minimum Essential Media* (MEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL).

As culturas foram incubadas a $37 \pm 2^\circ \text{C}$ em atmosfera de 5% de CO_2 . As células com confluência de 80 a 90% foram tripsinizadas. A atividade da tripsina foi interrompida pela neutralização com MEM com soro e a suspensão foi centrifugada a 1300 rpm por 3 min. Em seguida, as células foram transferidas em placas de 96 poços com densidade celular de $1,0 \times 10^6$ células/mL. As placas foram incubadas por 24 h para a completa adesão das células às placas.

Em seguida as células foram tratadas com 100 μ L de controle positivo (DMSO a 10% em MEM sem soro), controle negativo (MEM sem soro), e diferentes concentrações do EEtTr (0 a 11 mg/mL, solubilizado em MEM sem soro), durante 24 h (Figura 5). Após o plaqueamento, o meio de cultura foi removido, as placas o cuidadosamente lavadas com Tampão Salina Fosfato (PBS) e 100 μ L de MTT em PBS (1,0 mg/mL) foram adicionados em cada poço.

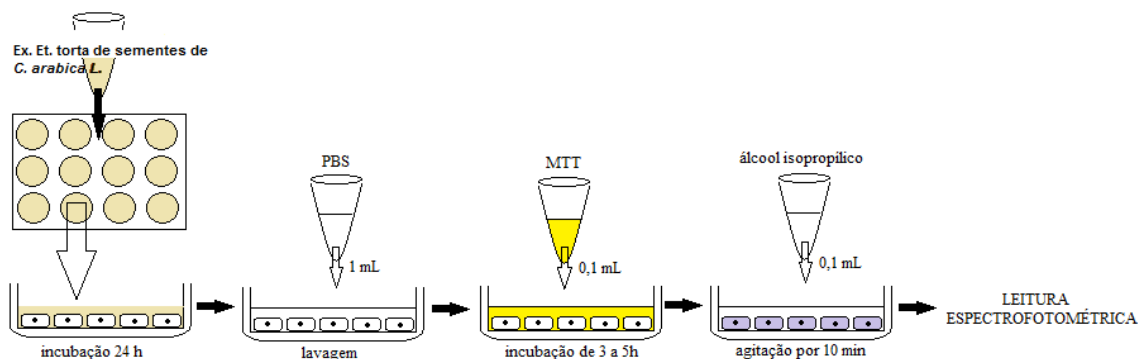
Figura 5 - Desenho esquemático da placa de 96 poços contendo a disposição dos controles e concentrações de amostras teste.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN
B	[] _i	[] _i	[] _i	[] _i	[] _i	[] _i	[] _i	[] _i	[] _i	[] _i	[] _i	[] _i
C	[] _{ii}	[] _{ii}	[] _{ii}	[] _{ii}	[] _{ii}	[] _{ii}	[] _{ii}	[] _{ii}	[] _{ii}	[] _{ii}	[] _{ii}	[] _{ii}
D	[] _{iii}	[] _{iii}	[] _{iii}	[] _{iii}	[] _{iii}	[] _{iii}	[] _{iii}	[] _{iii}	[] _{iii}	[] _{iii}	[] _{iii}	[] _{iii}
E	[] _{iv}	[] _{iv}	[] _{iv}	[] _{iv}	[] _{iv}	[] _{iv}	[] _{iv}	[] _{iv}	[] _{iv}	[] _{iv}	[] _{iv}	[] _{iv}
F	[] _v	[] _v	[] _v	[] _v	[] _v	[] _v	[] _v	[] _v	[] _v	[] _v	[] _v	[] _v
G	[] _{vi}	[] _{vi}	[] _{vi}	[] _{vi}	[] _{vi}	[] _{vi}	[] _{vi}	[] _{vi}	[] _{vi}	[] _{vi}	[] _{vi}	[] _{vi}
H	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP

Legenda: CN: Controle Negativo (MEM sem soro - 100 μ L); CP: Controle Positivo (DMSO 10% em MEM sem soro); []_i: 1570,0 μ g/mL; []_{ii}: 2980,0 μ g/mL; []_{iii}: 4560,0 μ g/mL; []_{iv}: 5970,0 μ g/mL; []_v: 7540,0 μ g/mL; []_{vi}: 1100,0 μ g/mL.

As células na microplaca foram incubadas a 37° C, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violetas de formazana (3 a 5 h). Para a solubilização dos cristais de formazana, 100 μ L de álcool isopropílico absoluto foram adicionados a cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorbância (595 nm) foi realizada em leitor de placas. O esquema pode ser visualizado na figura 6.

Figura 6 - Esquema do procedimento utilizado para avaliar a citotoxicidade do EEtTr (Adaptado de Chiari et al, 2012).



A porcentagem de células mortas foi calculada em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento, segundo proposto por Zhang et al. (2004), também foi determinada a porcentagem de células vivas. Para as diferentes linhagens foi calculado o CI_{50} . Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em pelo menos 3 experimentos independentes.

4.2.10 Incorporação do EEtTr na formulação cosmética

Foram preparadas três formulações de emulsões (A, B e C) a fim de comparar seus comportamentos de estabilidade e características sensoriais. Durante o desenvolvimento da formulação, foram utilizados componentes que proporcionassem sensorial agradável e toque pouco oleoso, visto que a finalidade do produto é para uso facial. Primeiramente foram desenvolvidas formulações sem a adição de extrato, denominadas formulações base. A Tabela 1 apresenta a composição percentual de cada formulação testada cujas composições propostas podem ser visualizadas abaixo.

Tabela 1 - Composição percentual das formulações.

Internacional Nomenclature Cosmetic Ingredients* (INCI name)	Função	% (m/m)		
		A	B	C
<i>Helianthus annuus</i> [Sunflower] Seed Oil (and) Polyacrylic Acid (and) Xylitol Sesquicaprylate (and) Glyceryl Stearate (and) Euphorbia Cerifera [Candelilla Cera] Wax (and) Sodium Hydroxide	Agente emulsificante	3,5	4,0	3,5
C12-15 Alkyl Benzoate	Solubilizante/emoliente	3,0	3,0	3,0
Dibutyl adipate	Solubilizante/sensorial leve	3,0	3,0	3,0
Bis-EthylhexyMetoxyphenyl Triazine	Filtro solar UVA/UVB	3,0	3,0	3,0
Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol	Filtro solar UVA/UVB	6,0	6,0	6,0
Ethylhexyl triazone	Filtro solar UVA/UVB	3,0	3,0	3,0
Glycerin	Solubilizante/umectante	3,0	3,0	3,0
Phenoxyethanol	Antimicrobiano	0,5	0,5	0,5
Benzyl alcohol	Antimicrobiano	0,3	0,3	0,3
Disodium EDTA	Sequestrante de metais	0,1	0,1	0,1
Xanthan Gum	Espessante hidrofílico	0,1	0,1	0,1
Cetilfosfato de K	Agente emulsificante	0,8	0,8	-
Octyl methoxycinnamate	Filtro solar UVA/UVB	-	6,0	-
Cyclomethicone (and) Dimethicone Crosspolymer	Sensorial	-	1,2	-
Acrylates Copolymer	Estabilizante	-	-	2,0
Hydroxypropyl Guar	Espessante hidrofílico	-	-	0,3
Aqua q.s.p	Solvente	100,0	100,0	100,0

* European Commission - Health and Consumers, 2014

A incorporação do extrato em concentração específica foi definida de acordo com o potencial antioxidante e o potencial citotóxico do extrato. Assim, a concentração de extrato que foi adicionada na formulação cosmética, estava sujeita

ao resultado da avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, e a citotoxicidade do EEtTr. Para a obtenção do fitocosmético foram adicionados, a cada formulação, 0,3%, em massa, do EEtTr.

As formulações emulsionadas foram preparadas por mistura direta, padronizada, de fase oleosa devidamente aquecida a 70° C, seguida pela adição da fase aquosa a 70° C com agitação manual ou mecânica até completa homogeneização. A solubilização do extrato foi adicionado na fase aquosa das formulações e também ao final destas, após ser solubilizado em pequena quantidade de água, visando completa solubilização e homogeneização no produto final.

4.2.11 Determinação do FPS

Foi utilizado o aparelho Optometrics SPF 290S para avaliar o fator de proteção solar da formulação escolhida, base e com o extrato (EEtTr). A medição do FPS foi realizada segundo o protocolo do fabricante. No suporte contendo a fita Transpore[®], foram aplicadas 110 mg das formulações, para formação de um filme uniforme de 2 mg/cm². Em seguida as amostras foram submetidas à incidência de radiação ultravioleta na faixa de comprimento de onda de 290 a 400 nm, a partir de uma lâmpada de Xenônio. As leituras foram repetidas doze vezes e o fator de proteção solar foi determinado a partir do software SPF (KALE et al., 2010; DURASAIMY et al., 2011). A fim de verificar se o EEtTr potencializa o fator de proteção solar de filtros solares químicos, a formulação escolhida foi acrescida dos filtros *Bis-EthylhexyMetoxyphenyl Triazine*, *Methylene Bis-benzotrizolyl Tetramethylbutylphenol*, *Ethylhexyl triazone* e *Octyl methoxycinnamate* e avaliada pela mesmo método.

4.3 Análise estatística

A análise estatística e a aquisição das figuras foi realizada utilizando os programas Origin 7, Excel e Prisma. A análise dos dados foi realizada pela determinação de média e desvio padrão, além de análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), quando adequado.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da perda por dessecação da torta da semente verde seca e da semente verde seca de *C. arabica*

Esse ensaio indica perda de substância volátil eliminada nas condições especificadas na monografia (BRASIL, 2010). A água residual encontrada no material vegetal seco está relacionada com a conservação, levando a perda do material por crescimento microbiano ou degradação enzimática de seus constituintes químicos (SIMÕES et al., 2007). A determinação da perda por dessecação da torta da semente foi realizada através do método gravimétrico e do método em balança com aquecimento por radiação infravermelha. No método gravimétrico como descrito no item 4.2.2, as amostras foram secas em estufa com temperatura entre 105 e 110° C, e depois de arrefecidas à temperatura ambiente em dessecador, foram submetidas a nova pesagem até a obtenção do peso constante. Essas medidas foram realizadas em três repetições para cada amostra. Dos resultados obtidos, calculamos a porcentagem de água retida em cada amostra da torta da semente seca e do grão de café verde seco. Foi calculada a porcentagem de perda por dessecação através da equação 2:

$$\frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100 = D \text{ (equação 2)}$$

Em que:

P_a = peso da amostra

P_u = peso do pesa filtro contendo a amostra antes da dessecação

P_s = peso do pesa filtro contendo a amostra depois da dessecação

D = perda por dessecação %

Os valores encontrados apresentaram perda de 8,8% (m/m) de água (média de 3 determinações) para a torta de semente seca, e 4,4% (m/m) para o grão de café verde seco.

No método por radiação infravermelha também foram pesadas cerca de 2,0 g do material vegetal e foram submetidas a aquecimento (105° C) pelo período de 90

min. A balança calcula a porcentagem e o resultado é direto, sendo assim os valores encontrados apresentaram perda de 8,1% (m/m) de água (média de 3 determinações) para a torta de semente seca, e 4,1% (m/m) para a semente de café verde seco. Os resultados foram muito próximos tanto pelo método gravimétrico como pelo método em balança com aquecimento por radiação infravermelha. O limite máximo de umidade para drogas vegetais é de 14% (SIMÕES et al, 2007), podendo inferir que o valor encontrado foi satisfatório e demonstrando que a qualidade do material vegetal está sendo mantida, evitando a contaminação por ação de micro-organismos e a decomposição por hidrólise e ações enzimáticas (CÓRDOVA et al., 2005).

Cabe ressaltar que a perda de massa pode estar relacionada a outros componentes voláteis presentes no material e não apenas a água. De qualquer forma, os métodos utilizados foram selecionados considerando que o material vegetal em questão não possui óleo essencial.

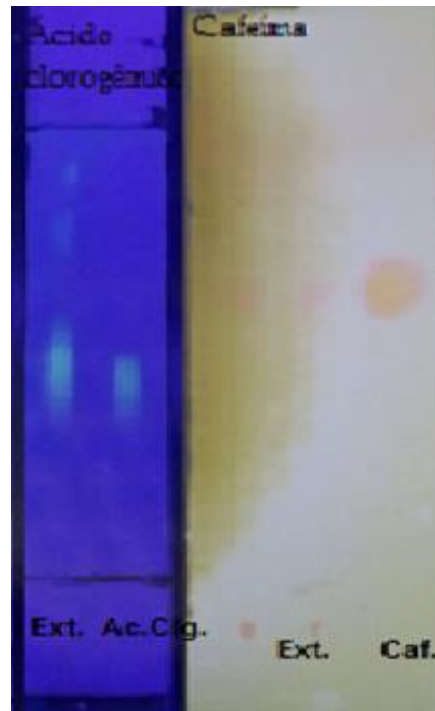
5.2 Obtenção dos extratos

Os extratos foram obtidos a partir da torta de sementes verdes e das sementes verdes de *C. arabica*. Ao lidar com material vegetal é necessário buscar as melhores condições para a eficácia da extração das substâncias de interesse. De acordo com o solvente escolhido para extração determina-se a qualidade da solução extrativa (SIMÕES et al., 2007). Nesse estudo foi empregado o etanol 70% levando em consideração a finalidade proposta para o produto final que é um cosmético – solvente biocompatível – e também a seletividade do etanol 70% em relação aos compostos fenólicos. O rendimento do EEtTr seco em relação ao material vegetal (sem descontar a perda por dessecação) foi de 21,0 % (m/m), e para o EEtSm foi de 20,4 % (m/m).

5.3 Análise do EEtTr de *C. arabica* por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A CCD baseia-se na separação dos componentes de uma mistura (no caso do EEtTr) através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente sobre um nível plano. As fases móveis são escolhidas em decorrência do tipo do extrato e da planta que é objeto de estudo, bem como do tipo de fase estacionária. Essa é uma técnica cromatográfica mais simples e econômica, quando se pretende a separação rápida e identificação visual. A análise por CCD do extrato permitiu identificar a presença de cafeína e ácido clorogênico, como apresentado na figura 7 (a e b), comparando-se o R_f e coloração das manchas dos padrões e as manchas correspondentes em EEtTr.

Figura 7 - Cromatoplasmas do EEtTr. **(a)** – condição de análise para o ácido clorogênico. **(b)** - condição de análise para a cafeína.



(a)

(b)

Legenda: **(a)** - fase móvel acetato de etila: ácido fórmico:ácido acético glacial:água 72:5:5:8 (v/v); revelação: NP-PEG. **(b)** - fase móvel: acetato de etila: metanol: água 85:10:5(v/v); revelação Dragendorff e H₂SO₄ 10%. Amostra EEtTr (Ext.); padrões ácido clorogênico (Ac. Clg.) e cafeína (Caf.); fase estacionária sílica gel.

5.4 Desenvolvimento de método analítico por CLUE para identificação e quantificação de cafeína e ácido clorogênico no EEtTr e no EEtSm

Schieber et. al. (2001) desenvolveram um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplado a detector de arranjo de diodos (DAD), o qual foi usado como base para o desenvolvimento de um método por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) para identificação e quantificação de substâncias nos extratos (EEtTr e EEtSm), a fim de reduzir o tempo das análises cromatográficas e o consumo dos solventes.

