

Regina Celis Lopes Affonso

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO E  
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE EXTRATOS DE GRÃOS  
DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.), APÓS REMOÇÃO DA  
FRAÇÃO ÓLEO, NO REPARO DE LESÕES CUTÂNEAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do Grau de Doutor em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Maraschin

Coorientador: Prof. Dr. Giordano Calloni

Florianópolis  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca  
Universitária da UFSC.

AFFONSO, REGINA CELIS LOPES  
CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO  
POTENCIAL DE EXTRATOS DE GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea  
arabica* L.), APÓS REMOÇÃO DA FRAÇÃO ÓLEO, NO REPARO  
DE LESÕES CUTÂNEAS / REGINA CELIS LOPES AFFONSO ;  
orientador, Marcelo Maraschin, coorientador,  
Giordano Calloni, 2017.  
171 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2.  
Café. 3. Reparo da pele. 4. Biotecnologia. 5.  
Saúde. I. Maraschin, Marcelo. II. Calloni,  
Giordano. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

**“Caracterização do perfil químico e avaliação do potencial de extratos de grãos de café (*Coffea arabica* L.), após remoção da fração óleo, no reparo de lesões cutâneas”**

Por

**Regina Celis Lopes Affonso**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (05/PPGBCD/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.

---

Prof(a). Dr(a). Geison de Souza Izídio  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento

Banca examinadora:

---

Dr(a) Marcelo Maraschin (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)

---

Dr(a) Zenilda Laurita Bouzon (Universidade Federal de Santa Catarina)

---

Dr(a) Evelise Maria Nazari (Universidade Federal de Santa Catarina)

---

Dr(a) Mabel Mariela Rodriguez Cordeiro (Universidade Federal de Santa Catarina)

---

Dr(a) Otniel Freitas Silva (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Rio de Janeiro)

---

Dr(a) Fernanda Ramlov (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 26 de maio de 2017.



Dedico este trabalho à minha família e à  
minha equipe de trabalho.



## AGRADECIMENTOS

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Marcelo Maraschin, pelo projeto, aprendizado e paciência.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Giordano Calloni, pela atenção e coorientação.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosa Maria Ribeiro-do-Valle, pela parceria nos projetos inovadores junto ao LMBV.

À Prof<sup>a</sup>. Yara Rauh Muller e ao Prof<sup>o</sup>. Geison Izídio, coordenadores do programa de pós-graduação, pelas orientações necessárias.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, que tiveram o cuidado em preparar aulas interessantes e em tratar os alunos com respeito, motivando-os sempre.

Às equipes de todos os laboratórios, que colaboraram para o avanço deste projeto de pesquisa, acompanhando-me nas etapas experimentais.

À cooperativa de cafeicultores Cooxupé, pela cooperação técnico-científica e apoio financeiro ao projeto.

À FAPESC, pela bolsa de estudos e apoio ao projeto de pesquisa e inovação empreendedora.

Aos meus pais lindos, Jorge e Conceição, que sempre acreditaram em mim e estiveram ao meu lado.

À minha linda irmã Regiane Affonso, pelo apoio e incentivo constante.

Ao José Carlos Miranda Cardoso, companheiro em muitos momentos.

À Maria Claudia Miranda Cardoso, pelo incentivo, livros e conversas.

Aos estagiários e amigos, que colaboraram para a realização deste trabalho.





O mais importante não é saber. É nunca perder a  
capacidade de aprender.  
(Leonardo Boff)



## RESUMO

O café é uma das *commodities* mais importantes no comércio internacional e uma das bebidas mais apreciadas mundialmente. A grande produção de café arábica (*Coffea arabica* L.) no Brasil tem gerado acúmulo de biomassa residual, a qual tem sido objeto de estudos visando agregar-lhe valor. Os grãos de café, após a prensagem para extração de óleo, originam a biomassa residual de café, conhecida como “pasta de café”, objeto deste estudo. Atividades biológicas relevantes têm sido identificadas em extratos de café, ou seus compostos isolados, e.g., atividades antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante. Este projeto é resultado de parceria de cooperação técnico-científica entre o Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV/UFSC) e a Cooperativa de Cafeicultores de Gaxupé (Cooxupé, MG), visando determinar a composição química de biomassas de cafés verde e torrado e o potencial dos extratos padronizados daquelas biomassas no reparo de lesões cutâneas. A administração tópica de compostos antioxidantes na pele tem recebido destaque entre os dermatologistas devido a suas atividades biológicas. A pele é a primeira defesa do corpo, impedindo a entrada de microrganismos ou substâncias estranhas, sendo fundamental a manutenção de sua integridade. Os extratos de cafés foram analisados utilizando-se técnicas analíticas clássicas, como a espectrofotometria-UV-Vis e a RP-HPLC. Ensaio bioquímicos avaliaram o potencial antioxidante dos extratos, assim como ensaios *in vitro* avaliaram a citotoxicidade, viabilidade, migração e proliferação celular, avançando-se posteriormente aos ensaios *in vivo* para verificar o potencial sobre o reparo da pele, em modelo murino. As análises fitoquímicas revelaram quantidades superiores de compostos fenólicos no extrato de café verde (EPCV =  $35,39 \pm 3,69$  mg.g<sup>-1</sup>), em relação ao extrato de café torrado (EPCT =  $24,13 \pm 1,45$  mg.g<sup>-1</sup>). A partir da concentração de 30 µg.mL<sup>-1</sup>, os extratos apresentam atividade antioxidante máxima (96%), similar ao Trolox, utilizado como controle positivo. Os extratos não evidenciaram citotoxicidade até a concentração máxima avaliada (10 mg.mL<sup>-1</sup>), sendo o EPCT responsável pela redução da viabilidade celular em linhagens de células L929, a partir de 3 mg.mL<sup>-1</sup>, com IC50 de 4,88 mg.mL<sup>-1</sup> e LD50 = 2.482,00 mg·kg<sup>-1</sup>. Os animais, após biópsia do tecido cutâneo dorsal, foram tratados com aplicação tópica diária de hidrogéis contendo: 1.extrato da pasta de café verde (HPCV, 10%, v/v); 2. extrato da pasta de café torrado (HPCT, 10%, v/v); 3.ácido clorogênico (HCGA, 3% m/v); 4. alantoína (CP, controle positivo, 1%

m/v) e 5. carbopol (CN, controle negativo, 1% m/v), sendo divididos por grupo (n=8) para análise da lesão após 3, 7 e 15 dias do pós-operatório. O efeito dos tratamentos foi determinado pela medida da redução da área da lesão, com resultado superior ( $p<0,05$ ) para o HPCV (78,20%) em relação aos demais tratamentos, i.e., HPCT (53,71%), CP (70,83%) e CN (23,56%). O HCGA reduziu significativamente a área da lesão na fase inflamatória, fato que pode estar associado a sua bem conhecida ação antioxidante e antiinflamatória. O uso tópico das pastas de cafés estudadas auxiliou o reparo cutâneo, apontando para uma interessante aplicação biotecnológica destas. Os resultados revelaram diferenças significativas de efeitos dos hidrogéis das pastas de cafés torrado e verde, sendo este último mais eficaz na recomposição das lesões cutâneas. Os hidrogéis contendo ácido clorogênico e extrato padronizado de pasta de café verde não diferiram em seus efeitos sobre o processo de regeneração tecidual cutânea, comparativamente aos controles.

**Palavras-chave:** Ácidos clorogênicos. Café. Compostos fenólicos. Pele. Reparo cutâneo.

## ABSTRACT

Coffee is one of the most important *commodities* in international trade and one of the most appreciated beverages worldwide. The great brazilian production of arabic coffee (*Coffea arabica* L.) has presented residual plant biomass, which has been object of some studies, adding value to the biomass that would otherwise become biowaste. The coffee beans residual, after pressing for oil extraction, give rise to the "coffee bean residual press cake", object of this study. Relevant biological activities have been identified in coffee extracts, or their isolated compounds, e.g., antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activities. This project is the result of a technical-scientific cooperation between the Laboratory of Morphogenesis and Plant Biochemistry (LMBV/UFSC) and Coffee Growers Cooperative in Guaxupé (Cooxupé, MG) aiming to determine the chemical composition of the green and roasted coffee bean residual press cake, and the potential of its standards extracts on the skin wound healing. The topical administration of antioxidant compounds on the skin wound healing has gained prominence among dermatologists because of their biological activities. The skin is the first body's defense, preventing the entry of microorganisms or xenobiotics, being fundamental to the maintenance of its integrity. The extracts of the coffee bean press cake were analyzed using classical analytical techniques, such as UV-Vis spectrophotometry and RP-HPLC. Biochemical assays evaluated the antioxidant potential of the extracts, as well as *in vitro* assays evaluated the cytotoxicity, viability, migration and cell proliferation, and later advanced *in vivo* assays to verify the potential on the skin repair in murine model. Phytochemical analyzes revealed higher amounts of phenolic compounds in the green coffee bean residual press cake (EPCV =  $35.39 \pm 3.69 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) when compared to the roasted coffee bean residual press cake (EPCT =  $24.13 \pm 1.45 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). From the concentration of  $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , the extracts present maximum antioxidant activity (96%), similar to Trolox, used as a positive control. The extracts did not show cytotoxicity up to the maximum concentration evaluated ( $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), and the EPCT was responsible for the reduction of cell viability in L929 cell lines from  $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , with  $\text{IC}_{50}$  of  $4.88 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  and  $\text{LD}_{50} = 2.482,00 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . The animals, after biopsy of the dorsal cutaneous tissue, were treated with daily topical application of hydrogels containing: 1. Green coffee beans press cake extracts (HPCV, 10%, v/v); 2. Roasted coffee beans press cake extracts (HPCT,

10%, v/v); 3. Chlorogenic acid (HCGA, 3% m/v) and 4. Allantoin (CP, positive control, 1% m/v); 5. Carbopol (CN, negative control, 1% m/v), and were divided by group (n = 8) for lesion analysis after 3, 7 and 15 days after surgery. The effect of the treatments was determined by the measure of area reduction of the lesion, with a superior result ( $p < 0.05$ ) for HPCV (78.20%) in relation to the other treatments, i.e., HPCT (53.71%), CP (70.83%) and CN (23.56%). The HCGA significantly reduced the area of lesion in the inflammatory phase, and that may be associated with the well-known antioxidant and anti-inflammatory potentials of CGA. The topical use of the coffee beans press cake studied assisted the cutaneous repair, pointing to an interesting biotechnological application for it. The results showed significant differences between the effect of the hydrogels of the roasted and the green coffee beans press cake, the latter being more effective in the recomposition of cutaneous lesions. The hydrogels containing chlorogenic acid and standardized extract of green coffee beans press cake did not differ in their effects on the cutaneous tissue regeneration process, compared to the controls.

**Keywords:** Chlorogenic acids. Coffee. Phenolic compounds. Skin. Wound healing.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química de compostos fenólicos: a) estrutura básica = anel aromático; b) ácido gálico. ....	40
Figura 2 - Estrutura química do núcleo flavânico. A e B – anéis aromáticos, C – anel heterocíclico. ....	42
Figura 3 - Fórmulas estruturais dos principais ácidos clorogênicos encontrados na natureza. ....	44
Figura 4 - Fórmulas estruturais: a) cafeína (1,3,7- trimetilxantina), b) teobromina ( 3,7-dimetilxantina) e c) teofilina ( 1,3-dimetilxantina)..	47
Figura 5 - Fórmula estrutural da trigonelina.....	47
Figura 6 - Redução tetravalente do oxigênio molecular (O <sub>2</sub> ) na mitocôndria até a formação de água (H <sub>2</sub> O). Várias espécies reativas de O <sub>2</sub> são formadas ao longo do processo. ....	51
Figura 7 - Mecanismos antioxidantes enzimáticos e a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. ....	55
Figura 8 - Representação esquemática da estrutura geral da pele. ....	57
Figura 9 - Representação esquemática das cinco camadas de queratinócitos e demais células que compõem a epiderme. ....	58
Figura 10 - Representação esquemática das quatro camadas de queratinócitos que compõem a epiderme delgada.....	59
Figura 11 - Representação esquemática de nichos de células tronco na derme, responsáveis pelo processo de reparo tecidual. Nichos na papila dermal do folículo piloso, nas glândulas sebáceas, no bulge do folículo piloso, na camada basal da epiderme, na derme e na hipoderme. ....	61
Figura 12 - Esquema da camada córnea da pele, com destaque ao filme hidrolipídico, aos lipídios intercelulares e à proteção contra a entrada de substâncias nocivas e perda de hidratação pela retenção da água. ....	65
Figura 13 - Esquema de três vias de internalização de substâncias através da pele: Permeação (seta verde) – entrada de substância pelos espaços intercelulares, permeando de uma camada a outra. Penetração (seta azul) – entrada na camada córnea. Reabsorção (seta rosa) – absorção da substância no via folículo, com entrada no sistema vascular (linfa ou sangue).....	67
Figura 14 - Fases da cicatrização e deposição de componentes da matriz cicatricial ao longo do tempo. A fibronectinae o colágeno tipo III constituem a matriz precoce. O colágeno tipo III é substituído gradualmente pelo tipo I, aumentando a resistência da ferida.....	71

Figura 15 - Esquema de identificação do tecido de granulação na lesão cutânea em lâmina histológica. Indicação das 5 medidas lineares da espessura do tecido de granulação. ....	95
Figura 16 - Esquema representativo dos quadrantes para contagem de células infiltrantes e vasos neoformados (1) e medida da espessura da camada epidérmica (2). ....	96
Figura 17 - Conteúdo de compostos fenólicos totais do extrato aquoso da pasta de café verde (EPCV) nos tempos zero, e após 1, 7 e 15 dias, mantidos em temperatura ambiente ( $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), estufa ( $40^{\circ}\text{C}$ ), freezer ( $- 20^{\circ}\text{C}$ ) e geladeira ( $4-8^{\circ}\text{C}$ ). Conteúdo expresso em $\mu\text{g}$ equivalente de ácido gálico por grama de massa seca. ....	104
Figura 18 - Conteúdo de compostos fenólicos totais do extrato aquoso da pasta de café torrado (EPCT) nos tempos zero, e após 1, 7 e 15 dias, mantidos em ambiente ( $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), estufa ( $40^{\circ}\text{C}$ ), freezer ( $- 20^{\circ}\text{C}$ ) e geladeira ( $4-8^{\circ}\text{C}$ ). Conteúdo expresso em $\mu\text{g}$ equivalente de ácido gálico por grama de massa seca. ....	104
Figura 19 - Espectros originais da varredura UV-Vis ( $\lambda = 200-700\text{ nm}$ ) dos extratos aquosos (10% v/v) das amostras de pastas de cafés em estudo, antes do pré-processamento dos dados. ....	108
Figura 20 - Espectro da varredura UV-Vis ( $\lambda = 280-400\text{ nm}$ ) dos extratos aquosos (10% v/v) das amostras de pastas de café em estudo, após pré-processamento dos dados. Perfil espectral pré-processado com correção da linha de base e otimização da relação sinal/ruído, onde cada perfil corresponde à média das triplicatas. ....	109
Figura 21 - Escores de dispersão dos dados espectrais de UV-Vis ( $\lambda = 280-400\text{ nm}$ ) nos eixos PC1 e PC2 das amostras de extratos das pastas de cafés verde e torrado. ....	110
Figura 22 - Dendograma dos espectros da região de fingerprint de compostos fenólicos (UV-Vis, $\lambda = 280-400\text{ nm}$ ) dos extratos aquosos das pastas de cafés verde e torrado. ....	111
Figura 23 - Escores de dispersão dos dados fitoquímicos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa nos eixos PC1 e PC2 das amostras dos extratos aquosos das pastas de cafés verde e torrado. ....	114
Figura 24 - Dendograma dos dados cromatográficos das amostras dos extratos aquosos das pastas de cafés verde e torrado. ....	114
Figura 25 - Viabilidade celular in vitro, após 24 h de exposição ao extrato aquoso da pasta de café torrado. Foram detectadas reduções importantes da viabilidade celular a uma concentração de $3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ou superior, tal como determinado através do ensaio de NRU. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão (sd). ....	117



Figura 26 - Viabilidade celular in vitro, após 48 h de exposição aos tratamentos. Concentrações: 0,003 a 10 mg.mL <sup>-1</sup> . CN = controle negativo; CGA = ácido clorogênico; EPCV = extrato aquoso da pasta de café verde; EPCT = extrato aquoso da pasta de café torrado. ....	118
Figura 27 - Fotomicrografia de células em cultura, após 48 h de tratamento, na concentração de 1 mg.mL <sup>-1</sup> , e de células não tratadas. Microscópio invertido, luz branca, objetiva de 40x.CN = controle negativo; CGA = ácido clorogênico; EPCV = extrato da pasta de café verde; EPCT = extrato da pasta de café torrado. Escala: 20 µm. ....	119
Figura 28 - Fotomicrografia do ensaio de migração celular e porcentagem de fechamento do espaço entre as bordas, em células L929 sem tratamento. A-C: Imagens representativas dos tempos 0, 12 e 24 h. D: Porcentagem de fechamento do espaço entre bordas nos tempos 0, 12 e 24 h. D: Porcentagem de fechamento do espaço entre bordas nos tempos 0, 8, 12, 24 e 48 h.....	121
Figura 29 - Fotomicrografia do ensaio de migração celular e porcentagem de fechamento do espaço entre as bordas, em células L929 tratadas com ácido clorogênico (1 mg.mL <sup>-1</sup> ).A-C: Imagens representativas dos tempos 0, 12 e 24 h. D: Porcentagem de fechamento do espaço entre bordas nos tempos 0, 8, 12, 24 e 48 h. ...	122
Figura 30 - Fotomicrografia do ensaio de migração celular e porcentagem de fechamento do espaço entre as bordas, em células L929 tratadas com extrato da pasta de café verde (1 mg.mL <sup>-1</sup> ).A-C: Imagens representativas dos tempos 0, 12 e 24 h. D: Porcentagem de fechamento do espaço entre bordas nos tempos 0, 8, 12, 24 e 48 h.....	123
Figura 31 - Fotomicrografia do ensaio de migração celular e porcentagem de fechamento do espaço entre as bordas, em células L929 tratadas com extrato da pasta de café torrado (1 mg.mL <sup>-1</sup> ).A-C: Imagens representativas dos tempos 0, 12 e 24 h. D: Porcentagem de fechamento do espaço entre bordas nos tempos 0, 8, 12, 24 e 48 h. ...	124
Figura 32 - Efeito dos tratamentos na migração/proliferação de células L929, in vitro, expresso pelo fechamento (%) do espaço entre as bordas da lesão da monocamada celular in vitro, ao longo do tempos experimentais de 8, 12, 24 e 48 h.....	125
Figura 33 - Redução percentual da área da ferida após 14 dias de tratamento com hidrogéis aplicados diariamente em camundongos com 9 meses de idade. Legenda: CN (controle negativo = 23,56% c), CP (controle positivo = 70,83% ab), HPCT (hidrogel da pasta de café torrado = 53,71% b) e HPCV (hidrogel da pasta de café verde = 78,20% a).....	126

Figura 34 - Tamanho da lesão (cm) nos períodos de 3, 7 e 15 dias do pós-operatório, consoante aos tratamentos com hidrogéis de alantoína, carbopol, ácido clorogênico e extrato da pasta de café verde. ....	130
Figura 35 - Evolução do processo de epitelização das lesões em modelo murino, nos tempos amostrais de 3, 7 e 15 dias do pós-operatório dos grupos tratados com hidrogéis da pasta de café verde (grupo I), de ácido clorogênico (grupo II), de alantoína (grupo III, CP = controle positivo) e de carbopol (grupo IV, CN = controle negativo)).Imagens analisadas e processadas com utilização do software ImageJ®. ....	131
Figura 36 – Micrografias de cortes histológicos das lesões cutâneas após 3 dias de tratamento, demonstrando a densidade de células do infiltrado inflamatório. Método de coloração: HE. Escala: 20 µm. ....	133
Figura 37 - Efeito dos tratamentos com hidrogéis da pasta de café verde (HPCV), de ácido clorogênico (HCGA), de alantoína (CP = controle positivo) e carbopol (CN = controle negativo) sobre o número de células infiltrantes no 3º dia do pós-operatório. ....	133
Figura 38 - Micrografiasde cortes histológicos das lesões cutâneas após 7 e 15 dias de tratamento, demonstrando a formação do tecido de granulação (tg), a epiderme (e). Método de coloração: HE. Aumento de 40X. Escala: 200 µm. ....	134
Figura 39 - Efeito dos tratamentos com hidrogel da pasta de café verde (HPCV), de ácido clorogênico (HCGA), de alantoína (CP = controle positivo) e carbopol (CN = controle negativo), após 7 e 15 dias do pós-operatório, sobre a espessura do tecido de granulação(µM). ....	135
Figura 40 - Micrografias de cortes histológicos das lesões cutâneas no 15º dia do pós-operatório, demonstrando a formação de novos vasos. Histograma do número de vasos em função dos tratamentos. Objetiva de 40X. As setas indicam estruturas vasculares. ....	137
Figura 41 - Espessamento da epiderme no reparo cutâneo no 15º dia do pós-operatório. Imagens representativas de cortes histológicos corados com HE. Histograma da medida média da epiderme. Objetiva de 40X. ....	139

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teores médios percentuais de compostos em grãos de cafés verde e torrado.....	37
Tabela 2 - Os valores de pH de extratos aquosos obtidos à 25° C e a 96° C, a partir de cafés submetidos à distintos tipos de torra: clara, média e escura.....	39
Tabela 3 - Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nas formas de radicais e não radicais.....	50
Tabela 4 - Componentes celulares envolvidos no sistema imunológico da pele .....	64
Tabela 5 - Citocinas envolvidas no processo de reparo tecidual, células produtoras e efeito biológico.....	68
Tabela 6 - Condições cromatográficas do gradiente estabelecido para os eluentes A e B, ao longo do tempo de 50 min de análise com fluxo de 1 mL.min para análise de ácidos fenólicos e alcalóides.....	84
Tabela 7 - Características sensoriais (aspecto, cor e odor) e pH dos extratos da pasta de café verde (EPCV) nos tempos zero e após 1, 7 e 15 dias, consoante as condições de armazenamento. ....	101
Tabela 8 - Características sensoriais (aspecto, cor e odor) e pH dos extratos da pasta de café torrado (EPCT) nos tempos zero e após 1, 7 e 15 dias, consoante as condições de armazenamento. ....	102
Tabela 9 - Valores de pH dos hidrogéis das pastas de cafés verde (HPCV) e torrado (EPCT), do ácido clorogênico (HCGA), de alantoína (HÁ) e de carbopol (HC), no tempo zero (T0) e após 15 dias (T15). .	105
Tabela 10 - Conteúdos totais de compostos fenólicos (mg de equivalente de ácido gálico. g <sup>-1</sup> biomassa seca, ), flavonóides (mg de equivalente de quercetina. g <sup>-1</sup> biomassa seca) e carotenóides (mg de equivalente de β-caroteno. g <sup>-1</sup> biomassa seca) dos extratos aquosos das pastas de cafés verde e torrado.....	112
Tabela 11 - Concentrações (mg. g <sup>-1</sup> de biomassa, peso seco) de ácidos fenólicos e alcalóides nos extratos aquosos des cafés verde e torrado, determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. ....	113
Tabela 12 - Atividade máxima percentual, de seqüestro do radical DPPH dos extratos aquosos das pastas de café verde e torrado, comparada à atividade de seqüestro do Trolox - controle positivo. ....	116
Tabela 13 - Atividades da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutaciona peroxidase (GPX) no tecido epitelial sem tratamento (dia 0) e nos tecidos tratados com os hidrogéis da pasta de café verde (HPCV),	

de ácido clorogênico (HCGA), de alantoína (CP = controle positivo) e carbopol (CN = controle negativo), extraídos por biópsia após 3, 7 e 15 dias de tratamento. .... 141

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIC	Associação Brasileira das Indústrias de Café
AMP	Aminometilpropanol
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> (Albumina bovina)
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CAT	Enzima Catalase
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CGA	<i>Chlorogenic acid</i> (Ácido clorogênico)
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
DPPH	2, 2-difenil-1-picrilhidrazil
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético)
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (Fator de Crescimento Epidermal)
EPCV	Extrato da pasta de café verde
EPCT	Extrato da pasta de café torrado
ERMOS	Espécies reativas derivadas do metabolismo do oxigênio
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> (Fator de Crescimento de Fibroblastos)
GC	Gas chromatography (Cromatografia gasosa)
GPX	Enzima glutatona peroxidase
GSH	Enzima glutatona reduzida
GSH-Rd	Enzima glutatona redutase

GSSH	Glutationa oxidada
G6PD	Glicose 6-fosfato desidrogenase
HCA	<i>Hierarchical cluster analyse</i> (Análise de cluster hierárquico)
HPCV	Hidrogel da pasta de café verde
HPCT	Hidrogel da pasta de café torrado
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta performace)
ICO	International Coffee Organization
ICCVAM	<i>Interagency coordinating committee on the validation of alternative methods</i>
IGF	<i>Insulin like growth factor</i> (Fator de Crescimento semelhante à insulina)
IL	Interleucina
IR	<i>Infrared</i> (Infravermelho)
KGf	<i>Keratinocyte growth factor</i> (Fator de Crescimento de Queratinócitos)
LC	Liquid chromatography (Cromatografia líquida)
LAMEB	Laboratório Multiuso de Estudos em Biologia
LEBIMA	Laboratório de estudos em Bioatividade e Morfogênese Animal
MEC	Matriz Extracelular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MMP	Metaloproteases ou Metaloproteínases
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromo tetrazólico)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
NBT	<i>Nitro Blue Tetrazolium</i>
NR	<i>Neutral red</i> – Vermelho neutro
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PCA	<i>Principal components analyse</i> (Análise de componentes principais)
PDGF	<i>Platelets derived growth factor</i> (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas)
Ph	Potencial hidrogeniônico
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
RSS	Espécies Reativas de Enxofre

RP-HPLC	<i>Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia líquida em fase reversa)
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Enzima superóxido dismutase
TGF	<i>Transforming growth factor</i> (Fator de Crescimento Transformante)
TNF	<i>Tumor growth factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)
TLC	<i>Thin liquid chromatography</i> (Cromatografia delgada)
TPK	Tampão fosfato de potássio
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)
UV-Vis	Ultra-violeta visível





# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>29</b>
1.1 ANÁLISE DO PERFIL FITOQUÍMICO.....	33
<b>1.1.1 Ferramentas analíticas.....</b>	<b>33</b>
<b>1.1.2 Composição química do café.....</b>	<b>35</b>
1.1.2.1 Compostos fenólicos do café.....	39
<i>1.1.2.1.1 Ácidos clorogênicos.....</i>	<i>43</i>
1.1.2.2 Compostos nitrogenados.....	45
1.1.2.3 Compostos resultantes da torrefação.....	48
<i>1.1.2.3.1 Melanoidinas.....</i>	<i>48</i>
<i>1.1.2.3.2 Compostos voláteis.....</i>	<i>49</i>
1.2 RADICAIS LIVRES, ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	49
1.3 PELE.....	56
<b>1.3.1 Estrutura.....</b>	<b>56</b>
1.3.1.1 Epiderme.....	57
1.3.1.2 Derme.....	60
<b>1.3.2 Funções.....</b>	<b>62</b>
1.4 O RÉPARO TECIDUAL.....	67
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>77</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	77
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	77
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>79</b>
3.1 MATERIAL AMOSTRAL, QUÍMICOS E LINHAGENS CELULARES.....	79
3.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	79
3.3 PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS PARA APLICAÇÃO TÓPICA.....	80
3.4 ENSAIO DE ESTABILIDADE ACELERADA.....	81
3.5 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS.....	81
<b>3.5.1 Análises esperctrofotométricas - perfil químico por varredura UV-Visível.....</b>	<b>81</b>
<b>3.5.2 Quantificação de compostos fenólicos, flavonóides e carotenóides totais.....</b>	<b>82</b>
<b>3.5.3 Análise cromatográfica para determinação de ácidos fenólicos e alcalóides por RP-HPLC.....</b>	<b>83</b>

3.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS – SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE <i>DPPH</i> .....	85
3.7 ANÁLISE DE SEGURANÇA E EFICÁCIA <i>IN VITRO</i> .DOS EXTRATOS AQUOSOS DA PASTA DE CAFÉ E DO ÁCIDO CLOROGÊNICO.....	86
<b>3.7.1 Avaliação da citotoxicidade dos extratos aquosos e do ácido clorogênico.....</b>	<b>86</b>
<b>3.7.2 Análise da viabilidade/proliferação celular por MTT.....</b>	<b>88</b>
<b>3.7.3 Ensaio de migração/proliferação celular – <i>cell scratch</i> .....</b>	<b>89</b>
3.8 ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS.....	91
<b>3.8.1 Procedimento cirúrgico.....</b>	<b>91</b>
<b>3.8.2 Etapa 1: avaliação do efeito dos extratos aquosos da pasta de café no processo de reparo tecidual.....</b>	<b>91</b>
3.8.2.1 Animais.....	91
3.8.2.2 Estudo macroscópico da lesão – redução da área da lesão ....	92
<b>3.8.3 Etapa 2: avaliação do potencial do extrato aquoso da pasta de café verde e o do ácido clorogênico no processo de reparo tecidual</b>	<b>92</b>
3.8.3.1 Animais.....	92
3.8.3.2 Estudo macroscópico da lesão – redução da área da lesão ....	93
3.8.3.3 Estudo histológico da pele.....	93
3.8.3.3.1 <i>Avaliação do tecido de granulação</i> .....	94
3.8.3.3.2 <i>Avaliação do infiltrado de células</i> .....	95
3.8.3.3.3 <i>Avaliação da angiogênese</i> .....	95
3.8.3.3.4 <i>Avaliação da espessura da epiderme</i> .....	96
3.9 ENSAIO EX VIVO.....	96
<b>3.9.1 Marcadores enzimáticos de estresse oxidativo.....</b>	<b>96</b>
3.9.1.1 Atividade da catalase .....	96
3.9.1.2 Atividade da superóxido dismutase .....	97
3.9.1.3 Atividade da glutathiona peroxidase.....	97
3.10 ANÁLISE DE DADOS.....	98
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>99</b>
4.1 ESTABELECIMENTO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO ..	99
4.2 ESTABILIDADE DOS EXTRATOS E PREPARO DOS HIDROGÉIS.....	101
4.3 PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS AQUOSOS.....	107
<b>4.3.1 Conteúdos de compostos fenólicos, flavonóides e carotenóides totais</b>	<b>111</b>
<b>4.3.2 Perfis cromatográficos de ácidos fenólicos e alcalóides.....</b>	<b>112</b>
4.4 POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS – ENSAIO <i>DPPH</i> .....	114

4.5	SEGURANÇA E EFICÁCIA <i>IN VITRO</i> .....	116
4.5.1	Citotoxicidade dos extratos e do ácido clorogênico .....	116
4.5.2	Viabilidade/proliferação.....	118
4.5.3	Morfologia .....	119
4.5.4	Migração/proliferação celular – <i>cell scratch assay</i> .....	120
4.6	ESTUDO PRÉ-CLÍNICO: POTENCIAL DE REPARO TECIDUAL <i>IN VIVO</i> DOS EXTRATOS AQUOSOS DE PASTAS DE CAFÉ .....	125
4.6.1	Potencial de reparo tecidual dos extratos da pasta de café verde e da pasta de café torrado .....	125
4.6.2	Avaliação do potencial de reparo tecidual do extrato da pasta de café verde e do ácido clorogênico.....	128
4.6.2.1	Estudo macroscópico da lesão.....	128
4.6.2.2	ESTUDO MICROSCÓPICO DA LESÃO.....	131
4.6.2.2.1	<i>Análise de células do infiltrado inflamatório</i> .....	132
4.6.2.2.2	<i>Espessura do tecido de granulação e vasculogênese</i> .....	134
4.6.2.2.3	<i>Espessura da epiderme</i> .....	137
4.7	MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO – <i>EX VIVO</i> ...	140
5	CONCLUSÕES.....	143
	ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais UFSC – CEUA.....	171



## 1 INTRODUÇÃO

O consumo mundial de café cresce consistentemente há mais de 50 anos, devido ao desenvolvimento dos apreciados sabores e aromas que lhe conferem grande receptividade mundial (MOREIRA et al., 2001). O café é uma importante fonte de divisas e riquezas ao Brasil, representando o segundo item de maior comercialização no mercado internacional. As espécies de maior importância econômica são: o café arábica (*Coffea arabica* L.) e o café robusta (*Coffea canephora* Pierre ex. A. Froehner), também chamado de conilon. Os principais países consumidores de café são os Estados Unidos, o Brasil, a Alemanha e a Itália, que consomem cerca de 80% da produção mundial. Sob a forma de café solúvel, Rússia, Ucrânia, Turquia e Reino Unido são os principais consumidores (ABIC, 2016).

Devido ao seu consumo elevado, o café tem despertado o interesse de pesquisadores quanto a suas propriedades funcionais, não somente dos grãos torrados ou *in natura*, mas também de produtos derivados, como o óleo, a biomassa após a extração da fração óleo, a casca, a polpa e as folhas (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012). Avanços na descoberta de compostos químicos e estudos relacionados aos efeitos na saúde humana têm contribuído para a compreensão de que o café pode trazer muitos benefícios, se ingerido moderadamente, o que contribui ainda mais para o aumento de seu consumo (BUTT; SULTAN, 2011; CHEONG et al., 2013; FARAH, 2009; ILLY; VIANI, 2015; MOREIRA et al., 2005; NKONDJOCK, 2009; TEMPLE, 2009; THOM, 2007; TORRES; FARAH, 2010; VAN DIJK et al., 2009; YUKAWA, 2004). No ano de 2015, o Brasil exportou 33 milhões de sacas de café *in natura*, sendo o maior produtor mundial, seguido de Vietnã, Colômbia, Índia e Honduras (ABIC, 2016).

A grande produção de café arábica (*Coffea arabica* L.) no Brasil tem gerado matéria orgânica residual, a qual tem sido objeto de estudos para seu aproveitamento como possível fonte de compostos bioativos, agregando valor à biomassa que, de outro modo, se transformaria em descarte (BAGGIO, 2006; LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003). Como exemplo, os grãos de café que não são selecionados pelos elevados critérios do mercado de bebidas, têm sido aproveitados à extração de óleo de café para estudos de desenvolvimento de formulações cosméticas (PEREDA et al., 2009). A extração da fração óleo é feita por prensagem mecânica a frio, originando uma biomassa residual, conhecida na cooperativa de cafeicultores como pasta de café, que é o objeto deste estudo.

A bebida café tem sido reconhecida como um alimento funcional, sendo uma importante fonte de antioxidantes na dieta humana, especialmente pelos altos teores de compostos fenólicos e cafeína (CLIFFORD, 1999; DÓREA; COSTA, 2005; FARAH, 2009). São considerados alimentos funcionais aqueles que, além de fornecerem a nutrição básica, possuem potencial para promover a saúde (SANDERS, 1998). O café é bem conhecido como estimulante do sistema nervoso central e inibidor do sono, propriedades atribuídas à cafeína. Entretanto, o crescente número de estudos de seus constituintes químicos associados a pesquisas de efeitos biológicos tem revelado amplas funcionalidades (BISHT; SISODIA, 2010; ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012; GEORGE et al., 2008; GLADE, 2010; HIDGON; FREI, 2006; MELETIS, 2006). Estudos epidemiológicos indicam que o consumo de café está associado à redução dos riscos de desenvolvimento de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e doenças neurodegenerativas (DÓREA; COSTA, 2005).

Os constituintes químicos do café envolvem compostos fenólicos e seus derivados, alcaloides, álcoois diterpenóides, carboidratos, lipídios, compostos resultantes da interação molecular promovida pelo processo de torrefação, como as melanoidinas, compostos voláteis e compostos heterocíclicos (BREZOVÁ et al., 2009; CLIFFORD; RAMÍREZ-MARTÍNEZ, 1991a, 1991b). Os ácidos clorogênicos (CGA) são os compostos fenólicos presentes em maior quantidade, sendo o café a principal fonte destes fenólicos na dieta humana (CLIFFORD, 1999).

Estudos com extratos de café e seus metabólitos secundários isolados revelaram atividades biológicas importantes, e.g., atividade antibacteriana (ALMEIDA et al., 2006, 2012), antiviral (UTSUNOMIYA et al., 2008), anti-inflamatória (MOREIRA et al., 2013, SANTOS et al., 2006), anti-hiperalgésica e antinociceptiva (BAGDAS, 2013, 2014b), supressiva da expressão de metaloproteinases (CHIANG et al., 2011), de redução de oxidação e danos a macromoléculas (HOELZ et al., 2010), antioxidante (DAGLIA et al., 2000; MOURA-NUNES et al., 2009; MARTINEZ-SAEZ et al., 2014; SERAFINI; TESTA, 2009; VIGNNOLI et al., 2001), hipotensiva (SUZUKI et al. 2002), anti-tumoral (CHUNG et al., 2004; HIDGON, 2007; LOFTFIELD, 2015; TAO et al. 2008), de estimulação do sistema nervoso central, diurética, de vasoconstrição periférica (HECKMAN et al., 2010) e de auxílio à cicatrização da pele (AFFONSO et al., 2016; BAGDAS et al., 2014a, 2014c, 2014d, 2015), dentre outros. Ressalta-se que os compostos fenólicos mostraram-se ativos nos tecidos cutâneos, ativando a ação da colagenase e contribuindo no processo de reparo

tissular (BAE et al., 2008). A administração tópica de compostos antioxidantes na pele tem ganhado destaque entre os dermatologistas por causa de sua ampla atividade biológica, incluindo ação contra fotoenvelhecimento, envelhecimento associado à idade e fator de proteção solar (FARRIS, 2007; LINDER, 2010; LUPO; DRAELOS; WAGEMAKER et al., 2011).

A pele é a primeira defesa contra a entrada de microrganismos ou substâncias estranhas ao nosso corpo, sendo fundamental a manutenção de sua integridade. A perda da integridade da pele resulta em lesões que podem levar a comprometimentos, caso não seja reparada, como infecções locais ou sistêmicas provocadas pela entrada de patógenos. A habilidade de responder às lesões e reparar tecidos é uma propriedade fundamental para os organismos multicelulares, sendo que o reparo pode ocorrer via regeneração tecidual, com a recomposição da funcionalidade do tecido, ou pela cicatrização, com o restabelecimento da homeostasia do tecido e perda da sua atividade funcional (GURTNER et al., 2008).

O tratamento de lesões da pele é uma etapa crucial na qualidade do reparo tecidual, podendo trazer benefícios significativos na qualidade de vida e longevidade de pacientes (MACNEIL, 2007). O processo de reparo tecidual adequado requer um ambiente propício, com temperatura ideal, hidratação e condições adequadas de oxigenação, sendo determinante à condição sistêmica do indivíduo. O atraso temporal e a qualidade do reparo são influenciados por diversos fatores como: estado nutricional, isquemia tecidual, obesidade, diabetes, infecções por bactérias, vírus e fungos, alcoolismo, tabagismo, uso de drogas, uso de medicamentos, doenças cardiovasculares, hemofilia, deficiência de fator XIII, desequilíbrio imune, endócrino, estresse e especialmente pela idade (ASHCROFT; HORAN; FERGUSON, 1997; GUO; DIPIETRO, 2010; KEYLOCK et al., 2008). A cicatrização tardia de feridas em indivíduos com idade mais avançada está diretamente relacionada à diminuição do ritmo metabólico, associada à resposta inflamatória alterada, tais como: infiltração tardia das células T na área da ferida, alterações na produção de quimiocinas, redução da capacidade fagocítica dos macrófagos, deficiência na síntese de colágeno, na angiogênese e na reepitelização (SWIFT et al., 1999, 2001). Inúmeras pesquisas têm sido realizadas a fim de identificar métodos de tratamento que resultem em um melhor processo de reparo, envolvendo procedimentos de antisepsia, aplicação de compostos bioativos, terapia celular e desenvolvimento de biomateriais (BURKE et al., 1981; SUZUKI et al., 1995; VELEIRINHO et al., 2012; JEREMIAS et al.,

2014; ALBERTI, 2016). A administração tópica de compostos antioxidantes sobre a pele tem ganhado destaque entre os dermatologistas devido ao seu potencial antiinflamatório, prevenção de danos oxidativos, fotoenvelhecimento e anticancerígeno (FARRIS, 2007; FITZMAURICE et al., 2011). Considerando a capacidade dos compostos fenólicos em atravessar a barreira epidérmica para alcançar receptores específicos e a riqueza do café integral em antioxidantes, decidiu-se investigar o potencial dos extratos da pasta de café no processo de reparo do tecido cutâneo, através de ensaios *in vitro* e *in vivo*,

O presente estudo foi delineado a partir do Projeto de Cooperação Técnico – Científica estabelecido entre o Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal/UFSC e a Cooperativa de Cafeicultores em Guaxupé, Cooxupé, Minas Gerais, interessada na avaliação do potencial da biomassa residual de grãos de café para o setor cosmético e farmacêutico.

