

FORMULAÇÃO TÓPICA COM GRÃOS VERDES DE CAFÉ PARA CICATRIZAÇÃO

Palavras-Chave: Café, Subproduto, Formulação

Giovanna Rossi Dotoli, FCF - UNICAMP

Me. Érica Mendes dos Santos, FCF – UNICAMP

Dr^a. Gisele Anne Camargo, ITAL – INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Prof. Dr^a. Priscila Gava Mazzola, FCF - UNICAMP

1. INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas depende de diversos componentes celulares e moleculares, deficiências nesse processo podem levar a cicatrizações ineficientes, sendo o estresse oxidativo uma causa significativa em feridas crônicas (Lawrence, 1994; Dissemond *et al.*, 2002). O desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes resulta na geração de radicais livres, causando danos teciduais (Colson & Grinstaff, 2012; Halliwell *et al.*, 2004).

Os compostos bioativos presentes nos grãos verdes de café neutralizam radicais livres e possuem atividades antimicrobiana e antienvhecimento (Affonso *et al.*, 2016; Castro *et al.*, 2018), especialmente os ácidos clorogênicos, devido às suas propriedades redutoras e estrutura química (Farah & Donangelo, 2006; Souza *et al.*, 2007). O café, do gênero *Coffea*, é um destaque no agronegócio brasileiro, com o Brasil liderando a produção global (Durán *et al.*, 2016). No entanto, o processamento pós-colheita gera resíduos significativos, como a polpa, casca, mucilagem e grãos defeituosos, que representam mais de 50% do fruto (Alves *et al.*, 2017).

Assim, este projeto visa utilizar extratos de grãos verdes de *Coffea Arabica* para melhorar a cicatrização de feridas. A partir da liofilização do extrato e incorporação numa formulação tópica, pretende-se contribuir para a qualidade de vida dos pacientes e minimizando os impactos ambientais associados à produção de café.

2. METODOLOGIA

2.1. Extração

Amostras de café verde Arábica (*Coffea Arabica*) foram obtidas com o Instituto de Tecnologia em Alimentos (ITAL), moídas e armazenadas a -36 °C. A extração foi realizada segundo Navarra *et al.* (2017), e posteriormente foram divididos em três grupos: extrato puro, extrato com 5 % (p/p) de goma arábica e extrato com 5 % (p/p) de maltodextrina. Em seguida, os três grupos foram liofilizados em um liofilizador (Lyostar 3, SP Scientific). As amostras foram congeladas a -40 °C por 4 horas e depois secas a vácuo a 100 mTorr. Durante as etapas de secagem, os extratos foram de -40 °C a 20 °C, totalizando um período de 137 horas. A temperatura de colapso de café é de - 20 °C (Bellows e King, 1972). Os extratos liofilizados foram dissolvidos em água ultrapura para avaliar atividade antioxidante, flavonoides, fenólicos e taninos totais.

2.2. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos.

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelos métodos de Eliminação do Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e Redução do Ferro (FRAP) (Brand-Williams *et al.*, 1995; Pires *et al.*, 2017).

O teste de DPPH foi feito segundo Pires *et al.* (2017), e os resultados foram expressos em porcentagem de atividade antioxidante (%AA) (Equação 1) e em EC₅₀.

$$\text{Equação 1. \% AA} = \frac{(\text{Abs Controle DPPH} - \text{Abs amostra}) \times 100}{\text{Abs Controle DPPH}}$$

O ensaio de FRAP foi realizado segundo Urrea-Victoria *et al.* (2016). Foi construída uma curva padrão de ácido gálico (0 a 6 µg/mL), e os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG/g) e EC₅₀.

2.3. Fenólicos totais

Para determinar o teor de compostos fenólicos foi utilizado o método Folin-Cicalteu, segundo Pires *et al.* (2017). Construiu-se uma curva padrão de ácido gálico (0 - 10 µg.mL⁻¹). O teor de substâncias fenólicas foi expresso em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG/ g de amostra).