As condições cromatográficas relatadas por Schieber et. al. (2001) e as dimensões das colunas cromatográficas foram lançadas no *software* Acquity® UPLC *Columns Calculator*, de transferência de métodos analíticos, e essa ferramenta

apresentou algumas condições que foram testadas. Com a finalidade de preservar o perfil cromatográfico quando ocorre a transferência de CLAE para CLUE é imprescindível considerar o *dwell volume*, que é o volume do sistema de mistura de fase móvel e tubulações entre os dois sistemas. O *software* Acquity® UPLC *Columns Calculator* ajusta automaticamente o tempo do gradiente baseado nessa diferença de volume.

O método analítico desenvolvido está descrito em métodos no item 4.2.5.2 e nas figuras 10 a 14. As amostras em estudo são compostas por substâncias ionizáveis, assim a adição de ácido acético é uma opção para diminuir o encaudamento dos picos, melhorar a resolução dos picos cromatográficos, a fim de permanecer no sistema apenas uma forma, desloca o equilíbrio aumentando a forma protonada.

Esse método utilizado para a avaliação do perfil cromatográfico dos extratos foi determinado experimentalmente com o objetivo de encontrar condições que fornecessem melhor resolução dos picos no cromatograma. O extrato foram submetidos ao procedimento de *clean-up*. Embora o *clean-up* seja uma preparação extensiva da amostra ele é essencial para se eliminar interferentes que podem prejudicar o sistema cromatográfico, especialmente a coluna.

Foi realizado também um teste só com a filtração, fazendo a solubilização do EEtTr e do EEtSm (15 mg) em 1,0 mL de metanol. Esse teste foi feito para validar o método de pré-tratamento, verificando a recuperação dos analitos na EFS. Nas figuras 10 a 14 é possível observar que foram identificados nos extratos (EEtTr e no EEtSm) por CLUE-UV o ácido clorogênico e a cafeína. Já o ácido cafeico, a rutina e a quercetina não foram identificadas. A identificação baseou-se na comparação dos t_R e na co-injeção do padrão adicionado na amostra.

Para as análises dos extratos (EEtTr e EEtSm) com o método analítico transferido e otimizado foi possível construir duas curvas analíticas (ácido clorogênico e cafeína). As concentrações dos padrões para as curvas analíticas (figuras 8 e 9) foram de 0,25 mg/mL a 10,00 mg/mL para o ácido clorogênico e 0,25 mg/mL a 2,00 mg/mL (tabela 2) para a cafeína, e cada solução foi injetada em triplicata.

Na figura 8 está representada a curva analítica do ácido clorogênico como uma relação entre a média das áreas dos picos e a respectiva concentração, de cada ponto da curva, sendo $y = 3E+06x + 172065$ e o $R^2 = 0,9977$. A figura 9

apresenta a curva analítica da cafeína como uma relação entre a média das áreas dos picos e a respectiva concentração, de cada ponto da curva, sendo $y = 5E+06x - 57312$ e o $R^2 = 0,9975$. Os dados referentes às curvas analíticas constam nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Área média (triplicata) dos picos dos cromatogramas em função da concentração de ácido clorogênico (mg/mL).

Concentração ácido clorogênico (mg/mL)	Área média	Desvio Padrão
0,25	543147	37799,8
0,50	1441088	40138,2
1,00	3906403	159356,4
2,00	7808085	480460,0
3,00	10239382	769330,9
4,00	14227538	1297828,0
6,00	21009321	21842,4
8,00	27245768	429747,5
10,00	40745902	201384,9

Figura 8 - Curva analítica para quantificação de ácido clorogênico.

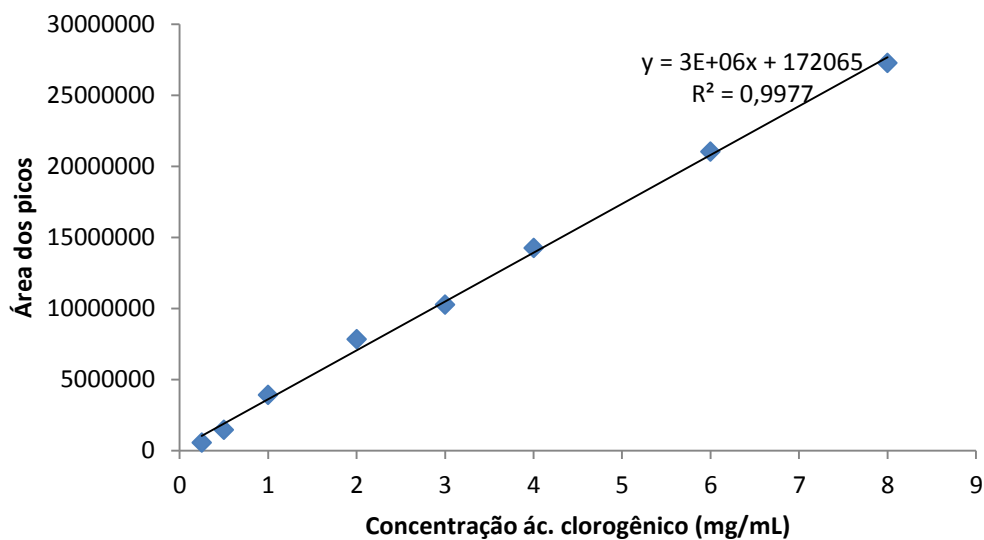
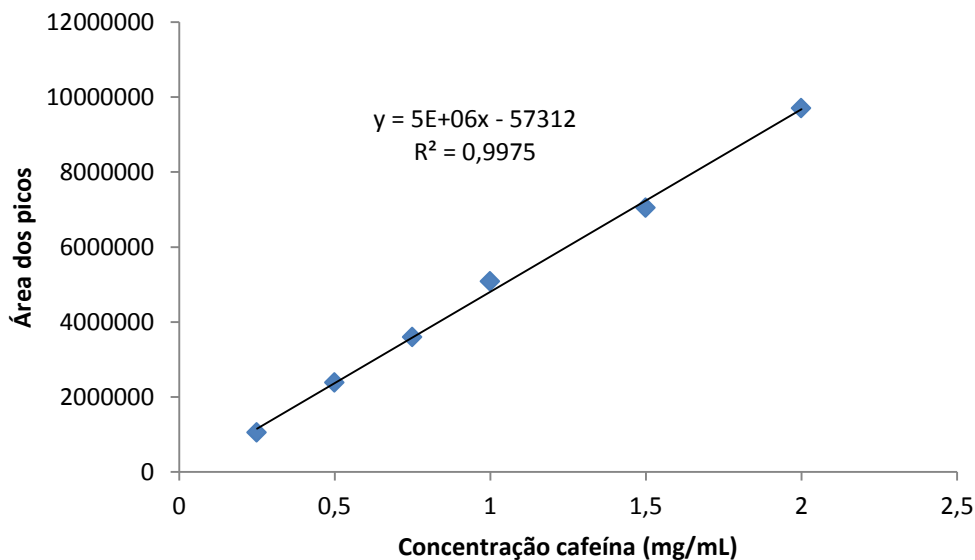


Tabela 3 - Área média (triplicata) dos picos dos cromatogramas em função da concentração de ácido cafeína (mg/mL).

Concentração cafeína (mg/mL)	Área média	Desvio Padrão
0,25	1051347	262490,7
0,50	2385910	331805,0
0,75	3595956	206971,3
1,00	5080661	83245,6
1,50	7039720	507956,9
2,00	9702112	240780,6

Figura 9 - Curva analítica para quantificação da cafeína.



Comparando-se os cromatogramas de EEtTr e EEtSm (figuras 10 e 11), verifica-se que possuem perfil cromatográfico idêntico. Com relação a quantificação, os teores de ácido clorogênico e cafeína foram determinados como de 21,2 e 7,2 %, respectivamente, para EEtTr e de 13,2 e 5,9 %, respectivamente, para EEtSm. Esta diferença pode estar relacionada a perda de massa relacionada fundamentalmente a óleos fixos, que ocorre na produção do óleo de sementes verdes de café, na qual a torta constitui o resíduo sem o óleo.

Para calcular o teor de ácido clorogênico e cafeína nos extratos utilizamos as equações obtidas figuras 8 e 9. Segue abaixo um exemplo de como foi realizado o

cálculo do teor de ácido clorogênico no EEtTr (o mesmo foi feito para o ácido clorogênico no EEtSm e para a cafeína no EEtTr e EEtSm) :

$y = 11.112.012$ (média da área do pico relativo ao ácido clorogênico no EEtTr)

$11.112.012 = 3.436.129,82 x + 172.064,95$

$10.939.947,05 = 3.436.129,82 x$

$x = 3,1838 \text{ mg/mL}$

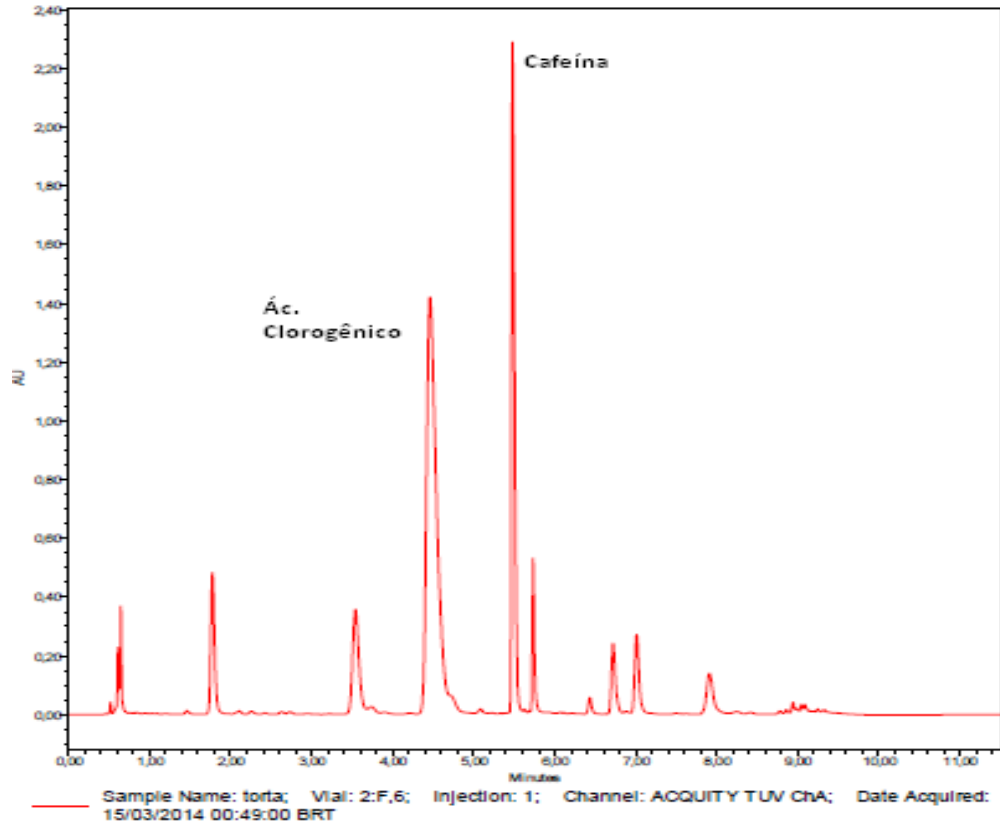
Após o *clean-up* 15,0 mg de EEtTr foi solubilizado em 1 mL de metanol. Assim como a concentração foi de 3,1838 mg mL, temos a massa de 3,1838 mg no total do volume do *vial*, que corresponde a todo ácido clorogênico contido na massa inicial de 15 mg de EEtTr. Portanto:

15,0 mg ----- 100 % da massa de EEtTr

3,1838 mg ----- T %

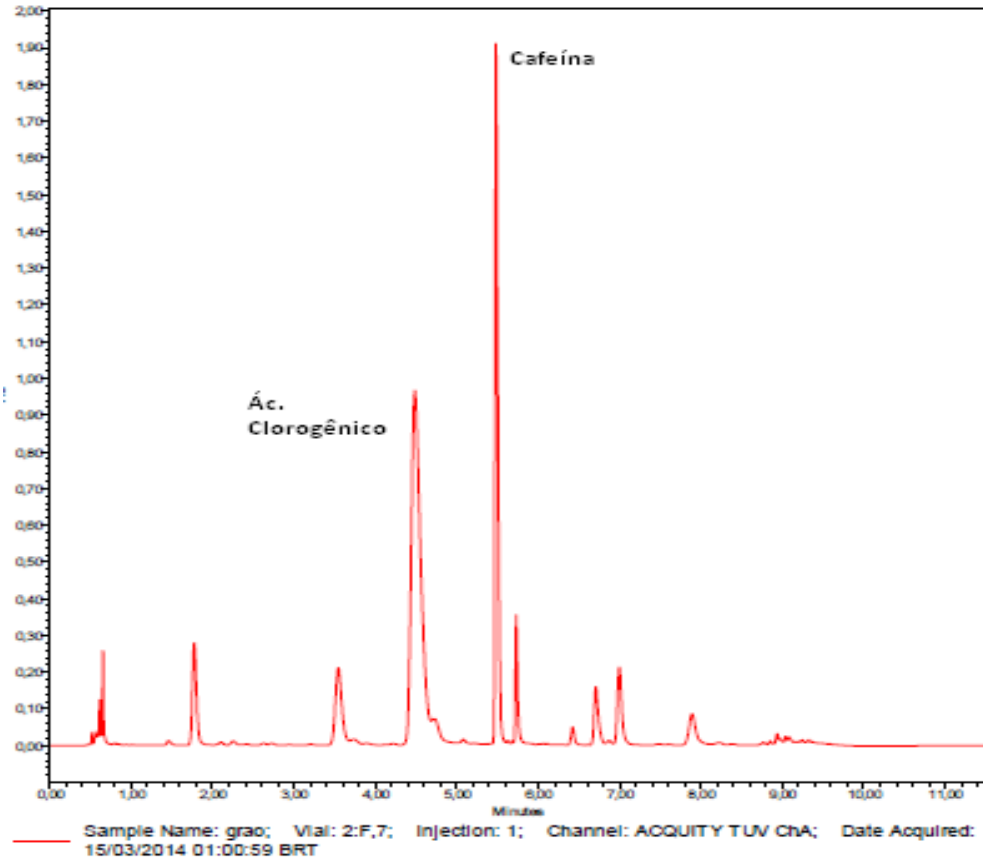
T = 21,2 % de ácido clorogênico em EEtTr

Figura 10 - Cromatograma do EETr.