Políticas de saúde globais têm promovido o aumento do consumo de vegetais como fonte de compostos antioxidantes com intuito de incentivar a prevenção de doenças crônicas relacionadas ao estresse oxidativo, tais como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Além do potencial antioxidante, os compostos químicos presentes em matrizes vegetais desempenham diversas funções biológicas (WHO, 2004). Há, também, ênfase considerável na recuperação de biomassas vegetais provenientes da indústria de alimentos, a fim de destiná-las a outros setores industriais, reduzindo volume de descarte, possíveis danos ambientais e agregando valor aos produtos (LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003). Nesse sentido, a produção de grãos de *C. arabica* no Brasil tem originado biomassa residual (grãos não selecionados pelos elevados critérios estabelecidos pelo mercado de bebidas) com potencial importante ao desenvolvimento de produtos cosméticos ou farmacêuticos (BAGGIO, 2006).

Estudos anteriores sobre os compostos químicos da biomassa residual de café arábica integral e ensaios *in vitro* demonstraram tratar-se de matéria-prima vegetal rica em compostos bioativos com potencial de uso como agentes terapêuticos (BAGGIO, 2006; FARAH; DONANGELO, 2006). Contudo, não foram encontrados estudos pré-clínicos atestando o potencial de extratos de grãos de café, após remoção da fração óleo, no processo de reparo cutâneo. Este trabalho agrega o valor socioambiental de reutilização da biomassa residual da grande indústria brasileira de café que, de outro modo, estaria sendo destinada ao descarte.



Neste sentido, a hipótese deste estudo baseia-se no pressuposto de que um extrato biologicamente compatível, ou seja, o extrato aquoso da biomassa de grãos de café, após a remoção da fração óleo (*C. arabica* L.), é uma fonte rica de compostos bioativos e que, administrado topicamente na lesão, auxilia no processo de reparo tecidual. Assim, foram determinados, numa primeira abordagem, o perfil fitoquímico, a atividade antioxidante, a citotoxicidade *in vitro* e o potencial dos extratos na redução do tempo de fechamento de lesão excisional, em modelo murino. Numa segunda abordagem, foi determinado o efeito *in vivo* da aplicação tópica de hidrogéis contendo os extratos aquosos, em modelo de ferida excisional em camundongos suíços.

## 1.1 ANÁLISE DO PERFIL FITOQUÍMICO

Os produtos naturais têm um histórico importante no processo de descoberta de fármacos. Por volta de 1970, a Organização Mundial de Saúde reconheceu os benefícios da medicina fitoterápica, pois foram obtidos importantes medicamentos originados de fontes naturais, contrapondo-se às drogas sintéticas que apresentam custos elevados de síntese, o que compromete a produção. Assim, pode-se dizer que neste século está se desenvolvendo uma nova química medicinal que transmite a ideia de que com recursos suficientes poder-se-á encontrar tratamentos adequados de forma mais eficiente (CALIXTO; YUNES, 2001).

### 1.1.1 Ferramentas analíticas

Técnicas analíticas como a espectrofotometria UV-Vis, a espectroscopia de infravermelho (IR), as cromatografias de camada delgada (TLC), líquida (LC) e gasosa (GC), a espectrometria de massa (MS) e a ressonância magnética nuclear (NMR) são ferramentas fundamentais à elucidação do perfil fitoquímico de uma determinada biomassa. A adoção de técnicas hífenadas, e.g., GC/MS (MS), LC/MS (MS) e LC-NMR, aumenta o poder de detecção e de resolução da análise, além de possibilitar a investigação concomitante de vários grupos de metabólitos (KUMAR et al., 2016).

A espectrofotometria de absorvâncias nas regiões das radiações ultravioleta e visível (UV-Vis) é uma técnica analítica utilizada há mais de 60 anos para identificação de muitas espécies moleculares inorgânicas, orgânicas e bioquímicas em diferentes tipos de materiais (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Para a análise preliminar de

uma determinada amostra, muitas vezes não é necessário recorrer a procedimentos analíticos complexos, sendo neste contexto adequado o uso da análise de varredura por espectrofotometria UV-Vis, identificando-se ou não a necessidade de avançar para uma análise mais complexa, consoante aos objetivos do estudo. Em termos de fornecimento de resultados rápidos, a análise de varredura é muito interessante, podendo ser acompanhada das análises quimiométricas dos dados espectroscópicos (NASCIMENTO, 2010).

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma matriz, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo, sendo que uma das fases permanece estacionária enquanto a outra move-se através dela. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *high performance liquid chromatography*) teve grande avanço com o desenvolvimento e a utilização de suportes com partículas diminutas responsáveis pela alta eficiência, as quais tornam necessário o uso de bombas de alta pressão para a eluição (corrida cromatográfica propriamente dita) da fase móvel, devido a sua baixa permeabilidade. Esta técnica tem sido utilizada em várias áreas da ciência como, por exemplo, no monitoramento de reações de síntese, em análises de alimentos e pesticidas, no isolamento de produtos naturais e sintéticos e na produção e controle de qualidade de medicamentos. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1995; DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Independente da estratégia de análise e do método analítico escolhido, não raro obter-se-á uma quantidade apreciável de dados, os quais precisam ser arquivados, analisados, interpretados e integrados. Para tal, inúmeras ferramentas de bioinformática têm sido desenvolvidas para gerenciar, processar, minerar, integrar, analisar estatisticamente e até criar modelos matemáticos de redes metabólicas (KUMAR et al., 2016). A necessidade de extrair informações a partir das análises estatísticas dos dados gerados pelas ferramentas analíticas define o que conhecemos como quimiometria. A quimiometria tem como objetivo o tratamento de dados químicos, ou bioquímicos, de caráter multivariado, retirando o máximo possível de informações presentes na análise de matrizes complexas, facilitando assim a interpretação destas.

Em análises quimiométricas, a extração de informação latente de conjunto de dados utiliza algoritmos de técnicas de estatística multivariada, sendo as mais frequentes as análises de agrupamento hierárquica (HCA - *Hierarchical Cluster Analysis*) e de componentes principais (PCA - *Principal Component Analysis*). A HCA usa distâncias interpontos entre todas as amostras, representando-as em

forma de um gráfico bidimensional, denominado dendrograma. Na geração destes gráficos, cada amostra é tratada inicialmente como uma classe que a uma determinada distância se une às amostras mais próximas para formar os agrupamentos ou classes (*clusters*), e assim sucessivamente, até formar um único agrupamento ou classe conjunta de todas as amostras. A proximidade de amostras ou variáveis dentro de um agrupamento ou classe pode ser associada à similaridade de propriedades químicas e/ou físicas. A PCA é uma manipulação matemática de dados de uma matriz cuja finalidade é transformar e extrair informações relevantes de dados complexos, tornando-os de mais fácil interpretação. Isso é possível através da combinação linear entre variáveis originais, constituindo um novo conjunto de variáveis que contém apenas as informações relevantes, criando-se novos eixos no espaço multidimensional, chamados de componentes principais. Assim, cada amostra é representada por um ponto no espaço multidimensional, do qual é possível extrair informações sobre a mesma e/ou sobre agrupamentos ou classes que apresentem características semelhantes. Tal ferramenta fornece uma visão estatisticamente privilegiada e simples do conjunto de dados, além de permitir a inferência de correlações existentes entre amostras e/ou variáveis independentes (MOITA NETO; MOITA, 1998; NASCIMENTO, 2010).

### **1.1.2 Composição química do café**

Compostos biologicamente ativos presentes nas biomassas de café são usualmente oriundos do metabolismo secundário, com destaque aos compostos fenólicos e alcaloides. Metabólitos secundários recebem este nome por não serem produtos das vias biossintéticas que geram produtos primários, ou seja, produtos comuns a todos os organismos como proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, carboidratos. Estes metabólitos apresentam como característica geral o fato de ocorrerem em quantidades pequenas, em relação ao conteúdo de metabólitos primários, podendo ser estocados em tecidos específicos das plantas ou distribuídos esparsamente, assim como podem ser específicos para um determinado táxon vegetal, e, em geral, possuem uma gama de atividades biológicas nas plantas que os sintetizam (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; ZANG et al., 2002). Compostos fenólicos, alcaloides e terpenos são produtos de vias metabólicas secundárias, produtos especializados através dos quais os vegetais interagem com o ambiente. Possuem ação protetora em casos de estresses abióticos, como mudanças na temperatura, no conteúdo de água, na intensidade de luz, e

na deficiência de nutrientes e minerais, assim como na proteção contra patógenos, herbívoros e interação com plantas e animais (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A composição química do café *in natura* depende da espécie e da variedade em questão, das práticas agrícolas, do grau de maturação do fruto do café na colheita, do processamento primário dos grãos e das condições de estocagem, por exemplo. Durante a torrefação, ocorrem consideráveis mudanças na composição química do café, que resultam na formação do aroma e sabor final da bebida. Dependendo do mercado consumidor, varia-se o grau de torrefação, produzindo-se cafés de colorações mais claras, apreciados nos Estados Unidos, até colorações mais intensas, apreciados na Europa. No Brasil, as torras média e moderadamente escura são mais utilizadas (FAGAN et al., 2011; TOCI et al., 2006). O processo de torrefação promove mudanças consideráveis como a degradação de componentes menos estáveis, como os compostos fenólicos, e a interação de compostos mais reativos que formam novos compostos, como as melanoidinas e compostos voláteis. De fato, o café é provavelmente um dos alimentos mais alterados durante o processamento do ponto de vista da gama de componentes formados, refletindo em mudanças nas características sensoriais da bebida. O processo de extração para formar a infusão de café também é determinante no conteúdo de compostos finais, considerando que os componentes mais solúveis em água são preferencialmente extraídos (CLARKE; MACRAE, 1985; FARAH et al., 2005; DUARTE; PEREIRA; FARAH, 2010).

Estudos sobre a composição química do café revelam a presença de uma série de metabólitos primários e secundários (Tabela 1), dentre eles os carboidratos (especialmente celulose, arabinogalactanas, galactomananas e açúcares solúveis), lipídios e ácidos graxos (mirístico, palmítico, linoléico e linolênico), proteínas, taninos, compostos fenólicos, compostos nitrogenados e compostos resultantes de transformações bioquímicas promovidas pela torrefação, como as melanoidinas, compostos heterocíclicos, (CLARKE; MACRAE, 1985; FERNANDES et al.; KY et al., 2001; NASCIMENTO, 2006; TRUGO, 1985;).

Tabela 1 - Teores médios percentuais de compostos em grãos de cafés verde e torrado.

Metabólito	Café verde (%)	Café torrado (%)
Água	8-12	1-5
Açúcares solúveis	10	2
Celulose	24	25
Cafeína	1,1-4,5	1,1-4,5
Ácidos clorogênicos	7	2
Subst. nitrogenadas	12	2
Cinzas	4,1	4,5

Fonte: Nascimento (2006).

A água é um componente importante do café sendo seu conteúdo em torno de 10 a 12% (m/m) no café verde e de 1 a 5% (m/m) no café torrado. O café é capaz de reter água em camadas monomoleculares e polimoleculares, nas superfícies internas e externas, ou por capilaridade através de microporos e macroporos presentes na matriz (CLARKE; MACRAE, 1989). De acordo com a Portaria n° 337, de 26 de abril de 1999, para se obter uma bebida de qualidade o café torrado deve conter no máximo 5% de teor de umidade (BRASIL, 1999).

Os carboidratos constituem 50 a 60% do peso do grão de café verde, contendo grupos de polissacarídeos e açúcares de baixo peso molecular. Os principais polissacarídeos do café verde são os resíduos de holocelulose, termo designado para a celulose, em conjunto com demais polissacarídeos, sendo os polissacarídeos não celulósicos chamados de hemicelulose. Os principais polissacarídeos extraídos por infusão dos cafés verdes são as arabinogalactanas (62%), as galactomanas (24%) e glucanas, enquanto no café torrado encontram-se as galactomanas (69%) e arabinogalactanas (28%). Os polissacarídeos solúveis em água são componentes do café que desempenham papel importante na retenção de voláteis e contribuem para a viscosidade da infusão, conferindo o “corpo” à bebida de café (NUNES; COIMBRA, 2001; NUNES; BAPTISTA, 2001). A sacarose é o açúcar livre presente em maior concentração no café verde, sendo rapidamente perdida durante a torrefação, chegando a 100% de degradação na torra escura (CLARKE; MACRAE, 1989).

Os lipídios são outra classe de compostos importantes do café, considerando não apenas a quantidade em que se encontram no grão, mas também a composição desta fração. Relacionam-se à qualidade da bebida, à coloração do café verde e ao potencial de exploração industrial

do produto com outros fins que não a bebida (SALVA; LIMA, 2007). O conteúdo de lipídios nos grãos de café depende da espécie, sendo em torno de 15% no café arábica e de 10% no café robusta. Os triacilglicerídeos representam a maior porcentagem dos lipídios totais, cerca de 75%, havendo ainda a presença de ácidos graxos livres, com predomínio dos ácidos palmítico e linoleico. Diterpenos como o caveol e o cafestol, esteróis e tocoferóis também são encontrados (CLARKE; MACRAE, 1989). Com o processo de torrefação do café, os lipídios sofrem uma degradação oxidativa, gerando, componentes voláteis como aldeídos, álcoois alifáticos e aromáticos (TOCI et al., 2006).

A torrefação dos grãos de café desnatura e degrada as proteínas, exercendo papel importante na geração de pigmentos. Algumas proteínas reagem com carboidratos, através da reação de *Maillard*, que envolve a condensação do grupo carbonila de açúcares redutores com o grupo amino de aminoácidos ou proteínas, originando também compostos voláteis importantes para o aroma, como os pirróis, alquil-furanos, pirazinas e alquil-pirazinas, principalmente a partir de hidróxi-aminoácidos (TRUGO, 2001). Os aminoácidos livres podem ser degradados durante a torrefação, ou combinados com outros componentes, gerando uma mistura de complexos voláteis e não voláteis. A principal família de compostos voláteis gerada por esses açúcares são os furanos, que contribuem consideravelmente para as características sensoriais do café torrado (DE MARIA; MOREIRA; TRUGO, 1999).

Estudos realizados por Nascimento (2006) sobre o efeito da torrefação no pH de extratos aquosos de cafés indicaram valores dependentes do tipo de torrefação adotado, i.e., torra moderadamente clara ( $200\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 20$ , tempo 5 min), torra média ( $200\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 20$ , tempo 8 min) e torra moderadamente escura ( $200\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 20$ , tempo 10 min). Os valores são mostrados na Tabela 2 e revelam valores crescentes de pH em função do aumento do tempo de torrefação. O grau de acidez, determinado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 1999) para obtenção de bebida de melhor paladar, deve estar em torno do pH 4,95 e 5,20. O ligeiro aumento do pH verificado com a torrefação mais intensa é justificado pela decomposição de alguns ácidos orgânicos, como o ácido quínico que se decompõe em pirogalol, catecol e fenol, e pela redução de açúcares, diminuindo a acidez do café.

Tabela 2 - Os valores de pH de extratos aquosos obtidos à 25° C e a 96° C, a partir de cafés submetidos à distintos tipos de torra: clara, média e escura.

	<i>Torra clara</i>	<i>Torra média</i>	<i>Torra escura</i>
<b>Extrato 25 °C</b>	5,45	5,91	6,15
<b>Extrato 96 °C</b>	5,19	5,69	5,75

Fonte: Nascimento (2006).

Assim como no processo de torrefação, o processo de descafeinação também interfere no conteúdo de compostos do café, pois durante a extração da cafeína há perda de outros compostos. A descafeinação é realizada nos grãos crus inteiros, antes do processo de torrefação. A maioria dos métodos de descafeinação existentes utiliza solventes para extração da cafeína, como diclorometano, clorofórmio, álcool, acetona, água e outros, sendo o diclorometano o mais utilizado no Brasil. (TOCI et al., 2006). Os teores de glicídios e lipídios totais são pouco afetados pelos processos de descafeinação e torrefação, contudo, o conteúdo de proteínas sofre maior influência, que se reflete nas amostras torradas. O aumento do teor de lipídios observado após o processamento térmico, tanto nas amostras integrais como descafeinadas, deve-se à perda de massa ocasionada pela decomposição, lixiviação e volatilização de outras substâncias e a estabilidade térmica daqueles metabólitos. O conteúdo de sacarose é consideravelmente reduzido nos dois processos. Os distintos métodos de torrefação e descafeinação utilizados mundialmente devem ser comparados com o intuito de se identificar as menores perdas de compostos bioativos, precursores do sabor e potencial atividade biológica (TOCI et al., 2006).

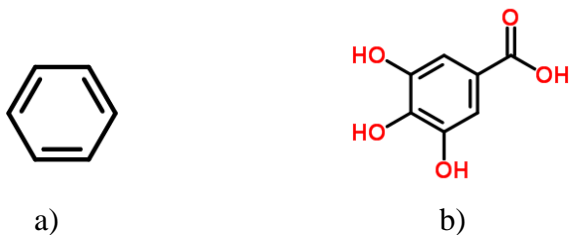
### 1.1.2.1 Compostos fenólicos do café

Os compostos fenólicos (ou polifenóis) são uma grande família de metabolitos secundários sintetizados pelas plantas e, conseqüentemente, estão presentes em alimentos e bebidas de origem vegetal. Atualmente, já foram identificados milhares de polifenóis naturais, apesar de só alguns estarem presentes em níveis significativos na dieta alimentar. Nas plantas, estes compostos têm diversas funções biológicas, sendo responsáveis pela cor, proteção contra a radiação ultra-violeta, defesa contra ataques microbiológicos e contra predadores, entre outras funções. Nos alimentos e bebidas de origem vegetal, os polifenóis são responsáveis pelas suas principais características sensoriais, nomeadamente propriedades do sabor (amargor e

adstringência), cor, odor e estabilidade oxidativa (NACZK; SHAHIDI, 2006).

O interesse nos polifenóis existentes nos alimentos, especialmente frutas, vegetais e bebidas derivadas de plantas, como por exemplo, cerveja, chá e vinho tinto, têm aumentado ao longo dos últimos anos devido a estarem associados aos benefícios para a saúde humana. Os polifenóis têm sido alvo de inúmeros estudos biológicos e epidemiológicos, sendo os antioxidantes naturais mais abundantes na dieta alimentar. Quimicamente, os polifenóis apresentam um ou mais anéis aromáticos (Figura 1) com um ou mais grupos hidroxilas, com uma grande diversidade estrutural compreendendo desde moléculas fenólicas simples até polímeros de elevado peso molecular. Os polifenóis geralmente são divididos em duas grandes famílias: os flavonóides e os não flavonóides (SOARES, 2012).

Figura 1 - Estrutura química de compostos fenólicos: a) estrutura básica = anel aromático; b) ácido gálico.



Fonte: ©Chemspider® (2017).

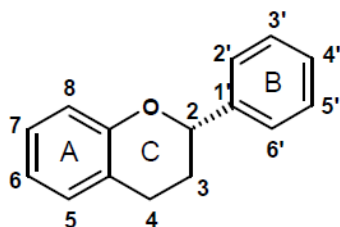
A classificação dos diversos compostos fenólicos é feita de acordo com o número de anéis aromáticos e grupos hidroxilas, compreendendo desde moléculas mais simples, como os ácidos cinâmicos e benzóicos, até estruturas mais complexas, como os taninos (SOARES, 2012). A maior parte dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares. Dentro dessa grande classe encontram-se compostos flavonóides (quercetina, miricetina, catequina, galocatequina, anthocianidina, genisteína) e compostos não flavonóides (ácidos fenólicos derivados dos ácidos cinâmico ou benzóico), ambos apresentando propriedades químicas e analíticas semelhantes e atividades biológicas em comum. Dentre os ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico destacam-se os ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico,



sináptico e os ácidos clorogênicos, um grupo derivado do ácido caféico. Dentre os ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico mencionam-se os ácido *p*-hidroxibenzóicos, gálico, protocatecuico e siríngico (FARAH; DONANGELO, 2006). Derivados de compostos fenólicos, e.g., os ácidos clorogênicos possuem marcada atividade antioxidante, sendo que estudos sugerem que doenças associadas a estresses oxidativos podem ser retardadas pela ingestão de antioxidantes naturais (SIMÕES et al., 2001). Os compostos fenólicos são termolábeis, ou seja, sofrem degradação sob elevadas temperaturas, reduzindo seus conteúdos através do processo de torrefação sofrido pelo café. No café, os compostos fenólicos contribuem de maneira altamente significativa no sabor e aroma do produto final, ocorrendo em concentrações elevadas, com destaque para os ácidos clorogênicos (CLIFFORD, 1985; FARAH et al, 2005; DUARTE; PEREIRA; FARAH, 2010). Os compostos não flavonóides são uma vasta família de compostos, sendo, sobre tudo, moléculas simples, como ácidos benzóicos, ácidos cinâmicos e estilbenos, mas incluem também moléculas mais complexas derivadas destes, nomeadamente galotaninos e elagitaninos. Os ácidos benzóicos e cinâmicos são ácidos fenólicos que se encontram principalmente em formas conjugadas (SOARES, 2012).

Os flavonóides são os polifenóis mais relevantes nos alimentos, sendo também os mais diversificados estruturalmente. Atualmente já foram descritos mais de 4.000 flavonóides e esta listagem continua a crescer. As diferentes classes de flavonóides (flavonas, isoflavonas, flavonóis, flavononas, chalconas, antocianinas) diferem entre si no grau de oxidação e padrão de substituição do anel que liga os dois anéis aromáticos (A e B) que compõem sua estrutura básica (Figura 2), o anel heterocíclico pirano (C). Além disso, dentro de uma classe, os compostos diferem entre si no número e posição dos grupos hidroxila, metoxila e glicosila (SOARES, 2012).

Figura 2 - Estrutura química do núcleo flavânico. A e B – anéis aromáticos, C – anel heterocíclico.



Fonte: ©Chemspider® (2017).

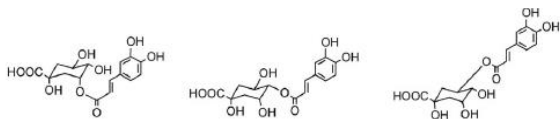
Os taninos representam um grupo de compostos fenólicos heterogêneo, sendo este termo inicialmente usado para descrever compostos de origem vegetal responsáveis pela conversão das peles de animais em couro, através da formação de complexos estáveis entre esses compostos e o colágeno da pele animal. Dentre as definições para taninos, considera-se que taninos são compostos fenólicos solúveis em água, com peso molecular situado entre 500 e 3.000 Daltons, que possuem a propriedade de formar complexos insolúveis com alcalóides, gelatina e outras proteínas (JOSLYN; GOLDSTEIN, 1964). Contudo, esta definição não se mostra completa, pois têm sido descobertos taninos com pesos moleculares muito elevados, na ordem das dezenas de milhares de daltons (PRIEUR et al., 1994). A propriedade de complexar e precipitar proteínas é duplamente a origem de atributos positivos e negativos atribuídos a estes compostos. Por um lado, é aceito que a interação dos taninos com as proteínas salivares está na origem da sensação de adstringência, que poderá ser, numa certa dose, atributo positivo da qualidade de certas bebidas, como o vinho tinto, cerveja e chá. (MCRAE; KENNEDY, 2011). Por outro lado, a interação dos taninos com enzimas digestivas pode inibi-las, originando problemas gastrointestinais e a diminuição do ganho de peso corporal (GONÇALVES et al., 2007). Classicamente, os taninos são divididos em dois grandes grupos: os taninos condensados (proantocianidinas), que são oligômeros de catequinas; e os taninos hidrolisáveis, que são ésteres de monossacáridos com ácido gálico ou oligômeros de ácido gálico/elágico. Os taninos condensados são mais frequentes na alimentação do que os hidrolisáveis, estando presentes em concentrações significativas no chocolate, frutas e bebidas derivadas (SCALBERT; WILLIAMSOM, 2000). Os taninos condensados podem diferir nas

unidades constituintes, posições das ligações interflavânicas, comprimento da cadeia e presença de substituintes, o que se traduz numa diversidade muito elevada de compostos. Os taninos hidrolisáveis estão presentes, sobretudo, nas partes não comestíveis das plantas. No entanto, estes compostos podem ser introduzidos na dieta alimentar devido a operações tecnológicas de transformação dos alimentos. (SOARES, 2012).

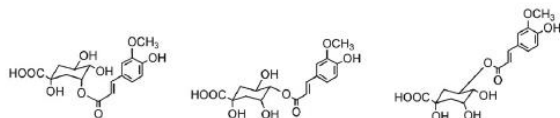
#### 1.1.2.1.1 Ácidos clorogênicos

O ácido clorogênico (CGA), possivelmente, teve seu primeiro relato em 1837 nos estudos de Robiquet e Boutron, mas o termo em si parece ter sido introduzido em 1846, por Payen, para designar um composto fenólico com função ácida, de estrutura ainda desconhecida, que conferia cor verde ao meio aquoso. Esse ácido foi isolado na forma de um complexo cristalino, denominado clorogenato de cafeína, a partir do qual se preparou um ácido puro. Atualmente, o termo CGA é usado para designar uma família de ésteres formados pela esterificação de um ou mais derivados do ácido *trans*-cinâmico (ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico) com o ácido quínico (ácido 1L-1(OH),3,4,5- tetra-hidroxíciclohexanóico). Esses compostos fenólicos podem ser subdivididos pela identidade do derivado do ácido cinâmico, número e posição dos resíduos acila. As formas majoritárias, encontradas na natureza são os ácidos 3,4,5 cafeoilquínico; 3,4,5 feruloilquínico e 3,4 - 3,5 - 4,5 dicafeoilquínico, cujas estruturas são demonstradas na Figura 3 (DE MARIA; MOREIRA, 2004).

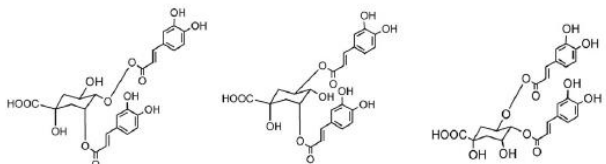
Figura 3 - Fórmulas estruturais dos principais ácidos clorogênicos encontrados na natureza.



ácido 3-cafeoilquínico    ácido 4-cafeoilquínico    ácido 5-cafeoilquínico



ácido 3-feruloilquínico    ácido 4-feruloilquínico    ácido 5-feruloilquínico



ácido 3,4-dicafeoilquínico    ácido 3,5-dicafeoilquínico    ácido 4,5-dicafeoilquínico

Fonte: Stalmach et al. (2006).

Os ácidos clorogênicos e compostos relacionados são os principais componentes da fração fenólica dos grãos de café, sendo responsáveis pela pigmentação e adstringência da bebida café. (FARAH et al., 2006a, 2006b; FARAH; DONANGELO, 2006). Os ácidos clorogênicos são uma família de compostos fenólicos, solúveis em água que geram, durante a torrefação, uma série de compostos fenólicos de baixa massa molar e compostos aromáticos, que apresentam características sensoriais bem variadas; similares a odores de especiarias, como cravo, assim como o amargor e a adstringência, desejáveis para compor a qualidade da bebida, possuindo também ampla atividade biológica (DUARTE; PEREIRA; FARAH, 2010; TOCI et al., 2006; MONTEIRO; FARAH, 2012; MURTHY; NAIDU, 2012; MUSSATTO et al., 2011). Esses compostos são metabólitos vegetais que desempenham importantes funções na planta, e.g., resposta de defesa a patógenos, atração por polinizadores e proteção contra estresses abióticos, como mudanças de temperatura, exposição à radiação UV e deficiência de minerais (FARAH, 2009).

Durante o processamento do café, os ácidos clorogênicos podem ser parcialmente isomerizados, hidrolizados, ou degradados a compostos de baixo peso molecular. As altas temperaturas no processo de

torrefação produzem derivados lactônicos pela perda de uma molécula de água a partir do ácido quínico e a formação de uma ligação éster intramolecular (FARAH et al., 2005; PERRONE et al., 2008; PERRONE; FARAH; DONANGELO, 2012). Fatores genéticos, fisiológicos e ambientais, assim como as condições de processamento dos grãos verdes influenciam a composição de CGAs do café (STALMACH, 2006). Nos últimos anos, uma série de benefícios para a saúde humana têm sido associados ao consumo de ácidos clorogênicos, como a redução da incidência de diabetes tipo 2 (RANHEIM; HALVORSEN, 2005; SHEARER et al., 2003, 2007) e da doença de Alzheimer (LINDSAY et al. 2002).

O café é a principal fonte alimentar de ácidos clorogênicos para muitas pessoas. Embora o ácido clorogênico seja hidrolisado por ação de enzimas bacterianas, este também pode ser absorvido na forma intacta. Pesquisa realizada por Stalmach e colaboradores (STALMACH; WILLIAMSON; CROZIER, 2014) verificaram absorção do ácido caféico e do ácido clorogênico no plasma e urina, em humanos. Estudos sobre a biodisponibilidade dos ácidos clorogênicos revelaram que o ácido cafeoilquínico e dicafeoilquínico são absorvidos e/ou metabolizados ao longo do trato gastrointestinal. Foram identificados compostos de ácidos clorogênicos intactos e seus metabólitos, tais como os ácidos sinápico, p-hidroxibenzóico, e dihidrocafeoilquínico em urina humana (DUARTE; FARAH, 2010, 2011; FARAH et al., 2008; OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001). O aproveitamento destes fitoquímicos pelo organismo pode ser otimizado pela clivagem do ácido clorogênico mediante ação de esterases da mucosa do intestino grosso e do metabolismo da flora microbiana. De fato, o ácido caféico, liberado pela clivagem enzimática do ácido clorogênico, e seus metabólitos produzidos pela flora intestinal são facilmente absorvidos pelo intestino grosso e podem ser metabolizados pelo fígado (MONTEIRO, 2007; MONTEIRO; MARQUES; FARAH, 2010; SCALBERT; WILLIAMSON, 2000).

#### 1.1.2.2 Compostos nitrogenados

O termo “compostos nitrogenados” refere-se a todos os compostos que contém nitrogênio. Dentre os compostos nitrogenados do café encontram-se a cafeína, a trigonelina, o ácido nicotínico, as proteínas e os aminoácidos livres, sendo a cafeína o alcalóide mais expressivo nos grãos de café.

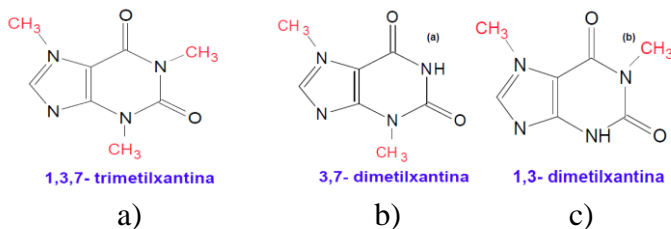
As plantas produzem dois tipos de alcalóides a partir de nucleotídeos: os alcalóides purínicos como a cafeína (1,3,7-*N*-trimetilxantina), a teobromina (3,7-*N*-dimetilxantina) e a teofilina (1,3-*N*-dimetilxantina) e o alcalóide piridínico trigonelina (ácido 1-*N*-metilnicotínico), representados nas Figuras 4 e 5 (ASHIHARA; SANO; CROZIER, 2008).

A cafeína é o alcalóide mais popularmente conhecido e estudado por suas atividades psicoativas, sendo o composto majoritário da bebida café, estando também presente no mate (*Ilex paraguariensis*) e em alguns chás (ASHIHARA; CROZIER, 2001; NASCIMENTO, 2006). Muitos estudos têm sido realizados sobre os efeitos fisiológicos desta substância, resultando, em amplas discussões sobre seus efeitos positivos ou negativos, sendo difícil chegar-se à um consenso. Enquanto alguns estudos relacionam o consumo de café à incidência de doenças coronarianas e câncer (KAWACHI et al., 1994; LA VECCHIA, 1993), outros estudos correlacionam seu consumo à diminuição do risco de suicídios e da incidência de cirroses, ao aumento do estado de alerta, à diminuição da fadiga e à melhora do estado de espírito. Tal dicotomia acaba por acarretar aumento do consumo de café descafeinado, muitas vezes por aconselhamento médico. Shlonsky e colaboradores (2003) traçaram o perfil dos consumidores de café descafeinado, e as análises dos dados revelaram que as pessoas que consomem café descafeinado o fazem devido a algum tipo de doença, principalmente cardiovascular, ou simplesmente porque procuram um estilo de vida mais saudável, com baixa incidência de tabagismo, baixo consumo de bebidas alcoólicas e cafeinadas e aumento do consumo de medicamentos para prevenir doenças (SHLONSKY; KLATSKY; ARMSTRONG, 2003).

A cafeína é um composto solúvel em água, sendo encontrada nas plantas na forma livre, ou combinada com taninos fracamente ácidos. Na natureza, avalia-se que a cafeína oferece proteção às plantas, agindo como um agente alelopático e anti-herbivoria (CHEN et al., 2008). A cafeína é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, especialmente quando da ingestão de bebidas quentes em relação às frias. A razão para isso é atribuída à diminuição da taxa de fluxo sanguíneo dentro do intestino pela bebida fria, diminuindo o potencial de absorção. A cafeína se dispersa por todo o corpo, penetra nas membranas, barreira hematoencefálica e placenta, não se acumulando nos tecidos ou órgãos (CHEN; PARRISH, 2008; CHOU, 1992; TEMPLE, 2009). Em apenas 15-20 minutos após a ingestão oral, observa-se o pico plasmático de concentração. O uso de anticoncepcionais, as doenças crônicas e a gravidez aumentam o metabolismo da cafeína, enquanto que doenças

hepáticas o retardam. A cafeína é degradada à teofilina no fígado. Apenas 2% a 3% da cafeína são excretadas na urina inalterada (CHOU, 1992). Comparativamente a cafeína, a teobromina e teofilina têm meias-vidas mais longas (GROSSO; BRAKEN, 2005).

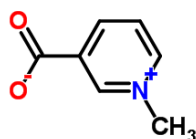
Figura 4 - Fórmulas estruturais: a) cafeína (1,3,7- trimetilxantina), b) teobromina ( 3,7-dimetilxantina) e c) teofilina ( 1,3-dimetilxantina).



Fonte: ©Chemspider® (2017).

A trigonelina, alcalóide derivado da piridina (Figura 5), foi isolada pela primeira vez da espécie *Trigonella foenum-graecum*, em 1885, por Jonhs e colaboradores (JOSHI; HANDLER, 1960). Posteriormente, foi identificada em várias espécies vegetais e em alguns animais como, por exemplo em ouriços-do-mar e águas-vivas. Os teores de trigonelina no café encontram-se em torno de 0,8 a 1,1% (m/m), sendo também importantes para a composição do aroma e sabor da bebida. As perdas de trigonelina podem variar de 50 a 100%, de acordo com o grau de torrefação, transformando-se em produtos voláteis, piridinas e niacina. Em 1984, Trugo e Macrae mostraram a relação entre a degradação da trigonelina e a geração de niacina, em função do tempo de torrefação. A niacina é também conhecida como vitamina B3, cujos estudos demonstram ser eficaz na redução do colesterol (NASCIMENTO, 2006).

Figura 5 - Fórmula estrutural da trigonelina.



Fonte: ©Chemspider® (2017).

### 1.1.2.3 Compostos resultantes da torrefação

#### 1.1.2.3.1 *Melanoidinas*

A maior parte dos alimentos industrializados sofre processamento térmico antes de serem consumidos, o que garante a segurança microbiológica, a inativação de algumas enzimas, a degradação de substâncias tóxicas e, algumas vezes, o desenvolvimento de substâncias aromáticas, colorações e a melhora da palatabilidade. As substâncias que se formam após o processamento térmico são genericamente denominadas “produtos da reação de Maillard”, reação que ocorre durante o processamento térmico em alimentos que contêm proteínas e açúcares redutores (SOMOZA, 2005). Esses novos compostos formados são biologicamente ativos e podem resultar em benefícios à saúde, por apresentarem atividades antioxidantes, prebiótica (componentes alimentares não digeríveis que estimulam seletivamente a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no intestino) e quimio preventiva. Contudo, podem também interferir em processos nutricionais importantes, diminuindo a biodisponibilidade de minerais e o valor biológico de proteínas, pelo comprometimento da atividade de enzimas digestivas.

As melanoidinas são genericamente definidas como compostos castanhos de alto peso molecular, que contêm nitrogênio (LEDL; SCHLEICHER, 1990) e que possuem caráter aniônico. São polímeros hidrosolúveis que representam importantes componentes da bebida café, pois desempenham papel no desenvolvimento do aroma e sabor (NUNES; COIMBRA, 2003). Durante a torrefação do café, parte de seus compostos fenólicos são convertidos às melanoidina. A diversidade de componentes químicos do café não torrado, tais como a sacarose, os polissacarídeos, os aminoácidos, as proteínas e os ácidos clorogênicos, contribui à complexidade e heterogeneidade química das melanoidinas presentes neste alimento. O interesse sobre estes compostos tem aumentado devido ao seu efeito antioxidante, cujos mecanismos baseiam-se na habilidade de reduzir hidroperóxidos em produtos não radiculares, sequestrar radicais hidroxilas, quebrar a cadeia de radicais pela doação de um hidrogênio e quelar metais formando complexos inativos (DELGADO-ANDRADE; RUFÍÁN-HENARES; MORALES, 2005; MONTEIRO; TRUGO, 2005).



### 1.1.2.3.2 Compostos voláteis

Os compostos voláteis do café são o grupo de substâncias responsáveis pelo seu aroma. O aroma atraente e popularmente conhecido do café é produzido somente durante o processo de torrefação dos grãos de café *in natura* devido à presença de metoxi-pirazinas que são degradadas pelo calor. O interesse em identificar os compostos responsáveis pelo aroma do café torrado sempre motivou o estudo de seus compostos voláteis, principalmente a partir da década de 80 quando houve grande intenção em identificar o composto de maior impacto no potencial odorífero do café (DE MARIA; MOREIRA; TRUGO, 1999).

Os principais compostos voláteis do café são os compostos heterocíclicos, que têm sido descritos na literatura como também presentes em vários alimentos processados, sendo eles: pirróis, furanos, tiazóis, tiofenos, piridinas, pirazinas, oxazol, tiobutirolactona, caveofurano, 2-furil-sulfeto de metila, 2-tio-hidroxi-metil-furano, e outros compostos de baixo peso molecular que conferem odor e sabor a alimentos torrados, apresetando também atividade antioxidante (DE MARIA; MOREIRA; TRUGO, 1999; TRUGO et al., 2001).

Além dos compostos heterocíclicos, existem vários outros compostos na fração volátil do café. Esses compostos, aqui classificados como alifáticos, alicíclicos e aromáticos, normalmente são encontrados em baixas concentrações, o que dificulta seu estudo quantitativo e a avaliação de suas propriedades sensoriais. Desse grupo de compostos podemos destacar os fenóis, aldeídos, cetonas, álcoois, éteres, hidrocarbonetos, ácidos orgânicos, anidridos, ésteres, lactonas, aminas e compostos contendo átomos de enxofre, como sulfetos e dissulfetos (MOREIRA; TRUGO; DE MARIA, 2000; TOCI, 2015).

