

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Ana Flávia Lawall Werneck Cerqueira**

**Desenvolvimento e caracterização de micropartículas poliméricas naturais  
contendo extrato de grãos de café verde (*Coffea arabica* L.)**

Juiz de Fora  
2018

**Ana Flávia Lawall Werneck Cerqueira**

**Desenvolvimento e caracterização de micropartículas poliméricas naturais  
contendo extrato de grãos de café verde (*Coffea arabica* L.)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Mirian Pereira Rodarte

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares

Juiz de Fora

2018

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Cerqueira, Ana Flávia Lawall Werneck.

Desenvolvimento e caracterização de micropartículas poliméricas naturais contendo extrato de grãos de café verde (*Coffea arabica* L.) / Ana Flávia Lawall Werneck Cerqueira. -- 2018.

66 f. : il.

Orientadora: Mirian Pereira Rodarte

Coorientador: Guilherme Diniz Tavares

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2018.

1. Quitosana. 2. Goma xantana. 3. Tripolifosfato de sódio. I. Rodarte, Mirian Pereira, orient. II. Tavares, Guilherme Diniz, coorient. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo aprendizado e oportunidade de crescimento e amadurecimento;

À minha orientadora, Profa. Dr. Mirian Pereira Rodarte, um exemplo de pessoa e de profissional. Obrigada pela dedicação, confiança e amizade;

Ao Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares, meu coorientador, por toda colaboração prestada, disponibilidade e incentivo;

À Profa. Dr. Fernanda Vilela e ao Prof. Dr. Fabiano Freire Costa, agradeço por todos os ensinamentos e experiências compartilhadas;

Às minhas colegas, Lívia, Luciana, Louise, Maria Fernanda, Jéssica e Giselle, pelo carinho, companhia e rizadas;

A todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Ciências Farmacêuticas;

Ao Laboratório Multiusuário de Bioprodutos e Bioprocessos (CENTRALBIO), ao Laboratório de Produtos Naturais Bioativos, ao Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA) pela disponibilidade para a utilização de diversos equipamentos e análises realizadas.

Ao Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular (NEEM) da UFJF pela utilização do Microscópio eletrônico de varredura e análise de tamanho de partícula;

Ao LaProMaV - Laboratório de Produção de Materiais Vítreos e Filmes Finos da UFJF pelas análises calorimétricas

Ao Laboratório de Espectroscopia de Materiais (LEM) pelas análises espectroscópicas.

À FAPEMIG e CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

À FAPEMIG (Processo APQ-01215-16) e à CAPES pelos auxílios financeiros para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Gostaria de agradecer a DEUS e a Nossa Senhora por guiarem e iluminarem meus passos;

Aos meus queridos pais e irmã, que sempre foram meu alicerce, me apoiando em todas as minhas decisões e por terem me dado as melhores condições para conquistar meus sonhos;

Ao amor da minha vida, Durval por sempre estar ao meu lado, me amando, apoiando, sendo companheiro, compreensivo e meu maior incentivador;

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estrutura química dos ácidos clorogênicos.	17
<b>Figura 2</b>	Morfologia das micropartículas.	20
<b>Figura 3</b>	Estrutura química da quitosana	25
<b>Figura 4</b>	Estrutura química de goma xantana.	28
<b>Figura 5</b>	Estrutura do sistema quitosana e goma xantana.	28
<b>Figura 6</b>	Estrutura química do tripolifosfato de sódio	29
<b>Figura 7</b>	Estrutura do sistema quitosana e tripolifosfato de sódio	30
<b>Figura 8</b>	Perfil cromatográfico do extrato de grãos de café verde	40
<b>Figura 9</b>	Espectros de absorção dos ácidos clorogênicos	41
<b>Figura 10</b>	Eletromicrografias do extrato de grãos de café verde e das micropartículas de quitosana	43
<b>Figura 11</b>	Perfil cromatográfico do sobrenadante do processo de obtenção das micropartículas quitosana e goma xantana	44
<b>Figura 12</b>	Perfil cromatográfico do sobrenadante do processo de obtenção das micropartículas quitosana e TPP	45
<b>Figura 13</b>	Espectro FTIR-MIR do extrato e das micropartículas de quitosana	46
<b>Figura 14</b>	Espectro FTIR-MIR do extrato e das micropartículas de quitosana e goma xantana	48
<b>Figura 15</b>	Espectro FTIR-MIR do extrato e das micropartículas de quitosana e TPP	48
<b>Figura 16</b>	Curvas termogravimétricas do extrato livre e das micropartículas de quitosana com e sem adição de extrato	49
<b>Figura 17</b>	Perfil de liberação de 5-ACQ das micropartículas de quitosana em fluido gástrico simulado	51
<b>Figura 18</b>	Perfil de liberação de 5-ACQ das micropartículas em fluido intestinal simulado	52
<b>Figura 19</b>	Espectros de absorção da mucina e do extrato de grãos de café verde.	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Atividade antioxidante do extrato de grãos de café verde	38
<b>Tabela 2</b>	Tamanho médio das partículas de quitosana	42
<b>Tabela 3</b>	Eficiência de encapsulamento de 5-ACQ nas micropartículas de quitosana	45
<b>Tabela 4</b>	Porcentagem de mucoadesividade das micropartículas	53