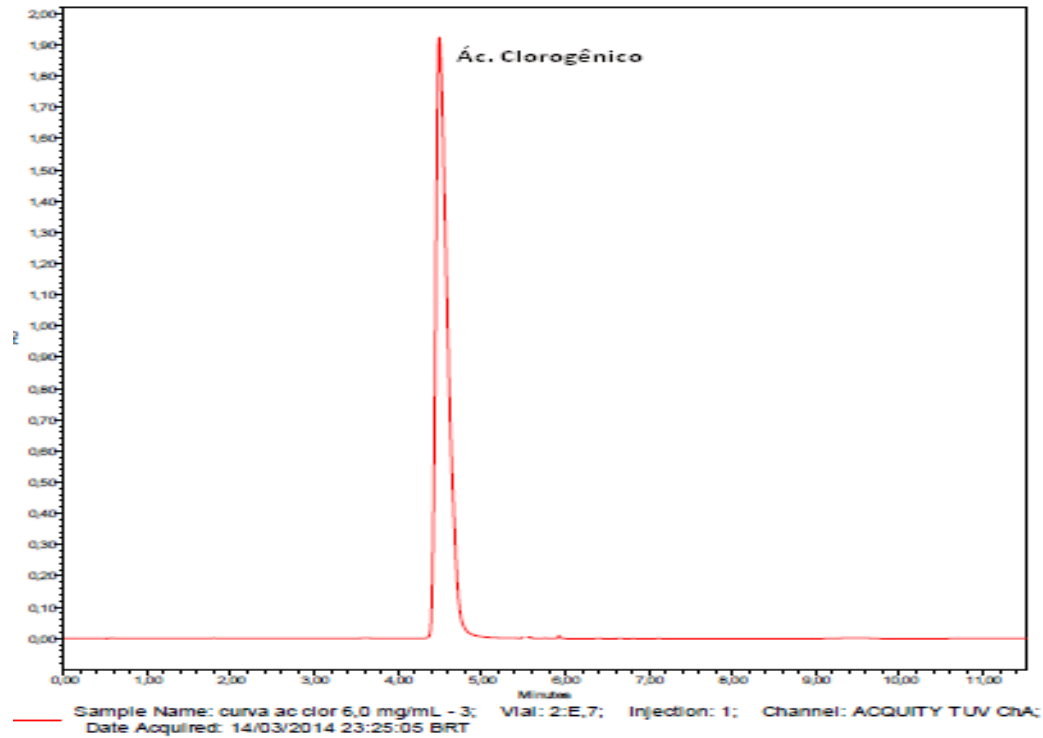


Legenda: Condições de análise: coluna Waters® HSS SB C₁₈ (2,1 x 100 mm; 1,8 μm); temperatura da coluna: 30 °C; composição da fase móvel: 2% (v/v) de ácido acético em água (eluente A) e 0,5% de ácido acético em água: acetonitrila (50:50, v/v; eluente B); gradiente: 10% a 12% B (1,5 min), 12% B(1,5-3,5 min), 12% a 40% B (3,5-4,5 min), 40% B (4,5-7,5 min) , 40% a 100% B (7,5-8,5 min), 100% a 10% B (8,5-9,5 min), 10% B (9,5-11,5 min). Vazão: 0,55 mL/min. Volume de injeção: 1 μL. Comprimento de onda (λ): 280 nm.

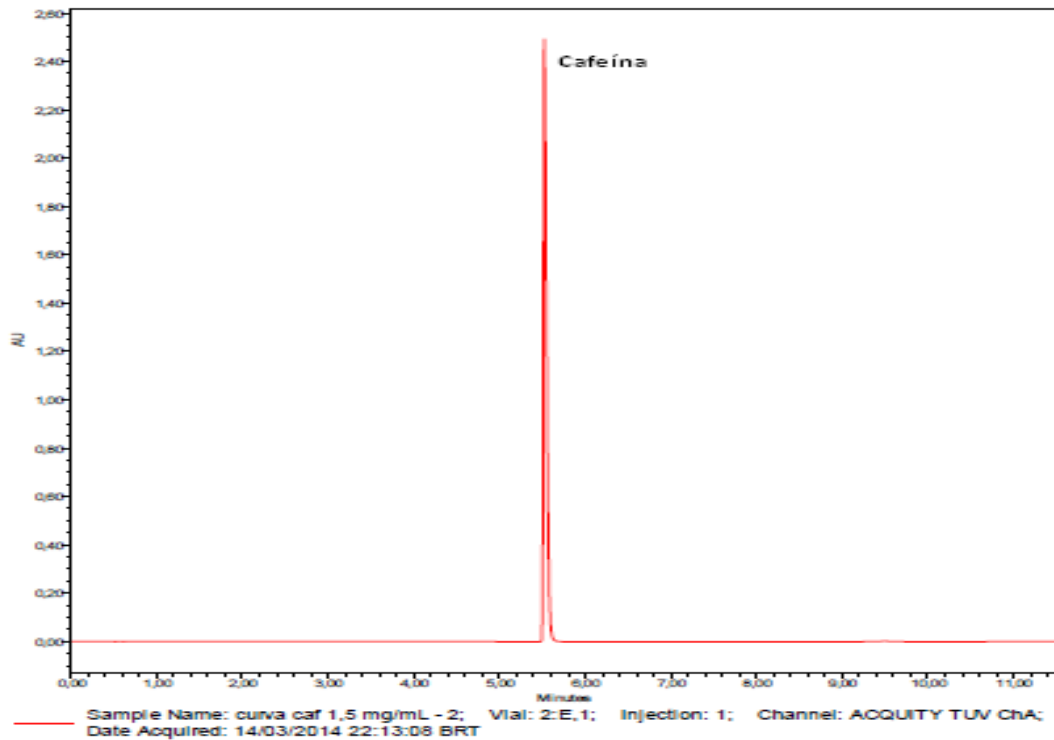
Figura 11 - Cromatograma do EEtSm.



Legenda: Condições de análise: coluna Waters® HSS SB C₁₈ (2,1 x 100 mm; 1,8 μm); temperatura da coluna: 30 °C; composição da fase móvel: 2% (v/v) de ácido acético em água (eluente A) e 0,5% de ácido acético em água: acetonitrila (50:50, v/v; eluente B); gradiente: 10% a 12% B (1,5 min), 12% B(1,5-3,5 min), 12% a 40% B (3,5-4,5 min), 40% B (4,5-7,5 min) , 40% a 100% B (7,5-8,5 min), 100% a 10% B (8,5-9,5 min), 10% B (9,5-11,5 min). Vazão: 0,55 mL/min. Volume de injeção: 1 μL. Comprimento de onda (λ): 280 nm.

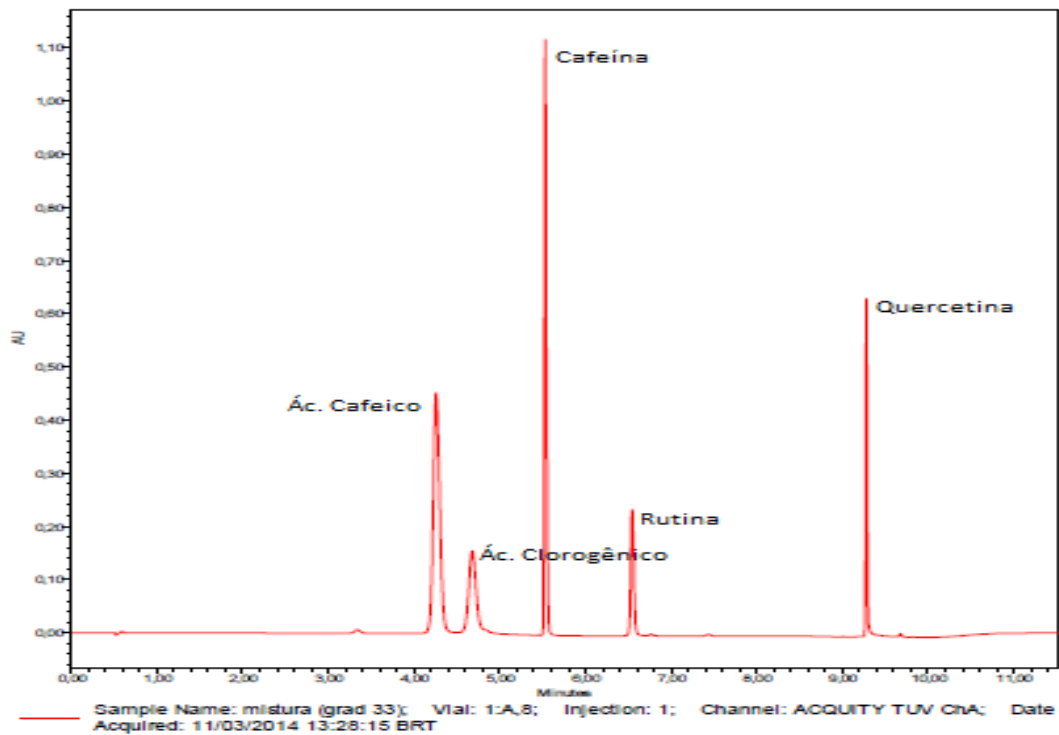
Figura 12 - Cromatograma do padrão de ácido clorogênico.

Legenda: Condições de análise: coluna Waters® HSS SB C₁₈ (2,1 x 100 mm; 1,8 μm); temperatura da coluna: 30 °C; composição da fase móvel: 2% (v/v) de ácido acético em água (eluente A) e 0,5% de ácido acético em água: acetonitrila (50:50, v/v; eluente B) (SCHIEBER et. al.,2000); gradiente: 10% a 12% B (1,5 min), 12% B(1,5-3,5 min), 12% a 40% B (3,5-4,5 min), 40% B (4,5-7,5 min) , 40% a 100% B (7,5-8,5 min), 100% a 10% B (8,5-9,5 min), 10% B (9,5-11,5 min). Vazão: 0,55 mL/min. Volume de injeção: 1 μL. Comprimento de onda (λ): 280 nm.

Figura 13 - Cromatograma do padrão de cafeína.

Legenda: Condições de análise: coluna Waters® HSS SB C₁₈ (2,1 x 100 mm; 1,8 μm); temperatura da coluna: 30 °C; composição da fase móvel: 2% (v/v) de ácido acético em água (eluente A) e 0,5% de ácido acético em água: acetonitrila (50:50, v/v; eluente B) (SCHIEBER et. al.,2000); gradiente: 10% a 12% B (1,5 min), 12% B(1,5-3,5 min), 12% a 40% B (3,5-4,5 min), 40% B (4,5-7,5 min) , 40% a 100% B (7,5-8,5 min), 100% a 10% B (8,5-9,5 min), 10% B (9,5-11,5 min). Vazão: 0,55 mL/min. Volume de injeção: 1 μL. Comprimento de onda (λ): 280 nm.

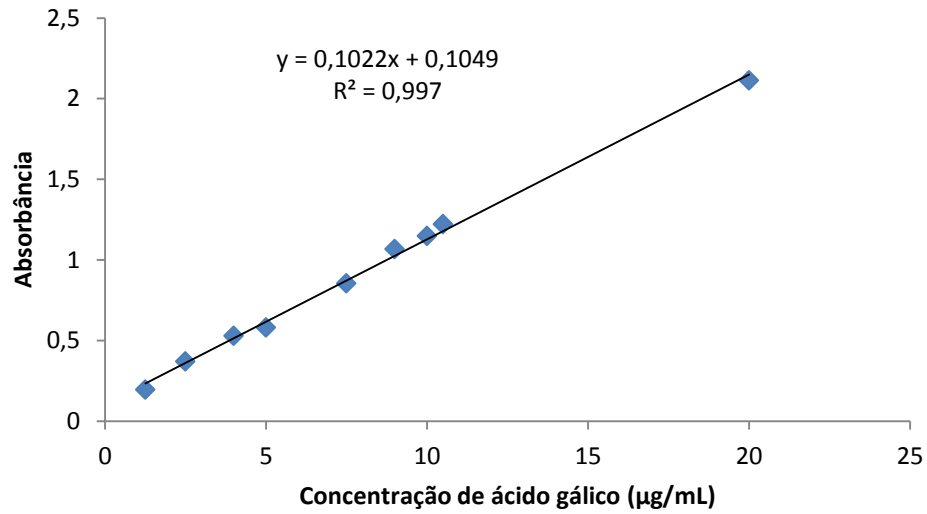
Figura 14 - Cromatograma do padrão de ácido cafeico, ácido clorogênico, cafeína, rutina e quercetina.



Legenda: Condições de análise: coluna Waters® HSS SB C₁₈ (2,1 x 100 mm; 1,8 μm); temperatura da coluna: 30 °C; composição da fase móvel: 2% (v/v) de ácido acético em água (eluento A) e 0,5% de ácido acético em água: acetonitrila (50:50, v/v; eluento B) (SCHIEBER et. al.,2000); gradiente: 10% a 12% B (1,5 min), 12% B(1,5-3,5 min), 12% a 40% B (3,5-4,5 min), 40% B (4,5-7,5 min) , 40% a 100% B (7,5-8,5 min), 100% a 10% B (8,5-9,5 min), 10% B (9,5-11,5 min). Vazão: 0,55 mL/min. Volume de injeção: 1 μL. Comprimento de onda (λ): 280 nm.

5.5 Determinação do teor de fenólicos totais do EEtTr e do EEtSm

O teor de fenólicos totais de EEtTr e do EEtSm foi determinado inicialmente utilizando a curva analítica de ácido gálico. Os resultados foram analisados a partir da equação da reta obtida por regressão linear da curva analítica do ácido gálico representada na figura 15 e foram expressos em μg de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico por 100 μg de EEtTr e EEtSm.

Figura 15 - Curva analítica do ácido gálico.**Tabela 4** - Valores de absorbância obtidos para o EEtTr e EEtSm na determinação de compostos fenólicos totais.

	ABS1	ABS2	ABS3	Média	Desvio padrão	A_{real}
Branco 1	0,026	0,027	0,024	0,026	0,002	----
EEtTr	0,558	0,543	0,551	0,551	0,008	0,525
Branco 2	0,021	0,019	0,019	0,020	0,001	----
EEtSm	0,596	0,607	0,598	0,600	0,006	0,580

ABS=Absorbância

A partir da média da absorbância do branco (controle) e da amostra (Tabela 4) foi calculada a absorbância real da amostra conforme a equação 3.

$$A_{\text{real}} = A_{\text{amostra}} - A_{\text{controle}} \text{ (equação 3)}$$

onde:

A_{real} = absorbância real da amostra;

A_{amostra} = absorbância experimental da amostra;

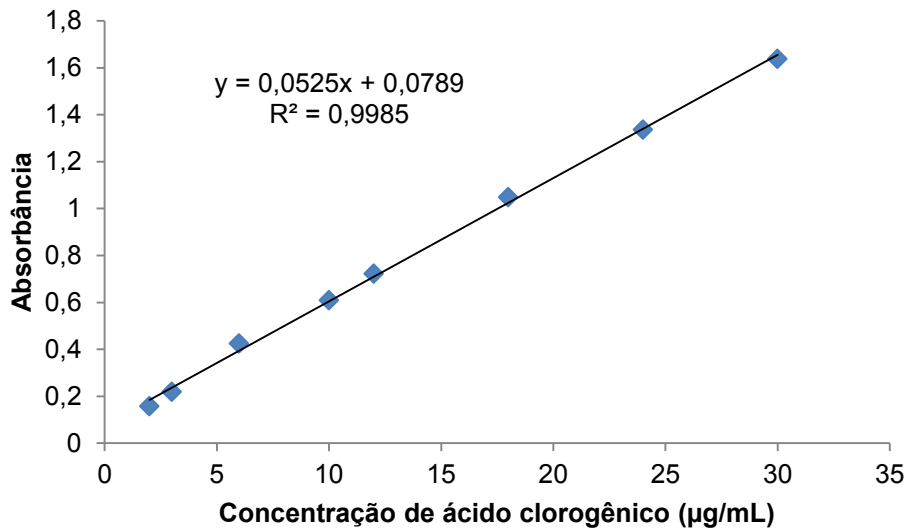
A_{controle} = absorbância do branco da reação (todos os reagentes exceto a amostra).