## 1.2 RADICAIS LIVRES, ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES

O termo radical livre refere-se a átomo ou molécula que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, deixando-o desemparelhado. Este não emparelhamento de elétrons na última camada orbital confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas. Um radical livre é definido como qualquer espécie química capaz de existência independente (daí o termo "livre") e que contém um ou mais elétrons não emparelhados. Por esse motivo, os radicais livres são reduzidos através da reação com outras moléculas e assim se tornarem estáveis. A maioria dos radicais livres deriva do metabolismo do O<sub>2</sub>,

sendo comum utilizar o termo ERMOS (espécie reativa do metabolismo do oxigênio) (Tabela 3).

Tabela 3 - Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nas formas de radicais e não radicais.

Radicais		Não-Radicais	
<b>Superóxido</b>	$O_2^{\cdot-}$	<b>Peróxido de hidrogênio</b>	$H_2O_2$
<b>Hidroxila</b>	$OH^{\cdot}$	<b>Ácido hipocloroso</b>	$HOCl$
<b>Peroxila</b>	$RO_2^{\cdot}$	<b>Ozônio</b>	$O_3$
<b>Alcoxila</b>	$RO^{\cdot}$	<b>Oxigênio singlete</b>	$^1O_2$
<b>Hidroperoxila</b>	$HO_2^{\cdot}$	<b>Oxigênio triplete</b>	$R_2C=O_3$
<b>Óxido Nítrico</b>	$NO^{\cdot}$	<b>Hidroperóxido</b>	$ROOH$
<b>Hipoclorito</b>	$ClO^{\cdot}$	<b>Peróxidos lipídicos</b>	$COOH^{\cdot}$
<b>Glutationil</b>	$GS^{\cdot}$	<b>Peroxinitrito</b>	$ONOO-$
<b>Fenoxil</b>	$C_6H_5O^{\cdot}$		
<b>Triclorometila</b>	$CCl_3^{\cdot}$		
<b>Radical peroxil</b>	$ROO^{\cdot}$		

Fonte: Adaptado de Halliwell (1992).

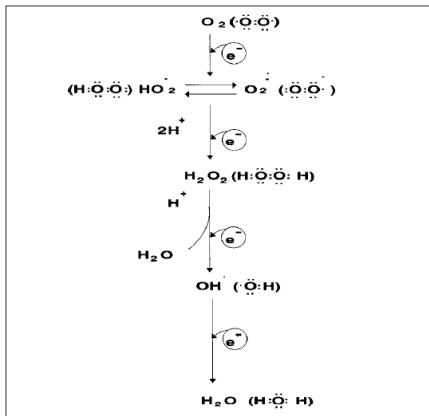
Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERMOS, porém a membrana é um dos mais atingidos, afetando sua estrutura, permeabilidade, seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos, como o malonaldeído, eventualmente levando à morte celular. Devido ao alto potencial para danificar sistemas biológicos vitais, as espécies reativas tem sido apontadas no processo de envelhecimento e em mais de 100 estados patológicos, como carcinogênese, doenças de Parkinson e Alzheimer, catarata, diabetes mellitus, processos inflamatórios e doenças autoimunes (AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993; DAGLIA et al., 2000; HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992). Contudo, nem sempre a peroxidação lipídica é prejudicial, pois seus produtos são importantes na resposta inflamatória, assim como na proliferação celular. As ERMOS atuam na defesa contra a infecção, quando neutrófilos são estimulados a produzir espécies reativas com a finalidade de destruir microrganismos no leito de uma lesão. O estímulo aos neutrófilos não pode ser exacerbado, sendo uma ação regulada por sistemas de defesa antioxidantes. A falha destes sistemas poderá levar ao excesso de espécies reativas causando lesões oxidativas prejudiciais aos tecidos.

De fato, a produção de espécies reativas, incluindo radicais livres, é parte integrante do metabolismo humano. As espécies reativas são produzidas em condições normais do metabolismo aeróbico, resultantes de diversos processos bioquímicos mediados pela ação de oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, desidrogenases, peroxidases, bem como pela presença de metais de transição no meio intracelular e também por macrófagos ativados (HALLIWELL, 1992).

Na busca de estabilidade, os radicais livres reagem com proteínas, carboidratos, ácidos nucléicos e lipídios da membrana formando espécies radicalares em cadeia. A propagação em cadeia dos radicais livres intensifica o dano, prejudicando a funcionalidade celular (SU et al., 2007).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o  $O_2$  sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de  $H_2O$ . Durante esse processo, são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ) e hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), e também o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Normalmente, a redução completa do  $O_2$  ocorre na mitocôndria e a reatividade das ERMO é neutralizada com a entrada de quatro elétrons (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), conforme demonstrado na Figura 6.

Figura 6 - Redução tetravalente do oxigênio molecular ( $O_2$ ) na mitocôndria até a formação de água ( $H_2O$ ). Várias espécies reativas de  $O_2$  são formadas ao longo do processo.



Fonte: Ferreira; Matsubara (1997).

O radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) pode ser escrito como  $O_2^{\cdot-}$  ou  $O_2^-$ , sendo formado após a primeira redução do  $O_2$ . O radical superóxido ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. Tem sido observadas lesões biológicas secundárias em sistemas geradores de  $O_2^{\cdot-}$ , seja enzimático, fagocítico ou químico, apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986).

O radical hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ) representa a forma protonada do radical superóxido. Existem evidências de que o hidroperoxila é mais reativo que o superóxido, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas. O radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) é considerado a ERMOM mais reativa em sistemas biológicos. A combinação extremamente rápida do  $OH^{\cdot}$  com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Assim, se o radical hidroxila for produzido próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, o radical hidroxila pode inativar várias proteínas (enzimas e de membrana celular, por exemplo) ao oxidar seus grupos sulfidrila (-SH) a pontes dissulfeto (-SS). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados de membranas celulares (lipoperoxidação) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, é um metabólito extremamente deletério. O  $H_2O_2$  é capaz de atravessar camadas lipídicas e reagir com proteínas ligadas ao  $Fe^{++2}$ . Assim, é altamente tóxico para as células, uma característica que pode ser aumentada de dez para mil vezes quando em presença de ferro, como ocorre, por exemplo, na hemocromatose transfusional. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986).

A peroxidação lipídica é o processo através do qual os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolípidios das membranas celulares são desintegrados, liberando ácidos graxos não saturados, podendo resultar em: ruptura das membranas, mutações do DNA, oxidação dos lípidios insaturados, formação de resíduos químicos, comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina). Na busca de estabilidade, os radicais livres reagem com proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e lípidios da membrana formando espécies radicalares em cadeia. A propagação em cadeia dos radicais livres intensifica o dano prejudicando a funcionalidade celular (SU et al., 2007).

Os possíveis danos oxidativos que podem ser causados pela reatividade são modulados por muitos fatores, incluindo a composição do substrato, a concentração de oxigênio e a ação pró-oxidante. As respostas celulares as ERMOS dependem da concentração e da duração da exposição, bem como do tipo de célula. Como moléculas sinalizadoras, os ERMOS modulam processos fisiológicos, incluindo proliferação e diferenciação celular, defesa do hospedeiro contra patógenos, e cicatrização de feridas (SIES, 2014).

O desequilíbrio homeostático entre a produção de espécies reativas e os sistemas de defesa antioxidantes é o que determina o grau do estresse oxidativo. A elevada produção de espécies reativas pode resultar em danos às proteínas, aos lipídios e ao DNA celular, enquanto a baixa produção pode interromper os efeitos fisiológicos necessários dos oxidantes importantes na sinalização e regulação da proliferação celular e defesa do organismo (SOARES, 2002).

Os sistemas de defesa antioxidantes, em sistemas aeróbicos são essenciais ao equilíbrio homeostático, pois modulam a interferência das ERMOS. Conforme citado anteriormente, esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do  $O_2$  e também em situações não fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta de  $O_2$ . Para proteger-se, a célula possui sistemas de defesa que pode atuar como detoxificador, antes que a lesão ocorra, como, por exemplo, através da ação de sistemas enzimáticos (Figura 7) como a catalase (CAT), superóxido-dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GSH-Px) e também pela vitamina E. Há também, um sistema de defesa que tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, glutationa reduzida (GSH), glutationa-redutase (GSH-Rd) e GSH-Px, entre outros. Com exceção da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes ocorre no meio intracelular, sendo de natureza polar (HEBBEL, 1986 apud FERREIRA; MATSUBARA, 1997; YU, 1994).

Existem várias evidências da atividade protetora dos componentes do sistema antioxidante. As lesões de reperfusão pós-isquemia de coração, rim, fígado e intestino são prevenidas por SOD, catalase ou alopurinol, sendo este último um bloqueador da produção de  $O_2^{\cdot -}$ , pela via da xantina-oxidase. A glutationa reduzida (GSH, L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina) está presente na maioria das células, sendo sua capacidade redutora determinada pelo grupamento -SH. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da

exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico,  $O_3$ , e radiação UV, sendo requerida também para a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas. Após exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG. A recuperação da GSH é feita pela enzima glutathiona redutase, GSH-Rd, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular. Habitualmente, a reserva intracelular de GSH-Rd é alta e somente uma grave deficiência desta enzima resultará em sinais clínicos. A GSH-Rd é uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) e, portanto, também dependente da integridade da via das pentoses. Sob condições de diminuição do fornecimento de NADPH, como no jejum e na deficiência de glucose- 6-fosfato desidrogenase (G6PD), há prejuízo da função da GSH-Rd. Por sua vez, a glutathiona-peroxidase (GSH-Px) catalisa a redução do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e peróxidos orgânicos a seus correspondentes alcoóis, às custas da conversão da GSH a GSSG. Embora a GSH-Px tenha ação fundamentalmente citosólica, *in vitro* ela é capaz de reduzir hidroperóxidos de membrana (SHAN; AW; JONES, 1990).

Na inativação de um agente oxidante ocorre produção de GSSG e depleção de GSH. Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, haverá recuperação da GSH. Entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo. Assim, a magnitude do estresse oxidativo pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH. O excesso de GSSG resulta em ambiente mais oxidante, que favorece a formação de pontes dissulfeto (-SS-) nas proteínas portadoras de grupamento tiol (-SH). As pontes dissulfeto oxidam estas proteínas, com prejuízo de suas funções. Esta oxidação é reversível à custa da ação de compostos antioxidantes, como a GSH (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

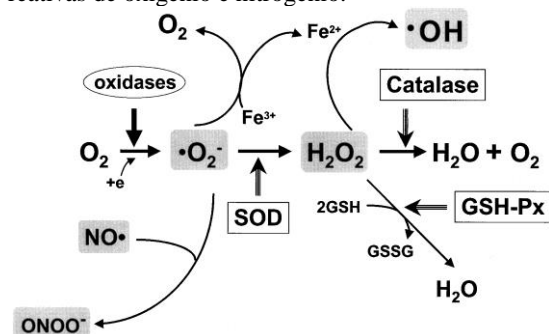
A catalase é uma heme proteína citoplasmática que catalisa a redução do  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$ . Sua atividade é dependente de NADPH. A suplementação de catalase exógena previne a oxidação da GSH mediada pelo  $H_2O_2$ , em eritrócitos humanos normais, e também inibe as lesões oxidativas do DNA de timo de carneiros submetidos à sobrecarga de  $Fe^{+++}$ . Em modelo de estresse oxidativo decorrente de agressão térmica, os eritrócitos exibem diminuição da atividade da catalase durante o processo hemolítico termodependente (YU, 1994).

A superóxido-dismutase (SOD) corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD. A forma SOD-cobre-

zincó está presente principalmente no citossol, enquanto que SOD-manganês localiza-se primariamente na mitocôndria. Esta enzima também tem papel antioxidante, catalisando a dismutação do radical superóxido em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$ , na presença do próton  $\text{H}^+$  (YU, 1994).

Além dos antioxidantes enzimáticos, a vitamina E confere proteção à membrana celular por atuar como quelante dos oxidantes produzidos durante a lipoperoxidação. É um importante antioxidante lipofílico, mas esta função poderá estar limitada em situações de sobrecarga de ferro (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; YU, 1994).

Figura 7 - Mecanismos antioxidantes enzimáticos e a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.



Fonte: Griendling; Fitzgerald (2003).

O antioxidante é um composto que, em baixas concentrações, protege os sistemas biológicos contra os potenciais efeitos nocivos dos processos ou reações que podem causar oxidação excessiva. Estes compostos podem agir sinergicamente devido às diferenças na reatividade com os diferentes oxidantes, gerando assim uma melhor proteção em combinação, comparativamente ao efeito individual, sendo que o sinergismo pode ser também devido à interação direta entre os antioxidantes. Estudos de Pitz e colaboradores comprovaram *in vitro* que extratos de jacobina (*Plinia peruviana*) apresentaram potente efeito citoprotetor contra o estresse oxidativo promovido por peróxido de hidrogênio em fibroblastos (PITZ et al., 2016). A compreensão dos mecanismos envolvidos e os fatores que influenciam a atividade de antioxidantes naturais possuem valor significativo para o desenvolvimento de tais antioxidantes (ABDALLA; ROOZEN, 1999). Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples à biosistemas complexos, por meio de dois principais mecanismos: inibição da formação de radicais livres que

possibilitam a etapa de iniciação; ou eliminando radicais importantes na etapa de propagação, através da doação de átomos de hidrogênio àquelas espécies químicas, interrompendo a reação em cadeia (SIMIC; JAVANOVIK, 1994). Antioxidantes de natureza fenólica, como aqueles encontrados no café, funcionam como sequestradores de radicais e, algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (FENNEMA, 2000; KRUPKOVA et al., 2016; PAVLIC; GEBHARDT, 2005; NATELLA, 2002; VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2011).

### 1.3 PELE

O ser humano possui três interfaces de contato com o meio ambiente: as mucosas do trato gastrointestinal, do trato pulmonar e a pele. A pele recobre todo o corpo, estando em continuidade com as membranas mucosas dos lábios, do ânus, do nariz, das finas bordas das pálpebras e dos orifícios externos do sistema urogenital. A pele é o maior órgão do corpo humano, representando cerca de 15% do peso corporal. Apresenta múltiplas funções para manutenção da saúde e bem-estar, assim como sua aparência tem impacto significativo sobre a auto-estima e socialização pessoal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; ISAAC et al., 2010).

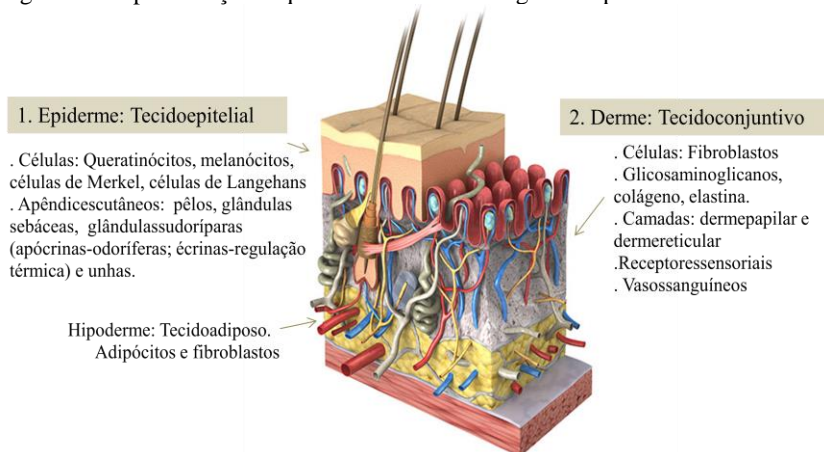
#### 1.3.1 Estrutura

Estruturalmente a pele é composta por duas camadas, uma camada externa formada por tecido epitelial pavimentoso estratificado queratinizado, de origem ectodérmica: a epiderme. A segunda camada, mais profunda e espessa, de tecido conjuntivo, tem origem mesodérmica e denomina-se derme (Figura 8). Apêndices como pêlos e glândulas são derivados da epiderme, mas penetram profundamente na derme. Abaixo e em continuidade à derme está a hipoderme que, embora tenha a mesma origem da derme, não faz parte da pele, apenas lhe serve de suporte e união com os órgãos subjacentes. A epiderme e a derme estão interligadas através das interdigitações das cristas epidérmicas e papilas dérmicas, que são separadas por uma membrana basal. As impressões digitais são evidências externas dessas interdigitações. A camada basal da epiderme a conecta com a derme através de proteínas integrinas, sendo um nicho de células-tronco epidermais da pele. As células-tronco epidermais são as responsáveis pela atividade proliferativa e pela formação das diversas camadas de queratinócitos na epiderme. Os



queratinócitos estão distribuídos em camadas distintas, decorrentes de alterações do processo de diferenciação das células-tronco epidermais em células maduras queratinizadas. A estrutura da pele e o seu comportamento diferem de acordo com a sua localização no nosso corpo (GARTNER; HIATT, 2002; JEREMIAS, 2013).

Figura 8 - Representação esquemática da estrutura geral da pele.



Fonte:©BASF®. Disponível em:<<http://www.skin-care-forum.basf.com>>. Acesso em agosto de 2016.

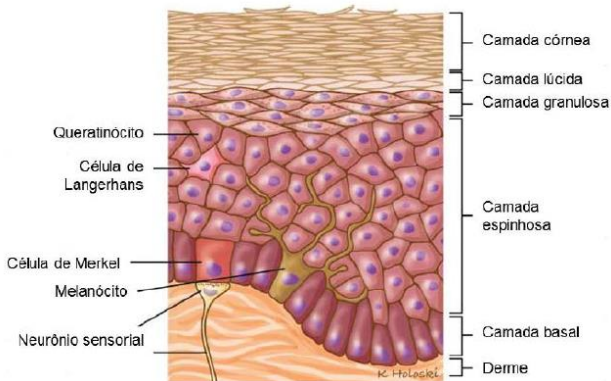
### 1.3.1.1 Epiderme

A epiderme tem espessura variável, de acordo sua localização no corpo, podendo ser muito delgada, em torno de 0,05 mm na face, ou espessa, em torno de 1,5 mm na palma da mão. Nesta última e na sola do pé, a pele é lisa, sem pêlos, com espessa camada de queratina, apresentando muitas glândulas sudoríparas. No restante do corpo, a pele apresenta pelos e camada mais fina de queratina. A epiderme não possui sistema de irrigação sanguínea direta, sendo os nutrientes transportados por capilaridade (GARTNER; HIATT, 2002).

A epiderme é composta por quatro tipos celulares: queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. Os queratinócitos, responsáveis pela produção de queratina, são as mais numerosas e derivam dos nichos de células tronco epidermais da camada basal. Os melanócitos, derivados das células da crista neural, são responsáveis pela produção de melanina, que é sintetizada em

organelas especializadas, denominadas melanossomas. Os melanócitos, segundo tipo celular mais freqüente na epiderme, se localizam intercalados entre os queratinócitos da camada basal (Figura 9), possuindo longos e delgados prolongamentos citoplasmáticos que se estendem nos espaços intercelulares entre as células da camada espinhosa, estando também presentes nos folículos pilosos e na derme. As células de Langerhans (células dendríticas) são derivadas da medula óssea, localizam-se principalmente na camada espinhosa e atuam como células apresentadoras de antígeno na resposta imune. As células de Merkel, derivadas de células da crista neural, estão intercaladas entre as células da camada basal e juntamente com os terminais dos neurônios sensoriais, formam as terminações nervosas de Merkel, adaptando mecanorreceptores cutâneos – receptores de toque, que são abundantes nas pontas dos dedos (SZEDER et. al., 2002).

Figura 9 - Representação esquemática das cinco camadas de queratinócitos e demais células que compõem a epiderme.

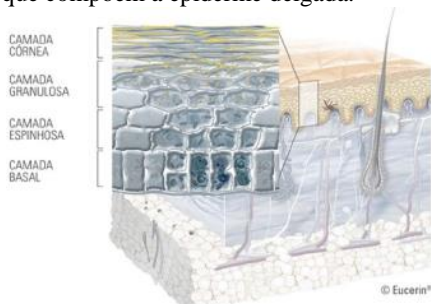


Fonte: Holoski (2015).

Os queratinócitos estão distribuídos linearmente em camadas morfológicamente distintas, cujas alterações são decorrentes da diferenciação das células troncos epidermais, presentes na camada basal. Durante o processo de maturação, os queratinócitos passam por algumas transformações como perda de atividade mitótica, síntese de novas organelas a partir da camada espinhosa, remodelagem da arquitetura observada pela variação morfológica das células e grau de compactação das camadas, modificações na membrana e síntese de novos lipídios e proteínas (JEREMIAS, 2013; HARRIS, 2016). A pele delgada difere da espessa porque apresenta somente três ou quatro camadas de

queratinócitos, diferentemente da pele espessa que pode apresentar até 5 camadas, conforme pode ser visto na Figura 10 (GARTNER; HIATT, 2002).

Figura 10 - Representação esquemática das quatro camadas de queratinócitos que compõem a epiderme delgada.



Fonte: ©Eucerin®. Disponível em: <http://www.eucerin.pt/sobre-a-pele/conhecimentos-basicos-da-pele>. Acesso em agosto de 2016.

A camada basal é composta por células em processo de diferenciação a partir das células tronco epidermais. As células tronco epidermais são estimuladas a se diferenciar de acordo com a necessidade da pele, como por exemplo num processo que exija a recuperação do tecido. Na camada basal há estruturas responsáveis pela ancoragem da epiderme, os hemidesmossomos, compostos por fibras de queratina. Nesta camada também se encontram os melanócitos e as células de Merkel. A camada espinhosa é o local onde se inicia o processo de queratinização, no qual filamentos de queratina (desmossomos) atravessam o citoplasma das células unido-as a suas vizinhas. Os poros existentes entre as células espinhosas permitem a passagem de nutrientes e conferem a essa camada aspecto esponjoso. Nesta camada inicia-se também a formação dos corpos lamelares, posteriormente responsáveis pela formação do manto hidrolipídico, e dos grânulos de querato-hialina. A camada granulosa caracteriza-se pela presença de grânulos de queratina nas células. As células espinhosas sofrem achatamento e formam placas de queratina. O estrato espinhoso e o granuloso apresentam os corpos lamelares, que liberam lipídios no espaço intercelular da camada córnea, formando uma barreira à prova d'água, o manto hidrolipídico. Nesta camada são sintetizadas proteínas que vão compor a camada córnea, a profilagrina e a involucrina. A profilagrina sofre degradação em filagrina, que posteriormente dá origem

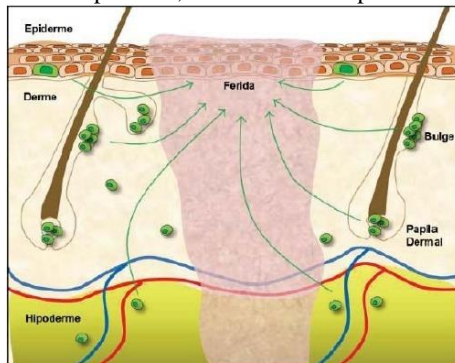
a aminoácidos livres, histidina e glutamina. A camada lúcida é relativamente delgada e nem sempre perceptível, estando presente somente na região palmar e plantar. As células desta camada não possuem núcleo ou organelas, mas filamentos bem compactados de queratina e eleidina, um produto da transformação da querato-hialina. A camada córnea é a parte mais externa da epiderme, sendo uma estrutura única, composta de células mortas, perfuradas somente pelos orifícios das glândulas sudoríparas e dos pelos. As camadas superficiais sofrem descamação na mesma frequência em que são repostas pela atividade mitótica das camadas basal e espinhosa (HARRIS, 2016).

### 1.3.1.2 Derme

A derme, derivada do mesoderma, é uma camada de tecido conjuntivo denso colágeno não modelado, sobre a qual a epiderme está conectada. Os tecidos conjuntivos, diferentes dos epitélios, são constituídos essencialmente de elementos intercelulares, ou seja, pela matriz extracelular, sendo responsáveis pela sustentação, defesa, transporte, armazenamento e reparo tecidual, sendo ricamente suprida de sangue através de rede de capilares. A matriz extracelular é composta por fibras (colágenas, reticulares e elásticas), substância fundamental amorfa e líquido tissular (GARTNER; HIATT, 2002; HARRIS, 2016).

Diversos tipos celulares estão presentes na derme, sendo algumas células residentes e outras transitórias. O fibroblasto é o tipo predominante, contudo estão presentes células imunes (macrófagos, plasmócito, mastócito e leucócitos), células do endotélio vascular, pericitos, células sensoriais (rede de neurônios), miofibroblastos, adipócitos e especialmente as células tronco mesenquimais, responsáveis pelo processo de reparo tecidual (Figura 11) (GARTNER; HIATT, 2002; HARRIS, 2016; JEREMIAS, 2013, 2014).

Figura 11 - Representação esquemática de nichos de células tronco na derme, responsáveis pelo processo de reparo tecidual. Nichos na papila dermal do folículo piloso, nas glândulas sebáceas, no bulge do folículo piloso, na camada basal da epiderme, na derme e na hipoderme.



Fonte: Wong et al., (2012).

Os fibroblastos são responsáveis pela síntese das fibras colágenas, reticulares e elásticas e de quase toda substância fundamental. Colágeno é a família de proteínas extracelulares mais importante, compondo a grande massa da matriz dermal, i.e., 70% a 80% do peso desta. A família dos colágenos é constituída por mais de 12 tipos, porém somente os tipos I, III, IV, V, VI e VII ocorrem na pele. O colágeno tipo I, de estrutura fibrilar, predomina na derme, sendo mais resistente e mais importante em termos estruturais, formando grandes feixes de fibras colágenas. O colágeno tipo III é denominado reticulina, apresenta estrutura fibrilar e compõe as fibras reticulares, ocorrendo também em quantidades apreciáveis, especialmente ao redor das terminações nervosas, vasos sanguíneos e adipócitos. Os colágenos tipo IV e VII estão presentes especialmente na membrana basal que faz a interface epiderme/derme. O tipo V está bem distribuído em toda derme e o tipo VI, de estrutura curta e ramificada, compõe uma fina rede dispersa nos interstícios das grandes fibras colágenas. O colágeno se deposita na forma de grandes feixes de fibras, formando estriações transversais em bandas típicas que podem ser observadas por microscopia eletrônica. As fibras elásticas são constituídas de elastina, rodeada por um componente microfibrilar (HARRIS, 2016).

A substância fundamental amorfa constitui a matriz em forma de gel, na qual as fibras e células estão inseridas e por onde se difunde o líquido tissular. É constituída de glicosaminoglicanas, proteoglicanas e

glicoproteínas. Os principais constituintes das glicosaminoglicanas são o ácido hialurônico, o condroitin-4-sulfato, o condroitin-6-sulfato, o dermatan-sulfato e o heparan-sulfato. As proteoglicanas são constituídas de um eixo central protéico no qual as glicosaminoglicanas se ligam covalentemente. As glicoproteínas, especialmente a fibronectina, são essenciais à adesão e à migração celular. Além das fibras e da substância fundamental, o líquido tissular ou líquido intersticial é originário do sangue, e por isso sua composição química é semelhante a do plasma (GARTNER; HIATT, 2002; HARRIS, 2016).

Estruturalmente, a derme é dividida em duas regiões, a papilar e a reticular. No seu limite inferior está o tecido subcutâneo. A derme papilar está localizada abaixo da epiderme, possuindo invaginações projetadas para a epiderme, as papilas dérmicas, e sistema circulatório associado, enquanto a derme reticular está localizada próxima ao tecido subcutâneo, possuindo uma estrutura de matriz extracelular mais densa. A função da derme papilar é fixar a membrana basal à rede de fibras elásticas da derme reticular. Na derme reticular estão os anexos invaginados da epiderme (folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas), vasos sanguíneos, linfáticos, nervos, receptores especializados nas sensações de frio, calor, tato, pressão, dor e uma rede de fibras elásticas que confere força e elasticidade à pele (GARTNER; HIATT, 2002; HARRIS, 2016).

O tecido subcutâneo, chamado também de hipoderme, é formado por tecido conjuntivo frouxo, que une de maneira pouco firme a derme aos órgãos subjacentes, sendo responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas na qual se apóia. Possui uma camada variável de tecido adiposo que funciona como isolante térmico e protetor a traumas mecânicos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

### **1.3.2 Funções**

A principal diferença entre a pele e os demais sistemas epiteliais é o fato de estar exposta a um ambiente externo extremamente agressivo, enquanto os demais sistemas epiteliais estão protegidos, como por exemplo, da radiação solar. A pele não só protege o organismo do ambiente externo, como também é capaz de se comunicar com o meio. Estímulos mecânicos, térmicos e de dor são percebidos por vasto número de receptores que, como um todo, transformam a pele em um órgão sensorial (KARIYA et al., 2005). Graças a sua complexidade estrutural, a pele desempenha diversas funções: proteção contra entrada de elementos nocivos, manutenção do equilíbrio hídrico, controle da

temperatura corporal, permeabilidade seletiva, proteção contra radiação solar, metabolismo de vitamina D, funções sensoriais, função endócrina, função imunológica, funções estéticas. Para assegurar a homeostase do organismo, isto é, manter constantes seus parâmetros biológicos diante das modificações do meio externo, é fundamental que a pele tenha seu funcionamento preservado e altamente regulado, o que é alcançado pela integração entre percepção neuronal, comunicação química através de hormônios e neurotransmissores e ativação concatenada de processos que mantém as estruturas (HARRIS, 2016; RONTI; LUPPATTELLI; MANNARINO, 2006; SLOMINSKI; WORTSMAN; TOBIN, 2005).

A pele apresenta externamente uma camada de proteção ácida ou filme hidro-lipídico, que desempenha um papel importante na proteção do tecido, ao lado da camada de células queratinizadas da epiderme. Formada por substâncias ácidas endógenas secretadas no suor e gordura, esta camada confere à pele um pH ligeiramente ácido, i.e., 4,6 - 5,8, devendo-se tal fato ao ácido láctico, tendo efeito antimicrobiano. Estando íntegra, a camada de proteção ácida mantém baixa a decomposição bacteriana dos componentes do suor (HARRIS, 2016). A pele constitui a primeira barreira imune do organismo. O pH ácido da pele e a presença de esfingolisina, resultante da degradação de ceramidas do manto hidrolipídico, garantem a primeira ação contra invasão de bactérias. O sistema imunológico da pele integra as respostas humoral e celular. As células imunocompetentes da pele podem ser subdivididas entre aquelas do sistema imune inato e aquelas do sistema imune adquirido, conforme pode ser verificado na Tabela 4 (BOS et al., 1987).

Tabela 4 - Componentes celulares envolvidos no sistema imunológico da pele

	<b>Células residentes e outros fatores</b>	<b>Células recrutadas</b>	<b>Células recirculantes</b>
<b>Imunidade inata</b>	Queratinócitos Células endoteliais Mastócitos Macrófagos	Monócitos Neutrófilos Eosinófilos Mastócitos Histiócitos	Células <i>natural killer</i> (fagócitos) Células dendríticas
<b>Imunidade adquirida</b>	Linfócitos T Células de Langerhans	Linfócitos T Linfócitos B	Linfócitos T
<b>Moléculas envolvidas</b>	Radicais livres Fatores do complemento Imunoglobulinas Citocinas Neuropeptídeos Sistema de coagulação		

Fonte: Bos et al. (1987).

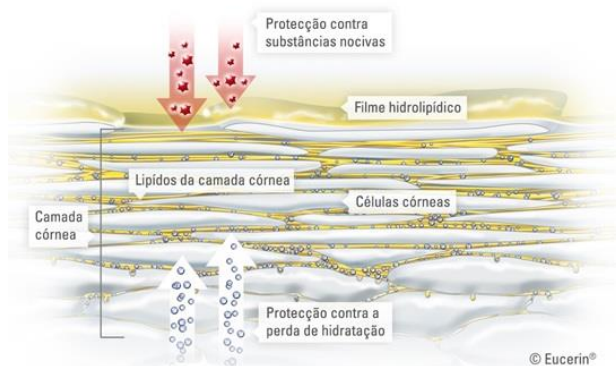
O conhecimento do pH da superfície cutânea tem motivado vários pesquisadores porque a concentração hidrogeniônica do manto ácido cutâneo é visto por alguns autores como um importante indicador funcional da pele. Além disso, as secreções cutâneas apresentam apreciável capacidade tamponante, importante propriedade, porque o pH da pele é freqüentemente alterado em consequência da utilização de produtos tópicos inadequados, expondo o tecido a uma série de agentes agressores, em especial microorganismos. A manutenção do pH cutâneo, do ponto de vista cosmético e/ou dermatológico, é de extrema relevância, uma vez que o contato com substâncias agressivas, como detergentes, costuma ser freqüente, ou até mesmo para evitar a utilização de produtos tópicos inadequados (RODRIGUES, 1995).

A camada córnea é um mosaico de camadas intercalares de componentes hidrofílicos (corneócitos) e hidrofóbicos (lipídios lamelares intercelular) que protegem a pele quanto à penetração de substâncias e danos mecânicos, evitando que o organismo perca água e eletrólitos. A água, ao passar pelos corneócitos pode ser retida pelas fibras de queratina, que são altamente hidrofílicas. Na pele saudável, os corneócitos possuem alta concentração de moléculas higroscópicas,



como aminoácidos, os ácidos láctico, pirrolidono-carboxílico, urocânico e a uréia que retêm a água e previnem sua evaporação, conforme demonstrado na Figura 12 (POLLOCK, 2016).

Figura 12 - Esquema da camada córnea da pele, com destaque ao filme hidrolipídico, aos lipídios intercelulares e à proteção contra a entrada de substâncias nocivas e perda de hidratação pela retenção da água.



Fonte: ©Eucerin®. Disponível em: <http://www.eucerin.pt/sobreapele>. Acesso em agosto de 2016.

O controle de temperatura corporal ocorre tanto pela perda de água transepidermal como pela transpiração (sudorese). A transpiração é uma atividade resultante do estímulo das glândulas sudoríparas écrinas, apócrinas e apoécinas, presentes em todo o organismo, de modo distinto (WILKE et al., 2007; THOMSON et al., 1954). O suor é uma solução composta essencialmente por água, cloreto de sódio, potássio, uréia e lactato. A regulação da temperatura também se dá através do alargamento ou estreitamento dos vasos sanguíneos na pele, além da secreção de líquidos pelas glândulas. As glândulas sudoríparas (glândulas écrinas) tem como principal função cuidar da manutenção da temperatura corporal e manutenção do equilíbrio hídrico, quando o corpo é exposto ao calor excessivo ou a atividade intensa. São encontradas em todo corpo, especialmente nas palmas das mãos, dos pés, axilas e testa. Sua atividade é controlada pelo sistema nervoso colinérgico simpático, sendo estimulada por funções térmicas, mentais e gustatórias. Seu ducto enovelado, localizado na hipoderme, abre-se na superfície através de um poro sudoríparo (HARRIS, 2016).

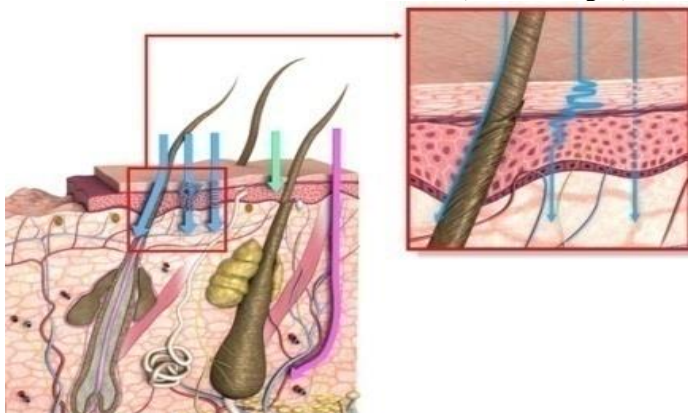
A exposição da pele ao sol promove uma série de efeitos metabólicos, alguns desejáveis e benéficos à saúde, como a síntese de vitamina D, enquanto outros são negativos, como os danos no DNA e câncer. A radiação solar é dividida, consoante aos comprimentos de onda dos fótons, em radiação ultravioleta (UV), de luz visível e de infravermelho (IR). Na radiação UV distinguem-se três faixas importantes de comprimento de onda, a saber: radiação de onda curta (UVB: 280-320 nm), radiação de onda longa (UVA: 320-400 nm) e radiação de onda muito curta (UVC: 100-280 nm). A radiação UVC é absorvida pela camada de ozônio da atmosfera terrestre e não atinge a superfície da terra. Por sua vez, a radiação UVB é a principal responsável por queimaduras da pele, uma inflamação que leva ao inchaço doloroso e vermelhidão do tecido. A radiação UVB é o principal fator de risco de desenvolvimento de câncer da pele, ainda que ao a radiação UVA também participe do processo. Esta última constitui o principal agente abiótico responsável pelo envelhecimento extrínseco da pele (CASTRO, 2011).

Peles que recebem grandes doses de raios UV, não só ficam vulneráveis às mutações, como também apresentam a função de vigilância do sistema imunológico da pele debilitada. A pele possui um sistema de reparo de danos ao DNA eficiente que é capaz de corrigir a maior parte das lesões quando não há exposição excessiva. Alguns indivíduos porém, não possuem este sistema de reparo eficiente. Exposição exacerbada ao sol promove malefícios, contudo a falta desta promove a carência de vitamina D. A principal função da vitamina D é manter a homeostase do cálcio. Distintas etnias possuem capacidade similar de síntese, contudo indivíduos com pele mais escura precisam de mais tempo de exposição ao sol para a síntese de vitamina D (CASTRO, 2011).

A avaliação da absorção de substâncias através da pele (também denominada absorção percutânea, cutânea ou dérmica) é um aspecto importante do complexo processo de avaliação de riscos do uso de substâncias aplicadas na pele. O processo de absorção percutânea/dérmica é um termo global que descreve a passagem de compostos através da pele. Substâncias podem ser absorvidas pela pele ao longo de três vias: venosa; intercelular e intracelular. A camada córnea da pele, mesmo sendo uma estrutura de células superficiais mortas e compactadas, protegidas pelo manto hidrolipídico, possui aberturas, sendo perfuradas pelos orifícios dos apêndices cutâneos, tais como cabelo, glândulas sebáceas e sudoríparas, que atuam como vias de penetração (Figura 13). Devido ao seu alto grau de compactação e

pequeno espaço intercelular, a camada córnea é seletivamente impermeável à entrada e saída de líquidos corpóreos (POLLOCK, 2016).

Figura 13 - Esquema de três vias de internalização de substâncias através da pele: Permeação (seta verde) – entrada de substância pelos espaços intercelulares, permeando de uma camada a outra. Penetração (seta azul) – entrada na camada córnea. Reabsorção (seta rosa) – absorção da substância no via folículo, com entrada no sistema vascular (linfa ou sangue).



Fonte: ©BASF®. Disponível em: <http://www.skin-care-forum.basf.com>. Acesso em: agosto de 2016.

#### 1.4 O REPARO TECIDUAL

A perda da integridade da pele poderá levar o organismo a graves comprometimentos, caso não seja reparada. O processo de reparo de lesões inicia-se tão logo a integridade tecidual seja rompida, sendo um evento altamente dinâmico que envolve interações entre as células epidérmicas da borda da lesão, as células residentes e transitórias da derme, moléculas da matriz extracelular, sinalizações quimiotáticas e mediadores solúveis. A Tabela 5 exemplifica algumas citocinas, sinalizadores envolvidas no processo de reparo tecidual, células produtoras e seu respectivo efeito biológico. A habilidade de responder a lesões e reparar tecidos é uma propriedade fundamental para os organismos multicelulares, sendo que o reparo pode se dar de duas formas: via regeneração tecidual, com a recomposição da funcionalidade do tecido, ou pela cicatrização, com o restabelecimento da homeostasia

do tecido e perda da sua atividade funcional, sendo este processo o comum em indivíduos adultos (GURTNER et al., 2008).

