

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS, *IN VITRO*, DOS EXTRATOS DO CAFÉ

Palavras-Chave: CAFÉ, RESÍDUOS, ANTIOXIDANTES

Autores/as:

LUÍZA DOMINGUES MONTICO [UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS]

ÉRICA MENDES DOS SANTOS [UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS]

LUCAS MALVEZZI DE MACEDO [UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS]

GISELE ANNE CAMARGO [INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS]

MARCELO LANCELLOTTI [UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS]

PAULO CÉSAR PIRES ROSA [UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS]

Prof.^a Dr.^a PRISCILA GAVA MAZZOLA (orientadora) [UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS]

INTRODUÇÃO:

O Brasil é o maior produtor e exportador de café mundial, com uma produção estimada de mais de 64 mil sacas de 60 kg (ICO, 2020). As duas espécies vegetais mais relevantes do comércio internacional são a *Coffea arabica* L. (arábica) e *Coffea canephora* Pierre (robusta), pertencentes a família Rubiaceae (ALVES *et al.*, 2017).

As etapas da produção do café geram enormes quantidades de resíduos, considerados fonte de contaminação e problema ambiental, em contrapartida, por serem ricos em compostos ativos, podem ser reaproveitados pelas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética (ALVES *et al.*, 2017).

A polpa do café (Figura 1), um dos subprodutos, possui substâncias ativas como a cafeína e o ácido clorogênico, além de atividades biológicas, como antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana (SANTOS *et al.*, 2021).

Há muito tempo, o conhecimento popular utiliza o pó de café caseiro para tratamento de feridas de forma eficaz (YUWONO, 2014). Quando aplicado topicamente, o ácido clorogênico, um dos ativos encontrados na polpa, demonstrou aumentar o processo de cicatrização (CHEN *et al.*, 2013).

Diante desses dados, evidencia-se a importância de estudos utilizando os subprodutos do café como forma de promover a valorização integral desses resíduos, visando a sustentabilidade e a compreensão de suas atividades biológicas, como a potencial aplicação de seus extratos em cicatrização de feridas. Portanto o objetivo deste estudo foi verificar as atividades biológicas dos extratos da polpa do café das espécies arábica e robusta.

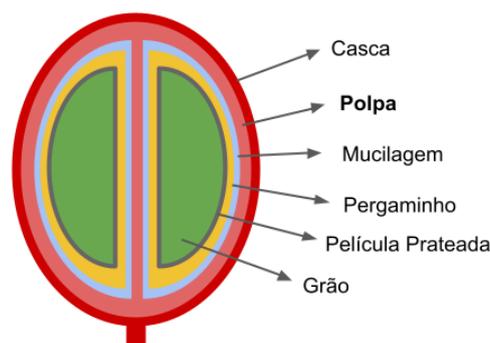


Figura 1 – Esquema das diferentes estruturas do grão de café, baseado na matéria seca. Figura adaptada de Santos *et al.*, 2021.

METODOLOGIA:

Amostras da polpa do café (SISGEN: AC8EF83) das espécies arábica e robusta foram obtidas por diferentes processamentos, gerando oito amostras (Tabela 1). A extração dos compostos ativos foi realizada por maceração com 100 mL de etanol 70% (v/v) a 25 °C, sob agitação durante 20 minutos e filtrado em papel

de filtro (NAVARRA *et al.*, 2017). As amostras foram concentradas em rotaevaporador e posteriormente liofilizadas. Os extratos liofilizados foram solubilizados em etanol 70% (v/v) para obter diferentes concentrações (2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg/mL) que posteriormente foram utilizadas nos testes.

Os teores de cafeína e ácido clorogênico foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando os extratos liofilizados (10 mg/mL), solubilizados em etanol 70% (v/v). A fase móvel foi composta por solução de 95% de ácido acético (5% v/v, pH = 2,4) e 5% de acetonitrila em um fluxo constante de 0,9 mL/min durante 15 minutos a 25 °C. A leitura da cafeína foi realizada a 272 nm e do ácido clorogênico a 360 nm. O método foi validado verificando-se os parâmetros de linearidade, limite de detecção e quantificação, seletividade, precisão, exatidão e robustez de acordo com a resolução nº 166 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2017).

