



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – FARMÁCIA-BIOQUÍMICA
CAMPUS DE ARARAQUARA

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE *Coffea arabica* L. PARA
FINS COSMÉTICOS**

Fernando Bombarda Oda

Araraquara/Sp

2014

FERNANDO BOMBARDA ODA

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE *Coffea arabica* L. PARA
FINS COSMÉTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Araraquara/Sp

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sei e desejo cada dia mais reconhecer que tudo o que tenho, tudo que sou, é graças a Ele.

Agradeço também à minha família e meus pais por tanto terem se esforçado - em especial à minha mãe e avó - para me proporcionar a oportunidade de estudar em uma universidade estadual tão bem conceituada como é a UNESP, num curso com tamanha tradição.

Aos meus ótimos professores, principalmente o meu orientador Marcos e coorientador André, que me ensinaram e me dirigiram para uma boa formação e um bom trabalho.

Às amizades que fiz e que se fortaleceram durante a minha graduação, ao pessoal do laboratório de cosmetologia e farmacognosia da UNESP. Também a Ana Carolina, que fez parte desse trabalho.

Enfim, agradeço a todos que participaram positivamente para conclusão desse trabalho e da minha graduação, especialmente os que continuam comigo até o final.

RESUMO

Dentre as várias espécies de café, *Coffea arabica* L. destaca-se pela sua ampla importância comercial relacionada ao consumo da bebida e à produção de óleo. O grão de café possui grande quantidade de compostos fenólicos bioativos - destacando-se os com atividade antioxidante e fotoprotetora - e após a extração do óleo há sobra de grande quantidade de subprodutos, denominado torta. O objetivo desse trabalho é produzir um extrato a partir da torta de café selecionando o melhor solvente extrator, avaliando o teor de compostos fenólicos e o potencial antioxidante, para o emprego como ativo cosmético em formulações desenvolvidas, com análise *in vitro* para quantificação do Fator de Proteção Solar (FPS) dessas. Os extratos foram previamente produzidos por sonicação utilizando solventes de diferentes polaridades, e o extrato escolhido foi produzido em maior escala por maceração e realizado também extração exaustiva com o solvente escolhido (extrato etanólico 70%, v/v). Na determinação do teor de fenólicos totais foi utilizado o método com o reagente Folin-Ciocalteu. Foi avaliado também o rendimento (m/m) dos extratos e atividade antioxidante pelo método do radical DPPH. O extrato apresentou boa atividade antioxidante e alto teor de compostos fenólicos em comparação com outras plantas consideradas referências nessas propriedades.

Para o preparo das formulações foram utilizados matérias primas aprovadas pela ANVISA, e as quantidades dos filtros solares químicos empregados para obtenção de Fator de Proteção Solar (FPS) teórico próximo de 30, utilizou-se como ferramenta o BASF - Sunscreen Simulator. As formulas desenvolvidas e preparadas foram analisadas com o equipamento Optometrics SPF 290S, capaz de fazer a determinação do FPS por análise "in vitro". A preparação selecionada foi a que apresentou FPS adequado pela análise "in vitro" e sensorial mais leve, visto que a

intenção era pra uso facial. O extrato escolhido foi utilizado em creme base sem e com filtros solares sintéticos, nas concentrações de 0,3; 1 e 5%. Os resultados obtidos mostraram que nessas concentrações o extrato utilizado no creme base, isento de filtros solares sintéticos, não apresentou atividade fotoprotetora considerável. Entretanto, quando utilizado em conjunto com os filtros solares sintéticos, houve significativo aumento do FPS.

Palavras chave: resíduo agroindustrial, *Coffea arabica* L., antioxidante, fenólicos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVO	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Materiais	16
3.1.1 Equipamentos.....	16
3.1.2 Solventes e Reagentes.....	16
3.2 Obtenção do material vegetal.....	16
3.3 Perda por dessecação.....	17
3.4 Secagem e moagem da torta	17
3.5 Granulometria.....	17
3.6 Seleção do solvente extrator	18
3.7 Extração exaustiva utilizando etanol 70% (v/v).....	19
3.8 Preparo do extrato etanólico 70% em maior escala.....	19
3.9 Análise do extrato da torta de sementes de <i>C. arabica</i> (Eet70) por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	20
3.10 Doseamento de compostos fenólicos totais.....	21
3.11 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos através do ensaio pelo radical DPPH.....	22
3.12 Desenvolvimento de formulação para adição do Eet70.....	23
3.12.1 Determinação do FPS.....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1 Perda por dessecação.....	26
4.2 Granulometria.....	27
4.3 Escolha do solvente extrator.....	28

4.4 Extração exaustiva utilizando solvente etanol 70% (v/v)	32
4.5 Preparo do extrato etanólico 70% (v/v) de <i>C. arabica</i>	34
4.6 Análise do Eet70 da torta de sementes de <i>C. arabica</i> por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	35
4.7 Avaliação da atividade antioxidante do Eet70 através do ensaio pelo radical DPPH.....	36
4.8 Doseamento de compostos fenólicos totais do Eet70.....	38
4.9 Desenvolvimento de formulação para incorporação Eet70 e determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) “in vitro”	41
5 CONCLUSÃO.....	44
6 REFERÊNCIAS.....	45
7 DADOS FINAIS.....	52

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Grão e torta de café verde (<i>Coffea arabica</i> L.).....	12
Figura 2. Estrutura dos isômeros do ACQ e AFQ: a) ácido <i>trans</i> -cinâmico; b) D-(-) - ácido quínico; c) ácido cafeico; d) ácido ferúlico e e) R = OH, ácido 5-cafeoilquínico, R = CH ₃ , ácido 5-feruloilquínico. A esterificação também é possível nos átomos do carbono 3 e 4 do ácido quínico.....	15
Figura 3. Extração por maceração da torta de café com etanol 70%.....	20
Figura 4. Gráfico de barras de distribuição do material vegetal.....	28
Figura 5. Curva analítica do ácido gálico.....	31
Figura 6: Cromatoplasmas do Eet70 de <i>Coffea arabica</i> L. As substâncias identificadas foram cafeína e ácido clorogênico, respectivamente.....	36
Figura 7. Percentagem de inibição de formação do radical DPPH <i>versus</i> concentração de ácido ascórbico.....	37
Figura 8. Atividade sequestrante do radical DPPH pelo extrato etanólico 70% da torta de <i>Coffea arabica</i> L.....	37
Figura 9. Curva analítica do ácido gálico.....	39
Figura 10. Curva analítica do ácido clorogênico.....	39
Figura 11. Correlação entre “ <i>in vivo</i> ” FPS e FPS analisado no Optometrics SPF-290 S.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das formulações desenvolvidas e função principal de seus componentes.....	24
Tabela 2. Análise granulométrica de torta de sementes de <i>Coffea arabica</i> L.....	27
Tabela 3. Rendimento da extração, teor de compostos fenólicos totais (FT) expressos em equivalente de ácido gálico no extrato e torta secos e atividade antioxidante avaliada pelo radical DPPH.....	30
Tabela 4. Absorbância das amostras em 760nm, utilizando-se o método de Folin-Ciocalteu.....	30
Tabela 5. Resultado das absorbâncias em 515 nm de cada extrato relativos ao ensaio da atividade antioxidante pelo radical DPPH.....	31
Tabela 6. Quantidade de extrato obtido, teor de compostos fenólicos totais (FT) expressos em equivalentes de ácido gálico e de ácido clorogênico no extrato e torta secos.....	33
Tabela 7. Absorbância das amostras 123T, 4T, 5T e 6T em 760nm, utilizando-se o método de Folin-Ciocalteu.....	33
Tabela 8. Relação entre extração e porcentagem de FT obtido e porcentagem acumulada.....	34
Tabela 9. Absorbância das amostras e branco em 760nm, utilizando-se o método de Folin-Ciocalteu.....	40
Tabela 10. Teor de compostos fenólicos totais (FT) expressos em mg equivalentes a ácido gálico e ácido clorogênico por g no extrato e torta secos.....	40
Tabela 11. Valores de FPS (Fator de Proteção Solar) de acordo com <i>BASF Sunscreen Simulator</i> e Optometrics SPF 290S.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

123T	Extrato etanólico 70% da torta de <i>Coffea arabica</i> L. das etapas 1, 2 e 3
4T	Extrato etanólico 70% da torta de <i>Coffea arabica</i> L. da etapa 4
5T	Extrato etanólico 70% da torta de <i>Coffea arabica</i> L. da etapa 5
6T	Extrato etanólico 70% da torta de <i>Coffea arabica</i> L. da etapa 6
ABIC	Associação Brasileira da Indústria de Café
ACQ	Ácido cafeoilquinico
AFQ	Ácido feruloilquinico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
Cl₅₀	Concentração necessária para inibição de 50% dos radicais DPPH em solução
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
Eet70	Extrato etanólico 70% da torta de <i>Coffea arabica</i> L.
FPS	Fator de Proteção Solar
FT	Compostos fenólicos totais
Na₂CO₃	Carbonato de sódio
NP-PEG	Reagente: difenilboriloxietilamina 1,0% em metanol, seguida de solução de polietilenoglicol 4000 5,0% em etanol
R_f	Fator de retenção (quociente entre a distância percorrida pela substância e a linha de frente na cromatoplaça da CCD)
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A (comprimento de onda entre 320-400nm)
UVB	Ultravioleta B (comprimento de onda 290-320nm)

Vis Luz visível (comprimento de onda 400-700nm)

® Marca registrada

1. INTRODUÇÃO

Cultivado no Brasil pela primeira vez no século XVIII, o café hoje é uma das principais *commodities* agrícolas do país. Grande parte da produção é consumida pelo mercado interno, principalmente como bebida, sendo que o país é o maior produtor e exportador mundial de café e possui o segundo maior mercado consumidor global em volume, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (ABIC, 2013).