Tabela 5 - Citocinas envolvidas no processo de reparo tecidual, células produtoras e efeito biológico

<b>Citocinas</b>	<b>Células produtoras</b>	<b>Efeito biológico</b>
<b>IL-1 (interleucina-1)</b>	Macrófagos, endotélio, queratinócitos	Super-expressão de selectinas no endotélio e aumento da síntese de NOS <sub>i</sub>
<b>IL-8 (interleucina-8)</b>	Macrófagos, fibroblastos	Quimiotaxia para polimorfonucleares e macrófagos
<b>INF-<math>\gamma</math> (interferon gama)</b>	Macrófagos	Diferenciação de monócitos em macrófagos e ativação destes, aumento da síntese de NOS <sub>i</sub>
<b>TNF-<math>\alpha</math> (fator de necrose tumoral alfa)</b>	Macrófagos e endotélio	Super-expressão de selectinas no endotélio, aumento da síntese de NOS <sub>i</sub> , supra-regulação de integrinas
<b>EGF (fator de crescimento epidérmico)</b>	Plaquetas, macrófagos	Quimiotaxia e proliferação de fibroblastos, proliferação e quimiotaxia de queratinócitos
<b>FGF (fator de crescimento dos fibroblastos)</b>	Macrófagos, endotélio, fibroblastos	Quimiotaxia e proliferação de fibroblastos e queratinócitos, potente fator angiogénico
<b>KGF (fator de crescimento dos queratinócitos)</b>	Fibroblastos	Quimiotaxia e proliferação de queratinócitos
<b>HGF (fator de crescimento dos hepatócitos)</b>	Células mesenquimais	Quimiotaxia e proliferação de queratinócitos
<b>VEGF (fator de crescimento vascular endotelial)</b>	Macrófagos, queratinócitos	Potente fator angiogénico
<b>PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas)</b>	Plaquetas, macrófagos, endotélio, queratinócitos	Quimiotaxia de polimorfonucleares, proliferação de fibroblastos e diferenciação para miofibroblastos, degradação do colágeno III e síntese do I, fator angiogénico
<b>TGF-<math>\beta</math> (fator transformador do crescimento beta)</b>	Plaquetas, macrófagos, endotélio, queratinócitos, fibroblasto	Quimiotaxia de polimorfonucleares, síntese de NOS <sub>i</sub> , proliferação de fibroblastos e diferenciação para miofibroblastos, degradação do colágeno III e síntese do I, fator angiogénico

Fonte: Isaac et al. (2010).

O tratamento da lesão da pele é uma etapa crucial na qualidade do reparo tecidual, podendo trazer benefícios significativos na qualidade de vida e longevidade de pacientes (MACNEIL, 2007). Uma das principais complicações da lesão é a infecção, sendo que o uso de antibióticos na terapia pode limitar o processo de cicatrização (DREIFKE; JAYASURIYA; JAYASURIYA, 2015; GODBOUT; GLASER, 2006).

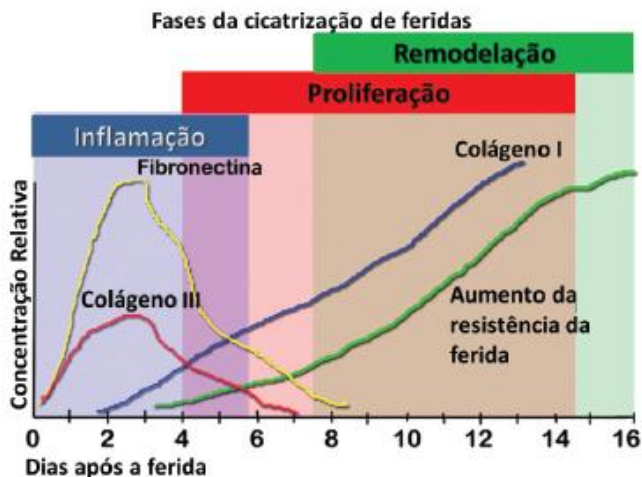
O uso de substâncias antioxidantes tem sido relacionado à menor formação de radicais livres e menor dano tecidual no tratamento de feridas (PINNELL, 2003; RATZ-LYKO et al., 2015; SEN et al., 2002). Os ácidos graxos polinsaturados tem sido utilizados como base para o reparo tecidual local, auxiliando também a função imune sistêmica e diminuindo o índice de outras complicações (ARNOLD; BARBUL, 2006). O procedimento padrão no cuidado de feridas consiste na antissepsia, limpeza e aplicação de curativo para evitar ou diminuir os riscos de complicações. Os tratamentos de lesões tiveram avanços com o desenvolvimento de algumas técnicas, como, por exemplo, a técnica da cultura de queratinócitos autólogos, que consiste na coleta de células, através de biópsia, multiplicação das mesmas *in vitro* e enxerto do epitélio cultivado na região lesionada. Todavia, a taxa de sucesso dessa técnica é bastante variável (0 a 85%), podendo demorar até quatro semanas para preparar-se um enxerto (~ 2 x 2 cm) e queratinócitos adultos possuem potencial de proliferação limitado (DREIFKE; JAYASURIYA; JAYASURIYA, 2015). Atualmente, prevalece o conceito de criar um ambiente ideal para que as células epiteliais se movimentem livremente, com boa oxigenação, em ambiente asséptico de modo que o processo de reparo ocorra normalmente. O uso de agentes farmacêuticos tópicos na forma de soluções, cremes, ou pomadas, por exemplo, desempenha um papel ativo na cicatrização, direta ou indiretamente, por meio de agentes de desbridamento do tecido necrótico, antissépticos, ou como veículos para fatores de crescimento. Biomateriais podem ser utilizados como veículos para liberação controlada e/ou prolongada de fármacos ou fatores de crescimento. Os curativos com sistema de liberação de drogas podem ser aplicados na forma de géis, filmes, espumas, discos porosos ou *scaffolds* fibrosos. O desenvolvimento do substituto dérmico comercializado com o nome de *Integra Artificial Skin*® foi um progresso tecnológico considerado importante na regeneração cutânea. Este produto é constituído por duas camadas, uma de colágeno tipo I bovino e glicosaminoglicanos de tubarão e a outra uma membrana de silicone. Atualmente, no Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) disponibiliza o tratamento com matrizes de regeneração, sendo o *Integra Artificial Skin*® uma das matrizes mais utilizadas. Os resultados são satisfatórios, mas apresenta a desvantagem do alto custo e do procedimento que requer uma etapa cirúrgica à aplicação da matriz e outra para a retirada da camada de silicone e aplicação de enxerto autólogo de epiderme (RODE, 2015).

O atraso temporal e a qualidade do reparo tissular são influenciados por diversos fatores como o estado nutricional, a isquemia

tecidual, obesidade, diabetes, infecções bacterianas, virais e fúngicas, alcoolismo, tabagismo, uso de drogas, uso de medicamentos, doenças cardiovasculares, hemofilia, deficiência de fator XIII, desequilíbrio imune, endócrino, estresse e especialmente pela idade (ASHCROFT; HORAN; FERGUSON, 1997; GUO; DIPIETRO, 2010; KEYLOCK et al., 2008; NATORI et al., 1999). A cicatrização tardia de feridas em indivíduos com idade avançada está diretamente relacionada à diminuição do ritmo metabólico, associada à resposta inflamatória alterada, tais como: infiltração tardia das células T na área da ferida, alterações na produção de quimiocinas, redução da capacidade fagocítica dos macrófagos, deficiência na síntese de colágeno, na angiogênese e na reepitelização (GOSAIN; DIPIETRO, 2004; SWIFT et al., 1999, 2001).

A cicatrização pode ser dividida, didaticamente, em fases para melhor compreensão de seu intrincado processo. Cada fase, ocorre temporalmente de forma sobreposta, envolvendo elementos celulares e extracelulares com a função de regular o processo de reparo (GURTNER et al., 2008; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; MARTIN, 1997; REINKE; SORG, 2012). As fases da cicatrização hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação estão representadas esquematicamente na Figura 14 (ISAAC et al., 2010).

Figura 14 - Fases da cicatrização e deposição de componentes da matriz cicatricial ao longo do tempo. A fibronectina e o colágeno tipo III constituem a matriz precoce. O colágeno tipo III é substituído gradualmente pelo tipo I, aumentando a resistência da ferida.



Fonte: Broughton et al. (2006).

A **hemostasia** ocorre nos primeiros minutos, com o intuito de conter o sangramento. O endotélio lesado e as plaquetas estimulam a cascata de coagulação. O extravasamento de sangue com seus constituintes que preenchem a área lesada com plasma e elementos celulares (plaquetas) aumentam a permeabilidade capilar com liberação de proteínas plasmáticas (fibrinogênio e fibronectina). Há interação dinâmica envolvendo a matriz extracelular (MEC), as células parenquimatosas e a liberação de fatores de crescimento pelas células lesadas, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fatores de transformação de crescimento beta e alfa ( $TGF-\beta$  e  $TGF-\alpha$ ) (KARUKONDA et al., 2000). As plaquetas ativadas aderem-se à MEC através dos fatores de Von Willebrand (Fator VIII), com formação do tampão hemostático primário e reversível, por agregação plaquetária. O ADP liberado pelas plaquetas induz a alteração conformacional dos receptores plaquetários GpIb em GpIIb-IIIa, permitindo que estas se agreguem, ligando-se por pontes de fibrinogênio com formação do tampão secundário e irreversível. O coágulo não só restabelece a hemostasia na superfície lesada dos vasos, como também ocupa os espaços vazios da ferida, dando suporte à migração celular

(ANDRADE, 2007; KARUKONDA et al., 2002). A liberação dos fatores de crescimento, promovida pela cascata de coagulação, atrai neutrófilos, iniciando a **fase inflamatória**. Os neutrófilos produzem radicais livres que auxiliam na destruição bacteriana e são gradativamente substituídos por macrófagos, após as primeiras 24h (BROUGHTON et al., 2006). Os neutrófilos são os primeiros leucócitos a chegar ao foco infeccioso, tendo como principal papel promover a limpeza da ferida, eliminando microrganismos e outros elementos estranhos, via mecanismos de fagocitose, enzimáticos e de geração de radicais livres. O número de neutrófilos começa a declinar quando aumenta o número de monócitos no leito da lesão. Os monócitos, aderidos à matriz, se transformam em macrófagos ativados e participam ativamente da fase inflamatória, através de desbridamento tecidual mediante fagocitose, digerindo microorganismos patogênicos, células apoptóticas e neutrófilos senescentes, promovendo o clareamento da ferida e a liberação de citocinas que estimulam a angiogênese (formação do tecido de granulação) e a formação tecidual. A ativação dos macrófagos se dá pela liberação inicial e transitória dos fatores provenientes dos grânulos plaquetários, citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\beta$ , IL-1 e IFN- $\gamma$ , além dos produtos da fagocitose de detritos celulares, como a fibronectina e colágeno. As citocinas nessa fase do reparo tissular derivam principalmente dos macrófagos, a saber: PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), TGF-1 (*Transforming Growth Factor*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*), ILGF-1 (*Insulin Like Growth Factor 1*), IL-1 (*Interleucine 1*), EGF (*Epidermal Growth Factor*) e TNF (*Tumoral Growth Factor*), além daquelas derivadas dos neutrófilos como TGF, interferon gama e IL-2. (KARUKONDA et al., 2000).

A **fase proliferativa** é constituída por quatro etapas fundamentais: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno (KO et al., 2001). Inicialmente, as células epiteliais das bordas da ferida proliferam na tentativa de restabelecer a barreira protetora. A epitelização corresponde ao restabelecimento da epiderme, após a lesão. A partir do momento que a organização da epiderme é alterada, o processo de restauração é iniciado imediatamente pelo mecanismo de “efeitos de vizinhança livre”. Através deste mecanismo, os queratinócitos migram e proliferam sobre o tecido de granulação em direção à borda oposta da lesão, até restabelecer o contato. Este processo é facilitado pela contração do tecido conjuntivo subjacente, realizado por miofibroblastos. Além do efeito de borda livre que estimula a atividade mitótica, diversos fatores também promovem a proliferação dos queratinócitos, incluindo o EGF (fator de crescimento



epidermal) e o TGF- $\beta$  e KGF (*Keratinocytes Growth Factor* - fator de crescimento de queratinócitos). A migração é proporcionada também pela ação de metaloproteinases (MMP), necessárias à remoção e organização da matriz provisória, permitindo esta migração. Após o recobrimento da lesão com monocamada de queratinócitos, a migração destas células é inibida e o processo de diferenciação terminal é iniciado, gerando uma nova epiderme estratificada. Ao final desta etapa, a lesão apresenta-se constituída por um tecido de granulação vascularizado, com a nova MEC sintetizada, revestida com a camada epidérmica recém-formada. Lentamente, o tecido de granulação é enriquecido com fibras colágenas, conferindo à região lesada a aparência de cicatriz. No entanto, o processo de reparo ainda continua durante meses, através do remodelamento da nova MEC (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A formação de novos vasos durante o reparo tecidual representa um dos eventos da fase proliferativa, a angiogênese. A angiogênese é inicialmente estimulada pelo TNF- $\alpha$ . Para tal, primeiramente a MEC e a membrana basal dos vasos são degradados para facilitar a migração das células endoteliais. Este processo é mediado por MMP (metaloproteinases ou metalaproteases) produzidas por tipos celulares como macrófagos e também por células endoteliais. As células endoteliais são atraídas à lesão em resposta ao estímulo de vários fatores como o VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor* - fator de crescimento endotelial vascular), FGF (fator de crescimento de fibroblastos) e TGF- $\beta$  que também promovem a diferenciação e a formação de tubos. Dentre estes fatores, o VEGF vem sendo descrito como um dos mais importantes mediadores pró-angiogênicos, atuando desde a fase inicial do processo de reparo tecidual.

A parte final da fase proliferativa consiste na formação de tecido de granulação. Os fibroblastos precisam ser ativados para que os mesmos migrem para a região lesada e se proliferem. Em seguida, é liberado o TGF- $\beta$ , que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno tipo I e a transformarem-se em miofibroblastos, que promovem a contração da ferida (WITTE; BARBUL, 1997). Nesta fase ocorre a fibroplasia, que se traduz pela proliferação de fibroblastos e sua migração ao interior da ferida por estímulo de fatores de crescimento. À semelhança das células epiteliais, os fibroblastos migram à ferida valendo-se de alterações morfológicas que possibilitam a expansão de segmentos da membrana celular ao acaso, chamados lamelipódios, que são análogos dos pseudópodos das células epiteliais em migração. Uma vez no interior da ferida, os fibroblastos interagem com os elementos da

MEC realizando sua síntese, deposição e remodelagem. Os fibroblastos assumem uma nova função, i.e., a síntese proteica, principalmente de colágeno. A produção de grande quantidade de colágeno nesta fase pode ser explicada pela evidente expressão de TGF-1 (CHANG et al., 1980). O aumento do número de fibroblastos na lesão promove modificações na composição da MEC, que é substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico. A matriz inicial, composta primariamente de fibrina e fibronectina (derivadas principalmente de plaquetas e plasma), é suplementada por glicosaminoglicanos, proteoglicanos e outras proteínas secretadas pelos fibroblastos recrutados na lesão. Essa modificação na composição da MEC favorece a fixação das células, estimulando a diferenciação para fenótipos mais maduros. Os fibroblastos sofrem mudanças fenotípicas mais acentuadas que resultam em uma maior síntese e secreção de colágeno. Este, aos poucos, substitui os proteoglicanos e a fibronectina, tornando-se o principal componente da MEC em formação. Os fibroblastos localizados na borda da lesão também sofrem mudanças fenotípicas, diferenciando-se em miofibroblastos (células com características funcionais similares às células do músculo liso). Estas células ocorrem alinhadas ao redor do depósito da nova MEC, unindo célula a célula e gerando força de tensão. Com isso, o processo de contração da ferida alcança a sua eficiência máxima. Tem sido relatado que o TGF- $\beta$  é um dos fatores mais importantes à função, quimiotaxia e depósito de MEC pelos fibroblastos, além da sua diferenciação para miofibroblastos. (BALBINO et al., 2005).

A **fase de remodelação** é caracterizada pela deposição de colágeno de maneira organizada. Fibroblastos e leucócitos secretam colagenases que promovem a lise da matriz antiga. A cicatrização tem sucesso quando há equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a lise da matriz antiga e, neste momento, são importantes os mecanismos de reabsorção do colágeno velho e a síntese de colágeno novo. A proliferação celular diminui e a maioria das células sofre apoptose, ou migra da área lesionada, originando uma região constituída de poucas células e que consiste principalmente de colágeno e outras proteínas da MEC. O mais importante nesta fase é o rearranjo e o *crosslink* de colágeno, onde a substituição do colágeno tipo III, depositado inicialmente de maneira desorganizada, pelo colágeno tipo I, fornece mais resistência ao tecido. No tecido íntegro, 80% do colágeno presente na derme é do tipo I e 20% de colágeno tipo III. As MMPs e seus inibidores são importantes mediadores da atividade proteolítica de processos fisiológicos e patológicos de remodelamento. A família das

MMPs tem a capacidade de degradar praticamente todos os componentes da MEC e da membrana basal, sendo essenciais na fase de remodelação tissular (CAMPOS; BORGES-BRAVO; GROTH, 2007; BALBINO et al., 2005).



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil químico e avaliar o extrato aquoso de grãos de café (*Coffea arabica* L.) verde e torrado, após remoção da fração óleo, quanto ao efeito no reparo de lesões cutâneas em modelos *in vitro* e *in vivo*, estabelecendo comparações com o potencial de reparo cutâneo do ácido clorogênico.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar o perfil espectrofotométrico UV-vis e o conteúdo de compostos fenólicos e carotenóides totais dos extratos de grãos de café verde e torrado, após remoção da fração óleo.

Discriminar os perfis metabólicos dos extrato através da análise multivariada aplicada à espectroscopia UV-vis e RP-HPLC.

Determinar a capacidade antioxidante dos extratos, via ensaio de sequestro de radicais livres.

Quantificar *in vitro* o efeito sobre a viabilidade/proliferação e migração celular e a toxicidade basal dos extratos sobre a linhagem celular de fibroblastos de camundongo L929.

Avaliar *ex vivo* marcadores de estresse oxidativo através de ensaios bioquímicos enzimáticos para as atividades das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPX), em pele de camundongos suíços tratados com hidrogéis dos extratos de café e ácido clorogênico.

Determinar o potencial de reparo cutâneo dos extratos aquosos, através de ensaios pré-clínicos de lesão excisional cutânea, em modelo murino.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL AMOSTRAL, QUÍMICOS E LINHAGENS CELULARES

As amostras de grãos de café verde e torrado, após a remoção da fração óleo, acondicionadas em embalagens de polietileno foram fornecidas pela Cooperativa de Cafeicultores em Guaxupé – Cooxupé (Minas Gerais) e transferidas ao Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (UFSC), sendo armazenadas à -20°C para posterior análise. Os padrões analíticos (ácidos clorogênico, gálico, *p*-hidroxibenzóico, cafeico, ferúlico, siríngico, *p*-cumárico, quercetina, cafeína, trigonelina, teobromina, teofilina e alantoína), o reagente de Folin-Ciocalteu, dodecil sulfato de sódio (SDS), dimetilsulfóxido (DMSO), 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), ácido ( $\pm$ )-6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametil-cromano-2-carboxílico (Trolox), tampão fosfato (TPK), tampão fosfato salino (PBS), Tween® 20, reagente de Bradford, albumina bovina (BSA), metionina, riboflavin, cloreto de nitrotetrazólio (NBT), corante vermelho neutro (*neutral red*, NR), meio de cultura modificado Dulbecco's (DMEM), membrana filtração PES (0,22  $\mu$ m), soro fetal bovino (SBF), penicilina e estreptomicina foram comprados da Sigma-Aldrich (Missouri, USA). Metanol etanol, ácido clorídrico, cloreto de sódio e peróxido de hidrogênio foram comprados da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Carbopol 940 NF, ácido etilenodiaminotetracético dissódico (EDTA) e aminometil propanol (AMP) foram adquiridos da Pharma Nostra (Campinas, SP, Brasil). As linhagens de fibroblastos murinos 3T3 e L929 e a linhagem de queratinócitos humanos HaCat foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

#### 3.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Os extratos aquosos dos grãos de café, após prensagem para retirada do óleo, foram produzidos de acordo com o método de extração a frio estabelecido pela Farmacopéia Brasileira (ANVISA, 2010), com modificações. O extrato foi preparado adicionando-se 4 g de amostra da pasta de café em 100 mL de solução extratora hidroetanólica 70% (v/v), seguido de agitação magnética (1h, temperatura ambiente, ausência de luz) e incubação (18 h, geladeira, 2-8°C), sendo recuperado por filtração a vácuo em suporte de celulose. O extrato recuperado foi centrifugado (10 min, 4000 rpm, 13.7cm raio do rotor), transferido para balão

volumétrico e concentrado em rotaevaporador (60°C, 82 rpm). O extrato concentrado foi ressuspenso em água destilada-deionizada até o volume de 10 mL, novamente centrifugado (10 min, 4000 rpm, 13.7cm raio do rotor), sendo o sobrenadante coletado e liofilizado. O extrato seco foi armazenado à -80° C para análises posteriores.

### 3.3 PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS PARA APLICAÇÃO TÓPICA

O hidrogel de carbopol 940 foi escolhido como base veicular à incorporação dos extratos de café e aplicação nas lesões dos ensaios *in vivo* por se tratar de produto amplamente utilizado como agente gelificante em formulações cosméticas e farmacêuticas (ACOFARMA, 2015). Os hidrogéis aos tratamentos foram manipulados em ambiente farmacêutico através de parceria técnico-científica com farmácia de manipulação, com adição do extrato aquoso de café, padronizado a 10% (v/v). A alantoína foi escolhida como controle positivo neste modelo experimental por ter ação reconhecida como antisséptica, antiinflamatória, promotora da proliferação celular e cicatrizante (PEREIRA, 2003).

Os extratos secos foram pesados, diluídos em água destilada-deionizada e incluídos em hidrogel de carbopol, por mistura manual, até obtenção de gel de aspecto homogêneo, na proporção de 10%, v/v. O hidrogel de carbopol foi preparado com carbopol 940 (1% m/v), EDTA (0,1% m/v), aminometil propanol (0,5% m/v) e água destilada (60 mL). Os hidrogéis para os tratamentos somente foram preparados na véspera de cada etapa experimental, sendo mantidos sob refrigeração (2-8 °C). A concentração de ácido clorogênico no hidrogel foi determinada em função do conteúdo deste composto presente na biomassa de grãos de café verde, após remoção da fração óleo, previamente estabelecido via HPLC. Foram preparados os seguintes tratamentos: *Tratamento CV*: Hidrogel da pasta de café verde (10% v/v), *Tratamento CT*: Hidrogel da pasta de café torrado (10% v/v), *Tratamento CGA*: Hidrogel de ácido clorogênico (3% v/m), *Tratamento CP – controle positivo*: Hidrogel de alantoína (1% v/m) e *Tratamento CN -controle negativo*: Hidrogel carbopol.



### 3.4 ENSAIO DE ESTABILIDADE ACELERADA

Os extratos foram submetidos a ensaio de estabilidade acelerada, tendo como modelo o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, estabelecido pela ANVISA, com adaptações (ANVISA, 2004).

Os extratos foram submetidos à 4 tratamentos térmicos, a saber: freezer - 20°C, geladeira 2-8°C, temperatura ambiente 21 à 25°C, e estufa à 40°C, objetivando acelerar possíveis reações entre seus componentes. Foram avaliados os parâmetros sensoriais (aspecto, cor e odor) e físico-químicos (valor de pH e quantificação de fenólicos totais) em intervalos de tempo previamente estabelecidos, i.e., logo após a extração ( $t_{zero}$ ), 1º dia, 7º dia e 15º dia. O aspecto, a cor e o odor foram considerados normais quando iguais ao observado em  $t_{zero}$  (EPCV = extrato translúcido, amarelo claro, odor característico; EPCT = extrato translucido, marron, odor característico), ou anormal quando distinto do observado em  $t_{zero}$ . O valor do pH foi determinado através da utilização de potenciômetro de bancada (pH 21, Hanna Instruments, São Paulo, Brasil). A quantificação de fenólicos totais foi realizada conforme descrito por Randhir e colaboradores (RANDHIR; SHETTY; SHETTY, 2002), com algumas modificações, utilizando-se o reativo de Folin-Ciocalteu e leitura da absorbância em 750 nm.

Após a obtenção dos resultados com os extratos, optou-se por manter os hidrogéis em geleadeira (2-8°C), verificando-se os parâmetros sensoriais (aspecto, cor, odor) e físico-químico (medida do pH), logo após a preparação dos hidrogéis ( $t_{zero}$ ) e após 15 dias.

Os ensaios de estabilidade acelerada, também conhecidos como testes de triagem, consistem em testes nas fases iniciais de desenvolvimento de um possível produto, tendo duração reduzida (ANVISA, 2004). O extrato preparado fresco, assim como o hidrogel recém preparado, foram escolhidos como padrões de comparação aos demais momentos amostrais. O aspecto, cor e odor foram observados visualmente e relacionando eventuais modificações macroscópicas ao padrão estabelecido.

### 3.5 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS

#### 3.5.1 Análises espectrofotométricas - perfil químico por varredura UV-Visível

A espectrofotometria de varredura UV-Vis considerou os extratos de café verde e torrado, recuperados do balão volumétrico, ressuspensos

em 10 mL de água destilada-deioizada. 1 mL deste extrato foi diluído em 9 mL de água destilada-deionizada e conduzido à leitura espectrofotométrica. As amostras de extratos foram analisadas em espectrofotômetro UV-Vis (BEL LGS 53, BEL Engenharia, Monza, Italia), na janela espectral de 200 a 700 nm (resolução 1nm/ponto), verificando-se os perfis espectrais através do registro dos valores de absorbâncias. As análises foram realizadas em triplicata e os dados espectrais foram comparados entre os tratamentos, inicialmente por inspeção visual dos espectros. Para verificar se o conjunto de dados espectrais analisados poderia caracterizar os grupos de tratamento em estudo, os dados espectroscópicos foram pré-processados, considerando a correção da linha de base pelo método *Modified Polynomial Fitting*, seguido da otimização da relação sinal/ruído (*smoothing*) pelo método de regressão local (*Loess*), seguido do cálculo dos componentes principais (PCA) e análise de agrupamentos hierárquicos (HCA). A HCA utilizou a distância euclidiana para o cálculo da distância entre os pontos e o método de encadeamento completo para definir os agrupamentos. Todas as análises e gráficos foram realizados utilizando *scripts* em linguagem R (v. 3.1).

### 3.5.2 Quantificação de compostos fenólicos, flavonóides e carotenóides totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais dos extratos aquosos foi determinado utilizando-se o reativo de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Randhir e colaboradores (RANDHIR; SHETTY; SHETTY, 2002). O reativo de Folin-Ciocalteu consiste da mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstico. O molibdênio está no estado oxidado (cor amarela), porém, na presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio tungstênio de cor azul (HUANG et al. 2005). Foi utilizada uma alíquota de 40  $\mu\text{L}$  de cada extrato, em 3,16 mL de água destilada, seguido de agitação (Vórtex), adição de 200  $\mu\text{L}$  do reativo de Folin-Ciocalteu e nova agitação. Foram acrescentados 600  $\mu\text{L}$  de solução de carbonato de sódio 20% (m/v), agitando-se novamente o meio de reação seguido de incubação (2 h, escuro) e leitura das absorbâncias a 750 nm em espectrofotometro UV-Vis (BEL LGS 53, BEL Engenharia, Monza, Italia). As análises foram feitas em triplicata e os resultados expressos como a média (mg equivalente de ácido gálico/g biomassa)  $\pm$  erro padrão da média (sem), baseados em curva de calibração do ácido gálico (100-700  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $r^2=0,98$ ,  $y = 0,001x$ ).

A determinação do conteúdo de flavonóides totais baseou-se em método espectrofotométrico, de acordo com Zacarias e colaboradores (ZACARIAS et al.,2007), com modificações. A uma alíquota de 0,5 mL de extrato aquoso foram adicionados 2,5 mL de etanol e 0,5 mL de solução de cloreto de alumínio a 2% (m/v, em metanol p.a.), seguido de agitação e incubação (1 h, ao abrigo de luz). Subsequentemente, as absorbâncias foram determinadas a 420 nm em espectrofotômetro UV-Vis (BEL LGS 53, BEL Engenharia, Monza, Italia). A quantificação dos flavonóides utilizou curva padrão de quercetina ( $10\text{-}200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $r^2 = 0,99$ ,  $y = 0,01x$ ), sendo os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três leituras sequenciais, em ug equivalentes de quercetina/mL.

A determinação do conteúdo de carotenóides totais utilizou o sistema de extração organosolvente hexano: acetona: BHT, em conformidade com protocolos anteriores estabelecidos pelo laboratório, baseado no método indicado à extração de compostos carotenóides, segundo Aman e colaboradores (AMAN et al. 2005) com modificações. Em 0,05 g de amostra bruta (pasta de café bruta), em vidro âmbar, adicionam-se 4 ml de solução extratora hexano: acetona: BHT (1:1:100 mg/l, v/v/m), seguido de agitação manual e repouso (30 min, temperatura ambiente, ausência de luz). Após este período, o sobrenadante foi recuperado por filtração em suporte de celulose, concentrado em fluxo de nitrogênio, ressolubilizado em 4,5 ml de MeOH 80% (v/v) e centrifugado (20 min, 4.000 rpm), sendo submetido às análises espectrofotométricas para leitura pontual da absorbância em 450 nm em espectrofotômetro UV-Vis (BEL LGS 53, BEL Engenharia, Monza, Italia). A quantificação dos pigmentos baseou-se em curva padrão de  $\beta$ -caroteno ( $1\text{-}15\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $r^2 = 0,99$ ,  $y = 0,023x$ ), expressando-se os resultados como valores médios ( $n = 3$ )  $\pm$  desvio padrão, em ug de equivalentes de  $\beta$ -caroteno.

### **3.5.3 Análise cromatográfica para determinação de ácidos fenólicos e alcalóides por RP-HPLC**

As análises cromatográficas dos compostos fenólicos e alcaloidais basearam-se no método descrito por Rodrigues e Bragagnolo (RODRIGUES; BRAGAGNOLO, 2013), com adaptações. Este método considera a determinação simultânea de ácidos fenólicos e cafeína. Para tal 1g de extrato seco foi solubilizado em 10 mL de methanol 80% e diluído 1:9, previamente à injeção cromatográfica. Alíquotas e 60 uL foram injetadas no cromatógrafo líquido (HPLC Thermo Scientific

UltiMate 3000RS Dual System) equipado com coluna de fase reversa (Thermo Scientific C18, 250 mm x 4,6 mm, Ø 0,5 µm partícula, 35°C) e detector de arranjo de diodos, operando em 240, 260, 280 e 320 nm. A quantificação dos compostos de interesse levou em consideração o comprimento de onda de máxima absorbância para cada analito, comparando-se com os picos determinados por análises prévias de padrões analíticos destes. A fase móvel consistiu de água Mili-Q, pH 2,3, acidificada com HCl (Eluente A) e metanol (Eluente B). As condições cromatográficas consideraram fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, tempo de corrida de 50 min e gradiente de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6 - Condições cromatográficas do gradiente estabelecido para os eluentes A e B, ao longo do tempo de 50 min de análise com fluxo de 1 mL.min para análise de ácidos fenólicos e alcalóides.

Tempo (min)	Eluente A (% v/v)	Eluente B (% v/v)
0-5	85	15
5-45	0	100
45-50	85	15

Fonte: Elaboração da autora.

A identificação dos compostos de interesse considerou os tempos de retenção e co-cromatografia de amostras padrão (Sigma-Aldrich), sob as mesmas condições experimentais. As quantificações de ácidos fenólicos e alcalóides xantínicos basearam-se na integração das áreas dos picos e em curvas padrão de ácido clorogênico (10–400 ug.mL<sup>-1</sup>,  $r^2 = 0,99$ ,  $y = 0,707x$ ) e cafeína (100–1000 ug.mL<sup>-1</sup>,  $r^2 = 0,99$ ,  $y = 0,842x$ ), respectivamente. Os extratos foram obtidos em triplicata e as análises consideraram a injeção ( $n = 3$ ) do *pool* de extratos. Os valores de concentração foram expressos como média (mg.g<sup>-1</sup>) ± desvio padrão. Para verificar se o conjunto de variáveis bioquímicas analisadas poderia caracterizar os grupos amostrais, foi aplicado o cálculo dos componentes principais (PCA) e análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) diretamente sobre os dados de quantificação. A HCA utilizou a distância euclidiana para o cálculo da distância entre os pontos e o método de encadeamento completo para definir os agrupamentos. As análises e gráficos foram realizados utilizando *scripts* em linguagem R (v. 3.1).

### 3.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS – SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE DPPH

A capacidade dos extratos em sequestrar o radical livre DPPH foi avaliada de acordo com o método desenvolvido por Molyneux e colaboradores (MOLYNEUX, 2004). A molécula de DPPH é um radical livre que apresenta certa estabilidade, que pode ser explicada pelo fato de sua estrutura possuir ligações duplas alternadas nos anéis benzênicos, sofrendo assim efeito de ressonância, muito eficaz para estabilizar carga eletrônica por dispersá-la por toda molécula.

O método DPPH consiste em avaliar a capacidade de uma substância em sequestrar o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). As substâncias antioxidantes possuem essa capacidade. O radical DPPH possui coloração púrpura, absorvendo com máxima de absorção comprimento de onda aproximadamente 517 nm. Por ação de um antioxidante, ocorre uma reação de oxi-redução, onde o DPPH, que apresenta coloração púrpura, é reduzido, ou seja, o elétron desemparelhado do nitrogênio se emparelha com o elétron cedido por um radical hidrogênio do antioxidante, formando o produto DPPH-H (difenil-picril-hidrazina), reduzido e estável. A solução assume coloração amarelada, e essa variação de coloração pode ser monitorada pelo decréscimo da absorbância em 517 nm. A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade sequestradora de radicais livres. Soluções-mãe dos extratos (10 mg/mL) foram diluídas em metanol 95% até as concentrações finais de 1 a 30  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Como controle positivo, Trolox, ( $\pm$ )-6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametil-cromano-2-carboxílico, solubilizado em metanol 95% (2,5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), foi usado, enquanto uma solução de metanol 95% constituiu o controle negativo. O potencial de sequestro de radicais livres das pastas de café verde e torrado foi determinada adicionando-se 28  $\mu\text{L}$  de solução metanólica de DPPH (70  $\mu\text{M}$ ) a 972  $\mu\text{L}$  das amostras testes, nas concentrações de 1 a 30  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , sendo incubadas por 20 minutos, a 25 ° C (n = 3). A atividade antioxidante dos extratos frente ao radical DPPH, que se manifesta como uma diminuição na absorbância em 517 nm foi medida em espectrofotômetro UV-Vis (UV-2000 Instruterm). A curva padrão de DPPH nas concentrações de 10 a 70  $\mu\text{M}$  foi construída e o decaimento da absorbância das amostras (Abs am) correlacionado ao decaimento da absorbância do controle (Abs ctrl) através da equação 1:

$$\% \text{SRL} = 100 - [\text{Abs am} \times 100 / \text{Abs ctrl}] \quad (1)$$

Onde % SRL = porcentagem de seqüestro de radicais livres

A fim de examinar a potência antioxidante de cada amostra de café, os valores de EC<sub>50</sub> (*efficient concentration* - concentração eficiente, necessária para sequestrar 50% dos radicais) foram calculados através de modelo de regressão linear para as várias concentrações dos extratos testados e percentual médio de atividade antioxidante.

### 3.7 ANÁLISE DE SEGURANÇA E EFICÁCIA *IN VITRO*. DOS EXTRATOS AQUOSOS DA PASTA DE CAFÉ E DO ÁCIDO CLOROGÊNICO

#### 3.7.1 Avaliação da citotoxicidade dos extratos aquosos e do ácido clorogênico

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados seguindo-se o método descrito pelo *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM, 2001), sendo adaptado neste ensaio para o uso da linhagem celular L929. Este documento descreve método *in vitro* usado para testar a segurança de compostos para uso cosmético ou farmacêutico, tendo sido revisto em 2010, e padronizado pela OECD 129 (*Organization for Economic Co-operation and Development Guidance Document 129*), sofrendo algumas modificações, sendo este último, atualmente o método reconhecido pelo CONCEA (resolução normative n°17/2015) e aceito pela ANVISA (RDC n°35/2015). Esse método avalia o efeito citotóxico de compostos químicos sobre células em cultura pela redução de viabilidade celular *in vitro* resultante da exposição da linhagem celular ao material amostral em estudo e posterior tratamento com o corante vermelho neutro (NRU - *Neutral Red Uptake*). O método mede a retenção do corante pelos lisossomas de células viáveis por espectrofotometria UV-Vis. O parâmetro final de avaliação é o estabelecimento da IC<sub>50</sub>, ou seja, da concentração da substância teste que inibe 50% do crescimento celular (GUIMARÃES; ALVES, 2010). A diferença entre os dois protocolos, o de 2001 e o de 2010, encontra-se no número de células por poço e no tempo de exposição ao tratamento. O protocolo descrito pelo ICCVAM estabelece o número de 1 x 10<sup>4</sup> células/poço e 24 h como tempo de exposição ao tratamento. O protocolo descrito pela OECD 129, considera a densidadecelular de 3 x 10<sup>3</sup>, com 48 h de tempo de exposição ao tratamento. Os dois métodos foram testados nas etapas iniciais desta pesquisa, optando-se pelo método descrito pelo ICCVAM (24 h de

tratamento, adaptado à fibroblastos L929) para testar a segurança dos extratos da pasta de café verde e torrado, e pelo método descrito pela OECD 129 (48 h de tratamento) para testar a segurança do ácido clorogênico.

As células L929, adquiridas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro, foram plaqueadas ( $1 \times 10^4$  células/poço, 96 poços) e incubadas durante 24 h ( $37^\circ\text{C}$ , 95% umidade relativa do ar, 5%  $\text{CO}_2$ ), possibilitando a adesão ao substrato e a multiplicação celular. O material amostral, extrato seco da pasta de café verde e café torrado, foi ressuspensão em meio de cultura e foram realizados ensaios com os extratos não filtrados e filtrados (filtro estéril,  $0,22 \mu\text{m}$ ), com o intuito de verificar a retenção de algum bioativo pelo material filtrante, optando-se após estes testes por avançar com extratos filtrados. Os extratos foram diluídos serialmente, em meio de cultura DMEM, estabelecendo-se oito concentrações teste: 0,003 a 10 mg/mL. Após o período de 24 h, as células foram lavadas ( $100 \mu\text{L}$  de PBS) e expostas aos extratos por 24 h, nas oito concentrações estabelecidas. Após o período de tratamento, as células foram lavadas ( $100 \mu\text{L}$  de PBS) e incubadas (3 h) na presença de  $100 \mu\text{L}$  de meio de cultura, adicionado do corante vermelho neutro ( $25 \mu\text{L}/\text{mL}$ ). Subsequentemente, as células foram lavadas ( $100 \mu\text{L}$  de PBS) e acrescidas de solução de dessorção do corante vermelho neutro (ácido acético a 1%: etanol a 50%: água destilada a 49%, v/v/v).

As células 3T3, adquiridas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro, foram plaqueadas ( $3 \times 10^3$  células/poço, 96 poços) e incubadas durante 24 h ( $37^\circ\text{C}$ , 95% umidade relativa do ar, 5%  $\text{CO}_2$ ), possibilitando a adesão ao substrato e a multiplicação celular. O ácido clorogênico foi diluído serialmente, em meio de cultura DMEM, estabelecendo-se oito concentrações teste: 0,003 a 10 mg/mL. Após o período de 24 h, as células foram lavadas ( $100 \mu\text{L}$  de PBS) e expostas ao ácido clorogênico por 48 h, nas oito concentrações estabelecidas. Após o período de tratamento, as células foram lavadas ( $100 \mu\text{L}$  de PBS) e incubadas (3 h) na presença de  $100 \mu\text{L}$  de meio de cultura, adicionado do corante vermelho neutro ( $25 \mu\text{L}/\text{mL}$ ). Subsequentemente, as células foram lavadas ( $100 \mu\text{L}$  de PBS) e acrescidas de solução de dessorção do corante vermelho neutro (ácido acético a 1%: etanol a 50%: água destilada a 49%, v/v/v).