A atividade antioxidante dos extratos foi verificada pelos testes de DPPH e FRAP. Para ambos os testes foi utilizado microplaca de 96 poços, as amostras em diferentes concentrações (2,5 – 10 mg/mL) e foram preparadas curvas de calibração de ácido gálico e branco amostras. Para o DPPH, adicionou-se 280 µL de solução DPPH e 20 µL das amostras. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV/Vis a 517 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade antioxidante (AA%) e EC₅₀ (PIRES *et al.*, 2017a). Para o FRAP, foi adicionado 20 µL das amostras, 15 µL de água ultrapura e 265 µL do reagente FRAP. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico/g de amostra (mg EAG/g) e EC₅₀ (URREA-VICTORIA *et al.*, 2016).

O teor de compostos fenólicos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, utilizando microplaca de 96 poços, 20 µL de cada amostra (10 mg/mL), 180 µL de água ultrapura, 20 µL de Folin-Ciocalteu 1 N, 20 µL de metanol e 60 µL de carbonato de sódio. Preparou-se o branco amostra e curva padrão de ácido gálico. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro UV/Vis a 760 nm. Os resultados foram expressos em mg EAG/g de amostra (PIRES *et al.*, 2017b).

Para determinar o teor de taninos totais, foram solubilizados 50 mg dos extratos liofilizados em 5 mL de etanol 70% (v/v) e 1 mL dessa solução foi misturado com 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu, 1 mL de solução de Na₂CO₃ e 8 mL de água destilada. A absorbância foi medida em espectrofotômetro UV/Vis a 725 nm. O teor de total de taninos foi calculado em mg equivalentes de ácido tânico (mg EAT/L) através da curva de calibração de ácido tânico (SHAD *et al.*, 2012).

Os teores de flavonóides foram determinados através da solubilização de 10 mg dos extratos liofilizados em 1 mL de etanol 70% (v/v), a partir desta solução, 100 µL foram solubilizados em 50 mL de água destilada. Em seguida, foram misturados 500 µL dessa solução e de solução de cloridrato de alumínio (AlCl₃) 2% em metanol. Preparou-se um branco amostra. A absorbância foi medida em espectrofotômetro UV/Vis a 425 nm. Construiu-se curva padrão de quercetina e os resultados foram expressos em mg equivalentes de quercetina/g amostra (mg EQ/g) (ALVES; KUBOTA, 2013).

O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo método MTT, utilizando células HaCaT (queratinócitos). As células foram cultivadas e após sua confluência, todo o fundo do frasco estava completo com uma monocamada de células. Em seguida, as células foram tripsinizadas com solução de 2,5 g/L tripsina/EDTA a 0,2 g/L e transferidas para placa de 96 poços, de modo que cada poço recebeu 1x10⁶ células/mL e os extratos em diferentes concentrações: 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL, em triplicata. Após 24 horas na estufa, o meio foi removido e adicionou-se 100 µL do reagente MTT, a placa foi levada a estufa novamente. Posteriormente, o reagente foi removido, adicionou-se 100 µg/mL de etanol 100% (v/v) e a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 570 nm. Para cálculo da viabilidade celular, o valor da absorbância do poço tratado foi multiplicado por 100 e dividido pela média da absorbância do poço controle, que foi considerada 100% (MOSMANN, 1983; MACHADO *et al.*, 2013).

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A análise estatística foi feita utilizando o ANOVA de uma via (p < 0,05) e as amostras foram comparadas pelo teste de Tukey, através do software Graph Pad Prism (versão 5.0). Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão e valores da concentração efetiva a 50% (EC₅₀) e a concentração inibitória média (IC₅₀) foram calculados utilizando o Prisma.

Amostras	Descrição
1	Arábica extrato
2	Arábica farinha
3	Arábica fibra
4	Robusta Adamantina extrato
5	Robusta Adamantina farinha
6	Robusta Adamantina fibra
7	Robusta 69.1 farinha*
8	Robusta IAC extrato**

Tabela 1 – Amostras da polpa do café utilizadas na pesquisa. *69.1 clone da espécie robusta; **IAC – Instituto Agrônomo de Campinas

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Através da linearidade, foram obtidas as curvas de calibração para a cafeína ($y=12138x-4128,1$; $r^2=0,9993$) e para o ácido clorogênico ($y=13084x-33801$; $r^2=0,9990$) e foram calculados os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) sendo de: LQ = 19,64 µg/mL (cafeína) e 25,13 µg/mL (ácido clorogênico); LD = 6,48 µg/mL (cafeína) e 8,29 µg/mL (ácido clorogênico). O método utilizado foi seletivo e os valores encontrados foram exatos. As porcentagens de recuperação ficaram abaixo do esperado, no entanto, por se tratar de uma amostra complexa e de acordo com as concentrações de analitos apresentados, os valores são aceitáveis (ANVISA, 2017). Pelos resultados da robustez, não recomenda-se realizar alterações de temperatura e composição da fase móvel para cafeína e de fluxo e composição de fase móvel para o ácido clorogênico.