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>11</b>
2.1	PRODUTOS NATURAIS	11
2.2	CAFÉ	12
<b>2.2.1</b>	<b>Gênero <i>Coffea</i></b>	<b>12</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Composição química dos grãos de café verde</b>	<b>13</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Atividades biológicas do café</b>	<b>14</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Aplicação industrial dos grãos de café</b>	<b>15</b>
2.3	ABSORÇÃO E DEGRADAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS	16
<b>2.3.1</b>	<b>Propriedades bioativas dos ácidos clorogênicos</b>	<b>17</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Absorção dos ácidos clorogênicos</b>	<b>18</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Degradação dos ácidos clorogênicos</b>	<b>19</b>
2.4	MICROENCAPSULAÇÃO	20
<b>2.4.1</b>	<b>Coacervação complexa</b>	<b>22</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Gelificação iônica</b>	<b>22</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Liofilização</b>	<b>23</b>
<b>2.4.4</b>	<b>Aplicação industrial da microencapsulação</b>	<b>23</b>
2.5	SISTEMAS POLIMÉRICOS NATURAIS	24
<b>2.5.1</b>	<b>Quitosana</b>	<b>25</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Goma Xantana</b>	<b>27</b>
2.6	AGENTES RETICULANTES	29
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>32</b>
4.1	AMOSTRAS DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE	32
4.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE	32
4.3	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE	32
<b>4.3.1</b>	<b>Método de sequestro de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)</b>	<b>32</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Sistema b-caroteno/ácido linoleico</b>	<b>33</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Quantificação de 5-ACQ por Cromatografia líquida de alta eficiência</b>	<b>33</b>
4.4	PREPARO DAS MICROPARTÍCULAS	34

4.4.1	<b>Soluções estoque</b>	34
4.4.2	<b>Obtenção das micropartículas</b>	35
4.5	<b>CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS</b>	35
4.5.1	<b>Determinação do tamanho de partícula</b>	35
4.5.2	<b>Análise Morfológica</b>	35
4.5.3	<b>Eficiência de encapsulamento do 5-ACQ</b>	36
4.5.4	<b>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)</b>	36
4.5.5	<b>Análise Termogravimétrica</b>	36
4.5.6	<b>Perfil de liberação de 5-ACQ encapsulado</b>	37
4.5.7	<b>Teste <i>in vitro</i> de interação com mucina</b>	37
4.6	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	37
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	38
5.1	<b>CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE</b>	38
5.1.1	<b>Atividade antioxidante dos grãos de café verde</b>	38
5.1.2	<b>Quantificação de 5-ACQ por Cromatografia líquida de alta eficiência</b>	40
5.2	<b>CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS</b>	41
5.2.1	<b>Tamanho de partícula</b>	41
5.2.2	<b>Análise Morfológica</b>	43
5.2.3	<b>Eficiência de encapsulamento do 5-ACQ</b>	44
5.2.4	<b>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)</b>	46
5.2.5	<b>Análise Termogravimétrica</b>	49
5.2.6	<b>Perfil de liberação do 5-ACQ</b>	50
5.2.7	<b>Teste <i>in vitro</i> de interação com mucina</b>	53
6	<b>CONCLUSÃO</b>	55
7	<b>REFERÊNCIAS</b>	56