Ao final dos ensaios, as absorbâncias ( $\lambda=540 \text{ nm}$ ) do meio de cultura foram registradas em leitor de microplacas (SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). O número de células na presença da amostra teste foi

comparado ao observado no controle negativo e a porcentagem de inibição do crescimento calculada. A concentração da amostra teste que apresentou inibição de 50% do crescimento celular ( $IC_{50}$ ) foi determinada e expressa em  $\mu\text{g/mL}$ . Este valor possibilitou comparação da citotoxicidade relativa do composto teste analisado. A determinação *in vitro* da citotoxicidade dos compostos é o primeiro ensaio biológico a ser realizado e não sendo constatada a citotoxicidade pode-se avançar para os ensaios *in vivo*. Considerando que os conteúdos de ácido clorogênico utilizados nos ensaios *in vivo* foram calculados em função do teor deste composto nos extratos de café verde, considerou-se para efeito de segurança os resultados obtidos pelos extratos de café verde. Os resultados foram calculados de acordo com a equação abaixo, onde  $C_v$  é a viabilidade celular (%),  $C_{me}$  é a média de absorbância de cada concentração da amostra,  $B_m$  é a média da absorbância do branco, e  $C_{tr_m}$  é a absorbância média do controle.

$$\left[ (C_v) = \left[ \frac{(C_{me} - B_m)}{(C_{tr_m} - B_m)} \right] * 100 \right] \quad (2)$$

### 3.7.2 Análise da viabilidade/proliferação celular por MTT

Células L929 foram cultivadas em placas de 96 poços (3 x  $10^3$  céls/poço), incubadas (37°C, 95% umidade, 5%  $CO_2$ ) para proliferação e adesão em monocamada. Após 24 h, as células foram observadas quanto à confluência e adesão, sendo tratadas com os extratos das pastas de café verde e torrado e ácido clorogênico, em oito concentrações: 0,003 a 10  $\text{mg/mL}$ , permanecendo em tratamento por 48 h. Culturas celulares não tratadas foram consideradas para efeito de controle negativo e células tratadas com SDS, nas mesmas concentrações dos extratos constituíram o controle positivo. A fim de analisar a sobrevivência das células após os tratamentos, nas distintas concentrações, foi utilizado o reagente 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromo tetrazólio para o ensaio colorimétrico de MTT, de acordo com Mosmann (MOSMANN, 1983). O MTT é um sal de tetrazólio (amarelo), solúvel em água e suscetível à ação das redutases mitocondriais das células vivas, gerando cristais de formazan como produto de reação, de coloração azul-violeta. Desta forma, este ensaio



atua como um indicador da função mitocondrial e, conseqüentemente, da viabilidade celular (MOSMANN, 1983). A mudança de coloração reflete a atividade celular e pode ser medida em termos de absorbância. Após 48 h de exposição aos tratamentos, 100 µL de meio DMEM e 10 µL de MTT (5 mg/mL, PBS) foram adicionados aos cultivos, seguido de incubação destes por 3 h (37°C, 95% umidade, 5% CO<sub>2</sub>). Após este período, o meio foi removido e acrescentou-se à amostra 50 µL de DMSO (dimetilsulfóxido). A coloração obtida a partir da adição de DMSO foi quantificada por leitura de absorbância (540 nm) em leitor de microplacas (SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). Os resultados foram calculados de acordo com a equação abaixo, onde  $C_v$  é a viabilidade celular (%),  $C_{me}$  é a média de absorbância de cada concentração da amostra,  $B_m$  é a média da absorbância do branco, e  $Ctr_m$  é a absorbância média do controle.

$$\left[ (C_v) = \left[ \frac{(C_{me} - B_m)}{(Ctr_m - B_m)} \right] * 100 \right] \quad (3)$$

### 3.7.3. Análise da morfologia celular

A análise da morfologia celular foi realizada após a obtenção dos resultados dos ensaios de citotoxicidade por NRU, como subsídio à escolha da concentração para o tratamento das células para subsequente análise de eventuais alterações morfológicas. As células L929 foram cultivadas em placas de 96 poços (3 x 10<sup>5</sup> cels/poço), para proliferação e adesão por 24 h. Na sequência, foram tratadas com os extratos das pastas de café verde e torrado e ácido clorogênico na concentração de 1 mg/mL, por 48 h. Células não tratadas foram consideradas para efeito de controle negativo. Após o período de 48 h de exposição aos tratamentos, as células foram observadas em microscópio invertido (Olympus IX83, 40X) e fotografadas, através de sistema de captura de imagem acoplado ao microscópio para posterior análise visual.

### 3.7.3 Ensaio de migração/proliferação celular – *cell scratch*

A migração e a proliferação de fibroblastos (L929) foram avaliadas utilizando-se um método que mimetiza a migração celular durante a cicatrização de feridas. O ensaio consiste na realização de uma raspagem na superfície da monocamada de células confluentes, simulando uma lesão pela interrupção da continuidade da camada de células. Quando a monocamada celular é removida por raspagem ela responde à interrupção dos contatos célula-célula, através da sinalização de citocinas, iniciando assim a proliferação e a migração celular, o que reflete a expansão da população de células no espaço entre as bordas, sendo possível medir as variações deste espaço, por exemplo (BALEKAR et al., 2012; LIANG et al., 2007). Com o intuito de verificar o efeito estimulatório dos extratos das pastas de café verde e torrado, assim como do ácido clorogênico, sobre a migração de células L929, adotou-se o método descrito por Pitz et al. (2016). Células L929 foram inoculadas a uma densidade de  $5 \times 10^5$  células/poço, em placa de 24 poços contendo meio de cultura (DMEM), suplementado com FBS a 10% (v/v) e incubado por 24 h, para adesão celular (37°C, 5% CO<sub>2</sub>e 95% de umidade). Depois do período de incubação, o meio de cultura foi removido e a monocamada celular foi removida por raspagem com o auxílio de uma ponta de pipeta amarela estéril. Os detritos celulares foram removidos por lavagem com tampão fosfato (PBS). As células foram tratadas e incubadas em meio de cultura contendo os extratos de interesse e o ácido clorogênico em seis concentrações (0,003 a 1 mg / mL), as quais foram definidas consoante aos resultados do ensaio de citotoxicidade que não indicaram efeito redutor na viabilidade celular. O controle negativo recebeu somente meio de cultura. A migração foi observada em intervalos regulares (0, 8, 12, 24 e 48 h), sendo capturadas imagens com câmera fotográfica acoplada ao microscópio (Nikon Eclipse 50i), usando-se objetiva de 40X. As imagens foram analisadas através do software ImageJ (1.42q/Java 1.6.010), estabelecendo-se medidas entre as bordas da lesão *in vitro*. Três medidas da distância entre as bordas dos cultivos foram realizadas para cada imagem, utilizando-se a média das distâncias. Os valores médios da distância entre as bordas da lesão após determinado lapso de tempo foram comparados aqueles da distância entre as bordas no tempo zero. Desta forma, foi inferida uma taxa percentual média de migração celular entre as bordas. O cálculo da taxa de migração celular, i.e., a taxa de migração/proliferação celular, foi realizado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de migração (\%)} = (D_0 - D_n) / D_0 * 100 \quad (4)$$

Onde  $D_0$  = distância entre as bordas da lesão *in vitro* ao início do ensaio;  $D_n$  = distância entre as bordas da lesão *in vitro* após o tempo “n”.

### 3.8 ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS

Os estudos pré-clínicos foram desenvolvidos através dos ensaios *in vivo*, em modelo murino, com camundongo suíço macho, para avaliação do processo de reparo tecidual cutâneo de lesão excisional dorsal. Os ensaios pré-clínicos foram desenvolvidos em duas etapas, adotando-se procedimento cirúrgico padrão.

#### 3.8.1 Procedimento cirúrgico

Os animais foram pesados, identificados e anestesiados intraperitonealmente com quetamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), através de cálculo de dosagem de acordo com o peso do animal. O efeito dos anestésicos foi monitorado imediatamente após a aplicação, seguido de tricotomia dorsal, assepsia local com iodopovidona (10%) e biópsia do tecido cutâneo. A biópsia do tecido cutâneo foi realizada utilizando-se molde padrão circular (raio = 0,5 cm), para demarcar a área a ser excisionada com auxílio de tesoura cirúrgica. Subsequentemente a biópsia, os animais receberam o tratamento que consistiu na aplicação de 0,1 g de gel de carbopol/lesão, sendo dispostos individualmente em gaiolas com ração e água, disponíveis *ad libitum*. Foi incluída medicação analgésica no pós-operatório, por exigência do comitê de ética, utilizado-se 1 mg.ml<sup>-1</sup> de paracetamol em água (CARPENTER, 2012). Os animais foram observados até sua completa recuperação do efeito anestésico. A limpeza da gaiola, água, alimentação, e o tratamento das lesões foram realizados diariamente, ao longo do período experimental. Ao término deste, os animais de cada grupo foram eutanasiados por inalação de CO<sub>2</sub>, sendo a área da lesão removida e fixada de modo adequado às análises posteriores.

#### 3.8.2 Etapa 1: avaliação do efeito dos extratos aquosos da pasta de café no processo de reparo tecidual

##### 3.8.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos suíços albinos (*Mus musculus*), machos, com 40-60 g e 9 meses de idade. Os animais, oriundos do

Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, foram transferidos ao Laboratório de Estudos em Bioatividade e Morfogênese Animal (LEBIMA - CCB) e permaneceram por 9 meses, tendo livre acesso à comida e água. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Santa Catarina (Anexo 1). O delineamento experimental completamente casualizado, utilizou 24 animais, divididos em 4 grupos ( $n = 6$ ), que foram tratados diariamente com aplicação tópica do hidrogel ao longo do período de 14 dias, conforme segue: *HPCV*, animais tratados com hidrogel da pasta de café verde (10% v/v), *HPCT*, animais tratados com hidrogel da pasta de café torrado (10% v/v), *CP*, animais tratados com hidrogel de alantoína (1% v/m), como controle positivo e *CN*, animais tratados somente com hidrogel carbopol, como controle negativo.

### 3.8.2.2 Estudo macroscópico da lesão – redução da área da lesão

A análise macroscópica da lesão buscou determinar o percentual de redução da área da lesão, através da comparação do tamanho desta em  $t_{zero}$  e ao término do período de tratamento. As lesões foram medidas com paquímetro digital, imediatamente após a cirurgia e ao fim do período experimental, i.e., 14 dias. As medidas foram sumarizadas e os tratamentos avaliados comparativamente através da média dos valores de redução da área lesada para cada grupo de tratamento. O percentual de redução da área da lesão foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\left[ (W_{cp}) = \frac{(W_{d0} - W_{dn})}{W_{d0}} * 100 \right] \quad (5)$$

Onde  $W_{cp}$  = percentual de contração da área da lesão;  $W_{d0}$  = área da lesão no dia 0;  $W_{dn}$  = área da lesão no dia n.

### 3.8.3 Etapa 2: avaliação do potencial do extrato aquoso da pasta de café verde e o do ácido clorogênico no processo de reparo tecidual

#### 3.8.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos suíços albinos (*Mus musculus*), machos, com 40-60 g e 2 meses de idade, originários do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Após transferência para o LEBIMA, permaneceram em ambientação por 15 dias, tendo livre acesso à comida e água. O delineamento experimental completamente casualizado utilizou 96 animais, divididos em 3 grupos (n = 8), considerando os momentos amostrais para a análise do processo de reparo, a saber, aos 3, 7 e 15 dias após o tratamento. Subsequentemente, cada grupo foi organizado de acordo com os seguintes tratamentos: *HPCV*, animais tratados com hidrogel da pasta de café verde (10% v/v), *HCGA*, animais tratados com hidrogel de ácido clorogênico (3% v/m), *CP*, animais tratados com hidrogel de alantoína (1% v/m)-controle positivo e *CN*, animais tratados somente com hidrogel carbopol (1% v/m) - controle negativo.

### 3.8.3.2 Estudo macroscópico da lesão – redução da área da lesão

O estudo macroscópico da lesão, nesta etapa, foi realizado através da análise comparativa do tamanho da lesão ao início e ao fim de cada período de tratamento. As lesões foram fotografadas com câmera digital (Câmera Digital Sony Cyber-Shot 12.1), com distância padronizada, imediatamente após a cirurgia, assim como ao fim de cada período experimental (3, 7 e 15 dias). As áreas das lesões foram mensuradas com auxílio do software ImageJ, a partir das fotografias obtidas. As medidas foram sumarizadas e os tratamentos avaliados comparativamente através da média dos valores da área lesada para cada tempo e grupo de tratamento. Os resultados foram expressos como a média da área da lesão (cm<sup>2</sup>) ± erro padrão da média (sem).

### 3.8.3.3 Estudo histológico da pele

O tecido cicatricial, coletado e fixado (formalina 10%, 24h) após cada período de tratamento, foi encaminhado ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), da Universidade Federal de Santa Catarina, onde foram realizadas as etapas de desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico (70, 90 e 100° GL), a diafanização em xilol, utilizando-se processador de amostras (Leica TP1020), a inclusão das amostras de pele em parafina líquida e a montagem de blocos (emblocador de amostras Leica EG1150 H e C), o corte em micrótomo (Leica RM2255), a montagem dos cortes nas lâminas e a coloração das amostras. Esta última utilizou sistema

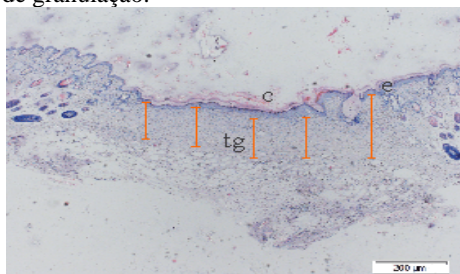
automático de coloração de lâminas, onde as etapas de desparafinização, hidratação em álcool etílico decrescente (100, 80, 70, 50° GL), aplicação dos corantes e a subsequente desidratação e fixação (Leica AUTOSTAINER XL) das amostras foi realizada sequencialmente. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) para as análises do tecido de granulação, do infiltrado inflamatório, da reepitelização e da densidade de vasos sanguíneos. Foram capturadas imagens através de digitalizador de lâminas (Axio Scan Z1 ZEISS), assim como, através de câmera acoplada ao microscópio invertido (Olympus IX83).

Para o estudo histológico da pele é importante a utilização de corantes que possibilitem a detecção e a discriminação dos diferentes elementos que a constituem. A maioria dos corantes se comporta como corantes ácidos ou básicos, formando ligações eletrostáticas com os radicais iônicos dos tecidos. A coloração de hematoxilina-eosina (HE) é a mais antiga coloração combinada e representa a coloração histológica básica geral. A hematoxilina cora em azul (violeta) estruturas ácidas como o núcleo das células e a matriz da cartilagem hialina. A eosina cora em vermelho o citoplasma, as fibras colágenas e outras estruturas básicas (MICHALANY, 1998).

#### *3.8.3.3.1 Avaliação do tecido de granulação*

A análise da espessura do tecido de granulação foi realizada em 1 lâmina/animal (n=8) nos períodos de 7 e 15 dias após os tratamentos, através da coleta de imagens em digitalizador (Axio Scan Z.1, Zeiss, Alemanha), no aumento padronizado de 40x, abrangendo toda a área da lesão. Foram realizadas 5 medidas lineares da espessura do tecido de granulação (Figura 15), utilizando-se o software Zen Axio Scan, calculando-se a média (mm).

Figura 15 - Esquema de identificação do tecido de granulação na lesão cutânea em lâmina histológica. Indicação das 5 medidas lineares da espessura do tecido de granulação.



Fonte: Elaboração da autora.

### 3.8.3.3.2 Avaliação do infiltrado de células

A avaliação do infiltrado de células foi realizada pela análise da região da lesão em 1 lâmina/animal (n=8), no 3<sup>o</sup> dia, através das imagens adquiridas em sistema de visualização Axio Scan Z.1 (Zeiss, Alemanha), equipado com lente objetiva de 40X. A análise ocorreu a partir da contagem de núcleos celulares corados por hematoxilina. Para a contagem, foi criado um quadrante padrão (0,012243 mm), que foi posicionado em 5 áreas ao longo da região da lesão, aleatoriamente, em cada lâmina, sendo consideradas “região de interesse” (Figura 16). Os núcleos foram contados por quadrante (5/lâmina) utilizando o marcador de pontos do programa Zen Axio, sendo calculada a média por lâmina/grupo tratamento. As análises foram realizadas considerando-se o método de “análise cega”, usando-se números sequenciais. A média final encontrada representou a quantidade aproximada de células infiltrantes, por grupo de tratamento.

### 3.8.3.3.3 Avaliação da angiogênese

A análise da densidade vascular foi realizada em 1 lâmina/animal (n=8) corada com HE, nos períodos de 7 e 15 dias após a aplicação dos tratamentos, através das imagens obtidas através em digitalizador Axio Scan Z.1 (Zeiss, Alemanha) no aumento padronizado de 40x, abrangendo toda a área da lesão. Foram contados os vasos sanguíneos presentes, considerando-se 5 quadrantes padronizados para a análise (0,012243), posicionados aleatoriamente (Figura 16). A média final encontrada representou a quantidade de vasos encontrados por campo, sendo indicada como densidade média de vasos.

### 3.8.3.3.4 Avaliação da espessura da epiderme

A avaliação da espessura da epiderme foi realizada ao final do período experimental, através de captura de 5 medidas lineares da camada da epiderme (1 lâmina/animal), nas imagens digitalizadas (Axio Scan, objetiva 40X, 5 medidas/amostra) de toda a área da lesão (Figura 16). Os valores de espessura da epiderme foram determinados com auxílio do programa Zen Axio e expressos como média/lâmina/animal.

Figura 16 - Esquema representativo dos quadrantes para contagem de células infiltrantes e vasos neoformados (1) e medida da espessura da camada epidérmica (2).



Fonte: Elaboração da autora.

## 3.9 ENSAIO *EX VIVO*

### 3.9.1 Marcadores enzimáticos de estresse oxidativo

As amostras de tecido cutâneo coletadas para análises bioquímicas foram preparadas aos ensaios enzimáticos, conforme descrito por Bagdas et al. (BAGDAS,et al. 2015).

#### 3.9.1.1 Atividade da catalase

As amostras de tecido cutâneo congelado (-20°) foram cortadas e pesadas em fragmentos de 20 mg. As amostras foram homogeneizadas (homogeneizador ULTRA-TURRAX) em 2mL de solução tampão fosfato de potássio (20 mM, pH 7,4) com TWEEN® 20 (1%) e NaCl (150 mM). As amostras foram agitadas (Vórtex) durante 10 s, centrifugadas (4000 rpm, 15 min, 4°C) e os sobrenadantes recuperados para análise. Os teores de proteínas foram determinados de acordo com



o método de Bradford (BRADFORD, 1976). A atividade da catalase (CAT) foi determinada através da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio em comprimento de onda de  $\lambda = 240\text{nm}$ , adaptando-se o método descrito por Aebi (AEBI, 1984) para utilização em microplacas de 96 poços. Para o teste, adicionaram-se 25  $\mu\text{L}$  de extrato de tecido cutâneo a 240  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0), suplementado com solução de peróxido de hidrogênio (10 mM). A taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio foi medida sequencialmente em intervalos de 20 s, até 10 min. As amostras foram analisadas em triplicata, sendo os resultados expressos em  $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumido/mg de proteína.

### 3.9.1.2 Atividade da superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada com base no método de Giannopolitis e Ries (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). A determinação considera a capacidade da enzima de inibir a fotorredução do cloreto de nitrotetrazólio azul (NBT). Determinou-se a atividade adicionando 25  $\mu\text{L}$  de amostra a 240  $\mu\text{L}$  de solução de trabalho em microplacas de 96 poços. A solução de trabalho foi preparada com 13 mM de metionina, 75  $\mu\text{M}$  de NBT, 100 mM de EDTA e 2 mM de riboflavina, em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,8). A reação foi iniciada pela exposição da microplaca à luz, incubando-a em câmara de lâmpadas fluorescentes (15W), à temperatura ambiente, por 5 min. Após 5 min, o conteúdo do produto azul (formazano) formado pela fotorredução do NBT foi medido espectrofotometricamente, a 560 nm. Para o cálculo da atividade específica da enzima, foi considerada a porcentagem da inibição enzimática obtida, do volume da amostra e da concentração da proteína da amostra ( $\mu\text{g}$  de proteína). Os resultados foram expressos como U SOD/ $\mu\text{g}$  proteína. Assim,  $1 \text{ U SOD}\cdot\text{mg}$  de proteína $^{-1} = [1/(x \mu\text{l} \cdot 1000 \cdot \text{diluição})]\cdot\text{mg}$  de proteína $^{-1}$ . O experimento foi realizado em triplicata e os dados expressos como médias  $\pm$  desvio padrão (sd). Uma unidade de SOD é definida como a atividade enzimática necessária para induzir 50% de inibição da fotorredução do NBT.

### 3.9.1.3 Atividade da glutatona peroxidase

A glutatona peroxidase (GPx) catalisa a redução de peróxido de hidrogênio, bem como de outros hidroperóxidos, utilizando a GSH como substrato para esta reação, produzindo glutatona oxidada (GSSG)

(EPP; LANDENSTEIN; WENDEL, 1983). Para a determinação da atividade desta enzima foi utilizado o método de Wendel (1981), onde o meio de reação é composto por tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0), 1 mM EDTA, GSH (1 mM), NADPH (0,225 mM) e 0,2 U/ml de GR. Inicia-se a reação pela adição de peróxido de cumeno (CHP) a uma concentração final de 1,0 mM. A enzima GPx presente na amostra degrada o CHP a partir da utilização da GSH como doador de elétrons, resultando em álcool do CHP, GSSG e água. A GSSG formada é rapidamente reduzida pela GR com o consumo de NADPH, que pode ser medido espectrofotometricamente em 340 nm. A atividade da GPx é proporcional ao consumo de NADPH. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e os valores foram expressos em  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  de NADPH consumido/mg de proteína.

### 3.10 ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram coletados, sumarizados e submetidos à análise de variância ANOVA unifatorial, seguida do teste de Tukey, quando necessário. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos considerando-se  $p < 0,01$  ou  $p < 0,05$ . Os valores foram expressos como média  $\pm$  sd ou sem, conforme indicado nas tabelas. Os dados das análises fitoquímicas foram tratados estatisticamente utilizando-se scripts R versão 3.1. Os demais dados foram tratados estatisticamente utilizando-se o programa BioEstat 5.1.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 ESTABELECEMENTO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO

Considerando-se que o álcool é sabidamente um bom extrator para biomassas vegetais e que a Farmacopéia Brasileira descreve os métodos de extração por soxhlet, extração a quente e extração a frio, utilizando-se como solvente o álcool, foi escolhido o método de extração a frio, com intuito de preservar ao máximo os bioativos das amostras (ANVISA, 2010; GONZÁLEZ; GONZÁLEZ, 2010).

A utilização da mistura etanol e água (70% v/v) como solvente extrator neste trabalho se mostrou adequada, considerando-se que os metabólitos foram extraídos de modo eficiente, o que foi comprovado através das análises fitoquímicas. A escolha de submeter o extrato à rotaevaporação possibilitou a retirada do etanol do extrato, sendo o extrato residual totalmente solúvel em água destilada para utilização nos ensaios biológicos posteriores. As análises fitoquímicas revelaram quantidades de cafeína e de ácidos clorogênicos superiores aos demais compostos identificados, fato que corrobora com dados apresentados anteriormente (CLIFFORD, 1985, 1999; HIGDON; FREI, 2014; KY, 2001; RODRIGUES; BRAGAGNOLO, 2013; SPILLER, 1998).

A água, o metanol, o etanol e a acetona são comumente usados como solventes de extração, no entanto, as misturas destes solventes com água constitui a estratégia mais utilizada para compostos fenólicos. As percentagens de solvente orgânico mais relatadas estão entre 50 e 95%. Em geral, nenhum organosolvente proporcionará uma recuperação de todos os compostos fenólicos, em função da diversidade estrutural e físico-química (e.g., acidez e polaridade) destes metabólitos. As relações de polaridades do solvente e dos compostos fenólicos influenciam a eficiência de extração e a atividade biológica dos extratantes obtidos. Em geral, agliconas hidroxiladas são formas de compostos fenólicos solúveis em álcoois. Solventes menos polares, como acetato de etila, acetona e clorofórmio são utilizados para as formas agliconas menos polares e altamente metoxiladas que são comuns na casca do fruto. Os fitoquímicos mais polares podem ser extraídos usando somente água. Os principais fitoquímicos do café, cafeína e ácidos clorogênicos são bastante polares, sendo facilmente extraídos somente com água, especialmente a quente. Contudo, é sabido que elevadas temperaturas de extração afetam a estabilidade dos compostos, e por este motivo foi escolhido o método de extração a frio (GONZÁLEZ; GONZÁLEZ, 2010; DORTA; LOBO; GONZÁLEZ, 2012). Além disso, o potencial

acidificante do álcool, no meio extrator, fornece íons  $H^+$  capazes de estabilizar as substâncias antioxidantes, conferindo maior precisão ao método de quantificação (ANDRADE et al., 2011). Frações ricas em substâncias com propriedade *scavenger* de radicais livres, utilizando métodos cujo produto final não seja tóxico, são potencialmente interessantes em formulações farmacêuticas e na indústria de cosméticos (KUKULA-KOCH et al., 2010).

Os métodos para a extração de compostos de matrizes vegetais, em geral, utilizam solventes orgânicos, ou misturas destes, como solventes extratores. De acordo com a finalidade do extrato, não é desejável que este possua resíduos tóxicos ao final, sendo necessário tratamento adequado pós-extração para a retirada do solvente, caso este seja tóxico. O estabelecimento do protocolo de extração levou em conta a natureza do resíduo vegetal, o solvente à ser empregado, o tamanho das partículas, a temperatura da extração e a análise comparativa com trabalhos anteriores, com o intuito de minimizar a degradação de componentes químicos da amostra ao longo do processo de extração. Embora seja pouco provável que uma única estratégia global seja válida para cada subproduto dada a diversidade de analitos e materiais, é possível fazer uma série de comparações e generalizações entre métodos. Em geral, o procedimento para determinar fitoquímicos de biomassas vegetais envolve quatro etapas comuns: seleção, armazenamento, preparação (extração do material vegetal, hidrólise e/ou purificação) e análise (quantificação e identificação).

## 4.2 ESTABILIDADE DOS EXTRATOS E PREPARO DOS HIDROGÉIS

Tabela 7 - Características sensoriais (aspecto, cor e odor) e pH dos extratos da pasta de café verde (EPCV) nos tempos zero e após 1, 7 e 15 dias, consoante as condições de armazenamento.

<b>EPCV</b>				
	<i>T0</i>	<i>T1</i>	<i>T7</i>	<i>T15</i>
Freezer (- 20°C)				
<b>Aspecto</b>	translúcido	translúcido	translúcido	translúcido
<b>Cor</b>	amarelo claro	amarelo claro	amarelo claro	amarelo claro
<b>Odor</b>	característico	característico	característico	característico
<b>pH</b>	5,5	5,6	5,6	5,6
Geladeira (4-8°C)				
<b>Aspecto</b>	translúcido	translúcido	translúcido	translúcido
<b>Cor</b>	amarelo claro	amarelo claro	amarelo claro	amarelo claro
<b>Odor</b>	característico	característico	característico	Característico
<b>pH</b>	5,5	5,6	5,6	5,6
Temperatura ambiente (23°C ± 2°C)				
<b>Aspecto</b>	translúcido	translúcido	translúcido	translúcido
<b>Cor</b>	amarelo claro	amarelo claro	amarelo claro	amarelo claro
<b>Odor</b>	característico	característico	característico	Característico
<b>pH</b>	5,5	5,6	5,7	6,0
Estufa (40°C)				
<b>Aspecto</b>	translúcido	translúcido	opaco	opaco
<b>Cor</b>	amarelo claro	amarelo claro	amarelo escuro	amarelo escuro
<b>Odor</b>	característico	característico	não característ	não característico
<b>pH</b>	5,5	5,7	6,0	6,0

Fonte: Elaboração da autora.

Tabela 8 - Características sensoriais (aspecto, cor e odor) e pH dos extratos da pasta de café torrado (EPCT) nos tempos zero e após 1, 7 e 15 dias, consoante as condições de armazenamento.

<b>EPCT</b>				
	<i>T0</i>	<i>T1</i>	<i>T7</i>	<i>T15</i>
Freezer (- 20°C)				
<b>Aspecto</b>	translúcido	translúcido	translúcido	translúcido
<b>Cor</b>	marrom	marrom	marrom	marrom
<b>Odor</b>	característic	característi	característic	característic
<b>pH</b>	5,2	5,3	5,3	5,1
Geladeira (4-8°C)				
<b>Aspecto</b>	translúcido	translúcido	translúcido	translúcido
<b>Cor</b>	marrom	marrom	marrom	marrom
<b>Odor</b>	característic	característic	característic	característic
<b>pH</b>	5,2	5,2	5,2	5,1
Temperatura ambiente (23°C ± 2°C)				
<b>Aspecto</b>	translúcido	translúcido	opaco	opaco
<b>Cor</b>	marrom	marrom	marrom escuro	marrom escuro
<b>Odor</b>	característic	característic	característi	característi
<b>pH</b>	5,2	5,2	5,2	4,8
Estufa (40°C)				
<b>Aspecto</b>	translúcido	translúcido	opaco	opaco
<b>Cor</b>	marrom	marrom	marrom escuro	marrom escur
<b>Odor</b>	característic	característico	não característ	não caracterís
<b>pH</b>	5,2	4,3	4,3	4,5

Fonte: Elaboração da autora.

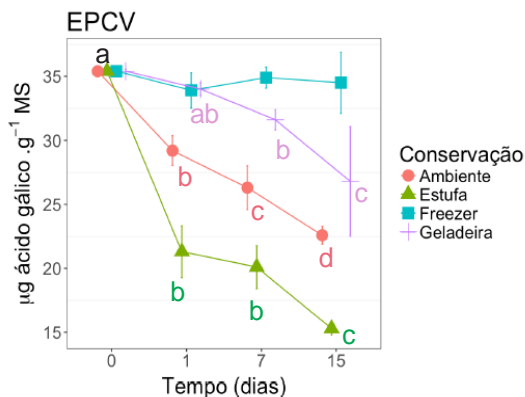
Os resultados dos estudos de estabilidade revelaram que os extratos sofreram alterações nos parâmetros sensoriais de cor e odor, após sete dias sob a condição de temperatura ambiente e estufa, assim como no conteúdo de fenólicos dos extratos. A condição de manutenção dos extratos em freezer mostrou-se mais adequada à manutenção das características sensoriais e conteúdo de fenólicos totais, com redução não significativa ao longo do período experimental de 15 dias. O armazenamento dos extratos sob refrigeração (4 – 8°C) preservou as características sensoriais ao longo de todo período experimental, contudo apresentou redução estatisticamente significativa no conteúdo total de fenólicos, ainda que inferiores ao observado sob condições de temperatura ambiente ou estufa. A manutenção dos extratos sob

temperatura ambiente, promoveu alteração na cor do extrato da pasta de café torrado, após 7 dias e do conteúdo de fenólicos totais ( $p < 0,05$ ) a partir do 1º dia. Considerando que todo o material amostral permaneceu protegido de luz, ao longo do período experimental, pode-se inferir que tais alterações são decorrentes essencialmente da ausência de refrigeração. O material amostral armazenado em estufa (40°C) apresentou alterações significativas de aspecto, cor, odor e compostos fenólicos totais a partir dos registros do 7º dia.

O pH dos extratos das amostras de café estudadas variou em torno de 4,3 a 6,0 e corroboram com estudos anteriores (NASCIMENTO, 2006). Por sua vez, o pH dos hidrogéis dos extratos da pasta de café variou entre 5,0 – 5,2, podendo-se ressaltar que é similar ao pH da pele humana, considerando que o manto hidro-lipídico da superfície da pele possui pH ligeiramente ácido, em torno de 4,5 – 5,8, tendo efeito antimicrobiano. O pH dos hidrogéis de ácido clorogênico, alantoina e carbopol puro, variou entre 4,0 – 4,5, sendo mais ácidos que as amostras de extratos de café. O conhecimento do pH da superfície cutânea, assim como de produtos à serem aplicados topicamente tem motivado pesquisadores, considerando que o potencial hidrogeniônico do manto ácido cutâneo é visto como um indicador funcional e um atributo importante para o equilíbrio da pele (RODRIGUES, 1995).

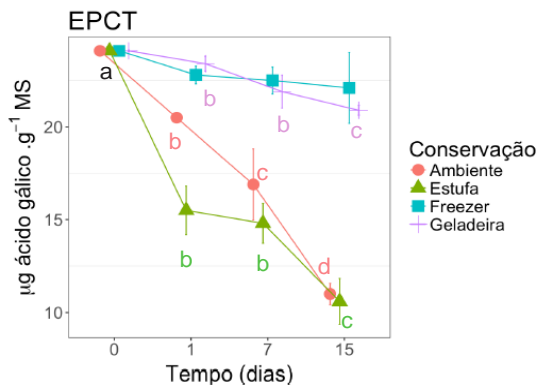
O conteúdo de fenólicos totais dos extratos da pasta de café apresentou redução significativa a partir do 1º dia na ausência de refrigeração, sendo a queda mais expressiva sob acondição da estufa, a 40°C (Figuras 17 e 18).

Figura 17 - Conteúdo de compostos fenólicos totais do extrato aquoso da pasta de café verde (EPCV) nos tempos zero, e após 1, 7 e 15 dias, mantidos em temperatura ambiente ( $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), estufa ( $40^{\circ}\text{C}$ ), freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) e geladeira ( $4-8^{\circ}\text{C}$ ). Conteúdo expresso em  $\mu\text{g}$  equivalente de ácido gálico por grama de massa seca.



Média de extrações em triplicata  $\pm$  sd. Letras distintas denotam diferenças significativas, teste de Tukey,  $p < 0.01$ . Fonte: Elaboração da autora.

Figura 18 - Conteúdo de compostos fenólicos totais do extrato aquoso da pasta de café torrado (EPCT) nos tempos zero, e após 1, 7 e 15 dias, mantidos em ambiente ( $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), estufa ( $40^{\circ}\text{C}$ ), freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) e geladeira ( $4-8^{\circ}\text{C}$ ). Conteúdo expresso em  $\mu\text{g}$  equivalente de ácido gálico por grama de massa seca.



Média de extrações em triplicata  $\pm$  sd. Diferentes letras denotam diferenças significativas, teste de Tukey,  $p < 0.01$ . Fonte: Elaboração da autora.



O ensaio de estabilidade indicou que a conservação dos extratos em freezer (-20°) foi adequada à manutenção do conteúdo de compostos fenólicos totais, no período experimental de 15 dias. Os demais tratamentos estudados apresentaram menor eficiência de estabilização dos metabólitos secundários nos EPCV e EPCT, indicando que se deve manter os extratos refrigerados a -20°C após seu preparo, assim como deve-se utilizar substâncias associadas aos extratos quando forem utilizados na confecção de produtos, com intuito de proteger os compostos fenólicos da degradação natural ao longo de determinado tempo.

De outra forma, os hidrogéis investigados nos tratamentos foram elaborados adicionando-se à formulação as substâncias tamponantes EDTA e aminometil propanol, comumente utilizadas no preparo de hidrogéis em farmácias de manipulação. Considerando-se que os ensaios de estabilidade indicaram que a manutenção dos extratos sob baixas temperaturas apresentou reduções menores, optou-se por manter os hidrogéis de tratamento na geladeira, ao longo do período experimental. Os hidrogéis contendo os extratos, utilizados nos tratamentos das lesões, em modelo murino, mostraram-se eficazes reduzindo a área da lesão tratada ao longo de 15 dias com variações nos valores de pHs consideradas não relevantes do ponto de vista dos ensaios biológicos (Tabela 9). Considerando que as propriedades físico-químicas originais dos extratos devem ser mantidas, alterações nesses fatores indicam fragilidade na estabilidade, sendo necessários estudos complementares e formulações que protejam de modo eficaz a estrutura química dos compostos bioativos nos extratos. Além desses aspectos, é necessário considerar também a manutenção das características do produto quanto à funcionalidade e segurança

Tabela 9 - Valores de pH dos hidrogéis das pastas de cafés verde (HPCV) e torrado (EPCT), do ácido clorogênico (HCGA), de alantoína (HÁ) e de carbopol (HC), no tempo zero (T0) e após 15 dias (T15).

	HPCV	HPCT	HCGA	HÁ	HC
<b>T 0</b>					
<b>pH</b>	5,2	5,0	4,3	4,0	4,5
<b>T 15</b>					
<b>pH</b>	5,0	5,1	4,2	4,0	4,5

Fonte: Elaboração da autora.

Os carbopóis são polímeros sintéticos do ácido acrílico, de alto peso molecular e caráter aniônico, que formam dispersões em meio aquoso, hidroalcoólico e com diferentes solventes orgânicos. Há diversos tipos de carbopóis, os quais são designados por um número, sendo o carbopol 940, o utilizado neste ensaio, atualmente o mais utilizado em farmácias de manipulação. Os carbopóis cuja designação é acompanhada pela letra P são de elevada pureza, com um teor residual de benzeno muito baixo sendo, por exemplo, permitindo o uso inclusive por via oral como aglutinante em comprimidos. Os termos carboxipolimetileno, polímero carboxivinílico e ácido poliacrílico são sinônimos dos carbopóis. O hidrogel de carbopol é amplamente utilizado como agente emulsionante, viscosificante, suspensor e gelificante, em fórmulas como soluções, suspensões, cremes, géis e pomadas, que se podem administrar por via oftálmica, retal e tópica. Como emulsionante é utilizado na elaboração de emulsões para uso tópico, quando se quer diminuir a proporção de gorduras. Como gelificantes, os carbômeros formam géis neutros transparentes, sendo esta característica dependente dos solventes e dos princípios ativos utilizados. Também é utilizado como aglutinante na formulação de comprimidos. Em formulação magistral, os géis acrílicos de carbopol costumam ser os de primeira escolha dado que, salvo as suas incompatibilidades, possuem ótimas características reológicas. O gel de carbopol é uma base extensível não gordurosa, que aumenta a absorção de princípios ativos incorporados. É uma base utilizada em agentes anti-seborreicos, hidratantes e revitalizantes, sendo termoestável, pelo que pode ser esterilizado em autoclave, sendo, por todos os motivos expostos acima, escolhido para esta pesquisa (ACOFARMA, 2015).

O estudo de estabilidade fornece indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade. De acordo com a Federação Internacional da Sociedade de Química Cosmética (IFSCC), o teste de estabilidade é considerado um procedimento preditivo e, como em todo procedimento preditivo, os resultados não são absolutos, mas têm probabilidade de sucesso. O estudo da estabilidade de produtos fornece informações que indicam o grau de estabilidade relativa de um produto nas variadas condições e orienta o desenvolvimento de formulações, o acondicionamento adequado, o prazo de validade, o monitoramento da estabilidade sensorial, físico-química e microbiológica, produzindo informações sobre a confiabilidade e segurança de produtos. (ANVISA, 2004).