2.4. Taninos

Para determinar o teor de taninos totais, utilizou-se o reagente Folin-Ciocalteu segundo Shad *et al.* (2012). O teor de taninos foi calculado em miligramas equivalentes de ácido tânico por grama de amostra (mg EAT/g) usando a curva de calibração de ácido tânico (10-50 mg/mL).

2.5. Flavonoides

O teor de flavonoides foi realizado segundo Alves (2013) e os resultados foram calculados em miligramas equivalentes de quercetina por grama de amostra (mg EQ/g) usando a curva de calibração de quercetina (5-80 µg/mL).

2.6. Desenvolvimento da formulação

Duas formulações foram desenvolvidas, sendo uma branca (sem extrato) e uma formulação contendo o extrato de grãos verdes de café. Os géis foram elaborados com excipientes naturais aprovados pelo Instituto Biodinâmico de Desenvolvimento Rural (IBD), visando o mínimo impacto ambiental. Foram utilizados 4 % (p/p) de alginato de sódio, 0,6 % (p/p) de ácido benzoico, 4 % (p/p) de glicerina, 0,1 % (p/p) de ácido cítrico e água (q.s.p 100 mL), e para o fitocosmético, utilizou-se 5 % (p/p) do extrato de grãos verdes de café.

2.7. Análise de estabilidade

A estabilidade das formulações foi avaliada conforme o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (2004). Para a estabilidade preliminar, características macroscópicas como cor, odor, aparência, separação de fases e pH foram analisadas por 15 dias consecutivos. A estabilidade acelerada foi realizada segundo Cefali *et al.* (2019). Os testes foram realizados em triplicata. Para que a formulação seja considerada estável, as variações nos resultados não devem ultrapassar 10% (ANVISA, 2004).

2.8. Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A análise estatística foi feita utilizando o ANOVA de uma via (p <0.05) e as amostras foram comparadas pelo teste de Tukey, através do software Graph Pad Prism (versão 5.0). Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão e valores da concentração inibitória de 50% (EC₅₀) foram calculados utilizando o Prisma.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise da atividade antioxidante

A atividade antioxidante de compostos pode ser verificada pelo método DPPH, que observa a redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil a 515 nm (Brand-Williams *et al.*, 1995). Todas as amostras exibiram boa atividade antioxidante pelo teste de DPPH em concentração de 4 mg/mL, variando entre 91,47 ± 3,18 a 95,35 ± 0,56 (R² = 0,9938), sem diferença significativa entre elas pelo teste de Tukey (p <0,05) (Figura 1).

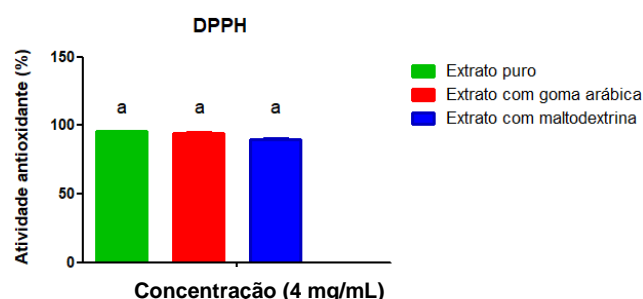


Figura 1: Atividade antioxidante no ensaio de DPPH dos extratos puro, com goma arábica e com maltodextrina. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão, n=3. Letras iguais significam que não há diferença

O EC₅₀ corresponde à concentração do antioxidante que induz 50 % de inibição do radical DPPH (Chen *et al.*, 2013). Quanto menor o valor, melhor a atividade antioxidante. O extrato puro teve o menor EC₅₀, de 4,07 mg/mL, indicando melhor atividade antioxidante.

No ensaio de poder de redução do ferro (FRAP), maior absorvância indica maior atividade antioxidante, expressa em mg EAG/g amostra e em EC₅₀. Houve diferença significativa entre o extrato puro e os extratos com carreadores ($p < 0,05$), mas não entre os extratos com carreadores (Figura 2).