Considerando o valor real de absorvância da amostra para o EEtTr (0,525), e utilizando a equação da reta que descreve a curva analítica do ácido gálico foi então calculado o teor de compostos fenólicos. A concentração de extrato de EEtTr utilizada no experimento foi de 30 µg/mL, assim sendo esse extrato possui 14,0 µg de compostos fenólicos equivalentes a ácido gálico por 100 µg de EEtTr. Já o teor encontrado para EEtSm. foi de 15,5 µg de compostos fenólicos equivalentes a ácido gálico por 100 µg de EEtSm.

Também foi extrapolado o resultado utilizando o rendimento da extração, para o EEtTr foi de 21% e para o EEtSm 20,4% (m/m) levando em consideração a perda por dessecação do material vegetal. Sendo assim o teor de fenólicos totais estimado para a torta seca é de 2,9% equivalentes ao ácido gálico, e para semente é de 3,2% de fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico. Aproxima-se dos valores encontrados em plantas que possuem alto teor de fenólicos, como da uvaancelota - 8% (m/m) em peso seco (ROCHENBACH et al., 2008).

O teor de compostos fenólicos totais (%) foi inferior ao teor obtido de ácido clorogênico por CLUE-UV em EEtTr, o que parece ser incoerente. No entanto, num método fotométrico analisando uma mistura complexa como um extrato vários erros estão associados. Um aspecto importante neste sentido é que o padrão utilizado não foi o fenólico majoritário na amostra (ácido clorogênico), mas sim o ácido gálico. Sua escolha justificou-se por ser um padrão muito utilizado na literatura e, desta forma, possibilitar a comparação de teores. Por outro lado, sua escolha não foi a mais acertada, considerando-se que a absorvância molar (760 nm) do complexo do ácido clorogênico (maior MM em relação ao ácido gálico e cromóforos semelhantes) com metais presentes no reagente de Folin-Ciocalteu deve ser menor no comprimento de onda escolhido, determinando assim um valor subestimado do teor de compostos fenólicos totais. Desta maneira, esta determinação foi repetida, utilizando o ácido clorogênico como padrão.

Foi construída uma curva analítica de ácido clorogênico e os resultados foram analisados a partir da equação da reta obtida por regressão linear representado na figura 16 e foram expressos em µg de compostos fenólicos equivalentes ao ácido clorogênico por 100 µg de EEtTr e EEtSm.

Figura 16 - Curva analítica do ácido clorogênico.**Tabela 5** - Valores de absorvância obtidos para o EEtTr e EEtSm na determinação de compostos fenólicos totais.

	ABS1	ABS2	ABS3	Média	Desvio padrão	A _{real}
Branco	0,017	0,018	0,017	0,017	0,001	----
EEtTr	0,539	0,541	0,529	0,536	0,006	0,519
EEtSm	0,527	0,522	0,533	0,527	0,005	0,510

ABS=Absorvância

A partir da média da absorvância do branco (controle) e da amostra (Tabela 5) foi calculada a absorvância real da amostra conforme a equação 3.

A partir do valor real de absorvância da amostra para o EEtTr (0,519), e utilizando a equação da reta que descreve a curva analítica do ácido clorogênico foi determinado o teor de compostos fenólicos. A concentração de extrato de EEtTr utilizada no experimento foi de 30 µg/mL, sendo encontrado para esse extrato 27,9 µg de compostos fenólicos equivalentes ao ácido clorogênico por 100 µg de EEtTr de *C. arabica* L. O teor obtido para EEtSm de *C. arabica* L. foi de 27,4 µg de compostos fenólicos equivalentes a ácido clorogênico por 100 µg de EEtSm de *C. arabica* L.

O teor de compostos fenólicos (%) equivalentes ao ácido clorogênico foi maior do que o obtido utilizando como padrão o ácido gálico, o que já era esperado

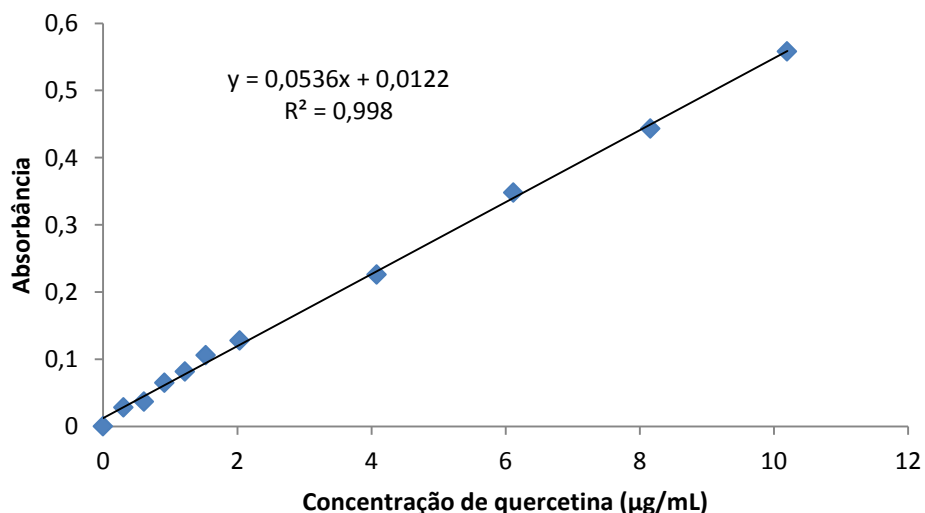
sabendo que o ácido clorogênico foi encontrado nos EEtTr e EEtSm por CLUE-UV como substância majoritária. Também é possível observar que pelo método fotométrico o teor de compostos fenólicos (% m/m) equivalentes ao ácido clorogênico foi maior do que o encontrado por CLUE-UV, 21,2% e 13,2 % para EEtTr e EEtSm respectivamente.

5.6 Determinação do teor de flavonoides totais do EEtTr e do EEtSm

Os flavonoides fazem parte do grupo de polifenólicos naturais e juntamente com os ácidos clorogênicos apresentam enorme importância, pois são capazes de sequestrar os radicais livres exercendo a atividade antioxidante (PRIOR; CAO, 2000). Assim sendo, extratos das plantas que os contêm são utilizados em cosméticos para retardar o envelhecimento da pele (CUNHA et al., 2004).

A quercetina foi utilizada como substância padrão, sendo obtida uma curva analítica da mesma (Figura 17). O resultado foi expresso em μg de flavonoides equivalentes a quercetina por 100 μg de EEtTr e do EEtSm.

Figura 17 - Curva analítica da quercetina.



Foram utilizadas soluções dos extratos na concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$ para determinação do teor de flavonoides. Os resultados encontrados foram de 3,96 μg

de flavonoides equivalentes a quercetina por 100 µg de EEtTr e 5,12 µg de flavonoides equivalentes a quercetina por 100 µg de EEtSm. O teor de flavonoides no extrato das sementes de *C. arabica* foi maior o que pode ser explicado visto que o extrato da torta é um resíduo da produção da indústria cafeeira e pode haver perda de flavonoides no processo de extração do óleo fixo do café. Porém, o teor encontrado em EEtTr é próximo do teor de EEtSm.

Também é possível notar que os resultados obtidos são coerentes, uma vez que a concentração de compostos fenólicos é maior que de flavonoides. Este resultado é explicado pelo fato dos compostos fenólicos representarem a soma da quantidade de todos os compostos fenólicos presentes, incluindo os flavonoides.

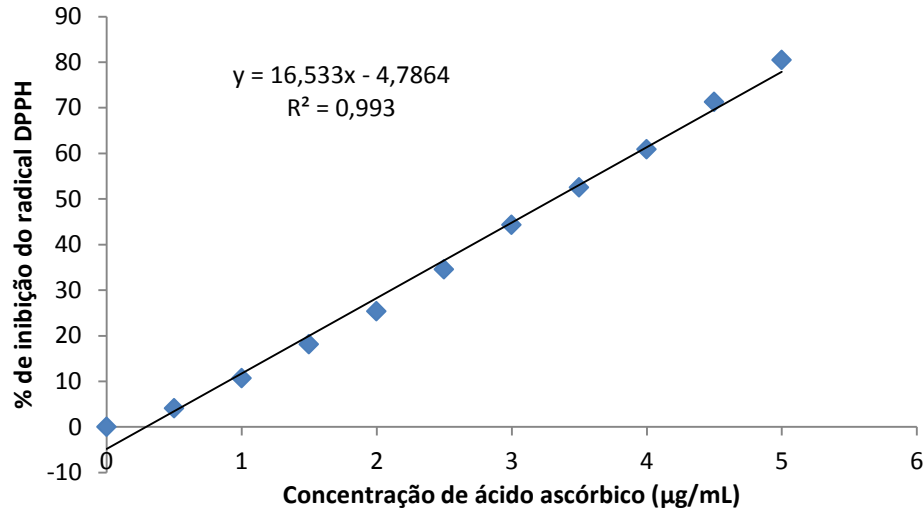
5.7 Determinação do potencial antioxidante

5.7.1 Ensaio do radical DPPH do EEtTr e do EEtSm

A atividade antioxidante do EEtTr e do EEtSm foi avaliada pelo método da inibição do radical DPPH. Esse método se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina. Se a substância atua doando átomos de hidrogênio quando ela é inserida na solução de DPPH ocorre uma mudança de cor de violeta para amarelo, sendo assim formada a hidrazina (ALVES, et al., 2010).

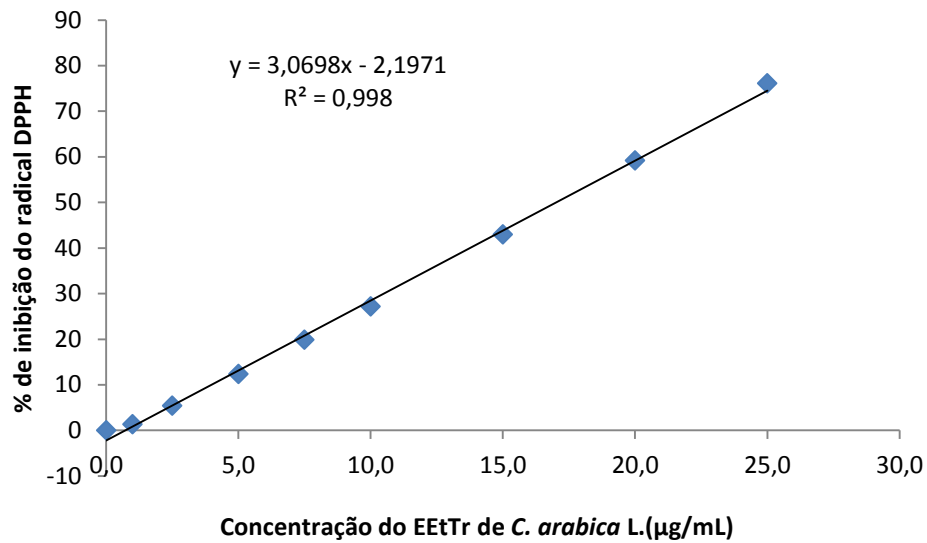
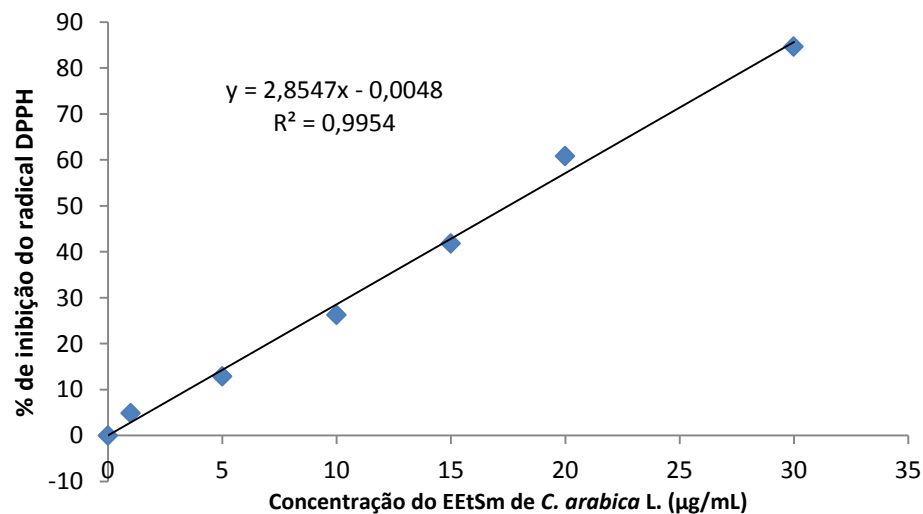
O ácido ascórbico foi utilizado como substância de referência antioxidante em diferentes concentrações (0,5 a 5 µg/mL). Com os resultados adquiridos foi possível obter um gráfico (% de inibição do radical DPPH & concentração) para o ácido ascórbico (Figura 18) com a finalidade de comprovar a eficácia do método para atividade antioxidante, e comparar o potencial dos extratos com o padrão antioxidante.

Figura 18 - Gráfico da porcentagem de inibição do radical DPPH *versus* concentração do ácido ascórbico.



Usando como referência a equação da reta (Figura 18) foi possível calcular o valor de CI_{50} , que se refere à quantidade de ácido ascórbico necessária para inibir 50% dos radicais DPPH em solução. O CI_{50} calculado foi de 3,31 µg/mL para o ácido ascórbico.

Posteriormente, foi determinada a atividade antioxidante nas diferentes concentrações - 0 a 25 µg/mL para o EEtTr e de 0 a 30 µg/mL para o EEtSm. Os resultados foram obtidos em triplicata para cada um dos extratos.

Figura 19 - Gráfico da porcentagem de inibição do DPPH[•] versus concentração de EEtTr.**Figura 20** - Gráfico da porcentagem de inibição do DPPH[•] versus concentração de EEtSm.

A partir da curva da porcentagem de inibição do radical DPPH versus a concentração do EEtTr e do EEtSm foi obtida a equação da reta para cada um dos extratos (respectivamente figura 19 e figura 20) e com cada uma das curvas foi calculado o CI_{50} para os respectivos extratos. O CI_{50} da atividade sequestrante do DPPH[•] para o EEtTr foi de 17,00 µg/mL. Já o CI_{50} do EEtSm foi de 17,52 µg/mL. O CI_{50} obtido para os extratos é maior do que o CI_{50} para o ácido ascórbico como já era esperado, sabendo que é uma substância de referência antioxidante, além

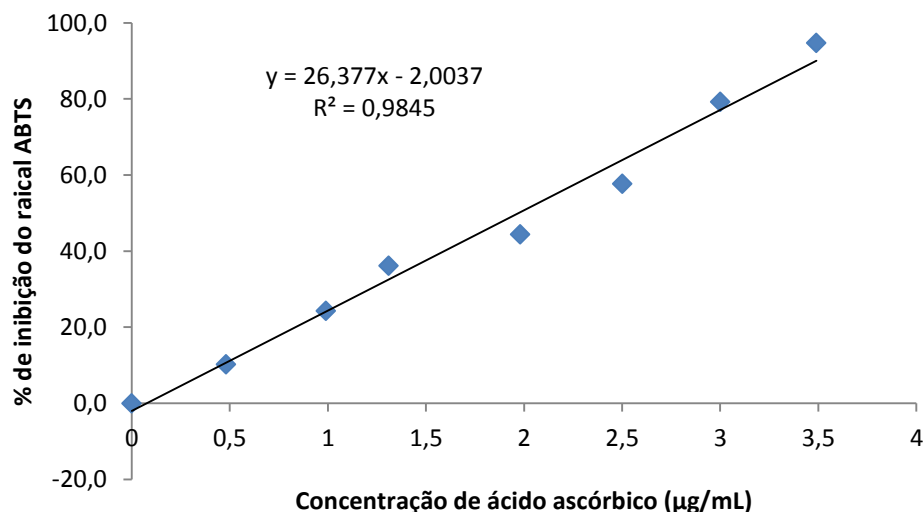
disso, é uma substância pura e o extrato é uma mistura de substâncias (REIS et al., 2001). Além disso, o ácido ascórbico possui cinética rápida e apresenta caráter hidrofílico, sendo eficaz para radicais hidrofílicos (ALVES et al., 2010).