Por possuir uma série de compostos bioativos, como cafeína e ácidos fenólicos, o café passou a ser utilizado com outras finalidades, como por exemplo para uso cosmético, o qual utiliza comumente o óleo de café verde, principalmente da espécie *Coffea arabica* L., obtido a partir da prensa de grãos não torrados (FERNANDES et al, 2003; ABRAHÃO et al., 2010; TURATTI, 2001).

O óleo do café possui comprovadamente uma grande quantidade de compostos bioativos, que apresentam diversas aplicabilidades na área da saúde (TURATTI, 2001; KUSKOSKI et al., 2006). Os grãos contêm apenas 13% em óleo fixo. Desta forma, após a extração das sementes de café por alta pressão, é obtida uma significativa quantidade de resíduo, denominado torta, descartada após esse procedimento (TURATTI, 2001). Sendo assim, este trabalho tem por objetivo estudar compostos de interesse presentes na torta de semente de *C. arabica*.



Figura 1. Grão e torta de café verde (*C. arabica*).

Em pleno século XXI, notamos uma iminente preocupação com o destino e reaproveitamento de resíduos industriais e para a torta obtida após extração do óleo do café não deve ser diferente. Daí a importância da tentativa de se utilizar esses subprodutos na obtenção de ativos cosméticos, o que evitaria problemas ambientais, poderia gerar uma nova fonte de renda à população das regiões produtoras, agregaria valor a essa *commodity*, sem contar no benefício que pode propiciar a saúde humana através da utilização dos cosméticos obtidos (VEGRO; CARVALHO, 1994).

Os compostos fenólicos têm-se apresentado como inibidores da oxidação lipídica - já que podem doar H^+ ou elétrons - e da enzima lipoxigenase “in vitro”, (SOUSA et al., 2007; WETTASINGHE; SHAHIDI, 1999) o que levou grande atenção a eles nas últimas décadas. Os lipídeos dos alimentos sofrem uma série de reações – sendo as oxidativas as principais - que podem culminar na formação de outros compostos que afetam o seu valor nutricional e características organolépticas, além de poderem ser tóxicos (HSIEH; KINSELLA, 1989; DONNELLY; ROBINSON, 1995). Ainda muito importante é a capacidade dos ácidos fenólicos funcionarem como sequestradores de radicais livres e algumas vezes como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação quanto no desencadeamento do processo oxidativo (WETTASINGHE; SHAHIDI, 1999, PRIOR; CAO, 2000). Outra vantagem é que os produtos intermediários formados pela ação dos desses são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático presente nessas estruturas (CHUN et al., 2005; HASLAM, E., 1996; SOARES, S. E., 2002).

No café, além dos compostos fenólicos contribuírem para sabor e aroma, eles também apresentam propriedades farmacológicas e fisiológicas importantes, como a atividade antioxidante, o que vai de acordo com o que Sun et al (2002) afirmaram, demonstrando que em muitos frutos essa atividade se deve principalmente aos

fenólicos (Abrahão et al, 2010) e que tem ação também na prevenção do fotoenvelhecimento, pois são capazes de inibir processos de degradação da pele causados pela radiação ultravioleta.

Resultados com testes *in vitro* em microssomas de fígado de rato mostraram que o ácido cafeico – um dos mais importantes ácidos fenólicos e que faz parte do ácido 5-cafeoilquínico - têm ação de inibição da peroxidação e oxidação induzidas (SOARES, S. E., 2002; SOUSA et al., 2007; PULLA REDDY; LOKESH, 1992). Devido a essas propriedades, os extratos das plantas que os contém são muito utilizados em cosméticos para beneficiar a pele, o que leva, além de outros, ao uso para proteção do envelhecimento precoce da pele. Uma maneira eficiente de prevenir esse envelhecimento é proteger-se do dano acumulativo produzido pela exposição à luz ultravioleta com consequente formação e ação deletéria dos radicais livres. A associação racional de substâncias com atividade antioxidante e fotoprotetora seria, desta forma, ideal para beneficiar e proteger a pele. Para essa função, extratos de plantas ricos em compostos fenólicos têm se mostrado muito eficazes (CUNHA et al., 2004; MAGALHÃES, 2000).

Dentre os principais polifenóis presentes no café, destacam-se os ácidos fenólicos, principalmente os denominados ácidos clorogênicos (ACG). Fazem parte desta família ésteres formados por derivados do ácido trans-cinâmico com o ácido quínico. Dessa maneira, os ACG podem ser classificados de acordo com a identidade dos derivados do ácido trans-cinâmico, número e posição dos resíduos acila. O grupo mais comumente encontrado na natureza é o ácido cafeoilquínico, e dentro deste o composto majoritário é o 5-cafeoilquínico (maior fonte no café). Por esse motivo ele é o mais conhecido e utilizado diversas vezes como fonte de muitos estudos. Nesse trabalho o ácido 5-cafeoilquinico será utilizado como sinônimo de ácido clorogênico

(DE MARIA; MOREIRA, 2004). Na Figura 2 estão apresentadas algumas estruturas dos compostos presentes no café e seus subestruturas.

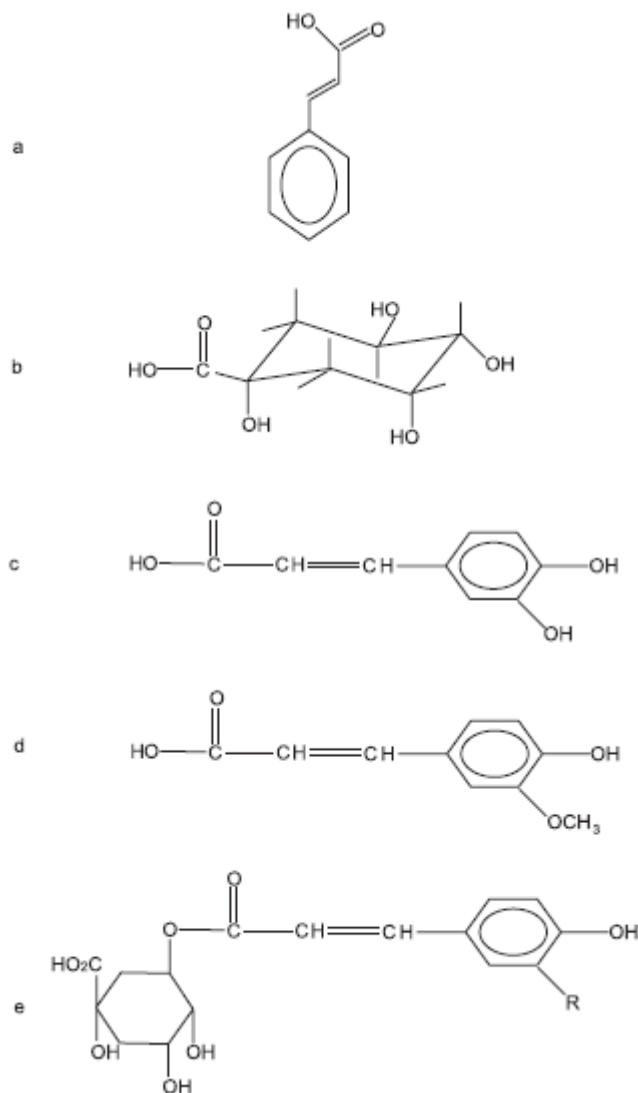


Figura 2. Estrutura dos isômeros do ACQ e AFQ: a) ácido *trans*-cinâmico; b) D-(-)-ácido quínico; c) ácido cafeico; d) ácido ferúlico e e) R = OH, ácido 5-cafeoilquínico, R = CH₃, ácido 5-feruloilquínico. A esterificação também é possível nos átomos do carbono 3 e 4 do ácido quínico. Fonte: DE MARIA; MOREIRA, 2004

2. OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi produzir um extrato a partir da torta de *Coffea arabica* L. selecionando o melhor solvente extrator, avaliando o teor de compostos

fenólicos e o potencial antioxidante para emprego como ativo cosmético em formulações desenvolvidas, com análise “in vitro” para determinação do FPS dessas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Equipamentos

Balança semi-analítica GEHAKA® modelo BG 200 (máx 200g; min 0,025g; d = 0,0001g). Balança analítica MARTE® modelo AY220 (Max 220g; min 0,01; d=0,001). Rota evaporador: IKA-DEST® modelo KV 05S3, com banho de aquecimento QUIMIS®, banho ultratermostatizado (refrigeração) QUIMIS® modelo Q214M3. Balança com infravermelho (LP11 - METTLER®). Espectrofotômetro UV/Vis (Hitachi U-2001). Estufa Quimis®. Geladeira Consul®. Optometrics (SPF-290S). Pipetadores automáticos com volume variável (Agipette®). SpeedVac Concentrator: THERMO SCIENTIFIC® modelo Savant SPD131DDA.

3.1.2 Solventes e reagentes

Solventes grau P.A. marcas Qhemis® e Synth®; água obtida a partir de osmose reversa. Ácido clorogênico (Sigma-Aldrich®); Ácido gálico (Sigma-Aldrich®). Cafeína (Sigma-Aldrich®). Carbonato de sódio. Placas em alumínio cobertas com sílica gel (Sigma-Aldrich®) (20 x 20 cm). Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazina (DPPH, Sigma-Aldrich®). Reagente Folin-Ciocalteau (Imbrlab®).

3.2 Obtenção do material vegetal

A torta resultante da extração de óleo de café foi cedida pela Cooperativa de Cafeicultores Cooxupé, localizada em Guaxupé-MG. O material vegetal utilizado era proveniente de colheita realizada no mês de março de 2011, após prensagem e retirada do óleo. Esse material foi armazenado em geladeira com temperatura de aproximadamente 5°C.