Os resultados para a quantificação da cafeína e ácido clorogênico estão apresentados na Tabela 2. As amostras 2, 3 e 7 ficaram abaixo do limite de quantificação para o ácido clorogênico, dessa forma, os valores encontrados não são exatos. As amostras da espécie arábica (1, 2 e 3) foram as que exibiram maiores concentrações de cafeína, enquanto para o ácido clorogênico, foram as da espécie robusta. A polpa possui valores inferiores aos encontrados para o grão verde de café, sendo de 15,132 mg/g de cafeína e 72,938 mg/g de ácido clorogênico (PANUSA *et al.*, 2017), o que é esperado por se tratar de um resíduo.

Todas as amostras exibiram boa atividade antioxidante pelo método de DPPH, em concentração de 10 mg/mL variando entre $81,55 \pm 1,91$ a $95,45 \pm 0,10\%$ (Tabela 3), sendo os melhores resultados exibidos pelas amostras 2, 5 e 6, sem diferença significativa entre elas. O menor valor de EC_{50} foi encontrado para a amostra 5 de 2,57 mg/mL, indicando melhor atividade antioxidante. Pelo método de FRAP, a amostra que demonstrou melhor atividade antioxidante foi a 8, com menor EC_{50} , de 4,51 mg/mL e um valor de $58,98 \pm 2,88$ mg EAG/g amostra.

Amostras	Cafeína	Ácido clorogênico
1	190,02	55,56
2	338,17	14,50
3	317,88	21,88
4	27,83	52,43
5	114,59	82,52
6	126,02	156,74
7	76,13	17,97
8	79,40	192,92

Tabela 2 – Concentração (µg/mL) de cafeína e ácido clorogênico nas amostras

Amostras 10 mg/mL	DPPH		FRAP	
	AA (%)	EC_{50} (mg/mL)	mg EAG/g	EC_{50} (mg/mL)
1	$83,64 \pm 2,43^{ad}$	4,07	$7,28 \pm 0,20^{ab}$	5,12
2	$95,45 \pm 0,10^b$	4,10	$8,93 \pm 0,62^a$	7,12
3	$87,00 \pm 3,78^{ae}$	5,08	$5,48 \pm 0,25^b$	5,80
4	$88,62 \pm 0,21^{ace}$	4,99	$34,11 \pm 0,31^c$	6,33
5	$92,33 \pm 0,48^{bce}$	2,57	$8,42 \pm 0,21^{ab}$	7,58
6	$92,51 \pm 0,58^{bce}$	-	$40,66 \pm 0,73^d$	6,48
7	$81,55 \pm 1,91^d$	6,27	$4,89 \pm 0,14^b$	7,26
8	$89,81 \pm 1,41^e$	-	$58,98 \pm 2,88^e$	4,51

Tabela 3 – Resultados DPPH e FRAP para as amostras da polpa (10 mg/mL). Resultados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$) e o valor de EC_{50} . As letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras de acordo com ANOVA de uma via ($p < 0,05$) e teste de Tukey. AA: atividade antioxidante; EAG: equivalentes ácido gálico; EC_{50} : concentração efetiva a 50%.

Os antioxidantes podem auxiliar no processo de cicatrização de feridas por neutralizarem radicais livres. Estes, quando em excesso, podem causar a morte de fibroblastos e tornar os lipídeos da pele menos flexíveis, sendo prejudiciais durante este processo (HOUGHTON *et al.*, 2005).

Compostos fenólicos podem atuar como antioxidantes devido sua estrutura química que proporciona atividade redutora. Dentro deste grupo, pode-se citar esta atividade para os flavonoides (PIRES *et al.*, 2017b) e taninos (SUNG *et al.*, 2012). Os resultados para os teores de compostos fenólicos, taninos e flavonoides estão presentes na Tabela 4.

A maior concentração de compostos fenólicos foi encontrada para a amostra 8 ($79,53 \pm 5,61$ mg EAG/g). O grão de café verde exibiu menor valor de fenólicos totais (48,51 mg EAG/g) do que a amostra 8, indicando que os resíduos do café possuem quantidades significativas destes compostos (PANUSA *et al.*, 2017).