Os resultados apresentados neste ensaio indicam que os extratos demonstram propriedade antioxidante, que pode ser principalmente atribuída aos compostos fenólicos. Entre os principais componentes fenólicos os ácidos clorogênicos se encontram em maior quantidade no grão de café verde, podendo ser eles os principais responsáveis pelo potencial antioxidante dos extratos (EEtTr e do EEtSm) (ABRAHÃO et al., 2010).

5.7.2 Ensaio do cátion radicalar ABTS^{•+} com o EEtTr e o EEtSm

A fim de confirmar o potencial antioxidante do EEtTr e EEtSm foi realizado um segundo ensaio *in vitro* para essa avaliação, o método do ABTS^{•+}. Como padrão antioxidante foi utilizado o ácido ascórbico em diferentes concentrações (0 a 3,49 µg/mL), figura 21.

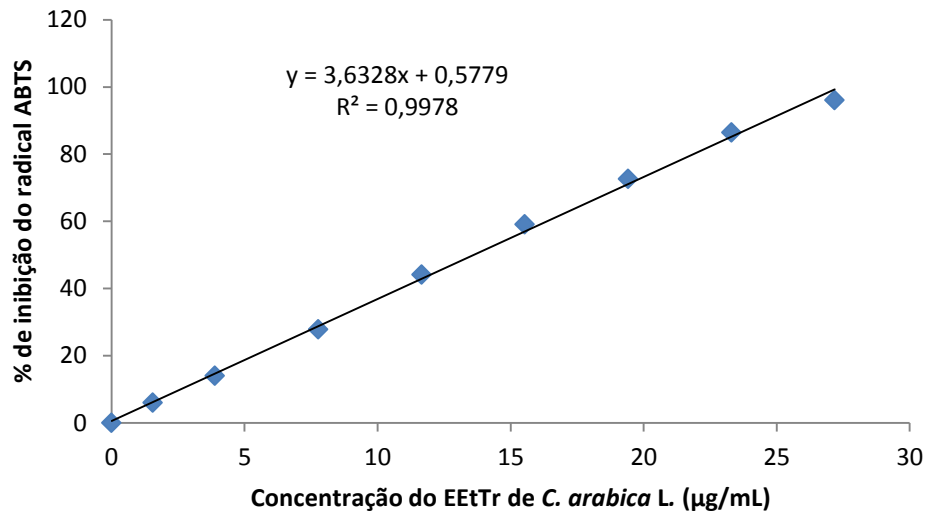
Figura 21 - Gráfico da porcentagem de inibição do ABTS^{•+} versus concentração de ácido ascórbico.



O CI_{50} da atividade antioxidante para o ácido ascórbico foi de 1,97 µg/mL, o que significa que, para se alcançar a inibição de 50% do radical ABTS presente no meio é necessário uma concentração de 1,97 µg/mL de ácido ascórbico.

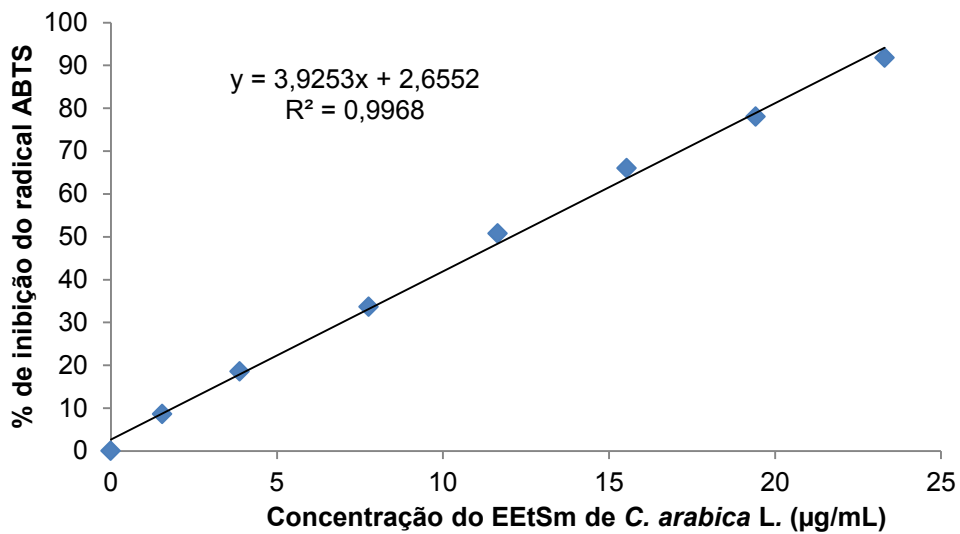
A Figura 22 mostra a curva de porcentagem de inibição obtida na avaliação do EEtTr.

Figura 22 - Gráfico da porcentagem de inibição do ABTS· versus concentração de EEtTr.



O CI_{50} para o EEtTr foi de 13,60 µg/mL. Esse resultado indica que o extrato tem um potencial antioxidante, porém o ácido ascórbico é mais potente, tendo em vista que a quantidade de extrato necessária para inibir 50% dos radicais ABTS em solução é significativamente maior, sendo o potencial antioxidante do ácido ascórbico maior.

A Figura 23 mostra a curva obtida na avaliação do EEtSm.

Figura 23 - Gráfico da porcentagem de inibição do ABTS *versus* concentração de EEtSm.

O CI_{50} para o EEtSm foi de 12,06 µg/mL. Ao compararmos os valores de CI_{50} obtidos para os extratos (EEtTr e EEtSm), utilizando os métodos dos radicais DPPH e ABTS, pode-se perceber que os valores de CI_{50} para padrão de referência utilizado (ácido ascórbico) são menores, o que indica que uma menor concentração de ácido ascórbico é necessária para que a mesma atividade antioxidante seja atingida.

Chiari (2011) avaliou a atividade antioxidante (ABTS) para o extrato etanólico (70° GL) de goiaba e o CI_{50} encontrado foi de 114,4 µg/mL, aproximadamente 8,4 vezes maior que o encontrado para EEtTr e 9,4 vezes maior que o obtido no EEtSm, sendo assim os extratos EEtTr e EEtSm possuem um maior potencial antioxidante segundo o método do radical ABTS.

É possível observar que existe uma relação significativa entre a capacidade antioxidante e teor de fenólicos totais que foi encontrado, indicando que os compostos fenólicos são os principais contribuintes para as propriedades antioxidantes das plantas.

5.7.3 Efeito supressor sobre radicais peroxila (AAPH/Piranina)

O ensaio com o AAPH foi baseado no decaimento da fluorescência da piranina quando ela é oxidada por radicais peroxila ($\text{ROO}\cdot$) (FARIA et al., 2012). Os dados são extraídos no formato do programa Gen 5, e a partir dos valores obtidos foram realizados os gráficos com o perfil cinético das reações para diferentes amostras, trolox e EEtTr (Figura 24 e 25).

Figura 24 - Gráfico com perfil cinético do decaimento da fluorescência da piranina com o trolox.

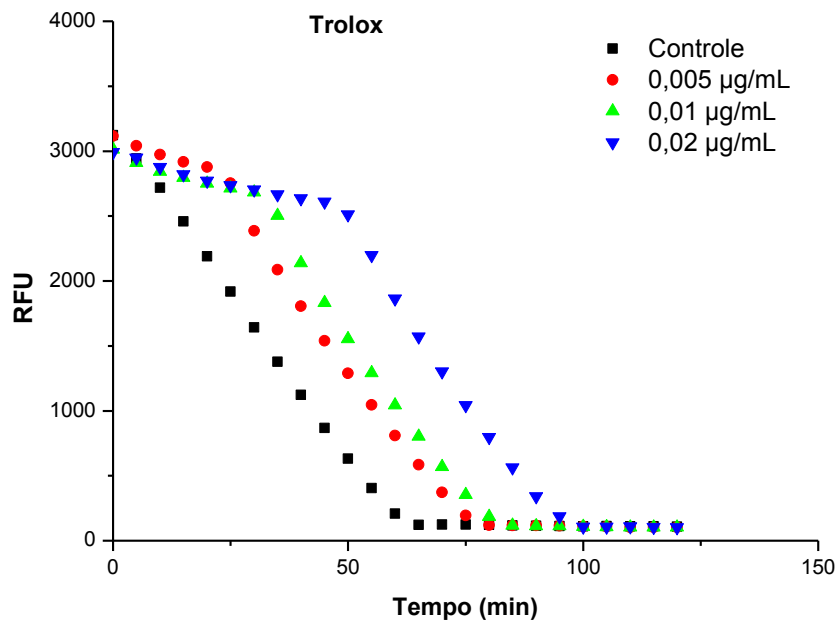
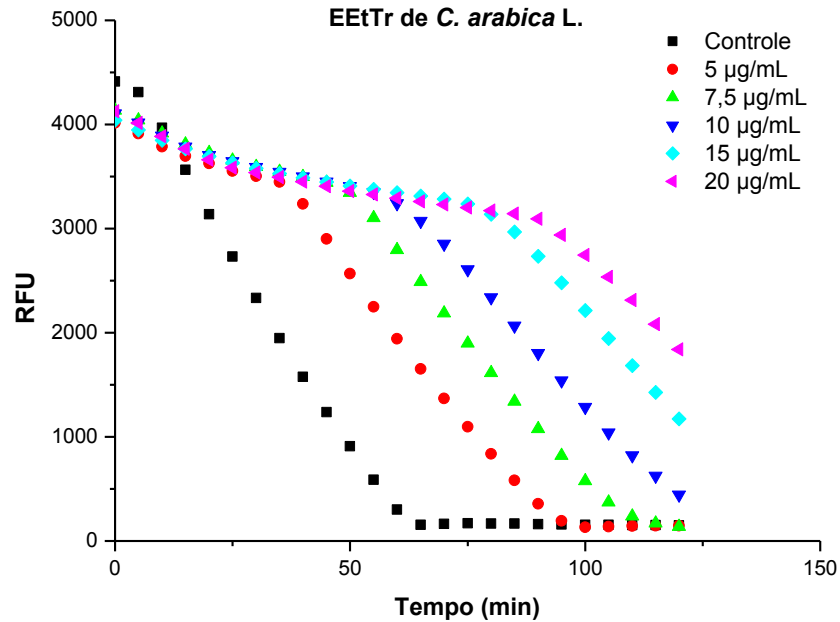


Figura 25 - Gráfico com perfil cinético do decaimento da fluorescência da piranina com o EEtTr.



Foi calculada a diferença das integrais do controle pelas integrais de cada concentração, do Trolox (padrão) e do EEtTr, e a partir desses resultados foi feito o cálculo de regressão linear. Com a equação da regressão linear foi obtido o coeficiente linear da reta (*slope*). O coeficiente linear do EEtTr. foi então dividido pelo coeficiente linear do Trolox. Veja a tabela 6 abaixo.

Tabela 6 - Avaliação da atividade antioxidante frente à ação redutora do radical peroxila (TEAC).

Substâncias	TEAC
EEtTr	1,63
Trolox	1,00

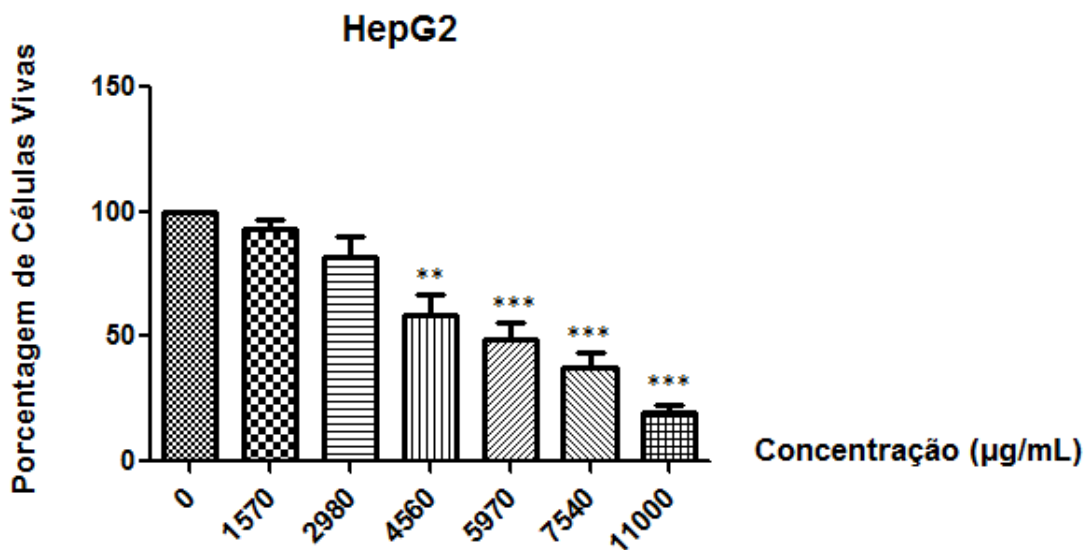
Os resultados desse ensaio foram expressos em TEAC, atividade antioxidante equivalente ao Trolox (substância padrão utilizada). Segundo esse método o extrato apresenta uma maior atividade antioxidante frente à ação redutora do radical peroxila que o Trolox, evidenciando um grande potencial antioxidante visto que esse é padrão de referência.

5.8 Avaliação do potencial citotóxico

Para a avaliação do potencial citotóxico do EEtTr foram escolhidas três linhagens celulares, HepG2, HaCat e fibroblasto. A primeira é uma linhagem de células de hepatoma humano, selecionada por ser um modelo muito utilizado de estudo de células metabolizadoras, permitindo a avaliação da toxicidade do metabólito formado, a partir do produto em estudo (Chiari et. al., 2012). HaCat (queratinócitos) e fibroblastos foram escolhidas por se tratar de um ativo para uso cosmético que apresenta por finalidade a aplicação na pele.

Na Figura 26, estão apresentados os resultados obtidos para a linhagem HepG2. Um gráfico com perfil dose *versus* resposta foi construído. Foi obtida também uma curva, e gerada uma equação por regressão linear, para ser determinada a concentração suficiente do EEtTr de *C. arabica* L. para inviabilizar 50% das células. Observando o perfil obtido foi verificado que concentrações de extrato em concentrações de até 2.980 µg/mL não foram tóxicas para células desta linhagem.