3.3 Perda por dessecação

A perda por dessecação, a qual determina a quantidade de substâncias voláteis e água eliminadas nas condições especificadas, foi realizada utilizando-se o método gravimétrico e o de balança por aquecimento com radiação infravermelha. Foram colocadas três amostras de aproximadamente 1 g do material vegetal (torta de *C. arabica*) seco e pulverizado em liquidificador por cerca de 10min, em pesa-filtros diferentes. Estas foram colocadas em estufa com circulação de ar entre 105-110° C durante 3 h, colocadas para esfriarem até temperatura ambiente em dessecador e pesadas, repetindo-se o processo até que tivessem seu peso constante (BRASIL, 2010). Os resultados da perda por dessecação foram calculados através da relação entre massa inicial e final (% m/m).

Para o método de balança por aquecimento com radiação infravermelha, foram pesados - em triplicada - aproximadamente 2,0 g da material vegetal e submetidos a radiação infravermelha (105° C) durante 90 min (INFRATEST). Os resultados foram apresentados pelo próprio equipamento em % (m/m).

3.4 Secagem e moagem da torta

Todo o material vegetal utilizado nesse trabalho foi seco em estufa com circulação de ar a 40°C até massa constante (aproximadamente 4 h) e pulverizada em liquidificador comum por cerca de 10 min.

3.5 Granulometria

Foi realizada a análise granulométrica e cálculo do tamanho médio de partícula (TMP) de todo material vegetal, já que a apresentação da droga vegetal pode interferir no teor de fenólicos presentes no extrato (NACZK; SHAHIDI, 2004). Cerca de 300g desse material pulverizado em liquidificador comum foi colocado no primeiro tamise de um conjunto de 6 tamises (com orifícios de 600 mm, 250 mm, 180 mm, 125 mm,

75mm e 63 mm) e agitados pelo equipamento vibratório durante 15 minutos com agitação média. Ao final do processo foi pesado o pó retido em cada tamise (% m/m) e realizado a análise granulométrica, para determinação do tipo de pó. Para tal, foi usado o seguinte cálculo de acordo com a equação 1 (BRASIL, 2010):

$$\% \text{ Retida pelo tamis} = P_1/P_2 \times 100 \text{ Equação 1}$$

onde:

P_1 = Peso da amostra retida em cada tamis (em gramas)

P_2 = Soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (em gramas)

100 = Fator de porcentagem

Para o cálculo do TMP foi utilizada a equação 2:

$$\text{TMP} = \Sigma (\% \text{retenção} \times \text{abertura média das malhas}) / 100 \text{ Equação 2}$$

A abertura média das malhas corresponde à média aritmética simples entre a abertura do tamise o qual as partículas passaram e a abertura do tamise que estas ficaram retidas. O tamise de abertura de 600 µm foi utilizado apenas para realização do cálculo.

3.6 Seleção do solvente extrator

Foram realizados testes de extração da torta de *C. arabica* com solventes de diferentes polaridades, baseando-se no encontrado na literatura para melhor extração de fenólicos (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Esses extratos foram produzidos por sonicação utilizando etanol 70 e 80% e metanol 60 e 80% (v/v). Em triplicata, para cada 1,00 g de material vegetal foram utilizados 15 mL de solvente extrator em um tubo de ensaio, em 3 etapas de 5 mL no ultrassom por 20 min cada – relação material vegetal: solvente 1:15 no total (m/v). As soluções extrativas foram filtradas e secas em SpeedVac®. Foi então realizado

doseamento de compostos fenólicos e ensaio com o radical DPPH dos respectivos extratos secos.

Considerando-se os resultados do teor de fenólicos e da avaliação da atividade antioxidante, além do custo, aspectos ambientais, toxicidade e a finalidade proposta, foi escolhido o melhor solvente extrator para utilização do respectivo extrato em um fitocosmético.

3.7 Extração exaustiva utilizando etanol 70% (v/v)

Para se determinar a máxima quantidade de compostos fenólicos que poderiam ser extraídas pelo etanol 70% (v/v), foram realizadas 6 extrações sequenciais no mesmo material, em triplicata: para cada 1,00 g de material vegetal foram utilizados 5 mL de etanol 70% (v/v) em um tubo de ensaio no ultrassom por 20 min. As soluções extrativas das 3 primeiras etapas foram unidas formando um único extrato (123T) e todas foram secas em SpeedVac®. Foi então avaliado rendimento e realizado doseamento de compostos fenólicos dos respectivos extratos secos e verificado a porcentagem relativa desses compostos em cada etapa de extração: 123T, 4T, 5T e 6T.

3.8 Preparo do extrato etanólico 70% em maior escala

Após realização da secagem, pulverização e da análise granulométrica, foi realizada extração de 300 g da torta de café através do método de maceração com etanol 70% (v/v) e aquecimento de 40°C. A relação entre droga vegetal e solvente extrator foi de 1:15, baseando-se nos resultados obtidos na extração por ultrassom. Houve troca de solvente extrator e agitação ocasional. Toda solução extrativa foi filtrada em papel de filtro, concentrada em rotaevaporador a 45°C para retirada do etanol e depois liofilizadas. O extrato seco foi armazenado em frasco de vidro âmbar

e colocado no refrigerador a cerca de 2°C. A figura 3 descreve com detalhes como foi feito o procedimento de extração.

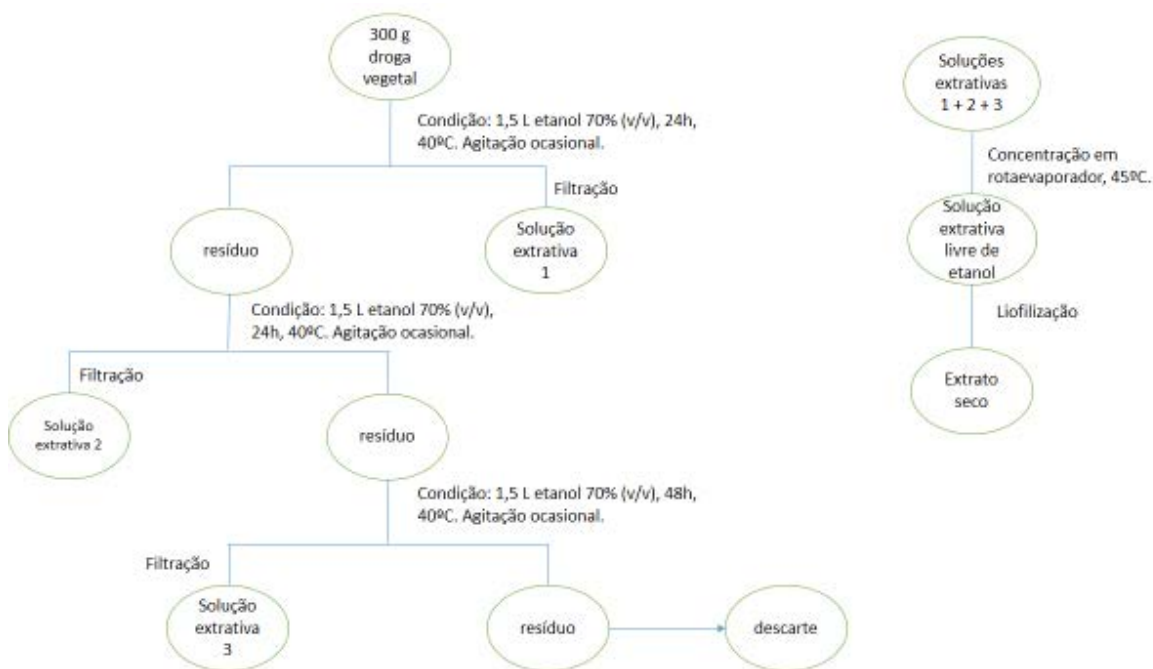


Figura 3. Extração por maceração da torta de café com etanol 70%.

3.9 Análise do extrato da torta de sementes de *C. arabica* (Eet70) por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Preliminarmente as análises foram realizadas em placas de vidro de sílica gel (20 x 20 cm x 0,25 mm) com o Eet70 de *C. arabica* utilizando como fase móvel diferentes misturas de solventes. Após determinadas as condições de fase móvel, onde o fator de retenção (R_f) estava entre 0,2 e 0,8, foram utilizadas placas de alumínio cobertas com sílica gel (Sigma-Aldrich®). As condições cromatográficas gerais com as placas de alumínio foram: sílica gel 60G, (20 x 20 cm x 0,25 mm); ativação a 110° C por 1 h. Escolheu-se como padrões para as análises a cafeína, ácido clorogênico e ácido cafeico na concentração de 15 mg/mL e a solução do Eet70 na concentração de 20 mg/mL.

A fase móvel utilizada para a análise da cafeína foi acetato de etila: metanol: água (85:10:5, v/v) e como reveladores o reagente de Dragendorff e ácido sulfúrico 10%.

A fase móvel utilizada para análise do ácido clorogênico foi acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (72:5:5:8) (v/v). Para o ácido cafeico foi utilizada fase móvel acetato de etila: ácido acético glacial: hexano (90:5:5, v/v). Para ambos foi utilizado como revelador o reagente de NP-PEG. (WAGNER; BLADT, 1996).

3.10 Doseamento de compostos fenólicos totais

Os teores de compostos fenólicos totais (FT) dos extratos secos foram determinados segundo adaptação do método descrito por Singleton & Rossi (1965) , Singleton (1999) e Waterhouse (1999) , utilizando o reagente Folin-Ciocalteu e curvas analíticas de ácido gálico, e clorogênico. Os extratos foram solubilizados em metanol em diferentes concentrações: 470 µg/ml (metanol 60%); 445 µg/ml (metanol 80%); 426 µg/ml (etanol 70%); 400 µg/ml (etanol 80%) e 1000 µg/ml (Eet70). 20 µL da solução dos extratos foram adicionados a 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu e 580 µL de água deionizada em *ependorff* de 2 mL. Após 8 min, foram adicionados 300 µL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 20 %. Os tubos foram agitados, adicionados de 1000 µL de água deionizada e deixados em repouso à temperatura ambiente durante 2 horas. Em seguida, as absorbâncias das amostras foram medidas em espectrofotômetro (UV/Vis Shimadzu 1603 e 1800) a 760 nm. Como branco utilizou-se metanol, adicionando-se apenas 20 µL deste solvente ao invés dos extratos. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em mg de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico ou ácido clorogênico (para o Eet70) por g de extrato e g de torta.