Para o teste de taninos totais, a amostra 8 exibiu maior concentração, de $133,81 \pm 3,56$ mg EAT/L. Para a película prateada encontrou-se um máximo de 0,43 mg EAT/L (COSTA *et al.*, 2014), quantidade significativamente menor que da polpa.

A maior concentração de flavonoides foi verificada para a amostra 7 ($55,11 \pm 3,33$ mg EQ/g) que não diferiu da amostra 1 ($47,33 \pm 3,85$ mg EQ/g) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A menor concentração foi da amostra 3 ($21,78 \pm 3,33$ mg EQ/g) que não foi estatisticamente diferente da amostra 5 ($25,11 \pm 3,33$ mg EQ/g). Por meio destes resultados, infere-se que os teores de flavonoides não variam conforme a espécie de café. Ademais, a polpa demonstrou possuir maior concentração de flavonoides que o bagaço da uva, fruta fonte de antioxidantes (WANG *et al.*, 2010).

Amostras 10 mg/mL	Fenólicos totais mg EAG/g	Taninos totais mg EAT/L	Flavonoides totais mg EQ/g
1	$20,05 \pm 1,68^a$	$47,95 \pm 2,21^a$	$47,33 \pm 3,85^{ad}$
2	$19,46 \pm 0,82^a$	$44,47 \pm 0,33^a$	$46,22 \pm 13,85^a$
3	$10,75 \pm 0,43^b$	$31,97 \pm 0,29^b$	$21,78 \pm 3,33^b$
4	$33,04 \pm 2,76^c$	$89,75 \pm 2,27^c$	$32,89 \pm 1,93^c$
5	$17,31 \pm 1,53^{ab}$	$45,07 \pm 0,75^a$	$25,11 \pm 3,33^{bc}$
6	$44,22 \pm 3,58^d$	$110,94 \pm 3,10^d$	$42,89 \pm 1,93^a$
7	$8,31 \pm 0,50^b$	$22,73 \pm 2,22^e$	$55,11 \pm 3,33^d$
8	$79,53 \pm 5,61^e$	$133,81 \pm 3,56^f$	$46,22 \pm 1,92^a$

Tabela 4 – Resultados dos testes de fenólicos, taninos e flavonoides totais para as amostras da polpa (10 mg/mL). Resultados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$). As letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras de acordo com ANOVA de uma via ($p < 0,05$) e teste de Tukey. EAG: equivalentes de ácido gálico; EQ: equivalentes de quercetina; EAT: equivalentes de ácido tânico.

De acordo com o ensaio de MTT, as amostras estudadas não foram citotóxicas, visto que em diferentes concentrações exibiram viabilidade celular $\geq 79\%$ (ISO 10993, 2009), sendo que a amostra 8 (200 $\mu\text{g/mL}$) exibiu maior valor de $119,71 \pm 9,66\%$ (Figura 2). Amostras da espécie robusta (4, 5, 7 e 8), em diferentes concentrações produziram proliferação celular. O IC_{50} (Tabela 5) corresponde a concentração de extrato que é capaz de matar metade das células viáveis, valores variaram de 0,03 a 288,5 $\mu\text{g/mL}$, sendo os melhores encontrados para as amostras 4, 2 e 8.

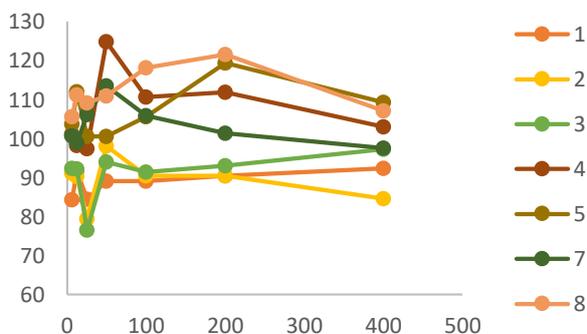


Figura 2 – Viabilidade celular de células HaCat após incubação com extratos da polpa do café.

Amostras	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
1	46,80
2	159,1
3	7,748
4	288,5
5	51,72
7	0,03
8	122,3

Tabela 5 – Concentração necessária para inibir em 50% o crescimento celular (IC_{50}) das amostras de café.

Além da polpa, outros subprodutos não foram citotóxicos em células HaCat. A película prateada não foi citotóxica até a máxima concentração testada, de 1 mg/mL (IRIONDO-DEHOND *et al.*, 2016), e a borra do café não afetou a viabilidade celular até a concentração de 0,3 mg/mL (GIGLIOBIANCO *et al.*, 2020).