Figura 26 - Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem HepG2, a partir da média de experimentos independentes (média ± desvio padrão). Tratamento realizado com o EEtTr de *C. arabica* L.. Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$.



O mesmo foi realizado para a linhagem fibroblasto (HDFa) e HaCat, um gráfico com perfil dose *versus* resposta foi construído (Figura 27 e 28). Foi obtida também uma curva, e gerada uma equação por regressão linear, para determinar o Cl_{50} .

Figura 27 - Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem HDFa, a partir da média de experimentos independentes (média \pm desvio padrão). Tratamento realizado com o EEtTr. Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$.

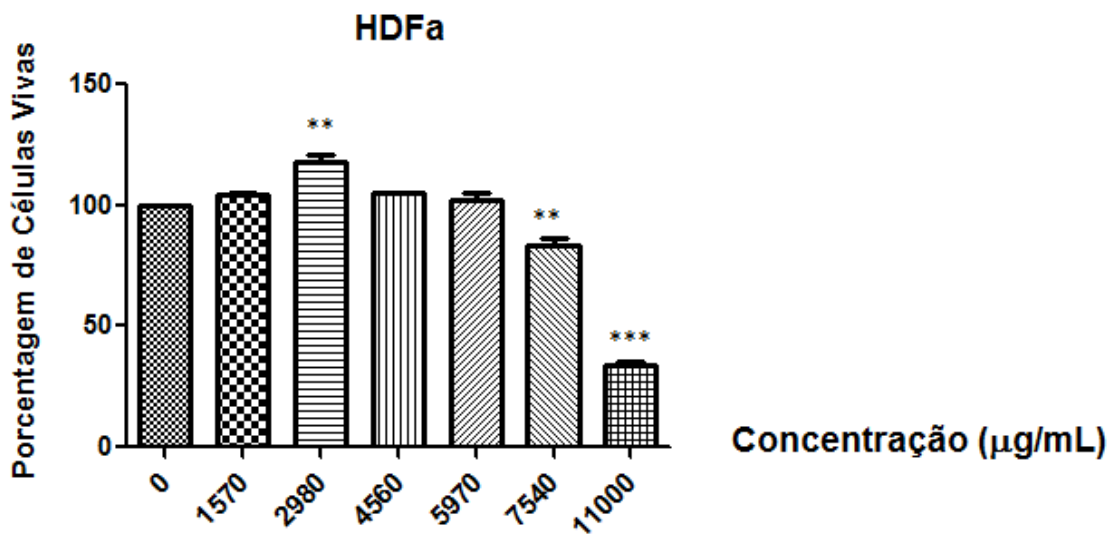
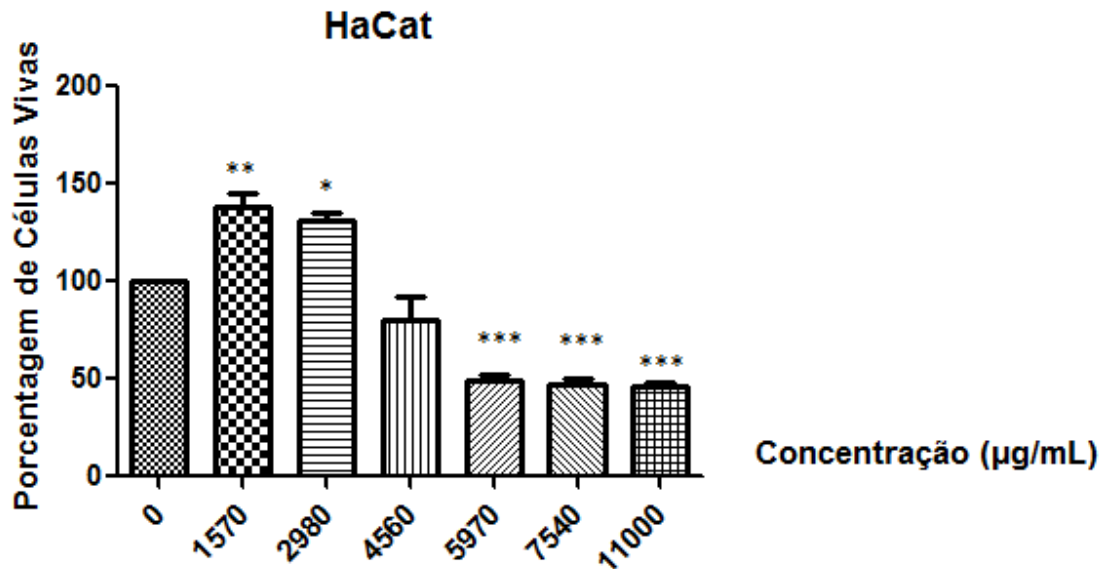


Figura 28 - Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem HaCat, a partir da média de experimentos independentes (média \pm desvio padrão). Tratamento realizado com o EEtTr. Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$.



Foi verificado que concentrações de EEtTr em concentrações até 5970 µg/mL não foram tóxicas para células da linhagem HDFa. Para essa linhagem a porcentagem de células viáveis presentes para cada concentração estudada apresentou-se próxima a 100%, com exceção da maior concentração. Examinando a Figura 28 foi possível verificar um aumento de células viáveis após o tratamento com o extrato. Isso pode ser justificado pelas substâncias presentes no extrato (carboidratos, aminoácidos). Observando o perfil dose-resposta para a linhagem HaCat a partir de 5970 µg/mL houve uma queda na porcentagem de células vivas, porém a partir dessa concentração elas não são estatisticamente diferente entre elas ($p < 0,001$), diferindo somente do controle negativo.

As concentrações foram estatisticamente comparadas a concentração zero que é o controle negativo (MEM sem soro), referindo-se a 100% de células vivas. No estudo com células HepG2 a partir da concentração 4560 µg/mL as concentrações foram estatisticamente diferentes em comparação a 100 % de viabilidade celular, apresentando um nível de significância $p < 0,001$ e $p < 0,01$ partir da concentração 5970 µg/mL.

Tabela 7 - Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) para as linhagens celulares tratadas com o EEtTr.

	Média ($\mu\text{g/mL}$)	Desvio padrão
HepG2	6952,58	673,76
HaCat	6007,39	544,80
HDFa	9883,23	65,29

Os valores de CI_{50} (Tabela 7) podem ser considerados muito elevados, comprovando, portanto, a segurança deste extrato, partindo do princípio que estamos trabalhando com concentrações mil vezes maiores que as testadas nos testes de fenólicos, flavonoides e antioxidantes. Esta segurança para a avaliação da citotoxicidade pode ser inferida comparando os resultados obtidos no trabalho de Martínez et al. (1999) que, testando o potencial citotóxico de frutas e verduras, obteve aproximadamente 80% de morte celular com concentrações em torno de 5 mg/mL dos extratos testados e esta concentração foi considerada elevada pelos autores, que julgaram como insignificantes o potencial citotóxico destes produtos.

5.9 Preparo das formulações

Como mostrado no item 4.2.10 foram preparadas três formulações de emulsões (A, B e C) a fim de comparar seus comportamentos de estabilidade e características sensoriais. Mediante as características sensoriais das formulações e visando finalidade proposta, um produto facial com toque pouco oleoso, foi escolhida a formulação B. Ao se escolher a formulação B, preparamos outra formulação para incorporação dos filtros solares *Bis-EthylhexyMetoxyphenyl Triazine* (3%), *Methylene Bis-benzotrizolyl Tetramethylbutylphenol* (3%), *Ethylhexyl triazone* (6%) e *Octyl methoxycinnamate* (6%).

A concentração de EEtTr que foi incorporado foi definido utilizando alguns critérios e extrapolações. Foram considerados os valores de CI_{50} obtidos para a atividade antioxidante pelo método do radical ABTS, além da consideração de que a formulação não libera 100% de ativo, e nem sequer permeia 100% de ativo na pele.

Dessa maneira foi determinada a concentração de 0,3% de extrato para a incorporação na formulação com filtros e extrato, formulação sem filtro com extrato. Esse valor corresponde a 3000 μg de extrato por g de formulação. Partindo do princípio que o CI_{50} para atividade antioxidante pelo método do ABTS foi de 13,6 $\mu\text{g/mL}$ e supondo que a atividade antioxidante chegasse ao 100%, então essa

concentração seria de 27,2 µg/mL, consideraremos 30,0 µg/mL. Supondo que no ensaio de avaliação do perfil de liberação *in vitro* liberasse 20% do ativo, foram utilizados aproximadamente 30,0 µg de extrato a cada 1 g de creme em uma área de aplicação de 1,77 cm², a concentração máxima que poderia ser liberada da formulação seria 150 µg/cm², este valor corresponde à concentração em µg de extrato/mL de solução ou µg de extrato/g de formulação. Portanto, se supostamente se fosse liberado 100% do ativo da formulação, e considerando que não permeou 5% e sim 100% esse valor corresponderia a 3000 µg/cm², uma concentração de µg de extrato/g de formulação. Assim sendo este valor seria 220 vezes maior que a concentração necessária para atingir o CI₅₀ da atividade antioxidante pelo método de inibição do radical ABTS, e está dentro da faixa segura de toxicidade para as células HepG2, HaCat e fibroblasto em que foram testadas concentrações de até 11000 µg/mL., e o CI₅₀ foi de 6952,58 µg/mL para a linhagem HepG2, 6007,39 µg/mL para a HaCat, e 9883,23 µg/mL para HDFa.

5.10 Avaliação “*in vitro*” do Fator de Proteção Solar das formulações base e fitocosmética

Para avaliação “*in vitro*” do FPS foram preparadas quatro formulações, a formulação base sem EEtTr, formulação base com EEtTr, a formulação com adição dos filtros solares *Bis-EthylhexyMetoxyphenyl Triazine*, *Methylene Bis-benzotrizolyl Tetramethylbutylphenol*, *Ethylhexyl triazone* e *Octyl methoxycinnamate* sem EEtTr, e a formulação com os filtros e com EEtTr. A adição dos filtros foi realizada para verificar se a adição do EEtTr poderia potencializar o FPS da formulação.

A partir dos dados de FPM (Figura 29) o *software* calcula o valor de FPS para cada formulação (Tabela 8).

Figura 29 - FPM (Fator de Proteção Máximo) em função do comprimento de onda das formulações.

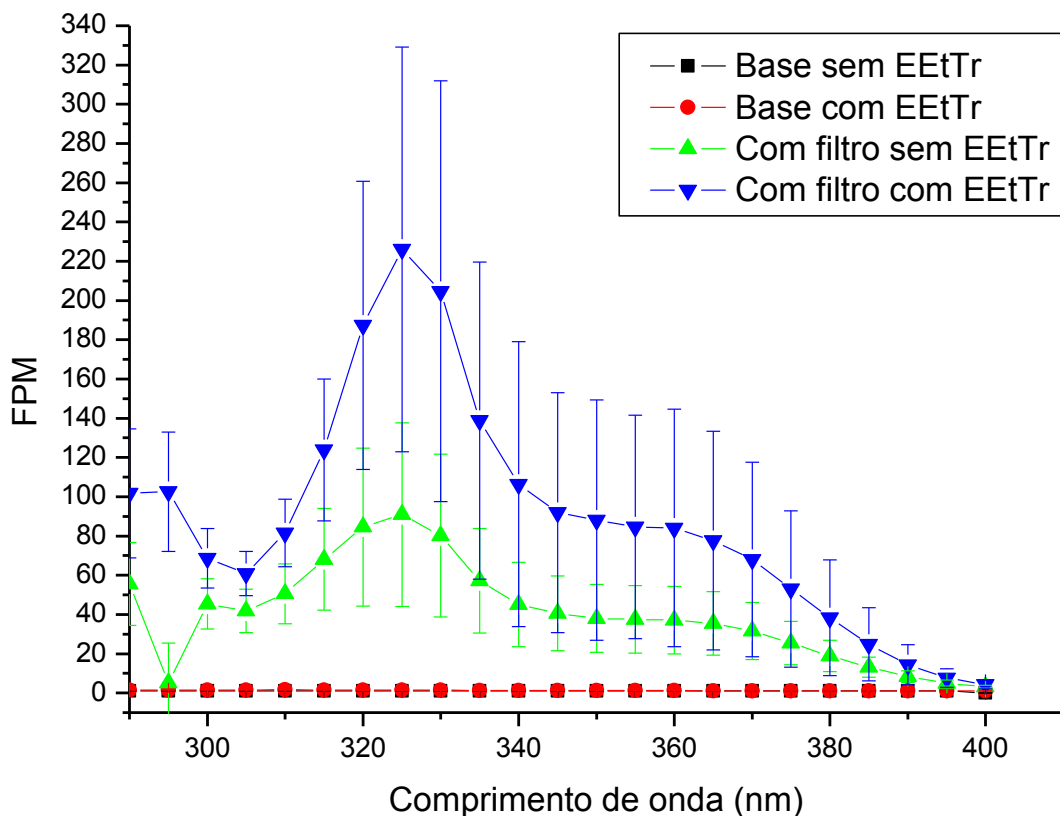


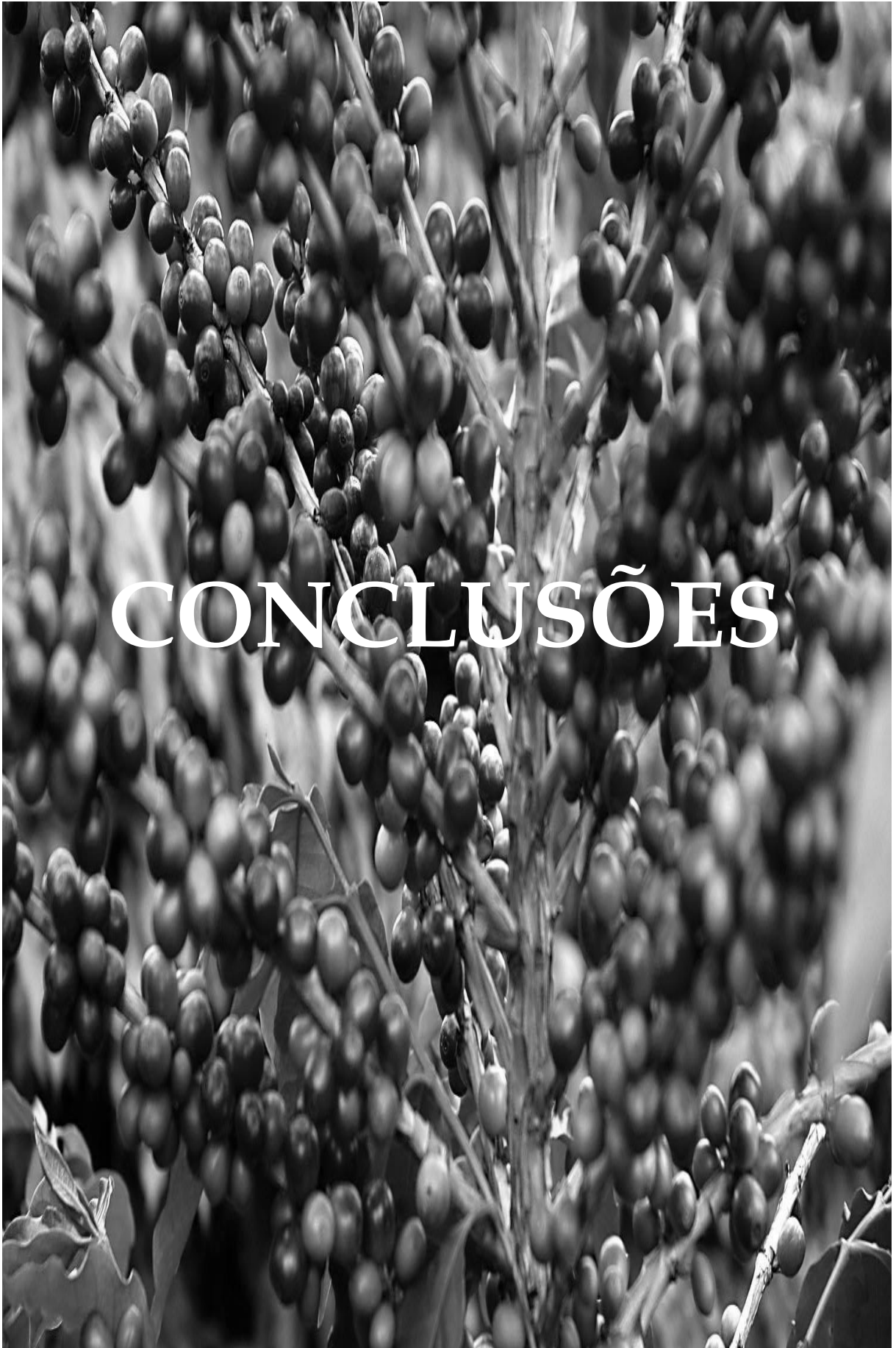
Tabela 8 - Valores de FPS obtidos pela metodologia de espectrofotometria de reflectância no Optometrics SPF 290.