### 4.3 PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS AQUOSOS

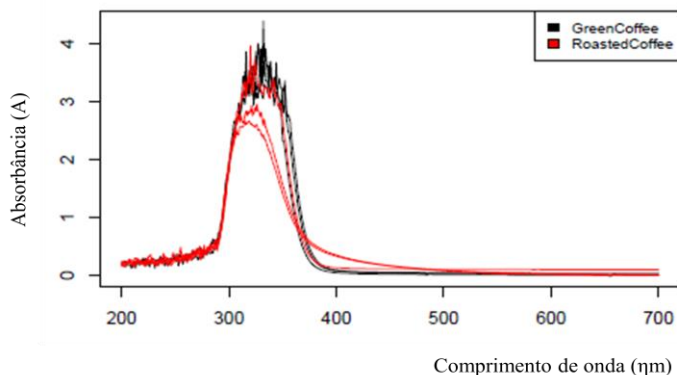
Ao se observar os perfis espectrais de UV-Vis das amostras de EPCV e EPCT, constatou-se que na região entre 280 a 380 nm, concernentes às absorvâncias das radiações UV-V e UV-A, (Figura 20) valores máximos ( $Abs > 4,0$ ) foram obtidos. As regiões após 380 nm, i.e., radiação visível, não apresentaram informações relevantes e, por este motivo, não foram incluídas nas análises posteriores de construção de modelos de classificação. Tais fatos evidenciam que a região espectral de trabalho entre 280 e 380 nm traz maiores informações referentes às amostras de café analisadas. Sabe-se que esta região engloba a região de absorvância de compostos fenólicos, indicando que o sistema de extração foi adequado à recuperação desta classe de metabólitos na matriz em estudo. A análise visual dos perfis espectrais revelou que as amostras apresentam composição química similar, sendo que os EPCT apresentam menores absorvâncias na faixa dos compostos fenólicos. Tal fato se justifica considerando que aqueles metabólitos são temolábeis, sendo usual o café torrado apresentar menores conteúdos em relação ao café verde, o que corrobora com estudos anteriores (CLARKE; MACRAE, 1989; DE MARIA; MOREIRA, 2004; FARAH et al., 2005; DUARTE; PEREIRA; FARAH, 2010).

As técnicas analíticas rápidas, baratas e robustas, como a espectrofotometria UV-Vis são de grande interesse à indústria como ferramentas de rotina no controle de qualidade de matrizes complexas, uma vez que técnicas mais específicas como as cromatografias líquida ou gasosa apresentam limitações importantes ao uso pelo seu elevado custo. Atualmente, a adoção de ferramentas de bioinformática associadas às técnicas analíticas, com o desenvolvimento de modelos descritivos e de classificação, via cálculo dos componentes principais e análise de agrupamentos hierárquicos, são ferramentas importantes à extração de informações latentes dos dados espectroscópicos.

Os espectros de varredura UV-Vis originais dos extratos gerados demonstraram variações sistemáticas e perfis com algum ruído, havendo assim a necessidade de pré-processar os dados. O pré-processamento dos dados é uma importante etapa que pode melhorar significativamente a interpretação dos espectros por reduzir a dimensionalidade, remover informações irrelevantes e *outliers*, além de melhorar a robustez e a acurácia de análises de classificação (LASCH, 2012). Os espectros originais foram submetidos ao pré-processamento seguido da determinação dos melhores modelos de classificação amostral. Os resultados mais satisfatórios foram obtidos adotando-se no pré-

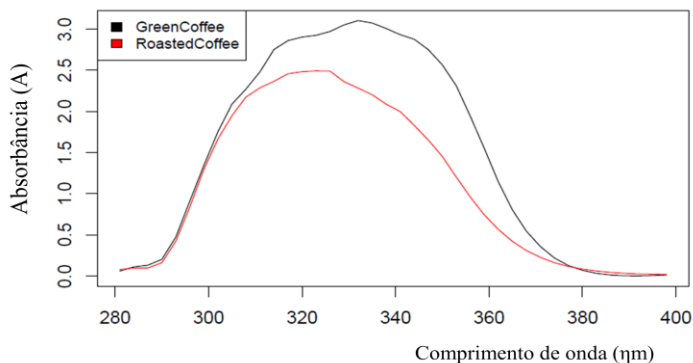
processamento dos dados a correção da linha de base pelo método *Modified Polynomial Fitting*, seguido da otimização da relação sinal/ruído (*smoothing*) método de regressão local (*Loess*). Observa-se na Figura 21 uma significativa mudança e melhora nos perfis espectrais resultantes do pré-processamento utilizado. A matriz de dados resultante do pré-processamento foi utilizada para a construção dos modelos quimiométricos discutidos a seguir.

Figura 19 - Espectros originais da varredura UV-Vis ( $\lambda = 200-700 \text{ nm}$ ) dos extratos aquosos (10% v/v) das amostras de pastas de cafés em estudo, antes do pré-processamento dos dados.



Fonte: Elaboração da autora.

Figura 20 - Espectro da varredura UV-Vis ( $\lambda = 280-400 \text{ nm}$ ) dos extratos aquosos (10% v/v) das amostras de pastas de café em estudo, após pré-processamento dos dados. Perfil espectral pré-processado com correção da linha de base e otimização da relação sinal/ruído, onde cada perfil corresponde à média das triplicatas.

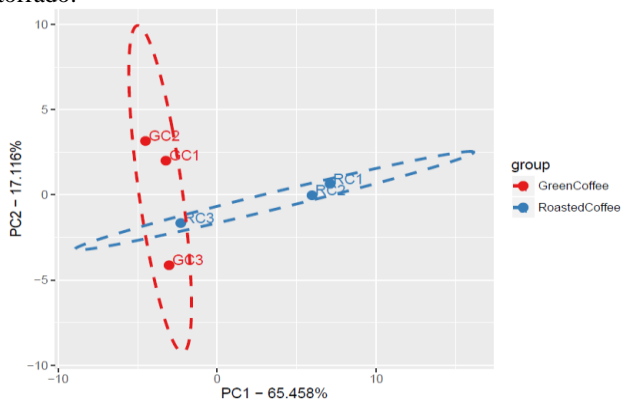


Fonte: Elaboração da autora.

Numa segunda abordagem, o conjunto de dados espectrais pré-processados foi submetido ao cálculo de componentes principais (PCA) e a análise de agrupamentos hierárquicos (HCA), considerando os dados espectrais da região de *fingerprint* de compostos fenólicos, 280-400nm.

No modelo derivado das amostras, PC1 explicou 65,46 % da variância dos dados e PC2 respondeu por 17,12 % da variância, totalizando 82,58 % da variabilidade acumulada dos dados espectroscópicos (Figura 22). APCA discriminou as amostras em dois grupos distintos, com alto percentual de variância explicado em PC1.

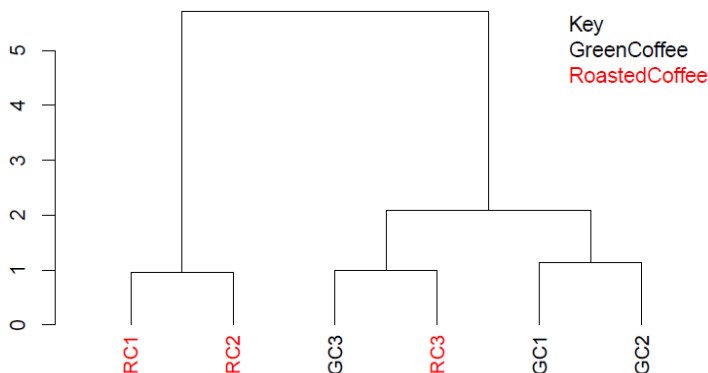
Figura 21 - Escores de dispersão dos dados espectrais de UV-Vis ( $\lambda = 280\text{-}400\text{nm}$ ) nos eixos PC1 e PC2 das amostras de extratos das pastas de cafés verde e torrado.



Fonte: Elaboração da autora.

Subsequentemente, a HCA identificou dois *clusters* iniciais de amostras, um dos quais se subdividiu em dois, originando três *clusters* conclusivos. As similaridades de amostras foram definidas com base na distância euclidiana entre os pontos e o método de encadeamento completo para os agrupamentos. Os objetos em cada cluster tendem a ser similares, porém diferem daqueles pertencentes a outros agrupamentos, não havendo qualquer informação prévia sobre a composição inicial do(s) grupo(s) (VICINI, 2005). No dendograma resultante da HCA, observa-se a formação de dois grupamentos, identificando os dois grupos de pasta de café, contudo após a subdivisão do segundo grupo, revela-se um terceiro grupo resultante da sobreposição das duas classes de pasta de café (Figura 23) Modelos de classificação de amostras baseados em técnicas de estatística multivariada tem sua robustez em função da amplitude do número de réplicas presente no conjunto de dados em análise. Assim, especula-se que o modelo de classificação construído a partir dos dados espectrais das amostras evidenciou que o perfil químico dos tratamentos é suficientemente distinto para ser bem classificado pelo método, contudo há necessidade de ampliação do universo amostral (n), para a obtenção de um modelo classificatório mais preciso e robusto.

Figura 22 - Dendrograma dosespectros da região de fingerprintde compostos fenólicos (UV-Vis,  $\lambda = 280-400\text{nm}$ ) dos extratos aquosos das pastas de cafés verde e torrado.



Fonte: Elaboração da autora.

#### 4.3.1 Conteúdos de compostos fenólicos, flavonóides e carotenóides totais

Os resultados dos conteúdos de compostos fenólicos totais mostrados na Tabela 10 revelaram valores apreciáveis e significativamente distintos ( $p < 0,05$ ) destes metabólitos secundários nas amostras estudadas. Deste modo, pode-se inferir que a extração da fração apolar da biomassa residual (i.e., fração óleo) de grãos de café, que dá origem à pasta de café, favorece a obtenção de um elevado rendimento de compostos fenólicos. A maior concentração destes metabólitos secundários foi detectada nos extratos da pasta de café verde, o que nos permite constatar a influência do processo de torrefacção que sabidamente degrada compostos fenólicos. Após a colheita e ao longo do processamento dos grãos de café, compostos fenólicos podem ser isomerizados, hidrolisados ou degradados em compostos de baixo peso molecular. As altas temperaturas do processo de torrefacção do café degradam parte dos compostos fenólicos (FARAH; DONANGELO, 2006) de interesse, ressalta-se que os conteúdos de flavonóides e carotenóides totais nas amostras investigadas foram inexpressivos.

Tabela 10 - Conteúdos totais de compostos fenólicos (mg de equivalente de ácido gálico. g<sup>-1</sup>biomassa seca, ), flavonóides (mg de equivalente de quercetina. g<sup>-1</sup>biomassa seca) e carotenóides (mg de equivalente de β-caroteno. g<sup>-1</sup>biomassa seca) dos extratos aquosos das pastas de cafés verde e torrado.

Amostra	Concentração (mg. g <sup>-1</sup> de biomassa, peso seco)		
	<i>Fenólicos</i>	<i>Flavonóides</i>	<i>Carotenóides</i>
<b>EPCV</b>	35,39 ± 3,69 a	0,22 ± 0,001 b	1,54 ± 0,06 a
<b>EPCT</b>	24,13 ± 1,45 b	1,43 ± 0,002 a	1,18 ± 0,005 a

Média de extrações em triplicata ± sem. Letras distintas denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. Fonte: Elaboração da autora.

### 4.3.2 Perfis cromatográficos de ácidos fenólicos e alcalóides

O uso da cromatografia líquida com um sistema de eluição gradiente contendo água acidificada e metanol como fase móvel é freqüente na análise de compostos fenólicos (RODRIGUES; BRAGAGNOLO, 2013). Contudo, o método adaptado neste ensaio permitiu a determinação simultânea de compostos fenólicos e alcalóides. Os resultados revelaram ácido clorogênico (11,11 mg.g<sup>-1</sup>) e a cafeína (4,5 mg.g<sup>-1</sup>) como os principais compostos no extrato de amostras de café verde (Tabela 11). Esse achado é consistente com resultados anteriores para grãos de café (CHEONG et al., 2013; CLARKE; MACRAE, 1985; FARAH et al., 2005; FARAH; DONANGELO, 2006). Novamente, considerando que os ácidos fenólicos e seus derivados podem ser degradados sob altas temperaturas, pode-se especular que a concentração mais baixa destes ácidos nas amostras da pasta de café torrado resulta do tratamento térmico dessa biomassa durante o processo de torrefação. As amostras de café torrado apresentaram quantidades superiores de cafeína comparativamente às biomassas verdes. Além disso, as amostras estudadas mostraram-se discrepantes em seus teores de alcalóides e ácidos clorogênicos, sugerindo diferentes potenciais quanto aos seus efeitos biológicos, haja vista que as quantidades daqueles metabólitos secundários são responsáveis por várias das atividades biológicas dos extratos de café (ESQUIVEL; GIMENÉZ, 2012).

A análise fitoquímica dos extratos de café permitiu identificar e quantificar, através das técnicas espectrofotométrica e cromatográfica, compostos bioativos relevantes e revelou ser o extrato da pasta de café verde o de maior conteúdo em ácido clorogênico, elegendo-o aos ensaios posteriores de citotoxicidade.



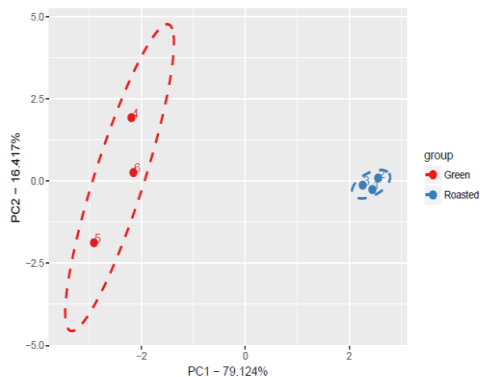
Tabela 11 - Concentrações (mg. g<sup>-1</sup> de biomassa, peso seco) de ácidos fenólicos e alcalóides nos extratos aquosos dos cafés verde e torrado, determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa.

Compostos	Conteúdos (mg. g <sup>-1</sup> de biomassa, peso seco)	
	<i>EPCV</i>	<i>EPCT</i>
	<b>280 nm</b>	
<b>Ácido clorogênico</b>	11,11 ± 0,28 a	1,95 ± 0,31 b
<b>Ácido siríngico</b>	0,96 ± 0,04 d	0,84 ± 0,08 c
<b>Ácido ferúlico</b>	1,40 ± 0,29 d	0,92 ± 0,16 c
<b>Ácido protocatecuico</b>	1,20 ± 0,003 d	0,21 ± 0,02 d
<b>Ácido p-hidroxi benzoico</b>	0,08 ± 4,1 e	0,05 ± 1,05 d
<b>Cafeína</b>	4,5 ± 0,06 b	5,6 ± 0,08 a
	<b>320 nm</b>	
<b>Ácido caféico</b>	0,01 ± 0,002 e	n.d.
<b>Teofilina</b>	0,01 ± 0,003 e	n.d.
<b>Trigonelina</b>	1,55 ± 0,51 c	1,02 ± 0,14 c

Média de injeções em triplicata ± sd. Letras distintas denotam diferenças significativas pelo teste de Tukey,  $p < 0,05$ . Fonte: Elaboração da autora.

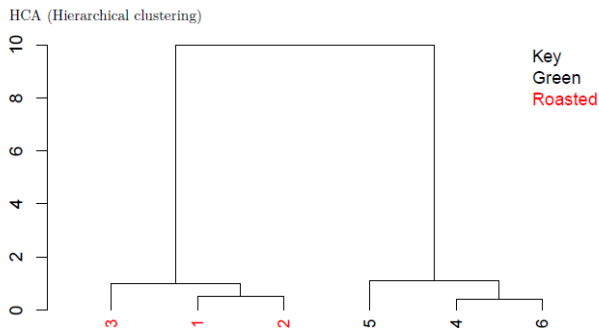
O conjunto de dados cromatográficos foi submetido ao cálculo de componentes principais (PCA) e a análise de agrupamentos hierárquicos (HCA). O modelo de classificação derivado da PCA demonstrou com clareza que os dois extratos apresentam perfis metabólicos distintos. PC1 explicou 79,12 % da variância dos dados, enquanto PC2 respondeu por 16,42 % da variância destes, totalizando 95,54 % da variabilidade acumulada (Figura 24). A HCA identificou dois *clusters* distintos que se subdividiram em outros dois, originando quatro *clusters* conclusivos (Figura 25). As similaridades foram definidas com base na distância euclidiana entre os pontos e o método de encadeamento completo para os agrupamentos. No dendograma resultante da HCA identifica-se com clareza os dois tipos de pasta de café investigados.

Figura 23 - Escores de dispersão dos dados fitoquímicos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa nos eixos PC1 e PC2 das amostras dos extratos aquosos das pastas de cafés verde e torrado.



Fonte: Elaboração da autora.

Figura 24 - Dendrograma dos dados cromatográficos das amostras dos extratos aquosos das pastas de cafés verde e torrado.



Fonte: Elaboração da autora.

#### 4.4 POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS – ENSAIO DPPH

O potencial de sequestro de radicais DPPH (%) dos extratos das pastas de cafés analisados foi calculado após 20 min de incubação, revelando atividade máxima com 30  $\mu\text{g/mL}$ , semelhante à atividade do Trolox, i.e., antioxidante utilizado como controle positivo (Tabela 12). A quantificação de compostos químicos nas amostras estudadas confirmou a presença dos metabólitos mais expressivos em biomassas

de café, cafeína e ácidos clorogênicos, metabólitos secundários relacionados à atividade antioxidante. Dentre os compostos presentes no café, revelados em muitos estudos anteriores, sabe-se da importância também das melanoidinas e dos compostos heterocíclicos como metabólitos com expressivo potencial antioxidante (BORRELI et al., 2002; DELGADO-ANDRADE et al., 2005; DEVASAGAYAM et al., 1996; VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2011). Sabe-se que o processo de torrefação degrada compostos fenólicos, contudo os alcalóides são termoestáveis, assim como há a formação de melanoidinas. Nos cafés, a atividade antioxidante é geralmente associada aos seus conteúdos de compostos fenólicos, cafeína e dos produtos da reação de Maillard (DEVASAGAYAM et al., 1996; GOMÉZ-RUIZ, et al., 2007; YANAGIMOTO et al., 2002). Entre os diferentes compostos fenólicos no café, os mais abundantes são os ácidos hidroxicinâmicos que existem principalmente na forma esterificada. O melhor exemplo é o ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquinico) com um teor médio de 100 mg por xícara de café (CLIFFORD, 1999). Poucos ácidos fenólicos livres estão presentes no café, embora pequenas quantidades de ácidos cafeico, ferúlico e vanílico tenham sido detectadas (CLIFFORD, 1985). É importante notar que o método aqui utilizado para quantificar os compostos fenólicos totais, isto é, o método do reagente Folin-Ciocalteu, é baseado em uma reação redox, podendo ser também considerado uma avaliação da atividade antioxidante (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Com o intuito de verificar se há uma relação direta entre o conteúdo de fenólicos totais e de cafeína dos extratos das pastas de cafés com seu potencial de sequestro do radical DPPH, procedeu-se à análise de correlação de Pearson. A atividade de sequestro do radical DPPH do extrato aquoso da pasta de café verde correlacionou-se positivamente ( $r = 0,5$ ) ao conteúdo de compostos fenólicos totais, enquanto que a correlação com o extrato aquoso da pasta de café torrado foi negativa. Por sua vez, a atividade de sequestro do radical DPPH do extrato da pasta de café torrado apresentou correlação positiva ( $r = 0,9$ ) com os teores de cafeína, sendo a correlação com este componente negativa para os extratos de café torrado.

O equilíbrio oxidativo em sistemas fisiológicos é regulado por mecanismos endógenos e exógenos, sendo o fundamental para a homeostase, pois o excesso de radicais livres provoca o estresse oxidativo que está relacionado a muitas doenças (BOUAYED; BOHN, 2010; SU et al., 2007). O controle do excesso de moléculas oxidativas inclui a ingestão ou aplicação tópica de antioxidantes exógenos ou mesmo moléculas que podem estimular o sistema de antioxidantes

endógenos (HOELZL et al., 2010). Assim, a atividade antioxidante de extratos de grãos de café está relacionada à presença de vários constituintes naturais e aos compostos formados durante o processamento, por exemplo, cafeína (DEVASAGAYAM et al., 1996), ácidos clorogênicos e hidroxycinâmicos (DELGADO-ANDRADE et al., 2005; GALLARDO, *et al.*, 2006) e produtos da reação de Maillard (BORRELI et al., 2002; DELGADO-ANDRADE et al., 2005).

Tabela 12 - Atividade máxima percentual, de seqüestro do radical DPPH dos extratos aquosos das pastas de café verde e torrado, comparada à atividade de seqüestro do Trolox - controle positivo.

Amostra (30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Atividade máxima (%)	EC 50 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
<b>EPCV</b>	96,21 $\pm$ 1,26	15,5 $\pm$ 0,84
<b>EPCT</b>	95,35 $\pm$ 2,20	14,0 $\pm$ 2,89
<b>Trolox</b>	96,36 $\pm$ 0,33	4,3 $\pm$ 0,76

Média de leituras  $\pm$  desvio padrão. ANOVA, uma via. Fonte: Elaboração da autora.

## 4.5 SEGURANÇA E EFICÁCIA *IN VITRO*

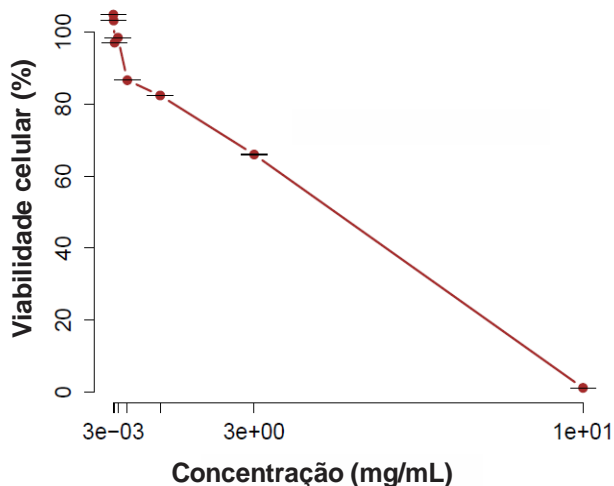
### 4.5.1 Citotoxicidade dos extratos e do ácido clorogênico

A citotoxicidade dos extratos aquosos das pastas de cafés verde e torrado e do ácido clorogênico foi determinada através do protocolo ICCVAM (1 x 10<sup>4</sup> células/poço, 24h tratamento). Através do método ICCVAM, adaptado com células L929, o extrato da pasta de café torrado e o ácido clorogênico apresentaram redução da viabilidade celular. O extrato da pasta de café torrado causou redução de viabilidade celular a partir de 3 mg.mL<sup>-1</sup>, com IC<sub>50</sub> de 4,88 mg.mL<sup>-1</sup> (LD<sub>50</sub> = 2.482,00 mg.kg<sup>-1</sup>), conforme demonstrado na Figura 25. Em função do valor de LD<sub>50</sub> observado, este extrato foi considerado inócuo. O IC<sub>50</sub> é uma variável que indica a concentração de dado composto capaz de inibir 50% da viabilidade celular. Por sua vez, a LD<sub>50</sub> é uma forma de expressar o grau de citotoxicidade de dada espécie química capaz de matar 50% dos indivíduos de uma população. Embora a viabilidade celular reduza totalmente a 10 mg.mL<sup>-1</sup>, o valor da LD<sub>50</sub> caracteriza o extrato aquoso da pasta de café torrado como não tóxico, pois a citotoxicidade é considerada para valores de LD<sub>50</sub> inferiores a 2000 mg.kg<sup>-1</sup>.

O ácido clorogênico causou redução da viabilidade a partir da concentração de  $0,3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , com  $\text{IC}_{50}$  de  $0,194 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $\text{LD}_{50} = 750 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), sendo considerado tóxico em função de seu valor de  $\text{LD}_{50}$ , i.e.,  $< 2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . O extrato aquoso de café verde não conduziu à redução da viabilidade celular em concentrações iguais ou inferiores a  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Os valores de desvios encontrados nos tratamentos utilizando extratos filtrados e não filtrados foram superiores para estes últimos, porém sem influência relevante na viabilidade celular, sugerindo que o material filtrante não retém substâncias bioativas. Todavia, por questões de obtenção de resultados estatísticos com menor desvio, optou-se em realizar todos os ensaios biológicos com extratos filtrados. Tradicionalmente, a determinação *in vitro* da citotoxicidade dos compostos é o primeiro ensaio biológico a ser realizado e não constatando-se a citotoxicidade pode-se avançar para ensaios *in vivo*, caso necessário.

Figura 25 - Viabilidade celular *in vitro*, após 24 h de exposição ao extrato aquoso da pasta de café torrado. Foram detectadas reduções importantes da viabilidade celular a uma concentração de  $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ou superior, tal como determinado através do ensaio de NRU. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (sd).



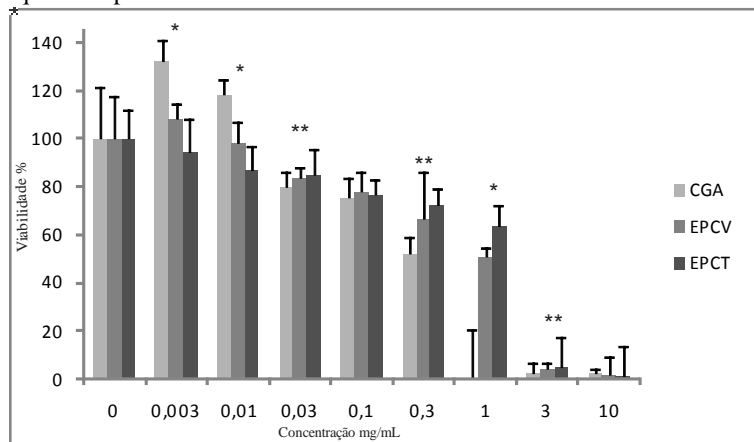
Fonte: Elaboração da autora.

#### 4.5.2 Viabilidade/proliferação

Os ensaios de viabilidade/proliferação celular através do teste colorimétrico por MTT revelaram que o ácido clorogênico aumentou a viabilidade/proliferação celular nas concentrações de 0,003 e 0,01 mg.mL<sup>-1</sup>. Contudo, a partir de 0,3 mg.mL<sup>-1</sup> a viabilidade celular foi reduzida (52,17% ± 7,02), sendo que concentrações iguais ou superiores a 1 mg.mL<sup>-1</sup> causaram morte celular em torno de 100%, com 48 h de tratamento (Figura 26).

Os tratamentos com os extratos da pasta de café revelaram que a concentrações até 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> alteraram pouco a viabilidade celular, mantendo-a em torno de 80% a 100% (Figura 27). Concentrações superiores causaram redução da viabilidade celular, a saber: 0,3 mg.mL<sup>-1</sup> (EPCV = 66,6% ± 9,8; EPCT = 72,32% ± 6,8) e 1 mg.mL<sup>-1</sup> (EPCV = 51,18% ± 3,3; EPCT = 63,32% ± 9,2). Assim, pode-se inferir que o ácido clorogênico pode ser considerado mais efetivo comparado aos extratos da pasta de cafés no sentido de promover o aumento de viabilidade se utilizado em concentrações até 0,01 mg.mL<sup>-1</sup>.

Figura 26 - Viabilidade celular in vitro, após 48 h de exposição aos tratamentos. Concentrações: 0,003 a 10 mg.mL<sup>-1</sup>. CN = controle negativo; CGA = ácido clorogênico; EPCV = extrato aquoso da pasta de café verde; EPCT = extrato aquoso da pasta de café torrado.



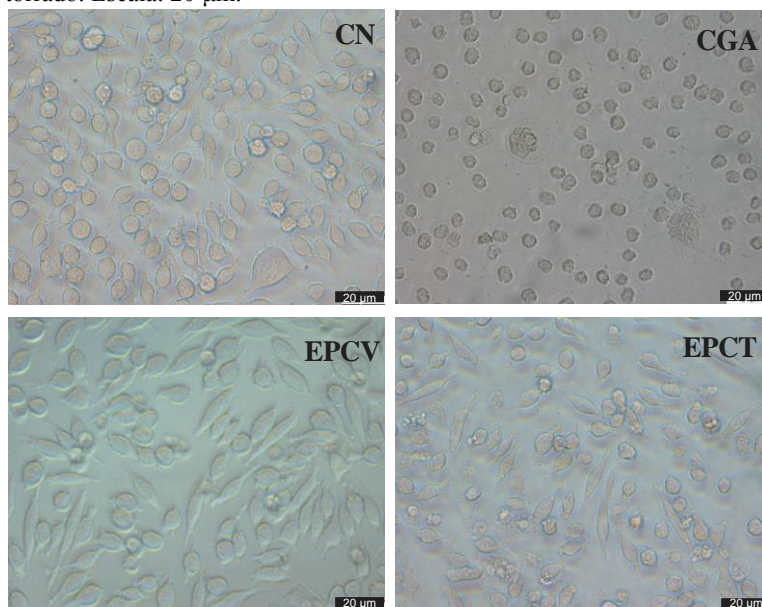
Os valores representam as médias ± desvio padrão de triplicata de 3 experimentos independentes. \* todos os tratamentos diferem entre si.

\*\*tratamento com CGA difere do tratamento com os extratos. ANOVA uma via, p<0,05, teste de Tukey. Fonte: Elaboração da autora.

### 4.5.3 Morfologia

A morfologia das células L929 *in vitro* foi observada em microscópio invertido, com aumento de 400X, após 48 h de tratamento, buscando identificar o grau de influência da concentração considerada “límitrofe” dos extratos das pastas de cafés ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), pelo ensaio de MTT. Os resultados demonstraram células com aspecto fibroblastóide após tratamento com extratos da pasta de café verde. O tratamento com os extratos da pasta de café torrado sugerem redução de viabilidade. A concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  conduziu as células à morte celular, corroborando com os ensaios de MTT, o que pode ser observado na Figura 27.

Figura 27 - Fotomicrografia de células em cultura, após 48 h de tratamento, na concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , e de células não tratadas. Microscópio invertido, luz branca, objetiva de 40x. CN = controle negativo; CGA = ácido clorogênico; EPCV = extrato da pasta de café verde; EPCT = extrato da pasta de café torrado. Escala:  $20 \mu\text{m}$ .



Fonte: Elaboração da autora.

#### 4.5.4 Migração/proliferação celular – *cell scratch assay*

A migração e a proliferação das células são eventos importantes em muitos processos fisiológicos como, por exemplo, no processo de reparo tecidual, sendo os fibroblastos responsáveis pela migração, proliferação e produção de colágeno. A capacidade de estimular o crescimento das células fibroblásticas é um modelo útil para testar a atividade cicatricial *in vitro* (ADETUTU et al., 2011).

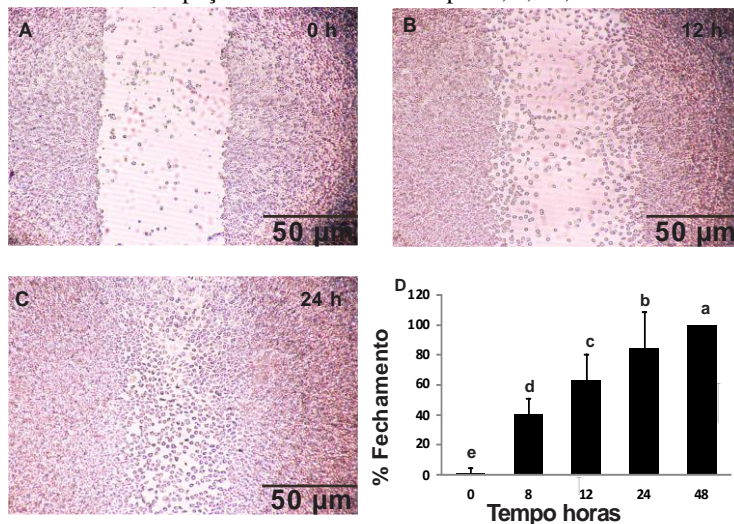
Os resultados dos ensaios de *scratch* ou *wound healing* para avaliar o potencial dos extratos de cafés em estimular a migração/proliferação celular, são mostrados nas Figuras 29 a 33, representativas dos tempos 0, 12 e 24 h de tratamento. O gráfico que acompanha as imagens revela o resultado do percentual de fechamento da área lesada nos tempos investigados.

A análise do efeito dos tratamentos ao longo do período experimental revelou que o ácido clorogênico mostrou-se mais eficiente no estímulo à migração celular, diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais tratamentos com os extratos das pastas de café no tempo de 8 h. Para este mesmo tempo amostral, o extrato da pasta de café verde apresentou efeito superior aquele da pasta de café torrado. Contudo, após 12 h de exposição aos extratos, os efeitos dos tratamentos sobre a migração celular foram similares, inclusive em relação ao controle negativo.

Após o lapso de tempo de 24 h, o fechamento da área lesionada ficou acima de 80% em todos os tratamentos, alcançando total oclusão após 48 h, exceto para o tratamento com CGA que causou a morte celular. Estes resultados demonstram que concentrações de até 1 mg.mL<sup>-1</sup> dos extratos das pastas de cafés, com tempo de exposição de até 48 h, não prejudicam a migração/proliferação das células L929 *in vitro*, considerando que o percentual de fechamento da área lesada foi similar ao controle. Curiosamente, este ensaio demonstrou que o tratamento com ácido clorogênico a 1 mg.mL<sup>-1</sup>/ 24 h não se mostrou prejudicial à migração/proliferação celular. De fato, as análises de viabilidade e morfologia celular revelaram a impossibilidade de tempos maiores de exposição celular àquele ácido polifenólico, como o observado no tratamento de 48h. Deste modo, podemos compreender que o tempo é determinante para o tratamento com ácido clorogênico.

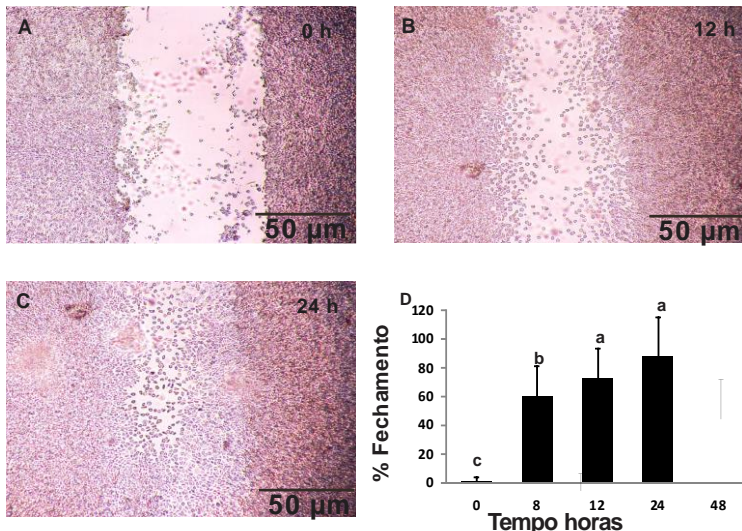


Figura 28 - Fotomicrografia do ensaio de migração celular e porcentagem de fechamento do espaço entre as bordas, em células L929 sem tratamento. A-C: Imagens representativas dos tempos 0, 12 e 24 h. D: Percentagem de fechamento do espaço entre bordas nos tempos 0, 12 e 24 h. D: Percentagem de fechamento do espaço entre bordas nos tempos 0, 8, 12, 24 e 48 h.



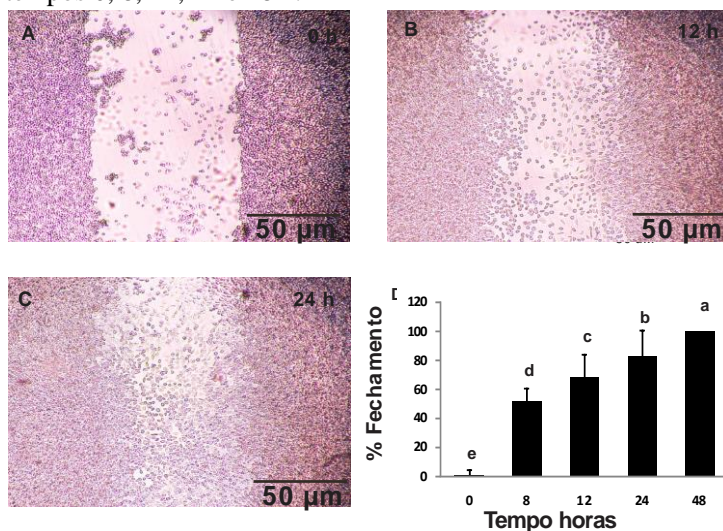
Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. ANOVA uma via, teste de Tukey  $p < 0,05$ . Fonte: Elaboração da autora.

Figura 29 - Fotomicrografia do ensaio de migração celular e porcentagem de fechamento do espaço entre as bordas, em células L929 tratadas com ácido clorogênico ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). A-C: Imagens representativas dos tempos 0, 12 e 24 h. D: Porcentagem de fechamento do espaço entre bordas nos tempos 0, 8, 12, 24 e 48 h.



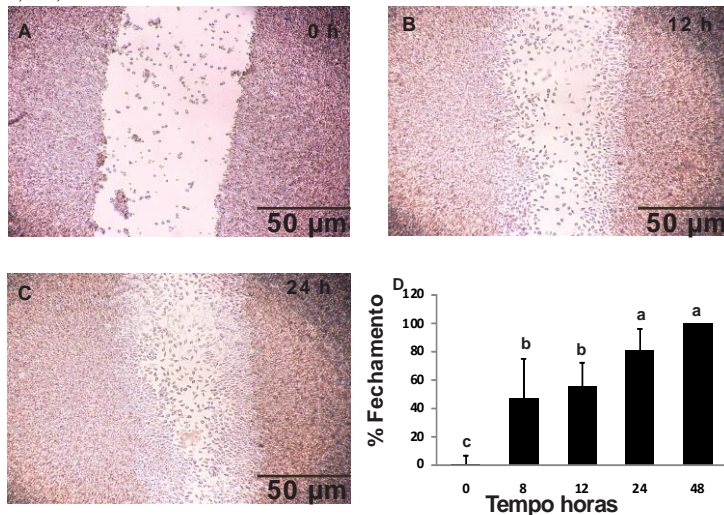
Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. ANOVA uma via, teste de Tukey  $p < 0.05$ . Fonte: Elaboração da autora.

Figura 30 - Fotomicrografia do ensaio de migração celular e porcentagem de fechamento do espaço entre as bordas, em células L929 tratadas com extrato da pasta de café verde (1 mg.mL<sup>-1</sup>). A-C: Imagens representativas dos tempos 0, 12 e 24 h. D: Porcentagem de fechamento do espaço entre bordas nos tempos 0, 8, 12, 24 e 48 h.



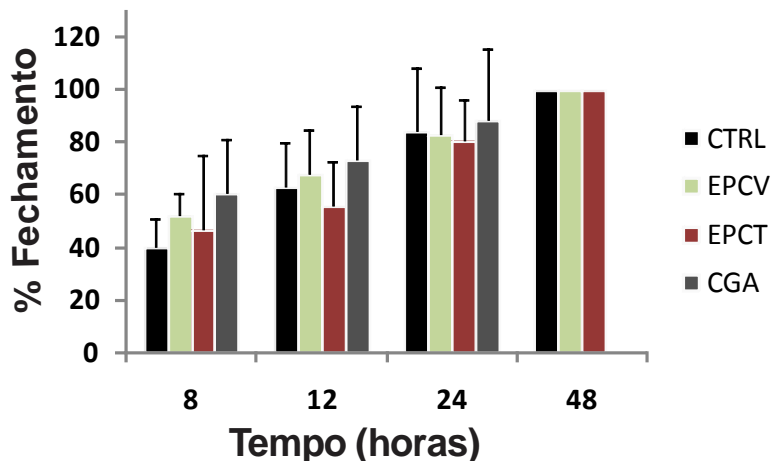
Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. ANOVA uma via, teste de Tukey  $p < 0.05$ . Fonte: Elaboração da autora.

Figura 31 - Fotomicrografia do ensaio de migração celular e porcentagem de fechamento do espaço entre as bordas, em células L929 tratadas com extrato da pasta de café torrado (1 mg.mL<sup>-1</sup>). A-C: Imagens representativas dos tempos 0, 12 e 24 h. D: Porcentagem de fechamento do espaço entre bordas nos tempos 0, 8, 12, 24 e 48 h.



Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. ANOVA uma via, teste de Tukey  $p < 0.05$ . Fonte: Elaboração da autora.

Figura 32 - Efeito dos tratamentos na migração/proliferação de células L929, *in vitro*, expresso pelo fechamento (%) do espaço entre as bordas da lesão da monocamada celular *in vitro*, ao longo do tempos experimentais de 8, 12, 24 e 48 h.



Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. \* todos os tratamentos diferem entre si. \*\* o tratamento com CGA difere do com EPCT. ANOVA uma via, teste de Tukey  $p < 0.05$ . Fonte: Elaboração da autora.