A amostra com melhor atividade antioxidante foi o extrato puro, com EC₅₀ de 0,61 mg/mL e $98,596 \pm 0,395$ mg EAG/g amostra. Esses valores são comparáveis aos de Affonso *et al.* (2016), que verificaram atividade antioxidante de 96,21 % para grãos verdes de café (*Coffea arabica*).

Tabela 1. Resultados dos testes de atividade antioxidante pelos métodos de DPPH e FRAP.

Amostras	DPPH – 4 mg/mL		FRAP – 0,8 mg/mL	
	AA (%)	EC ₅₀ (mg/mL)	mg EAG/g	EC ₅₀ (mg/mL)
Extrato puro	$95,355 \pm 0,56^a$	4,07	$98,596 \pm 0,395^a$	0,61
Extrato com goma arábica	$95,166 \pm 0,16^a$	4,10	$71,755 \pm 1,349^b$	0,74
Extrato com maltodextrina	$91,469 \pm 3,18^b$	5,08	$74,262 \pm 1,034^b$	0,60

Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3) e o valor de EC₅₀. As letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras de acordo com ANOVA de uma via ($p < 0,05$) e Teste de Tukey.

3.2. Fenólicos totais

Os compostos fenólicos compõem uma das principais classes de metabólitos secundários das plantas. A característica comum desses compostos é um anel aromático com uma ou mais hidroxilas (Robards *et al.*, 1999). O mecanismo de ação deve-se a sua estrutura química, sequestrando radicais livres e atuando como antioxidante (Pires *et al.*, 2017).

Os resultados para os fenólicos totais estão representados na Tabela 2. Obteve-se $R^2 = 0,9919$ para a curva padrão. A maior quantidade foi observada na amostra de extrato puro, com $98,74 \pm 2,13$ mg EAG/g, com diferença significativa de todas as outras amostras pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Entretanto, as amostras com goma arábica e maltodextrina não tiveram diferença significativa (Figura 3).

Estes valores estão em consonância com os resultados obtidos por estudos anteriores que apresentaram 104,3 mg EAG/g para o café cru (Abdeltaif *et al.*, 2018).

3.3. Taninos totais

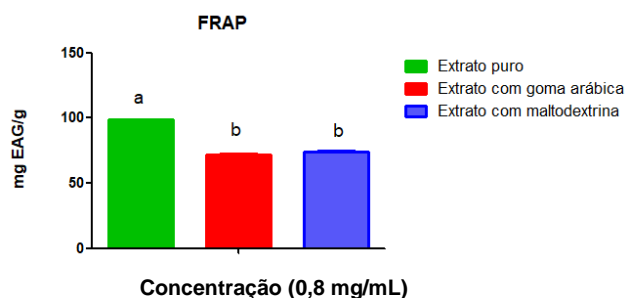


Figura 2: Atividade antioxidante no ensaio de FRAP dos extratos puro, com goma arábica e com maltodextrina. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão, n=3. Letras iguais significam que não há diferença significativa entre as amostras. Os resultados são representados em miligramas equivalente de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG/g).

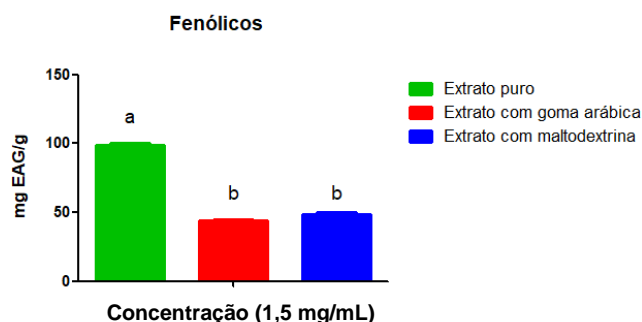


Figura 3 - Ensaio de Fenólicos dos extratos puro, com goma arábica e com maltodextrina. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão, n=3. Letras iguais significam que não há diferença significativa entre as amostras. Os resultados são representados em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG/g).