Estudo realizado com o ácido clorogênico, composto ativo encontrado em maior concentração na 8, demonstrou que além de não ser citotóxico, ele aumentou a viabilidade celular (IRIONDO-DEHOND *et al.*, 2017).

CONCLUSÕES:

O café é um produto consumido no mundo todo. Durante sua produção, quantidades significativas de resíduos são geradas, dentre eles, a polpa. A reutilização deste subproduto é interessante, visto que a sustentabilidade é visada atualmente.

A polpa do café possui compostos ativos como cafeína e ácido clorogênico, boa atividade antioxidante, teores significativos de compostos fenólicos, taninos e flavonoides, além de não ser citotóxica. Dentre as amostras testadas, a Robusta IAC extrato (amostra 8), apresentou melhores resultados nos testes

de FRAP, fenólicos totais, taninos totais, maior teor de ácido clorogênico e menor potencial citotóxico. Sendo assim, esta amostra é uma candidata para ser incorporada em futuras formulações para cicatrização de feridas.

BIBLIOGRAFIA

- ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de Ciência Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, p. 37-41, 2013.
- ALVES, R.C. et al. State of the art in coffee processing by-products. In: **Handbook of coffee processing by-products**, 1. ed.; Galanakis, C.M., Ed. Academic Press, Londres, p. 1-26, 2017.
- ANVISA. Resolução RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. **Diário Oficial da União**, Ministério da Saúde, ed. 141, seção 1, p. 87, 2017.
- CHEN, W. C. et al. Effect of topical application of chlorogenic acid on excision wound healing in rats. **Planta Medica**, v. 79, n. 8, p. 616-621, 2013.
- COSTA, A. S. G. et al. Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 350-357, 2014.
- GIGLIOBIANCO, M. R. Optimization of the Extraction from Spent Coffee Grounds Using the Desirability Approach. **Antioxidants**, v. 9, n. 5, p. 1-18, 2020.
- HOUGHTON, P. J. et al. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: Wound healing as an example. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2 p. 100-107, 2005.
- ICO. Coffee production by exporting countries. In: **International Coffee Organization**, Londres, 2020.
- IRIONDO-DEHOND, A. et al. Coffee Silverskin Extract Protects against Accelerated Aging Caused by Oxidative Agents. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 1-14, 2016.
- IRIONDO-DEHOND, A. et al. Validation of coffee silverskin extract as a food ingredient by the analysis of cytotoxicity and genotoxicity. **Food Research International**, v. 100, n. 1, p. 791-797, 2017.
- ISO. ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, Suíça, p. 34, 2009.
- MACHADO, D. et al. Irradiated Riboflavin Diminishes the Aggressiveness of Melanoma In Vitro and In Vivo. **Plos One**, v. 8, n.1, p. 1-12, 2013.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n.1-2, p. 55-63, 1983.
- NAVARRA, G. et al. Simultaneous Determination of Caffeine and Chlorogenic Acids in Green Coffee by UV/Vis Spectroscopy. **Journal of Chemistry**, v. 2017, p. 1-8, 2017.
- PANUSA, A. et al. UHPLC-PDA-ESI-TOF/MS metabolic profiling and antioxidant capacity of arabica and robusta coffee silverskin: Antioxidants vs phytotoxins. **Food Research International**, v. 99, n. 1, p. 155-165, 2017.
- PIRES, J. et al. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, 2017a.
- PIRES, J. S. et al. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, 2017b.
- SANTOS, É. M. d. et al. Coffee by-products in topical formulations: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 111, p. 280-291, 2021.
- SHAD, M. A. et al. Optimization of extraction efficiency of tannins from *Cichorium intybus* L.: Application of response surface methodology. **Journal of medicinal plant research**, v. 6, n. 28, p. 4467-4474, 2012.
- SUNG, S. H. Antibacterial and antioxidant activities of tannins extracted from agricultural by-products. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 15, p. 3072-3079, 2012.
- URREA-VICTORIA, V. et al. Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Univesidade de São Paulo**, 2016.
- WANG, X. et al. Chemical characterization and antioxidant evaluation of muscadine grape pomace extract. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1156-1162, 2010.
- YUWONO, H. S. The New Paradigm of Wound Management Using Coffee Powder. **Journal of Surgery**, v. 2, n. 2, p. 25-29, 2014.