Formulações	Média FPS \pm D.P
Base sem EEtTr	1,04 \pm 0,01
Base com EEtTr	1,50 \pm 0,14
Com filtro sem EEtTr	45,73 \pm 14,23
Com filtro com EEtTr	72,92 \pm 19,7

O desvio padrão das formulações base foi significativamente menor que das formulações com filtro (Tabela 8), isso se deve a maior viscosidade das formulações dificultando uniformização do filme aplicado na fita Transpore.

O FPS é um valor numérico que significa grau de proteção solar contra a queimadura solar. Foram utilizados quatro filtros, dentro dos padrões brasileiros (ANVISA, 2006). Para determinação do FPS no Brasil a ANVISA preconiza a adoção

de uma metodologia *in vivo* (ANVISA, 2002), porém como o objetivo do nosso trabalho foi avaliar a potencialização do FPS mediante a incorporação do EEtTr não havia a necessidade de fazer os testes *in vivo*. Para determinação do FPS foi utilizado um método *in vitro*. Esse método apresenta restrições por não se conseguir a uniformidade do filme, uniformidade da cor, por apresentar dificuldade de aplicação, não considera a interação com a pele e assim se torna um teste de difícil reprodutibilidade (ROHR et al.,2010); entretanto , tem demonstrado uma alternativa ao teste proposto por Mansur et. al. 1986, por possibilitar diferentes medidas no mesmo comprimento de onda.



CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Os resultados da perda por dessecação do material vegetal foram semelhantes com os dois métodos utilizados e os valores obtidos estão dentro das especificações para drogas vegetais.

O método utilizado em CLUE mostrou-se apropriado para a identificação e quantificação de ácido clorogênico e cafeína presentes no EEtTr e no EEtSm .

Comparando-se os teores de ácido clorogênico e cafeína foram determinados 21,2 e 7,2 %, respectivamente, para EEtTr e de 13,2 e 5,9 %, respectivamente, para EEtSm. Ao analisar o teor de fenólicos totais foi encontrado para 27,9 µg de compostos fenólicos equivalentes ao ácido clorogênico por 100 µg de EEtTr e 27,4 µg de compostos fenólicos equivalentes a ácido clorogênico por 100 µg de EEtSm. Por fim ao averiguar o teor de flavonoides totais foi obtido 3,96 flavonoides equivalentes a quercetina por 100 µg de EEtTr e 5,12 µg de flavonoides equivalentes a quercetina por 100 µg de EEtSm. Analisando esses resultados é possível verificar que o EEtTr e EEtSm são semelhantes e do ponto de vista de aproveitamento de compostos fenólicos e cafeína, a torta é promissora, pois apresenta teores altos.

O teor de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico nos extratos foi inferior ao teor de ácido clorogênico determinado por CLUE. Já a determinação de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido clorogênico equivalentes ao ácido clorogênico apresentou valor superior ao teor de ácido clorogênico. O resultado mais confiável e coerente é o expresso em equivalentes de ácido clorogênico, já que os ácidos clorogênicos são os compostos fenólicos majoritários na semente do café.

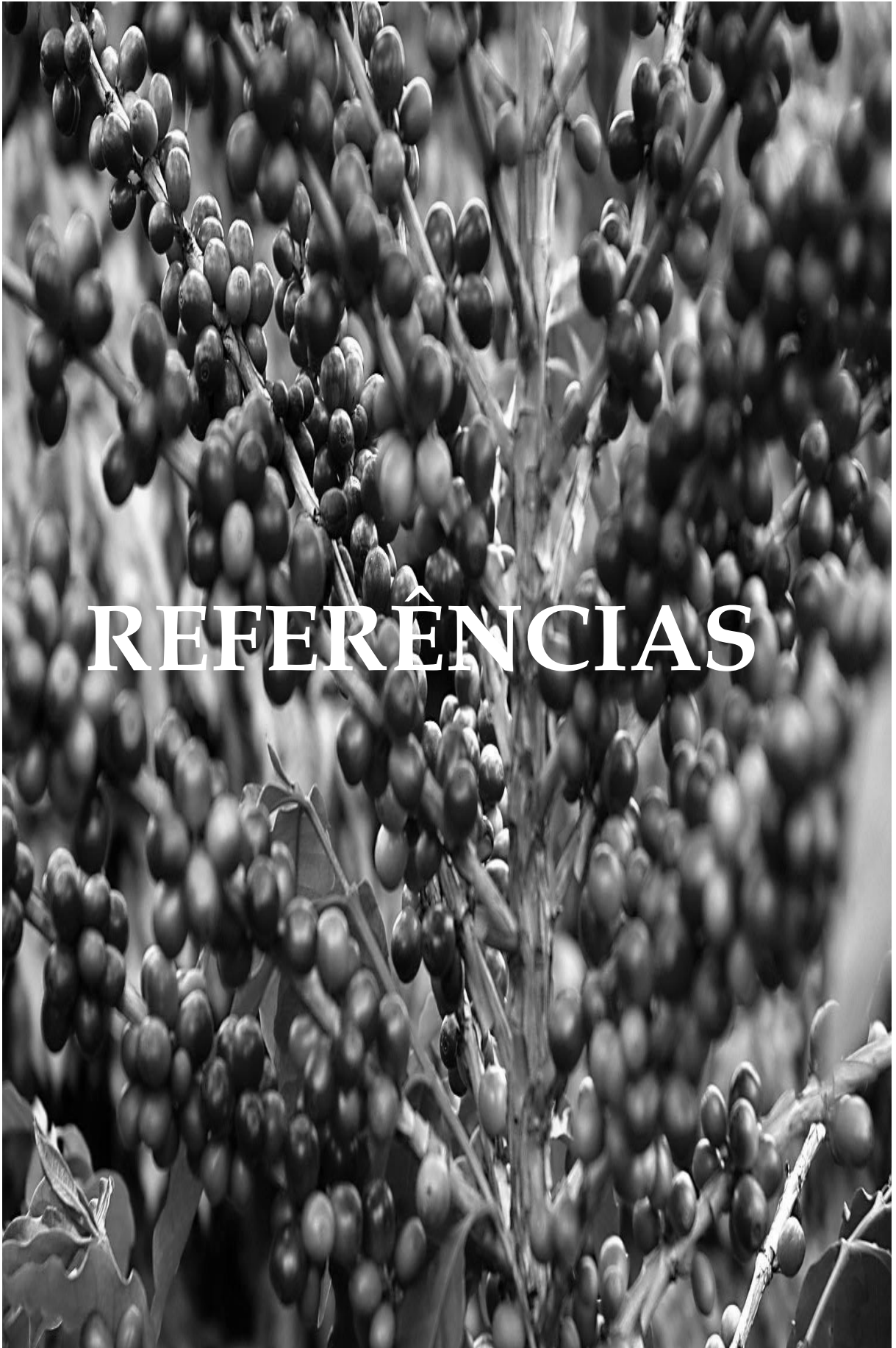
Os resultados obtidos nos ensaios de atividade antioxidante foram adequados para avaliar a atividade do EEtTr e através dos métodos de inibição dos radicais DPPH e ABTS, e do efeito supressor sobre os radicais peroxila (AAPH/ piranina) foi possível comprovar que o extrato possui ação antioxidante através da ação sequestradora de radicais livres. A atividade antioxidante da torta de café é significativa em relação a outras espécies vegetais e ao valor de CI_{50} obtido para o ácido ascórbico. No ensaio com o AAPH o EEtTr apresentou uma maior atividade

antioxidante frente à ação redutora do radical peroxila que o Trolox, evidenciando um grande potencial antioxidante visto que esse é um padrão de referência.

O extrato se mostrou seguro baseado no estudo da citotoxicidade para as linhagens celulares estudadas e, além disso, esse trabalho aplicou método alternativo frente à experimentação com animais. Deve também ser considerada a segurança levando em conta o uso do café na alimentação e em produtos cosméticos.

Com os resultados obtidos na determinação de compostos fenólicos, flavonoides, cafeína e atividade antioxidante é permitido atestar que o EEtTr pode ser utilizado em produtos cosméticos com a finalidade proposta no trabalho que é antienvhecimento. Além disso, pode ser usado como incremento em formulação com filtro solar visto que é significativa a influência do extrato no FPS.

Considerando os resultados apresentados o extrato etanólico 70% de torta de sementes de *C. arabica* apresenta um grande potencial para ser usado como matéria-prima para incorporação em produtos cosméticos, além de ser de suma importância no aproveitamento de resíduos da produção da agroindústria, a sua utilização agrega benefícios sociais e ao meio ambiente. A comparação da composição química de EEtTr e EEtSm indica ainda que a torta da semente de café pode ser uma interessante fonte de ácido clorogênico e cafeína.



REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

ABIC. Sabor do café: história do café. Disponível em: <http://www.abic.com.br/scafe_historia.html>. Acesso em: 01/ABRIL/2014.

ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; LIMA, A. R.; FERREIRA, E. B.; MALTA, M. R. Compostos bioativos em café integral e descafeinado e qualidade sensorial da bebida. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.12, p.1799-1804, 2008.

ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; DUARTE, S.M.S.; LIMA, A. R.; ALVARENGA, D.J.; FERREIRA, E. B.; Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica L.*). **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, n.2, p.414-420, 2010.

AGARWAL, R.; KATIYAR, S.K.; KHAN, S.G.; MUKHTAR, H. Protection against ultraviolet B radiation-induced effects in the skin of SKH-1 hairless mice by a polyphenolic fraction isolated from green tea. **Photochemistry and Photobiology**, v. 58, n. 5, p.695-700, 1993.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da RDC n. 237. Aprova Regulamento Técnico Sobre Protetores Solares em Cosméticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 de agosto de 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Brasília: Núcleo de Assessoramento em Comunicação Social e Institucional, v.1, 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos.pdf>. Acesso em: 20 março, 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da RDC n.47. Aprova o Regulamento técnico Lista de Filtros Ultravioletas Permitidos para Produtos de Higiene Pessoais, Cosméticos e Perfumes. Brasília, 16 de março de 2006. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/14c345804aee4083b759bfa337abae9d/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n%C2%B>

A+47,+de+16+de+mar%C3%A7o+de+2006.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 13 de fevereiro de 2014.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.

AMES, B.N.; GOLD, L.S. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. **Mutation Research**, v.250, p.3-16, 1991.

ANDUEZA, S.; CID, C.; NICOLI, M.C. Comparison of antioxidant and pro-oxidant activity in coffee beverages prepared with conventional and “torrefacto” coffee. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.37, p.893-897, 2004.

AUGUSTIN, C.; FREI, V.; PERRIER, E.; COLLOMBEL, C.; DAMOUR, O. Cellular engineering for cosmetology trials: dermal equivalent for determining cutaneous irritation and efficiency. In: 18th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 5, 1996, Amsterdam 7.7.1: Cellular Engineering, 2055-2056.

BABICH, H.; BABICH, J.P. Sodium lauryl sulfate and triclosan: *in vitro* cytotoxicity studies of gingival cells. **Toxicology Letters**, v.91, p. 189-196, 1997.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v.23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BERRA, C.M.; MENCK, C.F.M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v.29, n.6, p.1340-1344, 2006.

BERGER, M. M. Can oxidative damage be treated nutritionally? **Clinical Nutrition**, v. 24, n. 2, p. 172-183, 2005.

BRASIL. Farmacopeia brasileira. ANVISA/ Fundação Oswaldo Cruz. 5. ed., v.1, Rio De Janeiro, 2010.

CALABRESE, V.; SCAPAGNINI, G.; CATALANO, C.; DINOTTA, F.; GERACI, D.; MORGANTI, P. Biochemical studies of a natural antioxidant isolated from rosemary and its application in cosmetic dermatology. **International Journal of Tissue Reactions**, v.22, n.1, p. 5-13, 2000.

CAMPOS, A. M.; SOTOMAYOR, C. P.; PINO, E. LISSI, E. A Pyranine based Procedure for Evaluation of the Total Antioxidant Potential (TRAP) of Polyphenols. A Comparison with closely related Methodologies. **Biological Research**, v.37, p.287-292, 2004.

CAMPOS, P.M. **Avaliação da atividade inibitória de melanogênese do extrato hidroalcoólico da *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi**. Dissertação (Mestrado em Setor de Ciências Biológicas e da Saúde) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

CASTILLO, M.; AMES, J.; GORDON, M. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.50, p.3698–3703, 2002.

CHIARI, B.G. **Desenvolvimento, avaliação da eficácia e segurança de fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2011.

CHIARI, B. G.; MARTINI, P.C.; MORAES, J.D.D.; ANDRÉO, R.; CORRÊA, M.A.; CICARELLI, R.M.B.; ISAAC, V.L.B. Use of HEPG2 cells to assay the safety of cosmetic active substances. **International Journal of Research in Cosmetic Science**, v. 2, n.2, p.8-14, 2012.

CLIFFORD, M.C. Chemistry, in Clarke RJ and Macrae R (eds): Coffee. **Elsevier Applied Science**, v. 1, p.153–202, 1985.

CÓRDOVA, K.R.V.; GAMA, T.M.M.T.B.; WINTER, C.M.G.; KASKANTZIS NETO, G.; DE FREITAS, R.J.S. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa* degener) obtida por secagem. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Pesquisa de Alimentos**, Curitiba, v.23, n.2, p. 221-230, 2005.

CORRÊA, M.A. **Cosmetologia: Ciência e Técnica**. 1ed. Araraquara. Ed. Medfarma, 492 p., 2012.