Para o teste de taninos totais, o valor máximo obtido foi de $0,3462 \pm 0,07$ mg EAT/g, referente à amostra com extrato puro. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 2. Obteve-se $R^2 = 0,9946$ para a curva padrão.

As amostras demonstraram diferença significativa entre si ($p < 0,05$) (Figura 4). Os valores de taninos obtidos por Lima *et al.* (2012) através de diferentes métodos e a variação foi de $41,48 \pm 0,05$ a $64,35 \pm 0,03$ mg/L.

3.4. Flavonoides

Os flavonoides são o grupo de fenóis mais encontrados em plantas com alta eficácia antioxidante. Seu mecanismo de ação é pela inibição da oxidação lipídica iniciada por metal e formação com íons complexos (Abdeltaif *et al.*, 2018). Os teores encontrados estão representados na Tabela 2. Obteve-se $R^2 = 0,9915$ para a curva padrão. A amostra que apresentou o teor mais elevado foi o extrato puro, com $25,19 \pm 3,49$ mg EQ/ g amostra, apresentando diferença significativa das demais amostras ($p < 0,05$), enquanto as amostras com goma arábica e maltodextrina não apresentaram diferença significativa entre si. Os resultados obtidos com o extrato puro foram maiores aos publicados por Kreicbergs *et al.* (2018) com o grão do café, que obteve aproximadamente de 18 a 105 mg EQ/100g, fato este que ressalta mais uma vez a importância de se aproveitar esses subprodutos que são descartados.

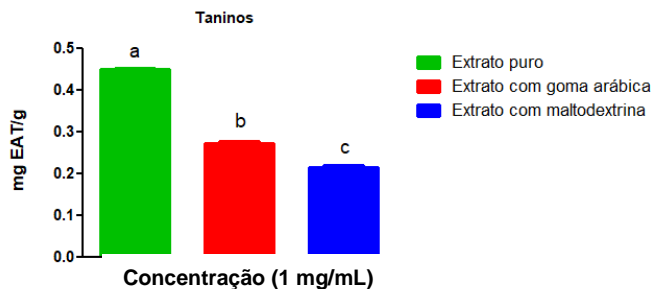


Figura 4 – Ensaio de Taninos dos extratos puro, com goma arábica e com maltodextrina. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão, n = 3. Letras iguais significam que não há diferença significativa entre as amostras. Os resultados são representados em miligramas equivalentes de ácido tânico por grama de amostra (mg EAT/g).

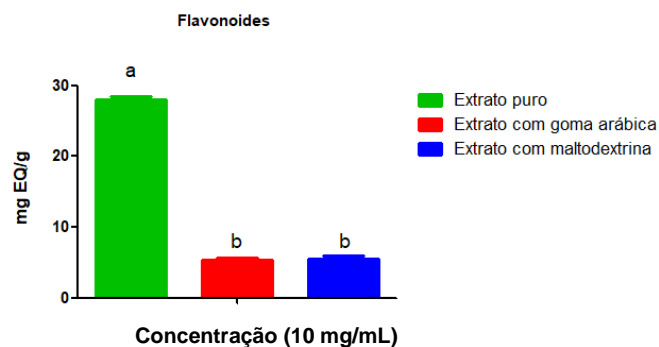


Figura 5 – Ensaio de Flavonoides dos extratos puro, com goma arábica e com maltodextrina. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão, n = 3. Letras iguais significam que não há diferença significativa entre as amostras. Os resultados são representados em miligramas equivalentes de quercetina por grama de amostra (mg EQ/g).

Tabela 2. Resultados dos testes de Fenólicos totais, Taninos e Flavonoides

Amostras	Fenólicos – 1,5	Taninos totais – 1	Flavonoides – 10
	mg/mL EAG/ g	mg/mL EAT/ g	mg/mL EAQ/ g
Extrato puro	$98,74 \pm 2,13^a$	$0,34 \pm 0,007^a$	$27,19 \pm 3,49^a$
Extrato com goma arábica	$44,07 \pm 0,65^b$	$0,19 \pm 0,006^b$	$5,87 \pm 2,01^b$
Extrato com maltodextrina	$48,47 \pm 2,14^b$	$0,14 \pm 0,007^c$	$5,99 \pm 3,89^b$

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3). As letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras de acordo com ANOVA de uma via ($p < 0,05$) e Teste de Tukey.