3.11 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos através do ensaio pelo radical DPPH

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada com o uso do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), segundo método descrito por Mensor et al. (2001) e Falcão et al. (2006), com modificações. Exatamente 1,0 mL da solução aquosa dos extratos, nas concentrações de 7,0 µg/ml (metanol 60%); 6,65µg/ml (metanol 80%); 6,2 µg/ml (etanol 70%); 6,0 µg/ml (etanol 80%), foi adicionado a 2,5 mL de solução etanólica de DPPH 0,004% (m/v). As soluções foram mantidas ao abrigo da luz e após 30 min foi determinada a absorbância em 515 nm. Foi usado como branco solução contendo apenas 1 mL de água e 2,5 mL da solução etanólica de DPPH a 0,004% (m/v). Todo o experimento utilizando o radical DPPH foi realizado em triplicata para cada amostra. A média das absorbâncias destas foi usada para o cálculo da porcentagem de inibição do radical DPPH (% de inibição) (MOLYNEUX, 2004):

$$\% \text{ de inibição do radical DPPH} = \frac{(A_{\text{máx}} - A_{\text{teste}})}{A_{\text{máx}}} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

$A_{\text{Máx}}$ é a absorbância do DPPH em 515nm na ausência de amostra (branco).

A_{Teste} é a absorbância do DPPH em 515nm na presença de amostra.

O ensaio também foi realizado, posteriormente, usando a vitamina C como padrão antioxidante, em diferentes concentrações (0,5 a 5 µg/mL) e com o Eet70, em concentrações (0 a 25 µg/mL).

Utilizando os resultados obtidos, foi feita uma curva de concentração *versus* % de inibição de DPPH e, então, calculado a quantidade de vitamina C e Eet70 necessários para inibição de 50% dos radicais DPPH em solução (CI_{50}).

3.12 Desenvolvimento de formulação para adição do Eet70

As formulações nas quais seriam incorporados os extratos foram desenvolvidas baseando-se na seleção de componentes pouco oleosos, e cuja aplicação resultasse em sensorial leve e seco, visto que o intuito era obter produtos para uso facial diário. Neste sentido, optou-se também pelo desenvolvimento de emulsões do tipo óleo em água (O/A).

Portanto, foram desenvolvidas 3 fórmulas (A, B, C), com diferentes componentes e concentrações de fotoprotetores sintéticos, respeitando-se os padrões brasileiros. O Fator de Proteção Solar (FPS) desejado foi calculado a partir do *BASF Sunscreen Simulator* - um simulador de FPS disponibilizado pela BASF – para que se obtivesse produtos com FPS próximo de 30. O FPS determina o grau de proteção solar contra a queimadura. As formulações foram feitas primeiramente sem o extrato Eet70 para avaliar e comparar seus aspectos sensoriais e de estabilidade, segundo a tabela 1 a seguir (Anvisa, 2006).

Tabela 1. Composição das formulações desenvolvidas e função principal de seus componentes.

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

* European Comission - Health and Consumers, 2014

Depois de escolhida a formulação que seria utilizada, foi adicionado Eet70 da torta de *C. arábica* L. em quantidade de 0,3; 1,0 e 5% (m/m), quantidades que são

usualmente utilizadas, (CAMPOS; FRASSON, 2011; GETTENS; FRASSON, 2007) para verificar se o extrato era capaz de potencializar o FPS em conjunto com os filtros solares sintéticos. A escolha também baseou-se no valor de CI_{50} obtido no teste de atividade antioxidante do Eet70 no ensaio utilizando o radical DPPH. Também foi manipulada uma formulação base sem os filtros solares químicos e sem o Eet70, e outra formulação base recebeu apenas o Eet70, para verificar se a presença do mesmo poderia determinar um valor de FPS e se a formulação base também poderia influenciar positivamente o FPS.

A preparação das formulações seguiam uma mesma metodologia, na qual a fase com os componentes oleosos era devidamente aquecida a 70°C e quando resfriada era adicionado o agente emulsificante. Depois, a fase aquosa aquecida era vertida lentamente e com agitação vigorosa sobre a fase oleosa. O Eet70 a 1% 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, para verificar se o aquecimento a 70°C seria capaz de degradá-lo e causar diminuição do FPS, ou se havia problema de dissolução quando fosse incorporado após a formulação estar pronta.

3.12.1 Determinação do FPS

Foi utilizado o aparelho Optometrics SPF 290S para avaliar o fator de proteção solar da formulação escolhida sem e com o extrato etanólico 70% (v/v) de *C. arabica* em diferentes concentrações. A medição do FPS foi realizada segundo o protocolo do fabricante. No suporte contendo a fita Transpore® (50 cm²), foram aplicadas 110 mg das formulações, para formação de um filme uniforme de 2 mg/cm². Foram deixadas para secar durante 15 minutos. Em seguida as amostras foram colocadas no aparelho, onde estiveram submetidas a incidência de radiação ultravioleta - advinda de uma

lâmpada de Xenônio - na faixa de comprimento de onda de 290 a 400nm. As leituras foram repetidas doze vezes pelo aparelho, em diferentes pontos da fita, e o fator de proteção monocromática para cada um dos comprimentos de onda (intervalos de 5nm) é obtido e utilizado pelo software *WIN SPF* para calcular o valor de FPS, com o respectivo desvio padrão (Optometrics - SPF Analyzer, 2014).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perda por dessecação

Pelo método gravimétrico as massas obtidas após a secagem da torta de *C. arabica* foram: 0,915 g (perda de 8,5%, m/m); 0,908 g (perda de 9,2%, m/m); 0,910 g (perda de 9,1%, m/m). A média obtida da perda por dessecação da torta de *C. arabica* foi de 8,9%.

Os resultados obtidos pelo método da balança com radiação infravermelha são calculados e gerados diretamente pelo equipamento, e os valores apresentados foram de: 8,1% (m/m); 8,3% (m/m); 8,2% (m/m). A média da perda por dessecação pelo método de dessecação por infravermelho foi de 8,1%.

Os resultados encontrados pelo método gravimétrico e pelo método em balança com aquecimento por infravermelho foram muito próximos, 8,9 e 8,1%, respectivamente. Ambos os resultados estão dentro do limite máximo aceitável de umidade para drogas vegetais, que é de 14%. Isso indica que a droga vegetal possui qualidade aceitável, uma vez que alto teor de água favorece a ação de enzimas, além de possibilitar o desenvolvimento de microrganismos, alterando assim, a composição natural do material vegetal. (SIMÕES et al., 2007).

4.2 Granulometria

Foi determinado o percentual de pó retido em cada tamis, utilizando-se cerca de 300 g de torta de *C. arabica*, que representava toda droga vegetal utilizada nesse trabalho. Os resultados estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Análise granulométrica de torta de sementes de *C. arabica*.

	Número do tamis (ABNT / ASTM)	Orifício do tamis (µm)	Massa retida (g)	Porcentagem (% m/m)	Abertura média das malhas (µm)	(% retida x abertura média das malhas) / 100
	30	600	0,00	0,0	-	-
	60	250	1,83	0,61	425	2,59
	80	180	5,62	1,88	215	4,04
	120	125	111,8	37,7	152,5	57,5
	200	75	166,3	55,7	100	55,7
	230	63	8,02	2,67	69	1,84
	Coletor	-	4,24	1,44	31,5	0,44
Final			297,8	100		122,1

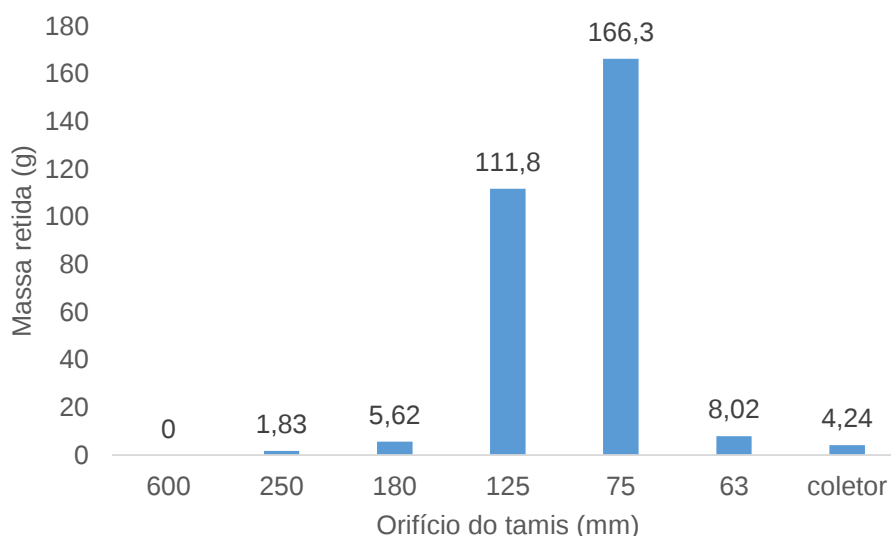


Figura 4. Gráfico de barras de distribuição do material vegetal em diferentes tamises.

De acordo com a porcentagem obtida, podemos classificar a apresentação do material vegetal de *C. arabica* utilizada para obtenção dos extratos como fino (aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamise com abertura nominal de malha de 180 mm), pois apenas 7,45 g (2,5%) do material vegetal não passou pelo tamise de abertura 180 μm . Além disso, o tamanho médio de partícula foi de 122,1 μm . Esses dados são importantes pois a composição da solução extrativa obtida depende, entre outros fatores, do tamanho das partículas da droga vegetal utilizada. Isso se aplica também aos compostos de maior interesse nesse trabalho, os fenólicos, pois interfere diretamente na velocidade de dissolução destes. (NACZK; SHAHIDI, 2004; BACCARIN et al, 2009).