#### 4.6 ESTUDO PRÉ-CLÍNICO: POTENCIAL DE REPARO TECIDUAL *IN VIVO* DOS EXTRATOS AQUOSOS DE PASTAS DE CAFÉ

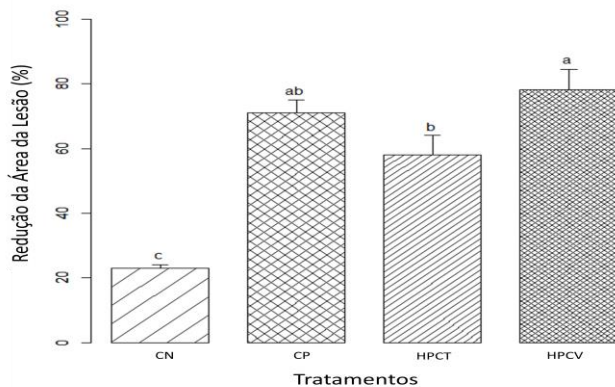
Os estudos pré-clínicos, realizados em duas etapas experimentais, demonstraram que os tratamentos de lesões com os hidrogéis enriquecidos com os extratos de café auxiliaram o processo de reparo cutâneo, reduzindo o tamanho da lesão.

##### 4.6.1 Potencial de reparo tecidual dos extratos da pasta de café verde e da pasta de café torrado

O potencial de reparo tecidual dos extratos de interesse foi avaliado através de uma primeira etapa experimental *in vivo*, com intuito de verificar qual dos extratos apresentaria melhor desempenho para avançar para a segunda etapa *in vivo*. Por este motivo foi utilizado um

grupo experimental de animais com nove meses de idade, sabendo-se da influência do fator idade na redução de respostas fisiológicas frente ao reparo tecidual, o que supostamente poderia exacerbar a resposta dos tratamentos. Os resultados da primeira etapa experimental *in vivo* referentes à redução do tamanho da lesão ao longo do tempo permitiram inferir que a estratégia escolhida favoreceu a análise comparativo potencial dos extratos no reparo de lesões. O tratamento com o hidrogel contendo extratos da pasta de café verde apresentou o melhor resultado na redução da ferida (78,20%), não diferindo estatisticamente do controle positivo (70,83% - Figura 34) O hidrogel da pasta de café torrado foi menos eficaz em relação ao hidrogel da pasta de café verde ( $p < 0,05$ ), porém não diferindo significativamente do controle positivo ( $p < 0,05$ ). Foi detectada uma pequena redução da área da ferida para o controle negativo (23,56%), diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Assim, pode-se assumir que os hidrogéis enriquecidos com os extratos da pasta de café auxiliam o processo de reparo de feridas cutâneas, revelando efeitos positivos quanto à redução do tamanho da lesão (Figura 31).

Figura 33 - Redução percentual da área da ferida após 14 dias de tratamento com hidrogéis aplicados diariamente em camundongos com 9 meses de idade. Legenda: CN (controle negativo = 23,56% c), CP (controle positivo = 70,83% ab), HPCT (hidrogel da pasta de café torrado = 53,71% b) e HPCV (hidrogel da pasta de café verde = 78,20% a).



Os dados são apresentados como média  $\pm$  sem. Letras distintas denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Fonte: Elaboração da autora.

De fato, pode-se argumentar que o desempenho superior no reparo de lesões cutâneas, do hidrogel contendo extrato de café verde relaciona-se a sua maior concentração de compostos fenólicos, de acordo com a análise fitoquímica. Ensaios *in vivo* sobre o efeito de extratos de café no processo de cicatrização de lesões cutâneas não foram encontrados na literatura até o presente momento. Embora todos os tratamentos tenham reduzido significativamente a área da lesão, quando comparados ao controle positivo, ressalta-se que o uso de camundongos adultos com 9 meses de idade, tipicamente difere de outras abordagens experimentais em que animais mais jovens são utilizados, em geral (GALIANO et al., 2004). De fato, há diferenças substanciais na resposta de cicatrização de lesões cutâneas entre indivíduos jovens e adultos, geralmente com maiores intervalos de tempo nos animais adultos. Os efeitos adversos do envelhecimento no reparo de feridas são bem conhecidos e são compensados por tratamentos que aceleraram o fechamento das feridas (GUO; DIPIETRO, 2010; SUZUKI, et al., 1989). Estudo prévio de Bagdas e colaboradores relataram que a aplicação sistemática de CGA em pequenas cirurgias de pele pode acelerar a cicatrização e que segmentos de pele de animais com atraso na cicatrização de feridas, por condições diabéticas, são capazes de sobreviver (BAGDAS et al., 2014a, 2014c). Nesse sentido, os achados ora descritos mostram-se consistentes com relatos prévios e são relevantes, porque indicam que o tratamento de lesões cutâneas com extratos das pastas de cafés é verdadeiramente eficiente para aumentar a resposta fisiológica, melhorando significativamente o processo de reparo tecidual da pele.

É importante destacar as diferenças da pele humana em relação à pele de camundongos. Esta apresenta estrutura variável conforme a região estudada, sendo mais espessa na região dorsal e mais fina na região ventral e nos membros. A epiderme é pouco espessa, formada por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, com colágeno denso e abundantes fibras elásticas. Na derme, o colágeno é mais delicado e frouxo, sendo constituído por fibras colágenas e elásticas finas. Nesta região, os folículos e respectivos pêlos são abundantes, havendo muitas glândulas sebáceas. Não há glândulas sudoríparas nem papilas dérmicas, e há muitos vasos e nervos (ANDRADE, 2007).

Modelos animais são abordagens experimentais desenvolvidas em determinadas espécies com o propósito de estudo de fenômenos que ocorrem em alguma outra espécie. Estes são válidos se apresentarem as mesmas estruturas envolvidas no comportamento ou na patologia humana em estudo. A importância desses modelos reside na

possibilidade de se proporcionar uma melhor compreensão das patologias humanas, servindo como ferramentas à elucidação de vias bioquímicas e fisiológicas envolvidas nas doenças e possibilitando a identificação de alvos que permitam o desenvolvimento de drogas terapêuticas (GALIANO et al., 2004).

Entre todos os organismos modelos conhecidos atualmente, o camundongo é muitas vezes escolhido por apresentar características como tempo de geração curto, fácil manipulação e criação, além de ser possível à realização de cruzamentos controlados com o intuito de promover as linhagens isogênicas. Ademais, a homologia tanto no nível genotípico quanto no fenotípico (fisiologia, patologia, vias metabólicas) entre *Homo sapiens* e *Mus musculus* justifica fortemente a escolha desta em relação às outras como modelo de estudos. De interesse, o DNA codificador do camundongo possui uma homologia em relação ao humano que pode variar de 70 a 90% (GALIANO et al., 2004).

O objetivo do uso de modelos animais em estudos de reparo de lesões é replicar a fisiologia humana e prever resultados terapêuticos. A cicatrização de feridas tem sido estudada em muitas espécies de animais. Modelos de roedores, no entanto, têm sido criticados porque o principal mecanismo de oclusão da ferida é a contração, enquanto a reepitelização e a formação de tecido de granulação são os principais mecanismos envolvidos na cura da ferida humana. Diversos tipos de modelos em cicatrização animal são descritos na literatura, incluindo o modelo excisional. Neste modelo, a cura ocorre a partir das margens da ferida, permitindo a avaliação de mecanismos envolvidos na cicatrização da lesão, incluindo a reepitelização, a formação de tecido de granulação e de cicatriz e a angiogênese. Além disso, esta técnica permite aplicação de medicamentos diretamente na ferida. Contudo, é preciso considerar que não há atualmente nenhum modelo de cicatrização de feridas em roedores que se assemelha estreitamente a cicatrização de feridas humanas, de modo que eventuais extrapolações àquela espécie deverão ser poderadas (GALIANO et al., 2004).

#### **4.6.2 Avaliação do potencial de reparo tecidual do extrato da pasta de café verde e do ácido clorogênico**

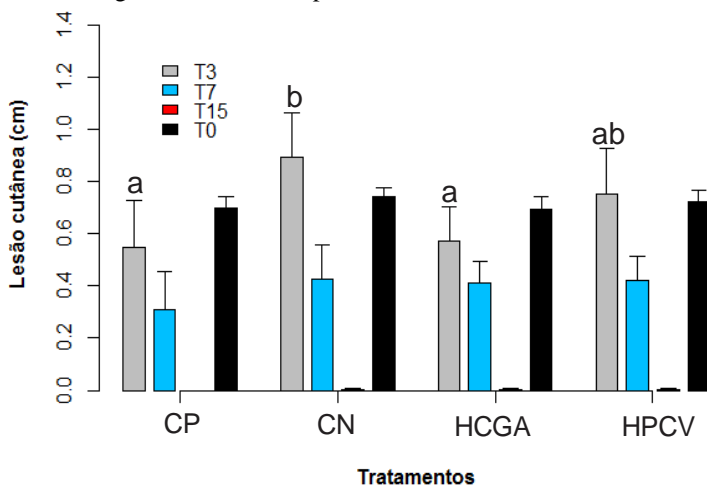
##### **4.6.2.1 Estudo macroscópico da lesão**

O hidrogel de ácido clorogênico aplicado diariamente sobre a lesão da pele reduziu significativamente o tamanho de sua área na fase inflamatória, 3 dias após o pós-operatório, o que pode estar associado



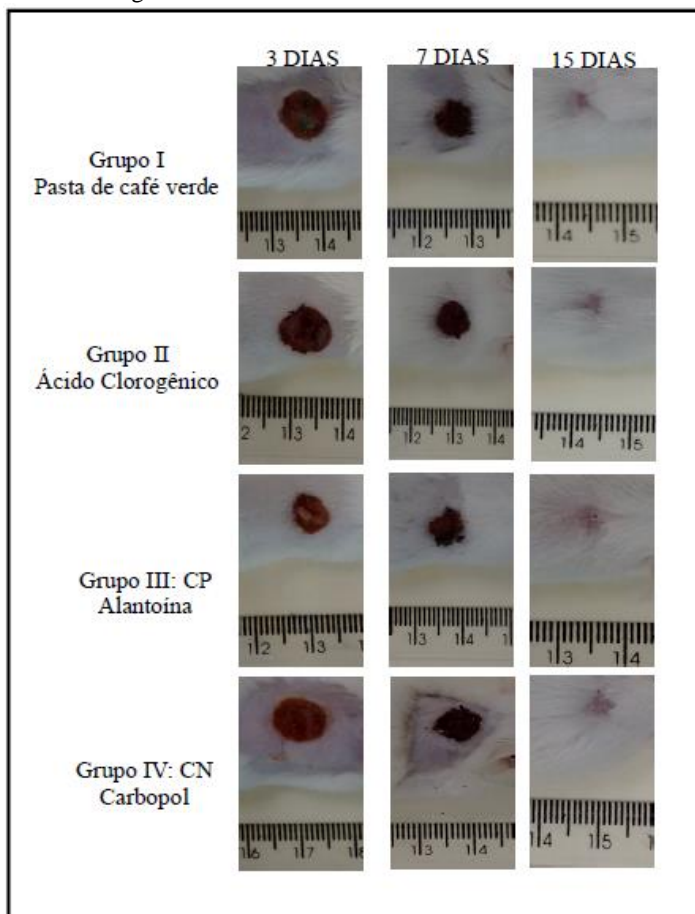
com as seu conhecido potencial antioxidante e anti-inflamatória. De fato, o hidrogel contendo CGA resultou ( $0,57 \text{ cm}_2 \pm 0,06$ ) num efeito semelhante em relação ao controle positivo ( $0,55 \text{ cm}_2 \pm 0,06$ ) como mostrado nas Figuras 35 e 36. Contrariamente, o extrato da pasta de café verde não obteve o mesmo desempenho ( $0,75 \text{ cm}_2 \pm 0,06$  sem) ao terceiro dia de tratamento. Contudo, todos os tratamentos mostraram efeito similar de oclusão da lesão cutânea após 7 e 15 dias de evolução do processo cicatricial. Nesta última etapa amostral, constatou-se a cicatrização completa da ferida. Pode-se supor que as respostas fisiológicas em camundangos jovens são decisivas para a cicatrização completa da ferida, considerando o tempo decorrido de 15 dias. As diferenças significativas no terceiro dia podem ser atribuídas à influência dos tratamentos sobre a resposta inflamatória que começa imediatamente após a lesão do tecido, avançando em torno de 3 dias. A inflamação é um evento importante para o processo de cicatrização da lesão, com ativação de componentes celulares do sistema imunológico, da cascata de coagulação do sangue, de citocinas e estresse oxidativo (GURTNER et al., 2008). Estudos de Moreira e colaboradores (MOREIRA et al., 2013) demonstraram o efeito antiinflamatório de extratos aquosos de café verde devido à presença de compostos com atividade antioxidante e antiinflamatória. O uso de ácido clorogênico melhorando a cicatrização de feridas na pele pode ser derivado da sua influência nos mediadores inflamatórios envolvidos nesta resposta e na sua capacidade antioxidante.

Figura 34 - Tamanho da lesão (cm) nos períodos de 3, 7 e 15 dias do pós-operatório, consoante aos tratamentos com hidrogéis de alantoína, carbopol, ácido clorogênico e extrato da pasta de café verde.



Dados expressos como a média  $\pm$  sem. Distintas letras denotam diferenças significativas (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). HPCV = hidrogel da pasta de café verde, HCGA = hidrogel de ácido clorogênico, CP = controle positivo =hidrogel de alantoína; CN = controle negativo =hidrogel de carbopol. Fonte: Elaboração da autora.

Figura 35 - Evolução do processo de epitelação das lesões em modelo murino, nos tempos amostrais de 3, 7 e 15 dias do pós-operatório dos grupos tratados com hidrogéis da pasta de café verde (grupo I), de ácido clorogênico (grupo II), de alantoína (grupo III, CP = controle positivo) e de carbopol (grupo IV, CN = controle negativo)). Imagens analisadas e processadas com utilização do software ImageJ®.



Fonte: Elaboração da autora.

#### 4.6.2.2 ESTUDO MICROSCÓPICO DA LESÃO

O estudo microscópico da lesão foi realizado através das análises histológicas da pele tratada com os hidrogéis em estudo, com o objetivo

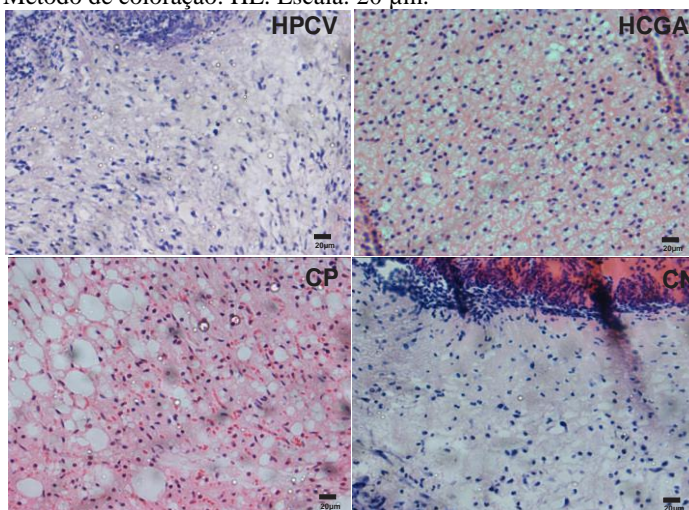
de verificar o grau de influência dos tratamentos na formação do novo tecido.

#### *4.6.2.2.1 Análise de células do infiltrado inflamatório*

Em uma primeira análise, observou-se a presença da crosta fibrino-leucocitária localizada na superfície da área lesada (Figura 37), considerando-se que o 3º dia do pós-operatório compreende a primeira etapa de análise deste ensaio, com a lesão na fase inflamatória.

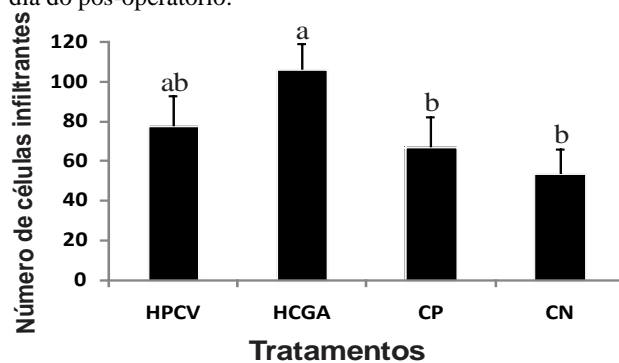
O processo de reparo tecidual tem início com a migração de células de defesa para a lesão, portanto esse foi o primeiro parâmetro quantificado no estudo histológico. Essa avaliação foi realizada através da análise de lâminas coradas com HE após três dias de pós-operatório. Para tanto, foi contado o número de células infiltrantes em 5 campos da lâmina histológica, considerando-se cada campo através de um quadrante padrão, que foi posicionado repetidamente cinco vezes, ao longo da área da lesão, sendo as células contadas pelos núcleos corados. Foi calculada a média/animal/grupo de tratamento, sendo indicada como densidade de células infiltrantes. Os resultados obtidos demonstram que o tratamento das lesões com hidrogel contendo ácido clorogênico promoveu um recrutamento maior de células ao local da lesão ( $106,25 \pm 13,04$ ), quando comparado aos demais tratamentos, sendo o resultado estatisticamente distinto ( $p < 0,01$ ) dos resultados dos controles positivo (hidrogel de alantoína -  $66,5 \pm 15,15$ ) e negativo (hidrogel de carbopol -  $54,1 \pm 12,24$ ). O tratamento com o hidrogel contendo o extrato da pasta de café verde também apresentou resultado positivo ( $78,75 \pm 15,84$ ), no sentido de promover o recrutamento de células, contudo a diferença entre este e os demais tratamento não foi estatisticamente significativa (Figura 38 e 39). Esses resultados indicam uma influência maior do ácido clorogênico na sinalização e recrutamento de células para o local da inflamação.

Figura 36 – Micrografias de cortes histológicos das lesões cutâneas após 3 dias de tratamento, demonstrando a densidade de células do infiltrado inflamatório. Método de coloração: HE. Escala: 20  $\mu$ m.



HPCV = Hidrogel da pasta de café verde; HCGA = Hidrogel de ácido clorogênico; CP = Hidrogel de alantóina, controle positivo; CN = Hidrogel de carbopol, controle negativo. Fonte: Elaboração da autora.

Figura 37 - Efeito dos tratamentos com hidrogéis da pasta de café verde (HPCV), de ácido clorogênico (HCGA), de alantóina (CP = controle positivo) e carbopol (CN = controle negativo) sobre o número de células infiltrantes no 3<sup>o</sup> dia do pós-operatório.

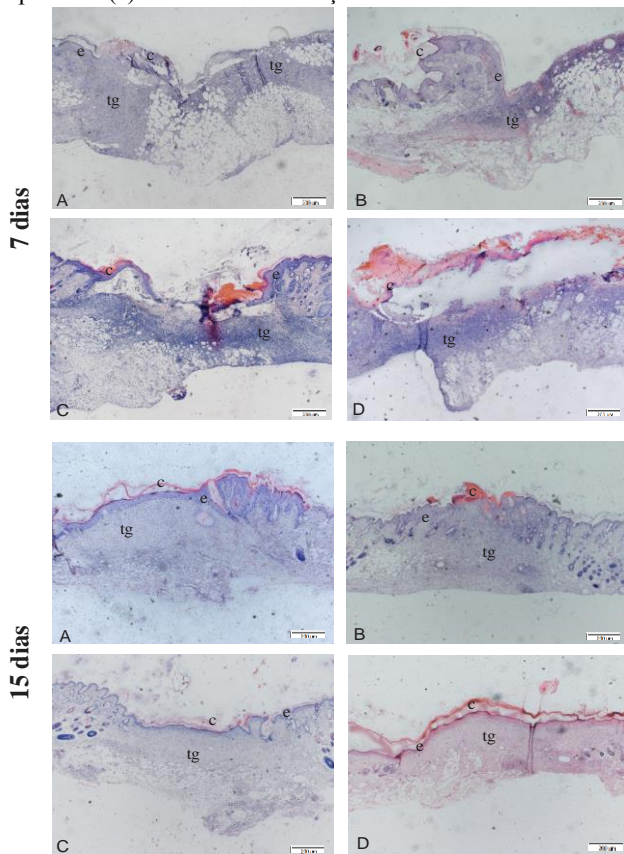


Média da contagem de células infiltrantes  $\pm$  dp (n= 8). Diferentes letras denotam diferenças significativas. ANOVA uma via, teste Tukey,  $p < 0,01$ . Fonte: Elaboração da autora.

#### 4.6.2.2.2 *Espessura do tecido de granulação e vasculogênese*

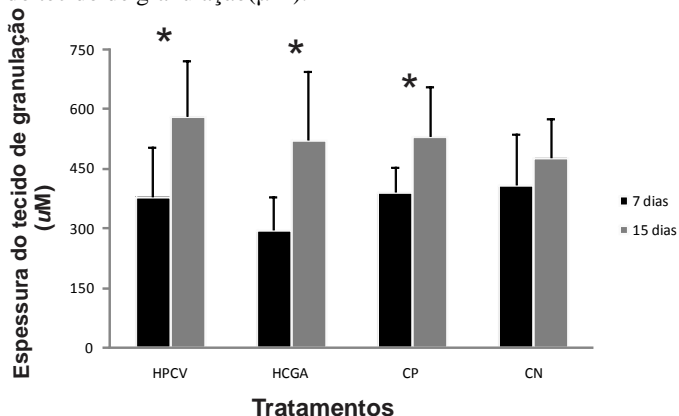
A espessura do tecido de granulação durante o processo de reparo tecidual foi avaliada por análise histológica de lâminas coradas com HE. A análise comparativa entre os tecidos tratados com os hidrogéis no 7º e 15º dias demonstrou efeito similar dos tratamentos sobre a formação do tecido de granulação (Figuras 36 e 37).

Figura 38 - Micrografias de cortes histológicos das lesões cutâneas após 7 e 15 dias de tratamento, demonstrando a formação do tecido de granulação (tg), a epiderme (e). Método de coloração: HE. Aumento de 40X. Escala: 200 µm.



A = hidrogel da pasta de café verde; B = hidrogel de ácido clorogênico; C = hidrogel de alantoína; D = hidrogel de carbopol; tg = tecido de granulação; e = epiderme. Fonte: Elaboração da autora.

Figura 39 - Efeito dos tratamentos com hidrogel da pasta de café verde (HPCV), de ácido clorogênico (HCGA), de alantoína (CP = controle positivo) e carbopol (CN = controle negativo), após 7 e 15 dias do pós-operatório, sobre a espessura do tecido de granulação ( $\mu\text{M}$ ).



Média das medidas do tecido de granulação  $\pm$  dp (n= 8). ANOVA uma via, teste Tukey,  $p < 0.05$ . \* diferença significativa. Fonte: Elaboração da autora.

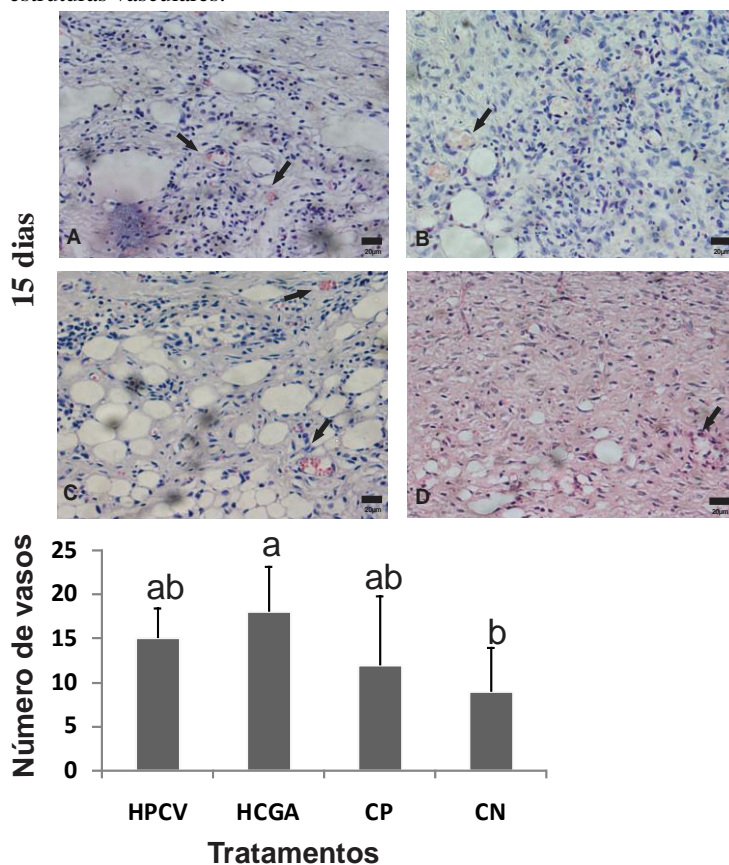
O tecido de granulação é formado na fase proliferativa, onde a migração e a proliferação celular se dão a partir das margens livres da ferida e de células mesenquimais, com muitos estímulos quimioatraentes e mitogênicos (ISAAC et al., 2010). Na fase proliferativa os macrófagos derivados de monócitos liberam mediadores químicos atraindo fibroblastos que migram à região das margens da ferida para o seu centro. Com o aumento de fibroblastos ativados cresce a produção de colágeno no local e a matriz extracelular passa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico, ocorrendo o que se chama de fibroplasia, necessária à formação de novos vasos sanguíneos, ou seja, para a neovascularização. Com a fibroplasia e a neovascularização inicia-se a formação do tecido de granulação, que é composta pelos macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados, suportados por uma matriz mais frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágenos tipos I e II (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Este tecido é edematoso e caracterizado pela presença de muitos espaços vazios, devido à imaturidade dos vasos, os quais são extremamente exudativos e sangram com facilidade. Ao serem observados a olho nu, a superfície deste tecido

parece conter muitos grânulos. Na verdade, estes nada mais são que as extremidades de vasos neoformados que estão organizados perpendicularmente em direção à superfície e possuem uma coloração vermelha escura. A neovascularização é essencial neste estágio porque permite a troca de gases e a nutrição das células metabolicamente ativas (ISAAC et al., 2010).

O recrutamento de macrófagos, dentre outras células, que ocorre no local da lesão é evento essencial à angiogênese e a fibroplasia durante o processo de reparo tecidual (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Desta forma, a influência dos tratamentos na formação de neovasos foi analisada histologicamente nos cortes histológicos dos tecidos após 15 dias de tratamento (Figura 38). Observou-se que o grupo tratado com hidrogel de ácido clorogênico apresentou maior formação de vasos ( $18,2 \pm 5,2 \mu\text{m}$ ) quando comparado aos demais tratamentos (HPCV =  $15,8 \pm 3,4 \mu\text{m}$ ; CP =  $11,6 \pm 7,8 \mu\text{m}$ ; CN =  $9,0 \pm 4,9 \mu\text{m}$ ), sendo os tratamentos com hidrogel da pasta de café verde e com alantoína também positivos na formação de neovasos, quando comparados ao grupo tratado com hidrogel de carbopol (CN). O incremento da angiogênese nos tecidos que receberam hidrogéis com os tratamentos é um indício de que estes, provavelmente, estão associados à capacidade de indução de proliferação celular, contribuindo para a formação de novos vasos.



Figura 40 - Micrografias de cortes histológicos das lesões cutâneas no 15º dia do pós-operatório, demonstrando a formação de novos vasos. Histograma do número de vasos em função dos tratamentos. Objetiva de 40X. As setas indicam estruturas vasculares.



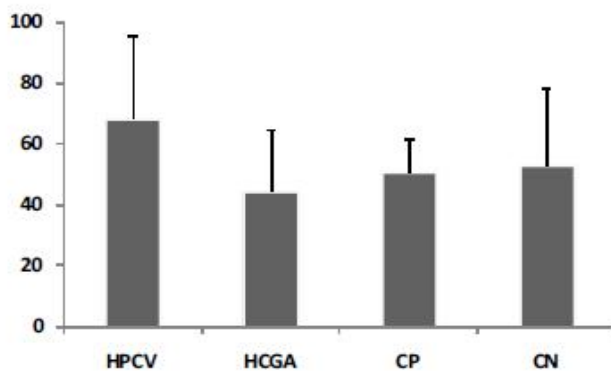
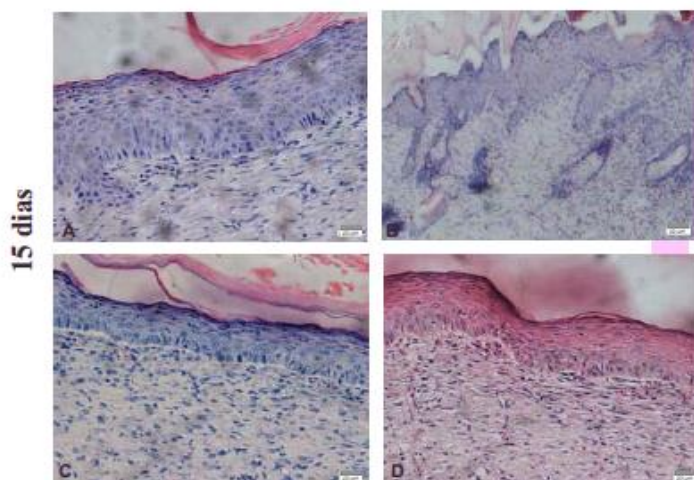
Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão de 8 animais por grupo (5 campos/animal). ANOVA uma via, seguido de teste de Tukey,  $p < 0,05$ . Letras distintas denotam diferenças significativas. A = tratamento com HPCV; B = tratamento com HCGA; C = tratamento com alantoína - controle positivo; D = tratamento com carbopol - controle negativo. Fonte: Elaboração da autora.

#### 4.6.2.2.3 Espessura da epiderme

O espessamento da epiderme foi avaliado no último dia do período experimental (15º dia), através de 5 medidas da epiderme, ao longo da lesão reepitelizada, considerando-se a média por

lâmina/animal/tratamento. Os resultados revelaram que os tecidos tratados com hidrogel contendo extratos da pasta de café verde formaram epiderme mais espessa ( $68,5 \pm 27,1 \mu\text{m}$ ), em relação aos tratados com hidrogel de ácido clorogênico ( $44,7 \pm 19,9 \mu\text{m}$ ). Contudo, comparando-se com as medidas da epiderme dos tecidos tratados com hidrogel de alantoina ( $50,7 \pm 10,8 \mu\text{m}$ ) ou tratados com hidrogel de carbopol ( $53,3 \pm 25,1 \mu\text{m}$ ), estatisticamente não denotam diferenças (Figura 38).

Figura 41 - Espessamento da epiderme no reparo cutâneo no 15º dia do pós-operatório. Imagens representativas de cortes histológicos corados com HE. Histograma da medida média da epiderme. Objetiva de 40X.



Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão ( $n=8$ , 5 medidas/animal,  $\mu\text{m}$ ). ANOVA, uma via. A = tratamento HPCV; B = tratamento HCGA; C = tratamento alantoina, controle positivo; D = tratamento carbopol, controle negativo. Fonte: Elaboração da autora.

#### 4.7 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO – *EX VIVO*

O sistema de defesa antioxidante foi desenvolvido pelo organismo como um mecanismo de proteção contra a formação de ERMOS. Entre os sistemas antioxidantes endógenos mais relatados está a atividade das enzimas CAT, SOD e GPX. A cicatrização da lesão necessita de um equilíbrio preciso entre as atividades antioxidantes porque as ERMOS são prejudiciais às células e aos tecidos na lesão cutânea (SUZUKI et al., 1989). É interessante notar o aumento significativo da atividade de CAT nos tecidos curados quando comparados com os não cicatrizados (Tabela 12). Além disso, a atividade de CAT foi aumentada no tecido tratado em todos os grupos de tratamento ao longo do processo de cicatrização de feridas. Provavelmente, o aumento pode ser atribuído aos maiores níveis de ERMOS no leito da ferida resultantes da resposta inflamatória, vias de sinalização celular para evitar a infecção, recrutando diferentes tipos de células e promovendo divisões de células. A atividade enzimática de CAT nos tecidos tratados com os hidrogéis contendo extratos aquosos da pasta de café verde e CGA aumentou no dia 3 (fase de inflamação), mostrou-se reduzida no sétimo dia durante o estágio de proliferação celular e apresentou um aumento relevante novamente até o 15º dia. O grupo controle positivamente mostrou um perfil semelhante de atividade de CAT, exceto no final do período experimental, no dia 15. Independentemente do tratamento, os resultados revelaram uma atividade de CAT superior ao longo do processo de cicatrização das lesões em comparação ao nível basal (dia 0), sugerindo que a atividade daquela enzima é positivamente modulada em tecidos cutâneos danificados. Finalmente, foram detectadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para cada tratamento, sugerindo que um padrão típico de atividade de CAT não parece ocorrer.

O ensaio de SOD mostrou maior atividade dessa enzima no estágio inicial de cicatrização (dia 3 – Tabela 12) para os tratamentos com pasta de café verde e CGA, seguido por uma redução gradual. Além disso, contrariamente à atividade da CAT, a atividade da SOD foi reduzida abaixo da linha de base em todos os tratamentos ao final do experimento, sugerindo que tal resposta enzimática ao estresse oxidativo parece não ser relevante para as células cutâneas a partir de um determinado momento do processo de reparo.

A enzima GPX possui ação semelhante à CAT, no sentido de neutralizar peróxidos, com oxidação da GSH para formar GSSH. A análise da atividade da GPX nos tecidos biopsados revelou que

estadecresce nos tecidos ao longo do período experimental (Tabela 13), contudo, após três dias de tratamento, a atividade da GPX aumenta, significativamente no tecido tratado apenas com o hidrogel de carbopol, quando comparado com os demais tratamentos, ou seja, no tecido sem interferência de antioxidantes exógenos. Considerando-se que o terceiro dia do pós-operatório é caracterizado pela fase inflamatória da lesão, etapa repleta de eventos oxidativos, e que a GPX catalisa a redução de peróxidos, pode-se inferir que a ausência de antioxidantes exógenos tenha resultado em maior atividade da GPX, antioxidante endógeno. Após sete dias de tratamento, na etapa proliferativa, o tecido tratado com alantoína, utilizada como controle positivo, demonstrou aumento significativo da atividade da enzima GPX, quando comparado com os demais tratamentos no mesmo período. Em relação a atividade enzimática basal da enzima GPX determinada no dia 0 (zero), os tratamentos não mantiveram sua atividade considerada normal até o fim do período experimental.

Tabela 13 - Atividades da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPX) no tecido epitelial sem tratamento (dia 0) e nos tecidos tratados com os hidrogéis da pasta de café verde (HPCV), de ácido clorogênico (HCGA), de alantoína (CP = controle positivo) e carbopol (CN = controle negativo), extraídos por biópsia após 3, 7 e 15 dias de tratamento.

<b>Dia</b>	<b>HPCV</b>	<b>HCGA</b>	<b>CP</b>	<b>CN</b>
<b>CAT (mmol.min<sup>-1</sup>/mg protein)</b>				
<b>0</b>	164,1 ± 12,6	164,1 ± 12,6	164,1 ± 12,6	164,1 ± 12,6
<b>3</b>	597,5 ± 12,4 b	360,6 ± 12,6 c	909,3 ± 5,8 a	174,7 ± 2,1 d
<b>7</b>	260,7 ± 11,9 d	399,5 ± 19,4 c	846,6 ± 20,1 a	683,7 ± 4,1 b
<b>15</b>	1005,0 ± 16,5 a	506,6 ± 10,7 b	408,7 ± 1,8 c	300,0 ± 12,8 d
<b>SOD (U/mg protein)</b>				
<b>0</b>	0,45 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,45 ± 0,02
<b>3</b>	1,05 ± 0,08 b	1,07 ± 0,04 b	0,25 ± 0,01 c	2,33 ± 0,02 a
<b>7</b>	0,52 ± 0,02 a	0,29 ± 0,03 b	0,26 ± 0,02 b	0,20 ± 0,03 c
<b>15</b>	0,12 ± 0,01 b	0,17 ± 0,03 b	0,21 ± 0,02 a	0,25 ± 0,05 a
<b>GPX (nmol.min<sup>-1</sup>/mg protein)</b>				
<b>0</b>	82,32 ± 17,2	82,32 ± 17,2	82,32 ± 17,2	82,32 ± 17,2
<b>3</b>	79,44 ± 14,7 b	78,77 ± 8,4 b	73,01 ± 18,3 b	90,51 ± 16,7 a
<b>7</b>	75,46 ± 13,9 b	76,50 ± 18,5b	99,60 ± 19,8 a	70,91 ± 12,7 b
<b>15</b>	63,96 ± 23,8	66,02 ± 14,4	64,67 ± 7,1	61,77 ± 11,7

Dados expressos como a média ± erro padrão da média. Distintas letras, a cada linha, denotam diferenças significativas (teste de Tukey, p<0,05). HPCV = hidrogel da pasta de café verde, HCGA = hidrogel de ácido clorogênico, CP = controle positivo, hidrogel de alantoína; CN = controle negativo, hidrogel de carbopol. Fonte: Elaboração da autora.



## 5 CONCLUSÕES

As análises fitoquímicas revelaram que a pasta de café é uma biomassa rica em ácido clorogênico e cafeína, indicando que pode ser reaproveitada como fonte destes compostos.

As análises fitoquímicas indicaram que o processo prévio de extração do óleo dos grãos não compromete a qualidade da biomassa residual.

Os ensaios de sequestro do radical livre DPPH sugerem elevado potencial antioxidante dos extratos da pasta de café.

Os ensaios de viabilidade/proliferação e migração celular indicam que os extratos da pasta de café não prejudicam estes eventos celulares, se utilizados em concentrações seguras.

Os extratos da pasta de café verde e torrado auxiliam o processo de reparo tecidual, considerando-se que houve diferença significativa no processo de redução da lesão, no grupo experimental com idade avançada, comparando-o ao grupo tratado sem bioativo (CN).

Considerando que os experimentos foram realizados com o extrato bruto, ou seja, uma matriz complexa, assume-se que os efeitos são derivados da ação sinérgica de seus componentes.

O tratamento com ácido clorogênico promoveu melhora significativa na qualidade da lesão, similarmente ao tratamento com alantoína, composto reconhecido como cicatrizante, o que nos permite inferir tal propriedade também ao ácido clorogênico.

Os extratos aquosos da pasta de café verde e torrado são fontes de compostos que administrados topicamente auxiliam no processo de reparo da pele, considerando o efeito sinérgico de seus compostos.





## REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A.E.; ROOZEN, J.P. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. **Food Chemistry**, WAGENINGEN, v. 64, n. 3, p.323-329, fev. 1999.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. ABIC. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 15 set. 2016.
- ACOFARMA. 2015. Disponível em: <<http://www.acofarma.com/admin/uploads/download/Carbopol2020Ge20carbCBmero022302apdf>>. Acesso em: 15 jul. 2015.
- ADETUTU, A.; MORGANA, W. A.; CORCORANA, O. Ethnopharmacological survey and *in vitro* evaluation of wound-healing plants used in South-western Nigeria. *J. Ethnopharmacol.*, v. 137, p. 50-56, 2011.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 204, p. 234-254. 1984.
- AFFONSO, R. C. L. *et al.* 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. **Oxidative Medicine Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-10, nov. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5124758/pdf/OMCL2016-1923754.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2016.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília, DF: 2004, v. 1, 52 p. (Série Qualidade em Cosméticos). Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos.pdf>>. Acesso em: 26 mar. 2015.
- \_\_\_\_\_. **Farmacopéia Brasileira**. 5. ed. Brasília, DF, 2010, v.1. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/index.htm](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm)>. Acesso em: 20 ago. 2014.

\_\_\_\_\_. Dispõe sobre a aceitação dos métodos alternativos de experimentação animal reconhecidos pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal-Concea. Resolução da Diretoria Colegiada(RDC) n. 35, de 7 de agosto de 2015. Diário Oficial da União, Poder Executivo, de 10 de agosto de 2015.

ALBERTI, T. B. **Desenvolvimento de nanomatrizs de álcool polivinílico e própolis com aplicação em cicatrização de pele.** 2016. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas)–Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

ALMEIDA, A. A. P. *et al.* Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. **J.agric. food. chem.**, v. 54, n. 23, p. 8738-8743, out. 2006.