3.5. Desenvolvimento da formulação e análise de estabilidade

O extrato puro foi escolhido devido aos melhores resultados. O gel branco tinha leve coloração amarelada e odor característico, enquanto o gel com extrato de café apresentou tonalidade marrom leve. Ambos os géis mantiveram pH (5,65 e 5,68), densidade (1,03 g/mL e 1,04 g/mL) e viscosidade (45990 cP e 42590 cP) estáveis (ANVISA, 2004). Após centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos, não houve separação de fases. As formulações brancas mantiveram cor e odor por 90 dias, mas precipitados surgiram após 10 dias à temperatura ambiente, com e sem exposição à luz. O pH, viscosidade e densidade permaneceram estáveis com variações menores que 10%.

Os géis com extrato escureceram na câmara climática (45 ± 2 °C) após 14 dias, tornando-se líquidos e com odor mais forte devido a reações de decomposição (Schueller, 2005). À temperatura ambiente, escureceram, exceto os na geladeira. O pH e densidade foram estáveis por 90 dias, com variações menores que 10%, mas a viscosidade variou mais de 10%, indicando que o extrato de café afeta significativamente a viscosidade (ANVISA, 2004).

4. CONCLUSÕES

Os grãos de café verde apresentaram resultados satisfatórios de atividade antioxidante, compostos fenólicos, taninos e flavonoides. Entretanto, a utilização de carreadores na liofilização não demonstrou melhoria significativa na atividade antioxidante e não foi observada proteção dos bioativos do café, os quais tiveram melhores resultados com o uso do extrato puro. A formulação com o extrato obteve boa estabilidade, com exceção da viscosidade, apresentando potencial de utilização para processos cicatrizantes.