4.3 Escolha do solvente extrator

A extração dos compostos fenólicos de materiais vegetais variam de acordo com sua composição natural, método extrativo, tamanho da amostra, tempo e as condições de estocagem, e pela presença ou não de interferentes. Além disso, sabe-se que a solubilidade desses compostos se deve ao grau de polimerização e interação

com outros componentes do vegetal, mas principalmente pelo tipo de solvente utilizado para extração (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Assim, são utilizados diversos tipos e misturas desses para extração de fenólicos, como metanol, etanol, água, acetato de etila, etc. (NACZK; SHAHIDI, 2004; SIMÕES et al., 2007). Baseado nisso, nesse trabalho foram realizados testes de extrações da torta de café com solventes de diferentes polaridades, de acordo com o encontrado na literatura para melhor extração de fenólicos, e em menor toxicidade, já que o produto final é um fitocosmético.

Os solventes utilizados para extração da torta de sementes de *C. arábica* L. por sonicação geraram extratos com diferentes rendimentos (m/m), teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante. O ultrassom pode ser utilizado para várias atividades, como limpeza de materiais, degaseificação, esterilização e também para extração de plantas, isso porque as ondas sonoras de alta potência causam variação de pressão, produzindo pequenas rupturas nas estruturas vegetais e micro fluxos de fluidos, o que torna mais eficiente a extração, podendo diminuir o tempo desta, além de apresentar boa reprodutibilidade (FREITAS, 2007). Os resultados estão expressos na tabela 3. Os cálculos consideraram os valores obtidos pela perda por dessecação (8,5 %).

Tabela 3. Rendimento da extração, teor de compostos fenólicos totais (FT) expressos em equivalente de ácido gálico no extrato e torta secos e atividade antioxidante avaliada pelo radical DPPH.

Extrato	Rendimento (%) ^a	Teor de FT no extrato seco ^b	Teor de FT na torta seca ^c	Atividade antioxidante DPPH ^d	
				Concentração extrato (µg/mL)	Inibição DPPH (%)
Metanol 60%	280 mg (28%)	115,2	35,0	7,0	22,5
Metanol 80%	267 mg (27%)	138,0	40,1	6,65	18,8
Etanol 70%	248 mg (25%)	147,0	39,6	6,2	22,5
Etanol 80%	242 mg (24%)	117,5	30,7	6,0	18,7

^a (massa de extrato/massa de torta) x 100; ^b mg de fenólicos totais equivalentes a ácido gálico / g de extrato seco; ^c mg de fenólicos totais equivalentes a ácido gálico / g de torta seca; ^d a média de absorbância para o branco foi de 0,888.

As absorbâncias em triplicata obtidas para cálculo do teor de fenólicos dos extratos obtidos por sonicação estão dispostas na Tabela 4.

Tabela 4. Absorbância das amostras em 760nm, utilizando-se o método de Folin-Ciocalteu.

	Metanol 80%	Metanol 60%	Etanol 70%	Etanol 80%	Branco
Análise 1	0,119	0,118	0,120	0,106	0,030
Análise 2	0,112	0,111	0,117	0,107	0,032
Análise 3	0,111	0,106	0,110	0,110	0,035
Desvio padrão	0,0043	0,0060	0,0051	0,0020	0,0025
Média	0,114	0,113	0,115	0,107	0,032
Média real*	0,082	0,081	0,083	0,075	-

* Média real = média – média das análises – média do branco

Os teores de fenólicos totais dos extratos da torta de semente de *C. arabica* foram apurados utilizando-se a curva analítica de ácido gálico (padrão fenólico, Figura 5). Para se obter a absorbância média real - a qual foi utilizada para cálculo do teor de fenólicos a partir da equação da reta obtida por regressão linear da curva analítica

do ácido gálico (Figura 5) - utilizou-se a subtração da absorbância média obtida nas análises pela absorbância média do branco.

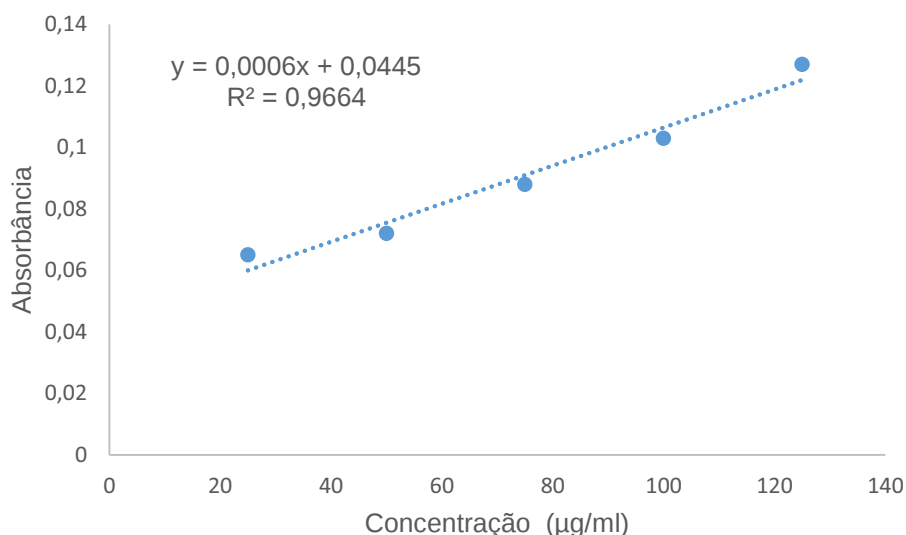


Figura 5. Curva analítica do ácido gálico

Os resultados de absorbância utilizados para cálculo da atividade sequestrante do radical DPPH estão dispostos na tabela 5, a seguir, calculados de acordo com o descrito anteriormente.

Tabela 5. Resultado das absorbâncias em 515 nm de cada extrato relativos ao ensaio da atividade antioxidante pelo radical DPPH.

Extrato	Análise 1	Análise 2	Média	Desvio padrão	Inibição (%)
Metanol 60%	0,691	0,690	0,690	0,0007	22,5
Metanol 80%	0,715	0,728	0,721	0,0091	18,8
Etanol 70%	0,696	0,681	0,688	0,0106	22,5
Etanol 80%	0,702	0,732	0,717	0,0212	18,7
Branco	0,889	0,887	0,888	0,0014	-

O extrato etanólico 70% e metanólico 60% apresentaram a mesma inibição do radical DPPH (22,5%). No entanto, o primeiro foi utilizado no teste em menor concentração, 6,2 µg/ml e 7,0 µg/ml, respectivamente, o que indica que apresenta maior atividade antioxidante relativa à quantidade de extrato utilizada. Além disso, o

extrato etanólico 70% apresenta maior teor de fenólicos totais do que o metanólico 60%, indicando que os compostos fenólicos contribuem para atividade antioxidante (FERREIRA et al., 2010). Baseando-se nos resultados obtidos em relação ao teor de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico e da inibição do radical DPPH pelos extratos produzidos por sonicação, o solvente etanol 70% (v/v) foi o escolhido para a finalidade proposta, já que comparativamente com os outros solventes utilizados ele teve os melhores resultados, além do etanol ser mais barato e menos tóxico do que o metanol. Esses aspectos são de grande importância para que o extrato possa ser utilizado na cosmetologia.

Desse modo, foi produzido novo extrato etanólico 70% (v/v) em maior escala, por maceração e foram realizadas novas análises, como curva de atividade antioxidante (CI_{50}) em relação ao padrão ácido ascórbico utilizando ensaio do radical DPPH, cromatografia em camada delgada (CCD).

4.4 Extração exaustiva utilizando etanol 70% (v/v)

As diferentes etapas para extração da torta de sementes de *C. arábica* L. por sonicação geraram extratos com diferentes rendimentos (m/m) e teor de compostos fenólicos (Tabela 6). No cálculo desses foi considerado o resultado obtido a partir da perda por dessecação (8,5%).

Para determinação do teor de fenólicos totais desses extratos foram utilizadas curvas analíticas do ácido gálico e ácido clorogênico, construídas a partir da média da leitura (em triplicata) de absorbância em diferentes concentrações (4,0 a 200,0 $\mu\text{g/mL}$) dessas substâncias, descontando-se o branco (Figuras 9 e 10, respectivamente). Os valores de concentração de fenólicos totais foi obtido a partir da regressão linear da curva análita obtida por esses dois padrões.

Tabela 6. Quantidade de extrato obtido por sonicação, teor de compostos fenólicos totais (FT) expressos em equivalentes de ácido gálico e de ácido clorogênico no extrato e torta secos.

Extrato	Rendimento (%, m/m) ^a	Teor de FT no extrato seco ^b		Teor de FT na torta seca ^c	
		Eq. ácido gálico	Eq. ácido clorogênico	Eq. ácido gálico	Eq. ácido clorogênico
123T	262 mg (27%)	148,2	210,1	42	60
4T	21 mg (2,1%)	45,9	63,4	11	14
5T	19 mg (1,9%)	25,2	33,4	5,1	7,2
6T	11 mg (1,1%)	11,3	13,5	1,1	2,1
Total	303 mg (30 0%)	230,6	320,4	59,2	83,3

^a (massa de extrato/massa de torta) x 100; ^b mg de fenólicos totais equivalentes a ácido gálico e ácido clorogênico / g de extrato seco; ^c mg de fenólicos totais equivalentes a ácido gálico e ácido clorogênico / g de torta seca.

As leituras das absorbâncias obtidas dos diferentes extratos (1 mg/mL), realizadas em triplicata, podem ser observadas na Tabela 7.

Tabela 7. Absorbância das amostras 123T, 4T, 5T e 6T em 760nm, utilizando-se o método de Folin-Ciocalteu.