COUTEAU, C.; CULLEL, N.P.; CONNAN, A.E.; COIFFARD, L.J. Stripping method to quantify absorption of two sunscreen in human. **International Journal of Pharmaceutics**, v.222, n.1, p.153-157, 2001.

CUNHA, A. P.; SILVA, A.P.; ROQUE, O.R.; CUNHA, E. **Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2004, p.49, 50 e 54.

DAI, J.; MUMPER, R.J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, v.15, n.10, p.7313-7352, 2010.

DE MARIA, C.A.B.; MOREIRA, R.F.A.; TRUGO, L.C. Componentes voláteis do café torrado, parte 1: compostos heterocíclicos. **Química Nova**, v.22, n.2, p.209-217, 1999.

DE MARIA, C.A.B.; MOREIRA, R.F.A. Métodos para análises de ácidos clorogênicos. **Química Nova**, v.27, n.4, p.586-592, 2004.

DE MARIA, C.A.B.; MOREIRA, R.F.A. Cafeína: Revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v.30, n.1, p.99-105, 2007.

DEVARY, Y.; ROSETTE, C.; DIDONATO, J. A.; KARIN, M. NF-kappa-B Activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. **Science**, v. 261, p.1442–1445, 1993.

DRAELOS, Z.D. Skin lightening preparations and the hydroquinone controversy. **Dermatologic Therapy**, v.20, p.308–313, 2007.

DUDONNÉ, S.; VITRAC, X.; COUTIÈRE, P.; WOILLEZ, M.; MÉRILLON, J-M. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.5, p.1768–1774, 2009.

DURASAMY, A.; NARAYANASWAMY, N.; SEBASTIAN, A.; BALAKRISHNAN, K.P. Sun protection and anti-inflammatory activities of some medicinal plants. **International Journal of Research in Cosmetic Science**, v.1, n.1, p.13-16, 2011.

EMBRAPA. Notícias: Um terço do café consumido no mundo é produzido no Brasil. Disponível em: <<http://www.sapc.embrapa.br/index.php/ultimas-noticias/um-terco-do-cafe-consumido-no-mundo-e-produzido-no-brasil>>. Acesso em 01/ABRIL/2014.

FALCÃO, D.Q.; COSTA, E.R.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; KUSTER, R.M.; MENEZES, F.S. Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. & Kunth, **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.16, p.73-76, 2006.

FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal Plant of Physiology**, v.18, n.1, p.23-26, 2006.

FARIA, C. M. Q. G.; NAZARE, A. C.; PETRONIO, M. S.; PARACATU, L. C.; ZERAIK, M. L.; REGASINI, L.O.; SILVA D. H. S.; FONSECA, L. M.; XIMENES, V. P. Protocatechuic Acid Alkyl Esters: Hydrophobicity As a Determinant Factor for Inhibition of NADPH Oxidase. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p.885- 893, 2012.

FARIAS, L.A.; FÁVARO, D.I.T. Vinte anos de química verde: conquistas e desafios. **Química Nova**, v.34, n.6, p.1089-1093, 2011.

FERNANDES, S. M.; PEREIRA, R. G. A.; PINTO, N. A. V. D.; NERY, F. C. Polifenóis, sólidos solúveis totais, açúcares totais, redutores e não-redutores em grãos de café arábica e conilon. In: **Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil**, Vitória. p. 1574-1579, 2001.

FERREIRA, C. Cooxupé investe na produção de óleo de café verde. **Revista Cafeicultura**, 2014. Disponível em: <http://www.revistacafeicultura.com.br/index.php?tipo=ler&mat=55871>. Acesso em 02 dez.2014.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidative Stress and Aging: Catalase Is a Longevity Determinant Enzyme. **Nature**, v.408, p.239-247, 2000.

FISHER, G.J.; VARANI, J.; VOORHEES, J.J. Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. **Archives of Dermatology**, v. 144, n. 5, p.666-672, 2008.

FLOR, J.; DAVOLOS, M.R.; CORRÊA, M.A. Protetores Solares. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 153-158, 2007.

HARBELL, J.W.; KOONTZ, S.W.; LEWIS, R.W.; LOVELL, D.; ACOSTA, D. Cell cytotoxicity assays. **Food and Chemical Toxicology**, v.35, p.79-126, 1997.

HERMAN, A.; HERMAN, A.P. Caffeine's Mechanisms of Action and Its Cosmetic Use. **Skin Pharmacol Physiol**, v.26, p.8-14, 2013.

HERNANDEZ, M.; MERCIER-FRESNEL, M.M. **Manual de cosmetologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999.

HIRATA, L.L.; SATO, M.E.O.; SANTOS, C.A.M. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p.418-424, 2004.

HO, Y.; YU, H.; SU, N. Re-examination of Chromogenic Quantitative Assays for Determining Flavonoid Content. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, p. 2674–2681, 2012.

HUBINGER, S.Z. **Estudo farmacognóstico e desenvolvimento de fitocosmético de ação antioxidante a partir dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae – Caesalpinioideae)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2006.

ILLY, A.; VIANNI, R. **Espresso coffee: the chemistry of quality**. 3 ed. San Diego: Ed. Academic Press Limited, p, 253,1998.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO H.R.N.; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.1, p. 85-100, 2008.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.359-365, 2008.

KALE, S.; GHOGHE, P.; ANSARI, A.; WAJE, A.; SONAWANE, A. Formulation and *in-vitro* determination of sun protection factor of *Nigella sativa* Linn. Seed Oil Sunscreen Cream. **International Journal of PharmTech Research**, v.2, n.4, p. 2194-2197, 2010.

KERZENDORFER, C.; O'DRISCOLL, M. UVB and caffeine: inhibiting the DNA damage response to protect against the adverse effects of UVB. **Journal of Investigative Dermatology**, v.129, p.1611–1613, 2009.

KIM, B.J.; KIM, J.H.; KIM, H.P.; HEO, M.Y. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): anti-oxidative activity and free radical scavenging activity. **International Journal of Cosmetic Science**, v.19, p.299–307, 1997.

KOO, S.-W.; HIRAKAWA, S.; FUJII, S., KAWASUMI, M.; NGHIEM, P. Protection from photodamage by topical application of caffeine after ultraviolet irradiation. **British Journal of Dermatology**, v.156, p. 957–964, 2007.

LIVNY, O.; KAPLAN, I.; REIFEN, R.; POLAK-CHARCON, S.; MADAR, Z.; SCHWARTZ, B. Oral cancer cells differ from normal oral epithelial cells in tissue like organization and in response to lycopene treatment: an organotypic cell culture study. **Nutrition and Cancer**, v.47, n.2, p.195-209, 2003.

LU, Y-P.; LOU, Y-R.; XIE, J-G.; PENG, Q-Y.; LIAO, J.; YANG, C.S.; HUANG, M-T.; CONNEY, A.H. Topical applications of caffeine or (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) inhibit carcinogenesis and selectively increase apoptosis in UVB-induced skin tumors in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.99, n.19, p.12455-12460, 2002.

MADISON, K.C. Barrier function of the skin: “la rasion d'être” of the epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v.121, n.2, p.231-241, 2003.

MANSUR, J. S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M. C. A.; AZULAY, R. D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. Rio de Janeiro, v. 61, p. 121-124, 1986.

MARTIN, K.R.; FAILLA, M.L.; SMITH JR., J.C. β -carotene and lutein protect HepG2 human liver cells against oxidant induced damage. **Journal of Nutrition**, v.126, n.9, p.2098-2106, 1996.

MARTÍNEZ, A.; IKKEN, Y.; CAMBERO, M.I.; MARÍN, M.L.; HAZA, A.I.; CASAS, C.; MORALES, P. Mutagenicity and cytotoxicity of fruits and vegetables evaluated by the Ames test and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. **Food Science and Technology International**, v.5, n.5, p.431-437, 1999.

MCCULLOUGH, J.L.; KELLY, K.M. Prevention and treatment of skin aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1067, p.323–331, 2006.

MENDES, A.J.T. Citologia das espécies de *Coffea*. Sua importância para o melhoramento do cafeeiro. **Boletim Diário da Secretaria da Agricultura**, n. 55, p.37-45, 1956.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, p.127-130, 2001.

MITANI, H.; RYU, A.; SUZUKI, T.; YAMASHITA, M.; ARAKANE, K.; KOIDE, C. Topical application of plant extracts containing xanthine derivatives can prevent UV-induced wrinkle formation in hairless mice. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**. v.23, p. 86-94, 2007.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v.26, n.2, p.211-219, 2004.

MONTEIRO, M. C.; TRUGO, L. C.; Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química Nova**, v.28, n.4, p.637-641, 2005.

MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; NASCIMENTO, E. A.; OLIVEIRA, G. S.; CHANG, R.; SANTOS, N. C.; ROSA, G.M. Análise de compostos bioativos, grupos ácidos e da atividades antioxidante do café arábica (*Coffea arabica*) do cerrado e de

seus grãos defeituosos (PVA) submetidos a diferentes torras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.198-207, 2008.

MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; MARIA, C. A. B. Componentes voláteis de café torrado. Parte II. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química Nova**, v.23, n.2, p.195-203, 2000.

NIJVELDT, R.J.; NOOD, E.; HOORN, D.E.C.; BOELENS, P.G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p.418-425, 2001.

PARRAS, P.; MARTÍNEZ-TOMÉ, M.; JIMÉNEZ, A.M.; MURCIA, M.A. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. **Food Chemistry**, v.102, p.582-592, 2007.

PEREDA, M.D.C.V.; DIEAMANT, G.C.; EBERLIN, S.; NOGUEIRA, C.; COLOMBI.; STASI, L.C.; QUEIROZ, M.L.S.; Effect of green *Coffea arabica* L. seed oil on extracellular matrix components and water-channel expression in *in vitro* and *ex vivo* human skin models. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.8, p.56-62, 2008.

PERIM, R. Café e seus efeitos na saúde. **Nutrição, Saúde & Performance**, ano 4, n. 22, p. 21-24, 2004.

PRADO, A.G.S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. **Química Nova**, v. 26, n.5, p. 738-744, 2003.

PRIOR, R. L.; C.A.O, G. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables. Diet and health implication. **The Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.35, p.588-592, 2000.

REIS A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, p.127-130, 2001.

RODRIGUES, H.G.; DINIZ, Y.S.; FAINE, L.A.; ALMEIDA, J.A.; FERNANDES, A.A.H.; NOVELLI, E.L.B. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rotina na concentração de colesterol-HDL. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 3, p.315-320, 2003.

ROSA, M.P. La domanda di olio d'oliva. **Olivae**, v. 63, p.24, 1996.

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E. KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p 238-244, dez 2008.

ROHR, M.; KLETTE, S.R.; BIMZCOK, R.; KLEBON, B.; HEINRICH, U.; TRONNIER, H.; JOHNCOCK, W.; PETERS, S.; PFLUCKER, F.; RUDOLPH, T.; FLOSSER-MULLER, H.; JENNI, K.; KOCKTT, D.; LADEMANN, J.; HERZOG, B.; BIELFELDT, S.; MENDROK-EDINGER, C.; HANAY, C.; ZASTROW, L.; In vitro Sun Protection Factor: Still a Challenge with No Final Answer. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.23, n.4, p 201-212, 2010.

ROSSETTI, R.P. **Determinação de fenóis totais em frutos do café: Avaliações em diferentes fases de maturação**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade de São Paulo , São Carlos, 2007.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; DE MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. **Comunicado Técnico on line (EMBRAPA)** n.128, 2007.

SANTOS, A.G.; FERREIRA, P.M.P.; JÚNIOR, G.M.V.; PEREZ, C.C.; TININIS, A.G.; SILVA, G.H.; BOLZANI, V.S.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.Ó.; CAVALHEIRO, A.J. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. **Chemistry & Biodiversity**, v.7, p.205-215, 2010.

SANTOS, A.G.; SALGADO, H.R.N.; CORRÊA, M.A.; CHORILLI, M.; MOREIRA, R.R.D.; PIETRO, R.C.L.R.; ISAAC, V.L.B. Fitocosméticos IN: SOUZA, G.H.B.; MELLO, J.C.P.; LOPES, N.P. **Farmacognosia Coletânea Científica**. Ouro Preto: UFOP, 2011.

SASSAKI, B.; CUNHA, T. N. Tratamento Facial e Bem-estar. **Cosmetics & Toiletries**, v.22, n.4, p.48-51, 2010.

SCHAFER, F.Q.; BUETTNER, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, p. 1191-1212, 2001.

SCHARFETTER-KOSHANEK, K.; Wlaschek, M.; Brenneisen, P.; Schauen, M.; Blandschun, R.; Wenk, J. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. **Journal of Biological Chemistry**, v. 387, n.11, p.1247–1257, 1997.

SCHIEBER, A.; KELLER, P.; CARLE, R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 910, p. 265-273, 2001.

SHI, X.; DALAL, N.S.; JAIN, A.C. Antioxidant behaviour of caffeine: Efficient scavenging of hydroxyl radicals. **Food and Chemical Toxicology**, v. 29, n.1, p.1-6, 1991.

SILVA, E.L. DA; PISKULA M.K; YAMAMOTO, N.; MOON, J.H; TERAQ, J. Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma. **FEBS Letters**, v.430, p.405-408, 1998.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PALAZZO de MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; ROS PETROVICK, P. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 833 p, 2007.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144-158, 1965.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA- RAVENTÓS, R.; Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p.152-178, 1999.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SPEER, K.; KÖLLING-SPEER, I. Lipids. In: CLARKE, R. J.; VITZTHUM, O. G. **Coffee: Recent Developments**. Oxford, Blackwell Science, 2001.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. **Life Sciences**, v.67, p.477-502, 2000.

STREILEIN, J.W.; TAYLOR, J.R.; VINCEK, V.; KURIMOTO, I.; SHIMIZU, T.; TIÉ, C.; COULOMB, C. **Immunology Today**, v. 15, p.174, 1994.

TERAQ, J.; PISKULA, M.K. Flavonoids and membrane lipid peroxidation inhibition. **Nutrition**, v.15, p.790-791, 1999.

TRUGO, L.C.; MACRAE, R. Chlorogenic acid composition of instant coffees. **Analyst**, v. 109, p. 263-266, 1984.

TURATTI, J.M. Extração e caracterização de óleo de café. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2, 2001, Vitória. Anais. Brasília, D.F. 2001. p. 1533-1539.

VARMAN, A.H.; SUTHERLAND, J.P. **Bebidas: tecnologia, química y microbiología**. Espanha: Acribia, 1997. p. 197 – 263.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VIRAVAIIDYA, K.; SIN, A.; SHULER, M.L. Development of a Microscale Cell Culture Analog to Probe Naphthalene Toxicity. **Biotechnology Progress**, v.20, p.316-323, 2004.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drugs Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas**, 2 ed. Springer, 1996.

WILKINSON, J.B.; MOORE, R.J. **Cosmetología de Harry**. Madri: Ediciones Díaz Santos, 1990.

WOLK, K.; WITTE, K.; SABAT, R. Interleukin-28 and interleukin-29: novel regulators of skin biology. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v.30, n.8, p.617-628, 2010.

ZHANG, Y.; WU, L.; TASHIRO, S.; ONODERA, S.; IKEJIMA, T. Evadamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. **Acta Pharmaceutica**, v.25, p. 83-89, 2004.

ZISHEN, H.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v.64, p.555-559, 1999.