\_\_\_\_\_. Influence of natural coffee compounds, coffee extracts and increased levels of caffeine on the inhibition of *Streptococcus mutans*. **Food Research International**,v. 49, n. 1, p. 459-461, nov. 2012.

AMAN, R.*et al.* Isolation of carotenoids from plant materials and dietary supplements by high-speed counter-current chromatography. **J. Chromatogr. A.**,v. 1074, n. 1-2,p. 99-105,maio. 2005.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. **Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging.** [Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.](#), Washington, v. 90, n. 17, p. 7915-7922, set. 1993.

ANDRADE, T.A.M. **Atividade da biomembrana de látex natural da seringueira Hevea brasiliensis na neoformação tecidual em camundongos.** 2007. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas)–Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

ANDRADE, K. S. **Avaliação das técnicas de extração e do potencial antioxidante dos extratos obtidos a partir de casca e de borra de café (*Coffea arabica L.*).** 2011. 132 f.Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)–Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

ARNOLD, M.; BARBUL, A. Nutrition and Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, Suppl. 7, p. 42S-58S. 2006.

ASHCROFT, G. S.; HORAN, M. A.; FERGUSON, M. W. J. The effects of ageing on wound healing: immunolocalisation of growth factors and their receptors in a murine incisional model. **J. Anat.**, v. 190, n. Pt 3, p. 351-365, abr. 1997.

ASHIHARA, H.; CROZIER, A. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. **Trends Plant Sci.**, v. 6, n. 9, p. 407-412, set. 2001.

ASHIHARA, H.; SANO, H.; CROZIER, A. Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Phytochemistry**, v. 69, n. 4, p. 841-856, fev. 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. 2016. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publico/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm>>. Acesso em: 3 jan. 2016.

BAE, J. Y. *et al.* Epigallocatechin gallate hampers collagen destruction and collagenase activation in ultraviolet-B-irradiated human dermal fibroblasts: involvement of mitogen-activated protein kinase. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, n. 4, p. 1298-1307, abr. 2008.

BAGDAS, D. *et al.* Antihyperalgesic activity of chlorogenic acid in experimental neuropathic pain. **J. Nat. Med.**, v. 67, n. 4, p. 698-704, out. 2013.

BAGDAS, D., *et al.* Effects of systemic chlorogenic acid on random-pattern dorsal skin flap survival in diabetic rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.37, p. 361–370, 2014 a.

BAGDAS, D. Antinociceptive effect of chlorogenic acid in rats with painful diabetic neuropathy. *Journal of Medicinal Food*, v. 17, p. 730–732, 2014 b.

BAGDAS, D. *et al.* Chlorogenic acid enhances abdominal skin flap survival based on epigastric artery in nondiabetic and diabetic rats. *Annals of Plastic Surgery*, v.77, n. 2, 2014c.

BAGDAS, D., *et al.* Pharmacologic overview of systemic chlorogenic acid therapy on experimental wound healing. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 387, p. 1101–1116, 2014 d.

\_\_\_\_\_. In vivo systemic chlorogenic acid therapy under diabetic conditions: wound healing effects and cytotoxicity/genotoxicity profile. **Food Chem. Toxicol.**, v.81, p.54-61, jul. 2015.

BAGGIO, J. **Avaliação dos resíduos (casca e pó orgânico) de café (Coffea arabica L.) como provável fonte de substâncias bioativas.** 2006. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)– Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

BALBINO, C.A.;PEREIRA, L.M.;CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p.27-51, jan./mar., 2005.  
Incluir no texto os demais autores . ...

BALEKAR, N.*et al.* Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. **J. Ethnopharm.**, v. 141, p. 817-824, 2012.

BISHT, S.; SISODIA, S.S.Coffea arabica: a wonder gift to medical science. **Journal of Natural Pharmaceuticals**, v. 1, n. 1, p. 58-65, dez. 2010.

BORRELI, R. C. Chemical Characterization and Antioxidant Properties of Coffee Melanoidins. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 6527-6533, 2002.

BOS, J. D. The Skin Immune System (SIS): Distribution and Immunophenotype of Lymphocyte Subpopulations in Normal Human Skin. **J. Investig. Dermatol.**,v. 88, n. 5, p. 569-573, 1987.

BOUAYED, J.; BOHN, T. Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state. Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. **Oxid. Med. Cell. Long.**, v. 3, n. 4, p. 228-237, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Athens, v. 72,n.1-2, p. 248-254, maio. 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria SVS/MS nº377, de 26 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico referente a Café Torrado em Grão e Café Torrado e Moído. Diário Oficial da União, Poder Executivo, de 29 de abril de 1999.

BREZOVÁ, V.; SLEBODOVÁ, A.; STÁSKO, A. Coffee as a source of antioxidants: an EPR study. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 859-868, jun. 2009.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C.E. The basic science of wound healing. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 117, n. 7 Suppl, p. 12S-34S, jun. 2006.

BURKE, J. F. *et al.* Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. **Ann.Surg.**,v. 194, n. 4, p. 413-428, out. 1981.

BUTT, M. S.;SULTAN, M. T. Coffee and its consumption: benefits and risks. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 51, n. 4, 363-373, abr. 2011.

CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. **Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. 1. ed. Chapecó-SC: Argus, 2001. 523 p.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRAVO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **Arq. Bras. Cir. Dig.**, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.

CARPENTER, J.W. **Exotic animal formulary**. 3. ed. [s.l.]: Elsevier. 2012. 724p.

Disponível em:

<<http://www.researchgate.net/publication/263675779ExoticAnimalFormularybyJamesWCarpenter>>. Acesso em: 25 jul. 2015.

CASTRO, L. C. G. O sistema endocrinológico vit. D. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 55, n. 8, p. 566-575, 2011.

- CHANG, K. *et al.* Increased collagen cross-linkages in experimental diabetes: reversal by betaaminopropionitrile and D-penicillamine. **Diabetes**, v.29, n.10, p.778-781, out. 1980.
- CHEN, Y.H. *et al.* Movement disorder and neuromuscular change in zebrafish embryos after exposure to caffeine. **Neurotoxicol Teratol.**, v. 30, n. 5, p. 440-447, set./out. 2008.
- CHEN, Y.; PARRISH, T. B. Caffeine's effects on cerebrovascular reactivity and coupling between cerebral blood flow and oxygen metabolism. **Neuroimage**, v. 44, n. 3, p. 647-652, fev. 2008.
- CHEONG, M. W., *et al.* Volatile composition and antioxidant capacity of Arabica coffee. **Food Res. Int.**, v. 51, p. 388-396, 2013.
- CHIANG, H.M. *et al.* Coffea arabica extract and its constituents prevent photoaging by suppressing MMPs expression and MAP kinase pathway. **Food Chem. Toxicol.**, v. 49, n.1, p. 309-318, jan. 2011.
- CHOU, T. Wake up and smell the coffee: caffeine, coffee and the medical consequences. **West. J. Med.**, v. 157, n. 5, p. 544-553, nov. 1992.
- CHUNG, T.W. *et al.* Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. **FASEB J., Local**, v. 18, n. 14, p. 1670-1681, nov. 2004.
- CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.). **Coffee**. London: Elsevier, 1985. 291 p. v. 1.
- \_\_\_\_\_. **Coffee**. London: Elsevier, 1989. 328 p. v. 2. Disponível em: <<https://pt.scribd.com/doc/240569204/COFFEE-VOLME-2-TECHNOLOGY>>. Acesso em: 19 dez. 2016.
- CLARKE, R. J. Water and mineral contents. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.). **Coffee**. London: Elsevier, v. 1. p. 42-82. 1985.
- CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.). **Coffee**. Ed. London: Elsevier, v.1. p. 153-202. 1985.

\_\_\_\_\_. Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the science of food agriculture**, v. 79, n. 3, p. 362-372, mar. 1999.

\_\_\_\_\_. Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1033-1043, maio. 2000.

CLIFFORD, M. N.; RAMÍREZ-MARTÍNEZ, J. R. Phenols and caffeine in wet-processed coffee beans and coffee pulp. **Food Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 35-42, dez. 1991a.

\_\_\_\_\_. Tannins in wet-processed coffee beans and coffee pulp. **Food Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 191-200, dez. 1991b.

COLLINS, C.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 6 ed. Campinas: Ed. da Unicamp, 1995. 297 p.

CONSELHO NACIONAL DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. CONCEA. Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências. Resolução Normativa, RN n. 17, de 3 de julho de 2014. Diário Oficial da União, Poder Executivo, de 14 de julho de 2014.

DAGLIA, M. *et al.* In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, n. 5, p. 1449-1454, maio. 2000.

DELGADO-ANDRADE, C.; RUFÍAN-HENARES, J. A.; MORALES, F. J. Assessing the Antioxidant Activity of Melanoidins from Coffee. Brews by Different Antioxidant Methods. **J. Food Chem.**, v. 53, p. 7832-7836, 2005.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise do ácido clorogênico. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.

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

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421999000200013>>. Acesso em: 25 jul. 2015.

DEGANI, A. L.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Atualidades em química**, n. 7, p. 21-27, 1998.

DEVASAGAYAM, T. P. A. *et al.* Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1282, p. 63-70, 1996.

DÓREA, J. G.; COSTA, T. H. M. Is coffee a functional food? **Br. J. Nutr.**, v. 93, n. 6, p. 773-782, jun. 2005.

DORTA, E.; LOBO, M. G.; GONZALEZ, M. Reutilization of mango byproducts: study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. **J. Food Sci.**, v. 71, n. 1, p. c80-88, 2012.

DREIFKE, M. B.; JAYASURIYA, A. A.; JAYASURIYA, A. C. Current wound healing procedures and potential care. **Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.**, v. 48, p. 651-662, mar. 2015.

DUARTE, G. S.; FARAH, A. The addition of milk to coffee decreases the urinary excretion of chlorogenic acids and metabolites in humans when compared to plain coffee. **FASEB J.**, v. 24, n. 1, p. 922-923, abr. 2010. Disponível em: <[http://www.fasebj.org/content/24/1\\_Supplement/922.3.abstract](http://www.fasebj.org/content/24/1_Supplement/922.3.abstract)>. Acesso em: 19 dez. 2016.

\_\_\_\_\_. Effect of simultaneous consumption of milk and coffee on chlorogenic acids bioavailability in humans. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, n. 14, p. 7925-7931, jul. 2011.

DUARTE, G. S.; PEREIRA, A. A.; FARAH, A. Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 851-855, fev. 2010.

EPP, O; LANDENSTEIN, R; WENDEL, A. The Refined Structure of the Selenoenzyme Glutathione Peroxidase at 0.2-nm Resolution. **Eur. J. Biochem.**, v. 113, p. 51-69, 1983.



ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V.M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 488-495, maio. 2012.

FAGAN, E.B. *et al.* Effect of time on coffee beans growth in cup quality. **Bioscience Journal**, v.27, n.5, p.729-738. 2011.

FARAH, A. *et al.* Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n.5, p. 1105-1113, mar. 2005.

\_\_\_\_\_. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, v. 98, n. 2, p. 373-380. 2006a.

\_\_\_\_\_. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. **J. Agric. Food Chem.**, EUA, v. 54, n.2, p. 374-381, jan. 2006b.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 18, n. 1, p. 23-26, jan./mar. 2006.

\_\_\_\_\_. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. **J. Nutr.**, v. 138, n. 12, p. 2309-2315, dez. 2008.

FARAH, A. Coffee as a functional beverage. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v. 20, n. 6, p. 36, nov./dez. 2009. Disponível em: <[http://www.teknoscienze.com/tks\\_article/vol-206-novemberdecember-2009issue-available-only-as-e-version/](http://www.teknoscienze.com/tks_article/vol-206-novemberdecember-2009issue-available-only-as-e-version/)>. Acesso em: 5 jan. 2017.

FARRIS, P. Idebenone, green tea, and Coffeeberry extract: new and innovative antioxidants. **Dermatol. Ther.**, v. 20, n. 5, p. 322-329, set./out. 2007.

FENNEMA, O. R. **Química dos alimentos**. Zaragoza: Acribia S.A., 2000. 1095p. disponível em: <<https://scea.files.wordpress.com/2014/05/quc3admica-de-los-alimentos-fennema.pdf>>. Acesso em: 19 dez. 2016.

FERNANDES, S.M. *et al.* Teores de polifenóis, ácido clorogênico, cafeína e proteína em café torrado. **Rev. Bras. de Agrociência**, v.7, n.3, 197-199, set./dez. 2001.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n.1, p. 61-68, 1997.

FITZMAURICE, S. D.; SIVAMANI, R. K.; ISSEROFF, R. R. Antioxidant therapies for woundhealing: a clinical guide to currently commercially available products. **Skin Pharmacol. Physiol.**, v. 24, n. 3, p. 113-126, mar. 2011.

GALIANO, R.D. *et al.* Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. **Wound Repair Regen.**, v. 12, n. 4, p. 485-492, jul./ago. 2004.

GALLARDO, C.; JIMÉNEZ, L.; GARCÍA-CONESA, M. T. Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions. **Food Chem.**, v. 99, p. 455-463, 2006.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Atlas colorido de histologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 413 p.

GEORGE, S. E.; RAMALAKSHMI, K.; RAO, L. J. M. A perception on health benefits of coffee. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 48, n. 5, p. 464-486, maio. 2008.

GIANNOPOLITS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. occurrence in higher plants. **Plant Physiol.**, v. 59, n. 2, p. 309-314, fev. 1977.

GLADE, M. J. Caffeine: not just a stimulant. **Nutrition**, v. 26, n. 10, p. 932-938, out. 2010.

GODBOUT, J. P.; GLASER, R. Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer. **J. Neuroimmune Pharmacol.**, v. 1, n. 4, p. 421-427, dez. 2006.

GOMEZ-RUIZ, J. A.; LEAKE, D. S.; AMES, J. M. In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 17, p. 6962-6969, 2007.

GONCALVES, R. *et al.* Inhibition of trypsin by condensed tannins and wine. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 18, p.7596-7601, set. 2007.

GONZÁLEZ, M.; GONZÁLEZ, V. Sample preparation of tropical and subtropical fruit biowastes to determine antioxidant phytochemicals. *Anal. Methods*, v. 2, p. 1842-1866, 2010. Disponível em:<[www.rsc.org/methods](http://www.rsc.org/methods)>. Acesso em: 10 fev. 2016.

GOSAIN, A.; DIPIETRO, L. A. Aging and wound healing. **World J. Surg.**, v. 28, n. 3, p. 321-326, mar. 2004.

GRIENGLING, K. K.; FITZGERALD, G. A. Oxidative stress and cardiovascular injury:part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. **Circulation**, v. 108, n. 16, p. 1912-1916, out. 2003.

GROSSO, L. M.;BRACKEN, M. B. Caffeine metabolism, genetics and perinatal outcomes: a review of exposure assessment considerations during pregnancy. **Ann. Epidemiol.**,v. 15, n. 6, p. 460-466, jul. 2005.

GUIMARAES, A. C. R.; ALVES, E. A. Cultura celular. In: CONCEITOS e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. [s.l.]: FIOCRUZ, 2010. p. 215-253. v. 2. Disponível em: <[http://www.epsvjv.fiocruz.br/upload/d/capitulo\\_5\\_vol2.pdf](http://www.epsvjv.fiocruz.br/upload/d/capitulo_5_vol2.pdf)>. Acesso em: 12 jul. 2015.

GUO, S.;DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing.**J. Dent. Res.**, v.89, n. 3, p: 219-229, mar. 2010.

GURTNER, G. C. *et al.* Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314-321. 2008.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J. Neurochem.**,v. 59, n. 5, p. 1609-1623, nov. 1992.

HALLIWELL, B.;GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch. Biochem. Biophys.**,v. 246, n. 2, p. 501-14, maio, 1986.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **J. Lab. Clin. Med.**, v. 119, n. 6, p. 598-620, jun. 1992.

HARRIS, M. I. N. C. **Pele**: do nascimento à maturidade. São Paulo: Senac, 2016. 301 p.

HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 107, n. 5, p. 401-404, maio. 1986.

HECKMAN, M. A.; WEIL, J.; GONZÁLEZ DE MEJÍA, E. Caffeine (1, 3, 7- trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. **J. Food Sci.**, v. 75, n. 3, R77-R87, abr. 2010.

HIDGON, J. V.; FREI, B. Coffee and health: a review of recent human research. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 46, n. 2, p. 101-123. 2006.

HOELZL, C. *et al.* Instant coffee with high chlorogenic acid levels protects humans against oxidative damage of macromolecules. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 54, n. 12, p. 1-12, dez. 2010.

HUANG, D-J; CHEN, H-J; LIN, Y-H. Antioxidant and antiproliferative activities of water spinach (*Ipomoea aquatica* Forsk) constituents. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v. 46, p. 99-106, 2005.

ILLY, A.; VIANI, R. **Espresso coffee**: the chemistry of quality. 2. ed. [s.l.]: Elsevier Academic Press, 2005. 398 p. Disponível em: <<http://www.amazon.com/Espresso-Coffee-Second-Edition-Science/dp/0123703719>>. Acesso em: 27 maio 2015.

INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS. In vitro methods for assessing acute systemic toxicity. **Federal Register Notice**, v. 66, n. 189, p. 49686-49687, set. 2001. Disponível em: <<http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/FR/6649686.htm>>. Acesso em: 24 abr. 2015.

ISAAC, C. *et al.* Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Rev. Med.**, São Paulo, v. 89, n. 3-4, p. 125-131, jul./dez. 2010.

JEREMIAS, T.S. **Avaliação do potencial terapêutico das células tronco mesenquimais derivadas da pele no reparo de lesões cutâneas**. 2013. 122 f. Tese. (Doutorado)–Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis,2013.

JEREMIAS, T. S. *et al.* Dermal substitutes support the growth of human skin-derived mesenchymal stromal cells: potential tool for skin regeneration. **Plos One**, v. 9, n. 2, p. 1, fev. 2014. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0089542>>.Acesso em: 12 dez.2016.

JAHNS, E. Ueber die Alkaloide des Bockshornsamens. Ber. Deut. Chem. Ges., v.18, p. 2518-2523. Joshi JG, Handler P (1960) Biosynthesis of trigonelline. J. Biol. Chem., v.235, p. 2981-2983. 1885.

JOSHI, J. G.; HANDLER, P. Biosynthesis of trigonelline. **J. Biol. Chem.**, v.235, p. 2981-2983, out. 1960.

JOSLYN, M. A.;GOLDSTEIN, J. L. Astringency of fruits and fruit products in relation to phenolic contente.**Adv. Food Res.**, v.13, p. 179-217. 1964.

JUNQUEIRA, L.;CARNEIRO, F. **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1999. 303 p.

KARIYA, Y. *et al.* Sex steroid hormone receptors in human skin appendage and its neoplasms. Endocrine Journal, v. 52, n. 3, p. 2005.

KARUKONDA, S.R.K.; *et al.* The effects of drugs on wound healing: part I.**Int.J. Dermatol.**, v.39, n. 4, p.250-257, abr. 2000.

KAWACHI, I., COLDITZ, G. A.; STONE, C. B. Does coffee drinking increase the risk of coronary heart disease? Results from a meta-analysis. **Br. Heart J.**,v. 72, n. 3, p. 269-275, set. 1994.

KEYLOCK, K. T. *et al.* Exercise accelerates cutaneous wound healing and decreases wound inflammation in aged mice.**Am. J.Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 294, n. 1, p. R179-R184, jan. 2008.

KO, S. H. *et al.* The role of stem cells in cutaneous wound healing: what do we really know? **Plast.Reconstr.Surg.**, v. 127, Suppl.1, p. 10S-20S, jan. 2011.

KRUPKOVA , O. *et al.* The natural polyphenol epigallocatechin gallate protects intervertebral disc cells from oxidative stress. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, v.2016, 17 p., fev. 2016.Disponível em<<http://dx.doi.org/10.1155/2016/7031397>>. Acesso em: 15 ago. 2016.

KUKULA-KOCH, W. *et al.* Influence of extraction procedures on phenolic content and antioxidant activity of Cretan barberry herb. **Food Chem.**, v. 138, p. 406–413, 2013.

KUMAR, M. *et al.* Metabolomics: An emerging frontier of systems biology in marine macrophytes. **Algal Research**, v. 16, p. 76-92, 2016.

KY, C.*et al.* Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. **FoodChem**, v.75, p.223-230, 2001.

LA VECCHIA, C. Coffee and cancer epidemiology. In: GARATTINI,S.(ed.).**Caffeine, coffee, and health**. Milan: Raven Press, 1993.

LASCH, P. Spectral pre-processing for biomedical vibrational spectroscopy and microspectroscopic imaging. **Chemometr. Intell. Lab. Sys.**, v. 117, p. 100-114, 2012.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 167-198, 2003.

LEDL, F. ;SCHLEICHER, E. New aspects of the maillard reaction in foods and in the human body.**Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 29, n. 6, p. 565-594, jun.1990.

LEITÃO, A.S.S.P. **Análise dos ácidos clorogénicos e avaliação do seu papel na interação Coffea arabica - Hemileia vastatri.** 2010. 73 f.Dissertação (Mestrado)–Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa,2010.

LIANG, C; PARK, A. Y.; GUAN, J. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature*, v. 2, n. 2, 2007. Disponível em<<http://www.nature.com/natureprotocols>> Acesso em 14 set 2016.

LINDER, J. Antioxidants: crucial additions to dermal photoprotection. **Cosmetic Dermatology**, v.23, n. 1, p. 40-44. 2010.

LOFTFIELD, E. *et al.* Coffee drinking and cutaneous melanoma risk inthe NIH-AARP diet and health study. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.107, n. 2, p. 1-9, jan.2015.

LUPO, M. P.; DRAELOS, Z. D.; FARRIS, P. K. CoffeeBerry: a new, natural antioxidant in professional anti-aging skin care proceeding from clinical roundtable. **Cosmetic Dermatology**, v. 20, n.1, p. 51-59. 2007.

MACNEIL, S. Progress and opportunities for tissue-engineering skin. **Nature**, v.445, n. 7130, p.874-880. 2007.

MCRAE, J. M.; KENNEDY, J. A. Wine and grape tannin interactions with salivary proteins and their impact on astringency: a review of current research. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 2348-2364. 2011.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.;MANDELBAUM, M.H. S. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - part I. **Annais Brasileiros de Dermatologia**, v.78, n.4, p.393-410. 2003.

MARQUES, V.;FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chem.**, v. 113, n. 4, p. 1370-1376, abr. 2009.

MARTIN, P. Wound healing: aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 75-81, abr. 1997.

MARTINEZ-SAEZ, N. *et al.* A novel antioxidant beverage for body weight control based on coffee silverskin. **Food Chem.**, v. 150, p. 227-234, maio. 2014.

MELETIS, C. D. Coffee: functional food and medicinal herb. **Alternative and Complementary Therapies**, v. 12, p. 7-13, fev. 2006.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para cirurgião, enfermeira e citotécnico**. 3. ed. São Paulo: Michalany, 1998. 295 p.

MO, J. *et al.* Wound healing activities os standardized pomegranate rind extract and its major antioxidant ellagic acid in rat dermal wounds. **J. Nat. Med.**, v. 68, n. 2, p. 377-386, abr. 2014.

MOITA NETO, J. M; MOITA, G. C. Uma introdução a análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J. Sci. Technol., v. 26, n. 2, 2004.

MONTEIRO, M. C. Chlorogenic acids from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. **J. Nutr.**, v. 137, n. 10, p. 2196-2201, out. 2007.

MONTEIRO, M. C.; FARAH, A. Chlorogenic acids in brazilian coffea arabica cultivars from various consecutive crops. **Food Chem.**, v. 134, n. 1, p. 611-614, set. 2012.

MONTEIRO, M. C.; MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids from green and roasted coffees are equally absorbed and metabolized by humans. **FASEB J.**, v. 24, n. 1, p. 922, abr. 2010.

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, jul./ago. 2005.



MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; DE MARIA, C. A. B.

Componentes voláteis do café torrado. Parte 2. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Quim. Nova**, v. 23, n. 2, p. 195-203, 2000.

MOREIRA, R. F. A. *et al.* Discrimination of brazilian arabica green coffee samples by chlorogenic acid composition. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v. 51, n. 1, p. 95-99, mar. 2001.

MOREIRA, D.P. *et al.* Contribution of chlorogenic acids to the iron-reducing activity of coffee beverages. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 5, p. 1399-1402, mar. 2005.

MOREIRA, M. E. C. *et al.* Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of roasted and green *Coffea arabica* L. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 466-474, jan. 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p.55-63, dez. 1983.

MOURA-NUNES, N. *et al.* The increase in human plasma antioxidant capacity after acute coffee intake is not associated with endogenous non-enzymatic antioxidant components. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v. 60, Suppl 6, p. 173-181, 2009.

MURTHY, P.; NAIDU, M. M. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, n. 3, p. 897-903, abr. 2012.

MUSSATTO, S.I. *et al.* Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. **Sep. Purif. Technology**, v. 83, p. 173-179, nov. 2011.

NACZK, M; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 41, n. 5, p. 1523-1543, 2006.

NASCIMENTO, P. M. **Estudo da composição química, atividade antioxidante e potencial odorífico de um café conillon, em diferentes graus de torrefação e análise comparativa com café arábica.** 2006.

103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra)–  
Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

NASCIMENTO, J. A. *et al.* Análise screening de vinhos empregando um analisador fluxo-batelada, espectroscopia UV-Vis e quimiometria. **Quim. Nova**, vol. 33, n. 2, p: 351-357, 2010.

NATELLA, F. *et al.* Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, n. 21, p. 6211-6216, out. 2002.

NATORI, J. *et al.* The influence of hypothyroidism on wound healing an experimental study. **Journal of Nippon Medical School**,v. 66, n. 3, p. 176-180, 1999.

NKONDJOCK, A. Coffee consumption and the risk of cancer: an overview. **Cancer Lett.**, v. 277, n. 2, p. 121-125, maio. 2009.

NUNES, C. S.;BAPTISTA, A. O. Implicações da reação de Maillard nos alimentos e nos sistemas biológicos. **Rev. Port. Ciênc. Vet.**,v. 96, n. 538, p. 53-59. 2001.

NUNES, F. M.; COIMBRA, M. A. Chemical characterization of the high molecular weight material extracted with hot water from green and roasted arabica coffee. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 4, p. 1773-1782. 2001.

NUNES, F. M.;COIMBRA, M. A. Estrutura dos polissacarídeos das infusões dos cafés torrados. Ocorrências de complexos polissacarídeos-melanoidinas. In: VI Encontro de química dos alimentos, jul. 2003, Lisboa.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **J. Nutr.**, v. 131, p. 66-71. 2001.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT TEST GUIDE 129. **Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute systemic toxicity testes: series on testing and assessment, n°. 129.** Paris, 2010.

Disponível em: <<http://www.oecd.org/env/testguidelines>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

PAVLICA, S.; GEBHARDT, R. Protective effects of ellagic and chlorogenic acids against oxidative stress in PC12 cells. **Free Radic. Res.**, v. 39, n. 12, p. 1377-1390, dez. 2005.

PAYEN, M. Memoire sur le café: 3 part. **Comptes Rendus**, v. 23, p. 244-251. 1846.

PEREDA, M.C.V. *et al.* Effect of green Coffea arabica L. seed oil on extracellular matrix components and water-channel expression in vitro and ex vivo human skin models. **J. Cosmet. Dermatol.**, v. 8, n. 1, p. 56-62, mar. 2009.

PEREIRA, J.R.C. Tratamento de cicatrizes patológicas com a associação de cepalin, heparina e alantoína. **Rev. Bras. Med.**, v. 60, n. 8, p. 603-608, ago. 2003.

PERRONE, D. *et al.* Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in green and roasted economically relevant Brazilian coffee cultivars. **Food Chem.**, v. 106, n. 2, p. 859-867, jan. 2008.

PERRONE, D.; FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Influence of coffee roasting on the incorporation of phenolic compounds into melanoidins and their relationship with antioxidant activity of the brew. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, n. 17, p. 4265-4275, maio. 2012.

PINNELL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 48, n. 1, p. 1-19, jan. 2003.

PITZ, H. S. *et al.* In vitro evaluation of the antioxidant activity and wound healing properties of jaboticaba (plinia peruviana) fruit peel hydroalcoholic extract. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, p. 1-6, 2016.  
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2016/3403586>>. Acesso em: 12 set. 2016.

POLLOCK, B. *et al.* Topical aminolaevulinic acid-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris: a study of clinical efficacy

and mechanism of action. **British Journal of Dermatology**, v. 151, p. 616–622, 2004.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary SupplementS. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 4290–4302, 2005.

RANDHIR, R.; SHETTY, P.; SHETTY, K. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 11, p. 1247-1256, jun. 2002.

RANHEIM, T.; HALVORSEN, B. Coffee consumption and human health: beneficial or detrimental? Mechanisms for effects of coffee consumption on different risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 49, n. 3, p. 274-284, mar. 2005.

RATZ-LYKO, A. *et al.* Influence of polyphenols on the physiological processes in the skin. **Phytotherapy Research**, v.29, n. 4, p. 509-517, abr. 2015.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **Eur. surg. res.**, v. 49, n. 1, p. 35-43, jan. 2012.

ROBIQUET; BOUTRON. Ueber den Kapee von Robiquet und Boutron. **Ann Pharmacie**, v. 23, p. 93-95, 1837.

RODE, M. Avaliação da associação de células estromais multipotentes humanas a hidrogéis de carragenana para regeneração cutânea em modelo murino de excisão total. 2015. 103 p.  
Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

RODRIGUES, L. A avaliação biofísica da superfície cutânea: indicadores fisiológicos da funcionalidade epidérmica. **Rev Port Farm.** v. 45, n. 1, p. 52-9. 1995.

RODRIGUES, N. P.; BRAGAGNOLO, N. Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC–DAD–MS. **J. Food Comp. Anal.**, v. 32, p. 105-115, 2013.

RONTI, T.; LUPPATTELLI, G; MANNARINO, E. The endocrine function of adipose tissue: an update. **Clinical Endocrinology**, v. 64, p. 355-365, 2006.

SALVA, T. J. G.; LIMA, V. B. A composição química do café e as características da bebida e do grão. **O Agrônomo**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 57- 59. 2007.

SANDERS, M. E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, n. 5-6, p. 341-347, maio. 1998.

SANTOS, M. D.*et al.* Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biol. pharm. bull.**, v. 29, n. 11, p. 2236-2240. 2006.

SCALBERT, A.; JOHNSON I.T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 81, Suppl. 1, p. 215S-217S, jan. 2005.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J. Nutr.**, v. 130, p.2073s-2085s. 2000.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Bookman Ed. 836 p. 2002

SEN, C. K. *et al.* Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing. **Annals of the New York Academy of Sciences**,v. 957, n. 1, p. 239-249. 2002.

SERAFINI, M.; TESTA, M. F. Redox ingredients for oxidative stress prevention: the unexplored potentiality of coffee. **Clinics in Dermatology**, v. 27, p. 225-229. 2009.

SHAN, X.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther**,v. 47, n. 1, p. 61-71. 1990.

SHEARER, J. *et al.* Quinides of roasted coffee enhance insulin action in conscious rats. **J Nutr.**, v. 133, p. 3529-32. 2003.

SHEARER, J. *et al.* Effects of chronic coffee consumption on in vivo glucose kinetics in high-fat fed rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 85, n. 8, p. 823-830, ago. 2007.

SHLONSKY, A. K.; KLATSKY, A.L.; ARMSTRONG, M.A. Traits of persons who drink decaffeinated coffee. **Annals of Epidemiology**, v. 13, n. 4, p. 273-279, 2003.

SIES, H. Role of metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. Redox signaling and oxidative stress. **J. Biol. Chem.**, v. 289, n.13, p. 8735-8741, 2014.

SILVA, L. L. **Análise fitoquímica e determinação das atividades antioxidantes e vasculogênica dos extratos aquosos padronizados de Coffea arabica e Theobroma cacao.** 2005. 140 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)–Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

SIMIC, M.G.; JAVANOVIC, S.V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. In: HO, C.T. *et al.* (ed.). **Food phytochemicals for cancer prevention.** Washington: American Chemical Society, 1994. p. 20-33.v. 546.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3.ed. Florianópolis: UFSC, 2001. 173 p.

SKERGET, M. *et al.* Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant material and their antioxidant activities. **Food Chem.**, v. 89, n. 2, p.191-198. 2004.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental.** 5. ed. Porto Alegre : Bookman, 2002. reimpressão, 2006. 836 p.

SLOMINSKI, A.; WORTSMAN, J.; TOBIN, D. J. The cutaneous serotonergic /melatonergic system: securing a place under the sun. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 2, p. 176-194, 2005.

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

SOARES, S. I. P. **Influência dos compostos polifenólicos no sabor dos alimentos: relação entre a sua estrutura e a capacidade de interação com proteínas da saliva e receptores do sabor**. 2012. 253 f. Tese (Doutorado em Química)–Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 2012.

SOMOZA, V. Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: na update. **Mol. Nutr. Food. Res.**, v. 49, p. 663-75. 2005.

SPILLER, M.A. 1998. The Chemical Components of Coffee. In: *Caffeine*. pp. 97–161. Spiller, G. A., Ed., CRC Press, Boca Raton.1998.

STALMACH, A. *et al.* On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 18, n. 1, p. 253-262, jan./mar. 2006.

STALMACH, A.; WILLIAMSON, G.;CROZIER, A. Impacto of dose on the bioavailability of coffee chlorogenic acids in humans. **Food & Function**, v. 5, n. 8, p. 1727-1737, ago. 2014.

SU, L. *et al.* Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of Black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and orégano leaf.**Food Chem.**, v. 100, n. 3, p. 990-997, 2007.

SUZUKI, S. *et al.* Significance of reactive oxygen species in distal flap necrosis and its salvage with liposomal SOD. **Br. J. Plast. Surg.**, v. 42, p. 559-564, 1989.

SUZUKI, S. *et al.* Further applications of bilayer artificial skin. **Br. j. plast. surg.**, v. 48, n. 4, p. 222-229, jun. 1995.

SUZUKI, A. *et al.* Green coffee bean extract and its metabolites have a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats.**Hypertens. Res.**, v. 25, n. 1, p. 99-107, jan. 2002.

SWIFT, M. E.; KLEINMAN, H. K.; DIPIETRO, L. A. Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. **Laboratory Investigation**, v. 79, n. 12, p. 1479-1487. 1999.

SWIFT, M. E. *et al.* Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, n. 5, p. 1027-1035, 2001.

SZEDER, V. *et al.* Neural crest origin of mammalian Merkel cells. **Dev. Biol.**, v. 253, p. 258-263, 2003.

TAO, K. S. *et al.* The multifaceted mechanisms for coffee's anti-tumorigenic effect on liver. **Medical Hypotheses**, v. 71, p. 730-736. 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 762 p.

TEMPLE, J. L. Caffeine use in children: what we know, what we have to learn and why we should worry. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 33, p. 793-806. 2009.

THOM, E. The effect of chlorogenic acid enriched coffee on glucose absorption in healthy volunteers and its effect on body mass when used long-term in overweight and obese people. **J. Int. Med. Res.**, v. 35, n. 6, p. 900-908, nov./dez. 2007.

THOMSON, M. L. A comparison between the number and distribution of functioning eccrine sweat glands in europeans and africans. **Journal of Physiology**, v. 123, p. 225-233, 1954.

TOCI, A.; FARAH, A.; TRUGO, L.C. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés arábica e robusta antes e após a torrefação. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 965-971. 2006.

TORRES, T.; FARAH, A. Coffee is the most important contributor to the antioxidant capacity in Brazilians' diet. **FASEB J.**, v. 24, Suppl. 1, p. 919, abr. 2010. Disponível em:  
<[http://www.fasebj.org/content/24/1\\_Supplement/919.1.abstract?sid=80725a2a-3b14-48b2-9cb3-11def350e750](http://www.fasebj.org/content/24/1_Supplement/919.1.abstract?sid=80725a2a-3b14-48b2-9cb3-11def350e750)>. Acesso em: 14 mar. 2016.



TRUGO, L. C. Café: composição química e potencial nutracêutico. In: MERCADANTE, A. Z. *et al.* (ed.). **Ciência de alimentos**: avanços e perspectivas. Campinas: Universidade de Campinas, v. 2. 2001.

TRUGO, L. C.; MACRAE, R. A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. **Food Chem.**, v. 15, n. 3, p. 219-227. 1984.

TRUGO, L. C. Carbohydrates. In: Coffee (eds. R. J. Clarke e R. Macrae), cap. 3, pp. 83-114. Elsevier Applied Science Publishers, London e New York. 1985.

UTSUNOMIYA, H. *et al.* Antiviral activities of coffee extracts in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 1919-1924. 2008.

VAN DIJK, A.E. *et al.* Acute effects of decaffeinated coffee and the major coffee components chlorogenic acid and trigonelline on glucose tolerance. **Diabetes Care**, v. 32, n. 6, p. 1023-1025. 2009.

VELEIRINHO, B. *et al.* Nanofibrous poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/chitosan scaffolds for skin regeneration. **International journal of biological macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 343-350, 2012.

VICINI, L. **Análise multivariada da teoria à prática**. 2005. 215 P. Monografia (Especialização em Estatística e Modelagem Quantitativa) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: the influence of processing conditions and raw material. **Food Chem.**, v. 124, n. 3, p. 863-868, fev. 2011.

WAGEMAKER, T. A. L. *et al.* Sun protection factor, content and composition of lipid fraction of Green coffee beans. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 469-473. 2011.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325-333, 1981.

WILKE, K. *et al.* A short history of sweat gland biology. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 29, p. 169–179, 2007.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. *Surg. Clin. North Am.*, v. 77, n. 3, p. 509-528, jun. 1997.

WONG, V. W. *et al.* Stem cell niches for skin regeneration. **Int. j. biomater.**, v. 2012, p. 926059, jan. 2012.

WORLD HEALTH ORGANISATION. **Global strategy on diet, physical activity and health.** 2004. Disponível em: <[http://www.who.int/dietphysicalactivity/strategy/eb11344/strategy\\_english\\_web.pdf](http://www.who.int/dietphysicalactivity/strategy/eb11344/strategy_english_web.pdf)>. Acesso em: 23 ago. 2015.

YANAGIMOTO, K. *et al.* Antioxidative activity of heterocyclic compounds found in coffee volatiles produced by Maillard reaction. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, n. 19, 5480-5484, 2002.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, p. 139-162, jan.1994.

YUKAWA, G. S. Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. **Biochemistry**, v. 69, 70- 74, 2004.

ZACARIAS, A.A. *et al.* Determinação do teor de fenólicos e flavonóides no extrato e frações de tabebuia *heptaphylla*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30., 2007, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Sociedade Brasileira de Química, 2007.

ZHANG, W.; CURTIN, C.; FRANCO, C. Towards manipulation of post-biosynthetic events in secondary metabolism of plant cell cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 688-696. 2002.

## ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais UFSC – CEUA

14/04/2015

notes.ufsc.br/aplic/ceua.nsf/48fc5e6e9931c86832570260075533b33e2f31100cdd83257e26007081dd?OpenDocument

### Resultado de Solicitação de Protocolo

**Protocolo**

9909957

**Título**

Estudo da atividade cicatrizante a nível epitelial e caracterização do perfil químico do extrato da biomassa residual de grãos de café

**Data de Entrada**

27/01/2015

**Resultado:**

Aprovado

Data/ Prazo

10/04/2015

**Considerações**

Ofício nº 024/CEUA/PROPEQ/2015

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Marcelo Maraschin - Departamento de Fitotecnia/CCA

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO COM CONDIÇÃO, por quatro anos, para a utilização de cento e quarenta e quatro camundongos (*Mus musculus*).

Esta aprovação está condicionada à inclusão de medicação analgésica no pós operatório.

Sugestão: uso de Paracetamol 1 mg/ml na água de bebida (Ness R.D. Rodentes in Carpenter, J.W.

Exotic animal formulary 3rd ed, Elsevier, 2005).

- Procedência do animal: Biotério Central da UFSC

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 13/07/2019

Data 13/04/2015

Parecer(es):



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC  
PRESIDENTE