Extrato	123T	4T	5T	6T	Branco
Análise 1	0,226	0,088	0,063	0,045	0, 030
Análise 2	0,224	0,092	0,064	0,046	0, 030
Análise 3	0,219	0,090	0,063	0,045	0, 031
Desvio padrão	0,002	0,0013	0,0004	0,0004	0,0004
Média	0,223	0,090	0,063	0,045	0, 030
Média real*	0,193	0,060	0,033	0,015	-

* Média real = média – média das análises – média do branco

Podemos ver que na sexta etapa de extração praticamente não foram obtidos compostos fenólicos em relação ao material vegetal utilizado indicando que esta etapa

poderia ser considerada limitante. Para se analisar a quantidade de compostos fenólicos em relação ao total que poderia ser extraído pelo solvente etanol 70% (v/v), foi calculado a relação entre os resultados obtidos nas extrações (123T; 4T; 5T; 6T) pela somatória desses valores (Tabela 8).

Tabela 8. Relação entre extração e porcentagem de FT obtido e porcentagem acumulada.

Extrato	Médias do teor de FT na torta seca*	Soma*	Porcentagem relativa (%)
123T	51	51	72,0
4T	12,5	63,5	90,0
5T	6,1	69,6	98,4
6T	1,6	71,2	100,0
Total	71,2	-	-

* mg de fenólicos totais equivalentes a ácido gálico e ácido clorogênico / g de torta seca.

Podemos observar que nas três primeiras extrações (123T) a quantidade de fenólicos totais extraídas em relação à quantidade máxima foi de 72,0%. Isso demonstra um bom rendimento, visto que foi utilizado proporção de 1:15 (m/v) de droga vegetal em relação ao solvente extrator, como nos experimentos para escolha do solvente extrator. Esse raciocínio foi utilizado para obtenção do extrato etanólico 70% (v/v) em maior escala.

4.5 Preparo do extrato etanólico 70% (v/v) de *C. arabica*

O solvente etanol 70% foi o escolhido visando o objetivo principal do trabalho, que é a produção de um fitocosmético.

Após secagem de toda solução extrativa, a massa resultante de extrato seco foi de 60,9 g (rendimento de 21%, p/p), considerando o valor obtido na perda por dessecação (8,5 %). Esse valor se aproxima do rendimento obtido quando foi usado o ultrassom (25%, m/m), a mesma relação droga vegetal solvente (1 g de droga

vegetal para 15 mL de etanol 70%) e o mesmo número de etapas (3). Essa proporção de droga vegetal/solvente foi utilizada, já que, de acordo com os resultados obtidos de extração exaustiva, a quantidade de etanol 70% já foi capaz de extrair 72,0% de compostos fenólicos em relação à quantidade máxima estimada que poderia ser extraída.

4.6 Análise do Eet70 da torta de sementes de *C. arabica* por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Essa análise é comumente empregada para separação e identificação de produtos naturais, no controle de qualidade de fitoterápicos e drogas vegetais, pois além de simples, rápido e econômico, é um método relativamente eficiente. A CCD se baseia na separação de uma mistura por diferença de interações dos seus componentes entre uma fina camada plana de fase estacionária (ex. sílica Gel) e a fase móvel. Com auxílio dos respectivos padrões, é possível a identificação rápida de diversas substâncias (JULIÃO et al., 2003; CÉSAR et al., 2007).

Os resultados obtidos aplicando-se CCD com Eet70 de *C. arabica* estão representados na figura 6, onde foi possível identificar a presença de cafeína e ácido clorogênico, o que é confirmado por ABRAHÃO et al. (2010). Em estudo realizado pela estudante de mestrado Ana Carolina Conceição Monteiro de Castro do Laboratório de Farmacognosia da FCF-UNESP, a análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE-UV) de Eet70 permitiu também identificar esses metabólitos secundários. O ácido cafeico não foi identificado, como esperado, já que tal substância é encontrada apenas no café torrado, como produto de degradação do ácido clorogênico (FERNANDES et al., 2003).



Legenda: Eet70 e padrão (placa A: cafeína; placa B: ácido clorogênico) aplicados nesta ordem da esquerda para a direita. Identificação do ácido clorogênico - fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água 72:5:5:8 (v/v). Revelação: NP-PEG. Identificação da cafeína - fase móvel: acetato de etila metanol: água 85:10:5 (v/v). Revelação: Dragendorff e H₂SO₄ 10%.

Figura 6: Cromatoplasmas do Eet70 de *C. arabica*. As substâncias identificados foram cafeína e ácido clorogênico, respectivamente.

4.7 Avaliação da atividade antioxidante do Eet70 através do ensaio pelo radical DPPH

Na figura 7 pode ser visualizado o gráfico da porcentagem de inibição do radical DPPH por ácido ascórbico, o qual é frequentemente utilizado como padrão.

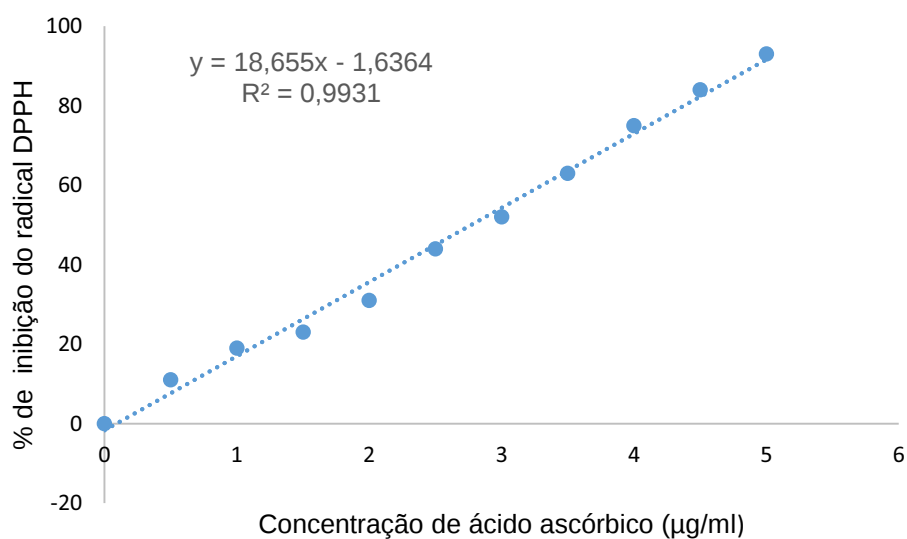


Figura 7. Percentagem de inibição de formação do radical DPPH *versus* concentração de ácido ascórbico.

Na curva obtida o valor do coeficiente de correlação (R) foi de 0,993, demonstrando sua linearidade. A concentração na qual há inibição de 50% do radical DPPH (CI_{50}) com o uso do ácido ascórbico foi de $2,76 \mu\text{g/mL}$ (CI_{50}).

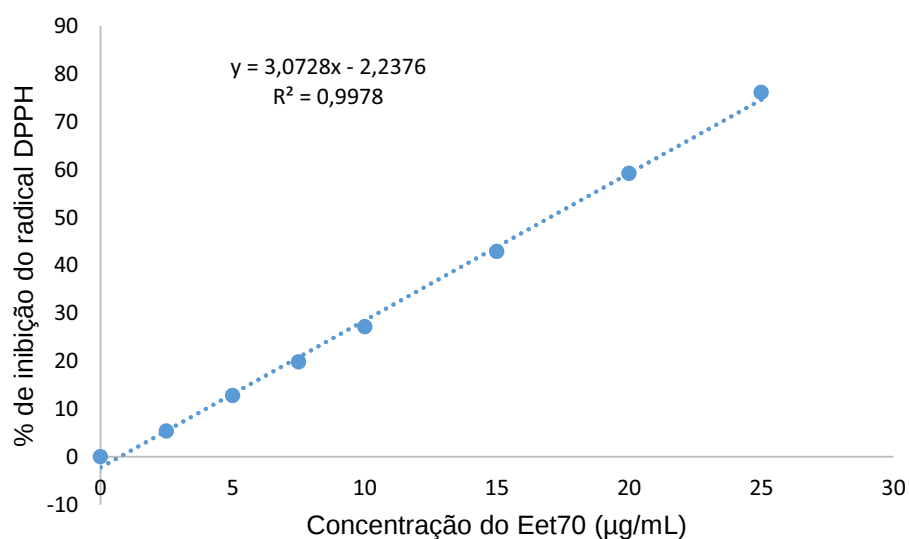


Figura 8. Atividade sequestrante do radical DPPH pelo extrato etanólico 70% da torta de *Coffea arabica* L.

Na curva obtida o valor do coeficiente de correlação (R) foi de 0,997. A concentração na qual há inibição de 50% do radical DPPH com o uso do Eet70 de *C. arabica* foi de 17,0 µg/mL (CI₅₀).

O ácido ascórbico, como esperado, apresentou atividade antioxidante maior do que o Eet70 de *C. arabica*, já que o primeiro é um antioxidante padrão, considerado potente, que é classificado como não-enzimático e que apresenta importante ação, diminuindo a concentração de radicais livres no organismo e quelando íons metálicos, o que previne a oxidação lipídica, por exemplo. Além disso, sua alta solubilidade em água permite que ele atue no interior das células. (FERREIRA et al., 2010).

Entretanto, o valor de CI₅₀ obtido com o Eet70 (17,0 µg/mL) indica que ele possui uma atividade antioxidante relativamente alta quando comparado com os valores encontrados em folhas de outras espécies vegetais, como a caneleiro (78,45 µg/mL), o cerne-amarelo (44,53 µg/mL) e o alecrim (80,84 µg/mL), o qual é usualmente utilizado como antioxidante em formulações alimentares e cosméticas (ROESLER et al., 2007; SOUSA et al., 2007).

4.8 Doseamento de compostos fenólicos totais do Eet70

Na determinação do teor de fenólicos totais do Eet70 foram utilizadas curvas analíticas de ácido gálico e ácido clorogênico, construídas a partir da média da leitura em triplicata da absorbância em diferentes concentrações (4,0 a 200,0 µg/mL) dessas substâncias, descontando-se o branco.