BIBLIOGRAFIA

- ABDELTAIF, S., A. HASSAN AND K. ELKHATIM (2018). "Estimation of Phenolic and Flavonoid Compounds and Antioxidant Activity of Spent Coffee and Black Tea (Processing) Waste for Potential Recovery and Reuse in Sudan." 3: 27.
- AFFONSO, R. C., A. P. VOYTENA, S. FANAN, H. PITZ, D. S. COELHO, A. L. HORSTMANN, A. PEREIRA, V. G. Uarrota, M. C. Hillmann, L. A. Varela, R. M. Ribeiro-do-Valle and M. Maraschin." **Phytochemical Composition, Antioxidant Activity, and the Effect of the Aqueous Extract of Coffee (*Coffea Arabica* L.) Bean Residual Press Cake on the Skin Wound Healing**". (2016).
- ALVES, R.C, RODRIGUES, F., NUNES, M.A., VINHA, A.F., OLIVEIRA, M.B.P.P. 2017. "State of the art in coffee processing by-products. In: **Handbook of Coffee Processing By-products: Sustainable**"
- ANVISA (2004). "Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos." 1: 52.
- BRAND-WILLIAMS, W., M. E. CUVELIER and C. BERSET (1995). "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." *LWT – Food Science and Technology* 28(1): 25 – 30
- BELLOWS, R. J. AND C. J. KING (1972). "Freeze-drying of aqueous solutions: Maximum allowable operating temperature." *Cryobiology* 9(6): 559-561.
- CASTRO, A., F. B. ODA, M. G. J. ALMEIDA-CINCOTTO, M. G. DAVANCO, B. G. CHIARI-ANDREO, R. M. B. CICALI, R. G. PECCININI, G. J. ZOCCOLO, P. R. V. RIBEIRO, M. A. CORREA, V. L. B. ISAAC AND A. G. SANTOS (2018). "Green coffee seed residue: A sustainable source of antioxidant compounds." *Food Chem* 246: 48-57.
- CEFALI, L. C., J. A. ATAIDE, A. R. FERNANDES, I. M. O. SOUSA, F. GONCALVES, S. EBERLIN, J. L. DAVILA, A. F. JOZALA, M. V. CHAUD, E. SANCHEZ-LOPEZ, J. MARTO, M. A. D'AVILA, H. M. RIBEIRO, M. A. FOGLIO, E. B. SOUTO and P. G. MAZZOLA (2019). "Flavonoid-Enriched Plant-Extract-Loaded Emulsion: A Novel Phytocosmetic Sunscreen Formulation with Antioxidant Properties." *Antioxidants* (Basel).
- CHEN, Z., R. BERTIN AND G. FROLDI (2013). "EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs." *Food Chemistry* 138(1): 414-420.
- COLSON, YL; GRINSTAFF, M.W., **Biologically Responsive Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery**, *Adv. Mater.* 24 (2012) 3878–3886
- DISSEMOND, J; GOOS, M; WAGNER, S.N. **Die bedeutung von oxidativem stress in der genese und therapie chronischer wunden**, *Hautarzt.* 53 (2002) 718–723.
- DURÁN, C. A. A.; TSUKUI, A.; SANTOS, F. K. F; MARTINEZ, S. T.; BIZZO, H. R.; REZENDE, C. M. (2016) . "Café: Aspectos Gerais e seu Aproveitamento para além da Bebida". *Revista Virtual Química*, 2017, 9 (1), no prelo. Instituto Biodinâmico de Desenvolvimento Rural (IBD) (2020). 7ª edição. Botucatu, São Paulo, 2020.
- FARAH, A.; DONAGELO, C.M. **Phenolic compounds in coffee**. *Brazilian Journal Plant of Physiololy*, Londrina, v.18, n.1, p.23-26, June/Mar. 2006.
- HALLIWELL B, WHITEMAN M. **Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?** *Br J Pharmacol.* 2004; 142(2): 231- 55.
- KREICBERGS, V., DIMINS, F., MIKELSONE, V. & CINKMANIS, I. **Biologically Active Compounds in Roasted Coffee** (2018).
- LAWRENCE WT, DIEGELMANN RF. **Growth factors in wound healing**. *Clin Dermatol* 1994; 12(1):157- 69.
- NAVARRA, G., M. MOSCHETTI, V. GUARRASI, M. R. MANGIONE, V. MILITELLO AND M. LEONE (2017). "Simultaneous Determination of Caffeine and Chlorogenic Acids in Green Coffee by UV/Vis Spectroscopy." *Journal of Chemistry* 2017: 8.
- PIRES, J., P. B. TORRES, D. Y. A. C. D. SANTOS AND F. CHOW (2017). "Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas." Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo: 6
- ROBARDS, K., P. D. PRENZLER, G. TUCKER, P. SWATSITANG, W. GLOVER (1999). "Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits" *Food Chemistry* 66(4): 401-436.
- SCHUELLER, R. R., P. (2005). "A essência das composições aromáticas." *Cosmetics & Toiletries* 17(6): 50-55.
- SHAD, M. A., H. NAWAZ, T. REHMAN, H. B. AHMAD AND M. HUSSAIN (2012). "Optimization of extraction efficiency of tannins from *Cichorium intybus* L.: Application of response surface methodology." *Journal of Medicinal Plants Research* 6(28).
- SOUZA C.M.M.; SILVA, H.R; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; AYRES, C.L.S.C.; ARAUJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAUJO, P.B.M.; BRANDAO, M.S.; CHAVES, M.H. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais**. *Química Nova*, São Paulo, v.30, n.2, p.351-355, jul. 2007.
- SUNG, S. H., K. H. KIM, B. T. JEON, S. H. CHEONG, J. H. PARK, D. H. KIM, H. J. KWEON AND S. SYSTEMS, S. M. (2020). "The thexture analysis applications directory: materials & products."
- URREA-VICTORIA, V., J. PIRES, P. B. TORRES, D. Y. ALVES, C. D. SANTOS AND F. CHOW (2016). "Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas." Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.