As equações das retas obtidas por regressão linear e suas respectivas curvas analíticas do ácido gálico, padrão fenólico geral, e do ácido clorogênico, principal composto fenólico presente no café, estão representados na Figura 9 e Figura 10, respectivamente (FERREIRA et al., 2010).

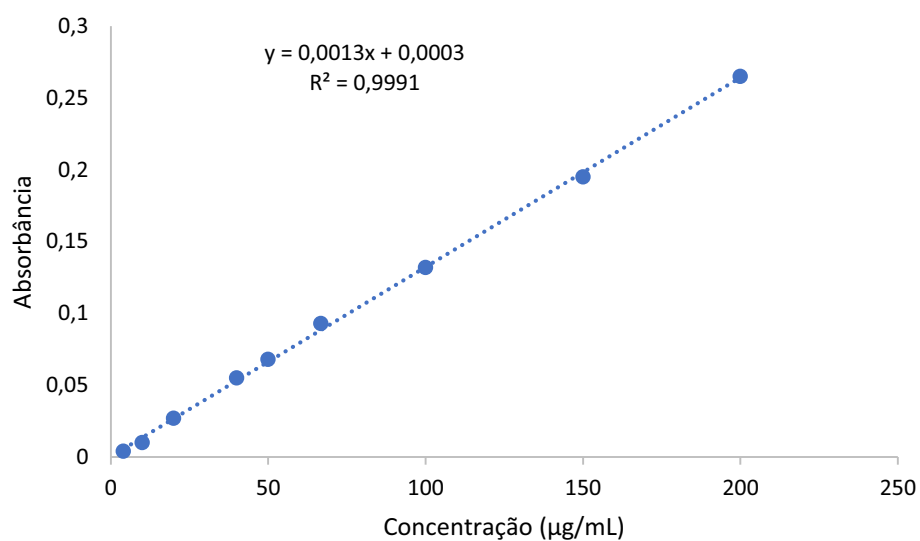


Figura 9. Curva analítica do ácido gálico.

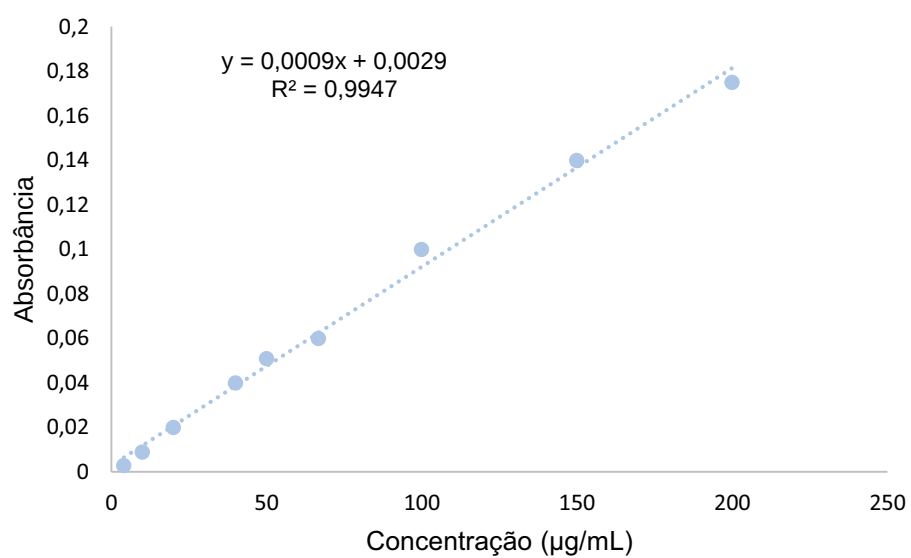


Figura 10. Curva analítica do ácido clorogênico.

As leituras das absorbâncias obtidas do Eet70 (1 mg/mL), realizadas em triplicata, podem ser observadas na tabela 9.

Tabela 9. Absorbância das amostras e branco em 760nm, utilizando-se o método de Folin-Ciocalteu.

Amostra	Análise 1	Análise 2	Análise 3	Média	Desvio padrão
Eet70	0,203	0,200	0,208	0,203	0,003
Branco	0,028	0,027	0,030	0,028	0,001

O valor de absorbância média real foi utilizada para cálculo do teor de fenólicos totais do Eet70 da torta de sementes de *C. arabica*. Ela foi obtida segundo:

$$0,203 - 0,028 = 0,175$$

$$(\text{absorbância média}) - (\text{absorbância branco}) = (\text{absorbância média real})$$

Os valores do teor de compostos fenólicos equivalentes em ácido gálico e ácido clorogênico, a partir do valor de absorbância média real (0,175) e a equação da reta das respectivas curvas, estão dispostos na tabela 10.

Tabela 10. Teor de compostos fenólicos totais (FT) expressos em mg equivalentes a ácido gálico e ácido clorogênico por g no extrato e torta secos.

Padrão utilizado	Teor de FT no extrato seco ^a	Teor de FT na torta seca ^b
Ácido gálico	134,4	30,1
Ácido clorogênico	191,2	42,2

^a mg de compostos fenólicos totais equivalentes a ácido gálico e ácido clorogênico / g de extrato seco;

^b mg de fenólicos totais equivalentes a ácido gálico e ácido clorogênico / g de torta seca;

O teor de compostos fenólicos totais nessas condições na torta seca foi de 3% em equivalente a ácido gálico, e 4,2% em equivalente a ácido clorogênico. A porcentagem menor do primeiro resultado em relação ao segundo já era esperado, visto que a capacidade de reação e consequentemente de absorbância de uma mesma quantidade em mol de ácido gálico é maior. Isso porque sua massa molecular é menor (170,12 g/mol) do que a do ácido clorogênico (354,31 g/mol). Então, em uma

mesma concentração, há maior quantidade de moléculas de ácido gálico, e por isso maior absorção, visto que os compostos possuem grupamentos cromóforos semelhantes. Desse modo, utilizando ácido gálico, a quantidade de FT equivalentes a ele no extrato é menor. Além disso, como o composto fenólico majoritário do café é o ácido clorogênico, este é mais indicado para ser utilizado como padrão de polifenóis no Eet70. (DE MARIA; MOREIRA, 2004).

Os valores encontrados mostram que a torta de semente de *C. arabica* apresenta considerável quantidade de compostos fenólicos, valores que se aproximam de plantas que possuem altos teores de fenólicos, como a erva-mate (cerca de 10%, m/m) e a uva Anceleta (9%, m/m), ambos em peso seco (ROCKENBACH et al., 2008; DONADUZZI et al., 2003).

4.9 Desenvolvimento de formulação para incorporação Eet70 e determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) “*in vitro*”

A formulação escolhida para adição do Eet70 de *C. arabica* foi a B. Ela apresentou boa viscosidade e sensorial leve, ideal de uma emulsão para o uso facial diário, além de FPS próximo do desejado (FPS 30). Foram determinados FPS “*in vitro*” com a formulação B com extrato adicionado na fase aquosa incorporado após a manipulação destas, afim de verificar se o aquecimento de 70°C na manipulação da formulação era capaz de degradar algumas das substâncias fotoprotetoras do extrato e diminuir o valor de FPS. Os valores de Fator de Proteção Solar de acordo com o *BASF Sunscreen Simulator* das formulações A, B e C; e de acordo com o teste “*in vitro*” usando o aparelho Optometrics SPF 290S das formulações A, B, C, base sem extrato, base com extrato, fórmula B com extrato adicionado na fase aquosa e fórmula B com extrato incorporado ao final estão dispostos na Tabela 11.

Tabela 11. Valores de FPS (Fator de Proteção Solar) de acordo com *BASF Sunscreen Simulator* e Optometrics SPF 290S.

Formulações	FPS BASF <i>Sunscreen Simulator</i>	FPS Optometrics SPF 290 ± D.P ^a
A	52,4	57,3 ± 5,32
B	28,5	30,3 ± 3,19
C	14,8	17,2 ± 6,31
Base sem Eet70	-	1,04 ± 0,01
Base com 0,3% Eet70 incorporado		45,4 ± 9,8
B com 0,3% Eet70 incorporado		1,50 ± 0,14
Base com 1% Eet70	-	1,57 ± 0,05
B com 1 % Eet70 fase aquosa	-	46,9 ± 7,56
B com 1% Eet70 incorporado		52,1 ± 6,7
B com 5% Eet70 incorporado	-	65,8 ± 4,3

^a média de doze medidas de cada amostra ± desvio padrão (D.P).

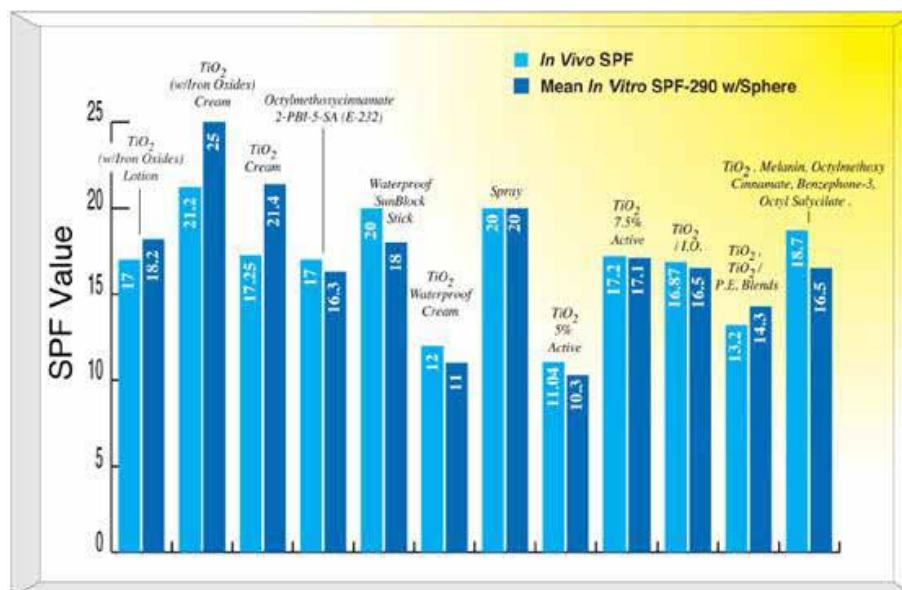
De acordo com o potencial antioxidante proveniente dos resultados obtidos a partir do ensaio utilizando-se o radical DPPH, as concentrações de extrato na formulação representavam valores muito maiores do que o CI_{50} . Considerando-se uma liberação e permeação de 100% do ativo na pele, com a concentração de 1% de extrato da formulação, teríamos 10 mg (10000 µg) de Eet70 por grama de formulação. Adotando-se 1 g de formulação como se fosse 1 mL, a concentração de extrato nesta seria de cerca de 640 vezes maior do que a contração necessária (CI_{50}) para inibição de 50% do radical DPPH (atividade antioxidante). Na concentração de 0,3% de Eet70

na formulação, teríamos uma concentração de cerca de 200 vezes maior do que a concentração de CI_{50} obtida no ensaio com o radical DPPH.

Com a concentração de 5% houve maior aumento do FPS, sugerindo que o mesmo cresceu com o aumento da quantidade de Eet70 na formulação, sendo necessários maiores estudos entre a interação e sinergismo entre os filtros solares químicos e o Eet70.

Apesar de ocorrer variação relativamente grande nas medidas obtidas do Optometrics *SPF 290* pelo fato de não se conseguir uma uniformidade do filme da formulação utilizada na membrana onde foram mensurados os valores de FPS, este teste possui correlação alta (em média 90%) em relação aos testes “*in vivo*” quando utilizado vários fotoprotetores químicos e formas farmacêuticas (Figura 11). Além disso, esse método é mais fidedigno do que o teste proposto por Mansur et al. 1986, uma vez que o primeiro utiliza maiores números de amostras que representam a formulação, e adotado como principal método para determinação do FPS pelas autoridades sanitárias da Coreia do Sul (Korea Food & Drug Administration).

A ANVISA institui que para determinação do FPS e liberação para utilização, deve ser aplicada uma metodologia “*in vivo*”. No entanto, como o objetivo desse trabalho é apenas verificar a influência do Eet70 no valor de FPS quando sozinho ou em conjunto com outros filtros solares químicos, foram utilizados apenas teste “*in vitro*” pelo OPTOMETRICS SPF-290 S (BRASIL, 2010).



Fonte: OPTOMETRICS, 2014

Figura 11. Correlação entre “*in vivo*” FPS e FPS analisado no Optometrics SPF-290S.

5. CONCLUSÃO

Considerando-se os resultados do teor de compostos fenólicos totais e da avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio com DPPH, além do custo, aspectos ambientais e de toxicidade, baseado na finalidade proposta, o extrato etanólico 70% foi o escolhido dentre os avaliados.

Os valores encontrados apontam que a torta apresenta pelo menos metade do teor de fenólicos totais presente no grão de *C. arabica* virgem e seco, que seria de aproximadamente 7% (NASCIMENTO, 2006). Além disso, esse teor encontrado na torta (3%, m/m em equivalente a ácido gálico) não é muito distante do valor encontrado em plantas que possuem alto teor de fenólicos como na erva-mate, *Ilex paraguariensis*, e uva Ancelota, *Vitis vinifera* (10% e 9%, m/m) (DONADUZZI et al., 2003; ROCKENBACH et al., 2008). A atividade antioxidante da torta de café no ensaio com DPPH também é significativa, já que o valor de CI₅₀ encontrado foi apenas cerca de 6 vezes maior do que o determinado para o ácido ascórbico. Esses resultados são animadores analisando que partimos de um resíduo agroindustrial

descartado em grande massa e que tem grande quantidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

O Eet70, além disso, mesmo em pequenas concentrações (0,3 e 1%) foi capaz de aumentar consideravelmente o FPS da formulação B, de 30,3 ($\pm 3,19$) para 45,4 ($\pm 9,8$) e 46,9 ($\pm 7,56$), respectivamente. Ainda, na concentração de 5% houve maior aumento do FPS (65,8 $\pm$ 4,3), sendo necessários maiores estudos, como teste “*in vivo*”, para confirmação do FPS e da relação entre Eet70 e filtros solares químicos.

Essas propriedades, aliada ao fato de que a torta de café é um resíduo, eleva mais ainda o potencial uso do Eet70 em produtos cosméticos, principalmente os com função antioxidante e fotoprotetora, além de outras aplicações.

6. REFERÊNCIAS

ABIC – Associação Brasileira da Indústria de Café, 2013. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=38>>. Acessado em: 12/setembro/2014.

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.

BACCARIN, T., CEPULA, A. I., FERREIRA, R. A., SILVA, R. M. L. Análise morfoanatômica das partes aéreas de *Wedelia paludosa* DC. (*Acmela brasiliensis*, *Sphagneticola trilobata*), Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2b, p. 612-616, 2009.

BASF - The Chemical Company - Sunscreen Simulator, 2014. Disponível em: <
https://www.sunscreensimulator.basf.com/Sunscreen_Simulator/Login_show.action;jsessionid=A971F04590AA0DA6AEE4B467AA18C3A3> Acessado em:
18/setembro/2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 237, de 22 de agosto de 2002. Brasília: Anvisa, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Farmacopeia Brasileira. 5ª ed. Volume 1. Brasília: Anvisa, 2010.

CAMPOS, J. S.; FRASSON, A. P. Z. Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de *Lafoensia pacari* A. ST-HIL. em emulsão não-iônica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 3, p. 363-368, 2011.

CÉSAR, I. C. C., BRAGA, F. C., SOARES, C. D. V., NUNAN, E. A., BARBOSA, T. A. S., CAMPOS, L. M. M. Determinação de daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 616-625, 2007.

CHUN, S.S., VATTEM, D. A., LIN, Y. T., SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 809-816, 2005.

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.

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

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.

DONADUZZI, C. M.; CARDOZO JR., E. L.; DONADUZZI, E. M.; SILVA, M. M.; STURION, J. A.; CORREA, G. Variação nos teores de polifenóis totais e taninos em dezesseis progênies de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) cultivadas em três municípios do Paraná, 2003. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/PDF/erva_mate_compostos.pdf> Acessado em: 18/setembro/2014.

European Comission - Health and Consumers, 2014. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/index.cfm?fuseaction=search.simple>> Acessado em: 18/setembro/2014.

FERNANDES, S. M.; PEREIRA, R. G. F. A.; PINTO, N. A. V. D.; NERY, M. C.; DE PÁDUA, F. R. M. Constituintes químicos e teor de extrato aquoso de cafés arábica (*Coffea arabica* L.) E conilon (*Coffea canephora* P.) torrados. **Ciências agrotecnologia**, v. 27, n. 5, p. 1076-1081, 2003.

FREITAS, L. S. Desenvolvimento de procedimento de extração do óleo de semente de uva e caracterização química dos compostos extraídos. 2007. 227f. **Tese de Doutorado em Química** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto , 2007.

FERREIRA, R. M. A., FERNANDES, P. L. O., FONTES, L. O., RODRIGUES, A. P. M. S., SILVA, L. T. Antioxidantes e sua importância na alimentação . **Revista Verde**, v. 5, n. 5, p. 26-30, 2010.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; GAVA J. R. F. Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações. São Paulo, **Nobel**, 2008.

GETTENS, L.; FRASSON, A. P. Z. Estudo comparativo da atividade antioxidante de creme aniônico e não-iônico contendo extrato seco e extrato glicólico de ginkgo biloba. **Revista Contexto e Saúde**, v. 6, n. 12, p. 41-47, 2007.

HASLAM, E. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 205-215, 1996.

JULIÃO, L.S., TAVARES, E.S., LAGE, C.L.S., LEITÃO, S.G. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. (erva-cidreira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 36-38, 2003.

Korea Food & Drug Administration Qualify the SPF-290S as an Alternative Method to in-vivo Testing. Disponível em: <<http://www.optometrics.com/spf-analyzer>> Acessado em: 27/setembro/2014.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1283-1287, 2006.

MAGALHÃES, J. Cosmetologia. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2000.

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.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS A.S.; DOS SANTOS, T.C.; 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.

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.

NACZK, M.; SHAHIDI, F.; Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v.1054, p.95–111, 2004.

OPTOMETRICS – SPF Analyzer, 2014. Disponível em: <http://www.optometrics.com/spf-analyzer> Acessado em: 27/setembro/2014.

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.

PULLA REDDY, A.C., LOKESH, B.R. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.111, n.1/2, p.117-124, 1992.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

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**, v28, p 238-244, dez 2008.

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^a ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, p. 833, 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.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOUSA, C. M. DE M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; DA 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.

SUN, J; CHU, Y. F.; Wu, X.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.7449–7454, 2002.

TURATTI, J.M. Extração e caracterização de óleo de café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2, 2001, Vitória, **Simpósio**, p. 1533-1539.

VEGRO, C. L. R.; CARVALHO, F. C. Disponibilidade e utilização de resíduos no processamento agro-industrial do café. **Informações Econômicas**, v.24, n.1, p.9-16, 1994.

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

WATERHOUSE, A. L. Folin-Ciocalteu micromethod for total phenol in wine, 1999. Disponível em: <<http://waterhouse.ucdavis.edu/faqs/foolin-ciocalteau-micro-method-for-total-phenol-in-wine>>. Acessado em: 12/setembro/2014.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.1801-1812, 1999.

7. DADOS FINAIS

Araraquara, 05 de janeiro de 2015.

De acordo,

Fernando Bombarda Oda

(Orientador)

Marcos Antonio Corrêa