## RESUMO

O café verde possui propriedades ativas contra diversas doenças, atribuídas, principalmente, aos ácidos clorogênicos, sendo o ácido 5-O-cafeoilquínico (5-ACQ) o mais importante dentre eles. Os grãos verdes possuem maiores concentrações de 5-ACQ, quando comparados aos grãos torrados, essa degradação ocorre, principalmente, devido à alta temperatura empregada no processo. A degradação do 5-ACQ pode ocorrer também frente a diversas condições de processamento e armazenamento. Além disso, apresenta baixa biodisponibilidade o que interfere na eficiência de suas propriedades e aplicações. Este trabalho foi realizado visando à proteção do extrato de grãos de café verde por meio da microencapsulação em sistemas poliméricos naturais de quitosana (Q). Foram preparadas micropartículas de quitosana com goma xantana (GX) e tripolifosfato de sódio (TPP) como agentes reticulantes. As micropartículas foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, microscopia eletrônica de varredura, eficiência de encapsulamento, espectroscopia, análise termogravimétrica, perfil de liberação e teste de mucoadesividade. Os resultados demonstraram que o extrato de café verde possui 110,15 µg/mg de 5-ACQ, e alta atividade antioxidante. As micropartículas se apresentaram de forma irregular, escamosa, friável e as partículas de Q/GX foram maiores do que as Q/TPP e apresentaram comportamentos diferentes no tamanho após adição do extrato. A eficiência de encapsulamento do 5-ACQ foi influenciada pelo agente reticulante utilizado, sendo as micropartículas de Q/TPP as que obtiveram maiores taxas de encapsulamento (74,04%). As análises físico-químicas demonstraram o aprisionamento do extrato pelas micropartículas e que os sistemas poliméricos obtidos são microesferas, além de possuírem maior estabilidade do que o extrato na forma livre. O perfil de liberação do 5-ACQ em fluido gástrico simulado, também foi influenciado pelo agente reticulante utilizado, sendo as micropartículas de Q/TPP as que liberaram maior porcentagem. Já em fluido intestinal simulado a liberação foi gradual e semelhante para ambos os sistemas poliméricos. Em relação à interação com a mucina, as micropartículas apresentaram alta capacidade mucoadesiva de 83,58 e 87,19%. Por meio deste trabalho, foi possível desenvolver e caracterizar micropartículas contendo extrato de grãos de café verde, com promissoras propriedades de aumentar a estabilidade e biodisponibilidade do 5-ACQ, e com isso, possibilitar maior eficácia e aplicabilidade do extrato.

Palavras-chaves: Quitosana. Goma xantana. Tripolifosfato de sódio.

## ABSTRACT

Green coffee has active properties against several diseases, mainly attributed to chlorogenic acids, with 5-O-caffeoylquinic acid (5-ACQ) being the most important among them. The green beans have higher concentrations of 5-ACQ, when compared to roasted grains, this degradation occurs due to the high temperature used in the process. Degradation of 5-ACQ may also occur under various processing and storage conditions. In addition, it presents low bioavailability which interferes with the efficiency of its properties and applications. This work was carried out aiming at the protection of green coffee bean extract by microencapsulation in natural chitosan (Q) polymer systems. Chitosan microparticles were prepared with xanthan gum (GX) and sodium tripolyphosphate (TPP) as crosslinking agents. The microparticles were characterized for particle size, scanning electron microscopy, encapsulation efficiency, spectroscopy, thermogravimetric analysis, release profile and mucoadhesive test. The results showed that the green coffee extract had 110.15 µg / mg of 5-ACQ, in addition to high antioxidant activity. In the characterization of the microparticles, we observed irregular, squamous, friable forms and the Q/GX particles were larger than the Q/TPP and showed different behavior in size after addition of the extract. The efficiency of encapsulation of 5-ACQ was influenced by the crosslinking agent used, being the microparticles of Q/TPP the ones that obtained higher rates of encapsulation (74.04%). The physico-chemical analysis demonstrated the entrapment of the extract by the microparticles and that the obtained polymer systems are microspheres, besides possessing greater stability than the extract in the free form. The release profile of 5-ACQ in simulated gastric fluid was also influenced by the crosslinking agent used, being the microparticles of Q/TPP the ones that released higher percentage. In simulated intestinal fluid the release was gradual and similar for both polymer systems. Regarding the interaction with mucin, all proposed microparticles have a high mucoadhesive capacity of 83.58 and 87.19%. In this work, it was possible to develop and characterize microparticles containing green coffee bean extract, which have promising properties to increase the stability and bioavailability of 5-ACQ, and thus, make the extracts more efficient and practicable.

Keywords: Chitosan. Xanthan gum. Sodium tripolyphosphate.

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais, em particular os oriundos de plantas, devido a grande diversidade, especificidade e eficiência dos seus efeitos biológicos, desempenham papel fundamental no processo de descoberta e desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios (CHEUKA *et al.*, 2017; GUO, 2017).

O crescente avanço de pesquisas e o uso de produtos naturais com finalidade profilática ou curativa estimulam o desenvolvimento de técnicas que garantam maior eficiência e proteção das substâncias bioativas e que possibilitem maior aplicabilidade desses extratos em produtos e processos. Isto porque, a vida útil dos extratos é limitada pela exposição ao oxigênio, umidade e luminosidade o que pode ocasionar degradação dos seus constituintes, implicando na perda da bioatividade (SERVAT, 2010).

As substâncias fenólicas são uma classe importante de metabólitos secundários de origem vegetal. Possuem atividades biológicas bem documentadas como alta capacidade antioxidante e reduzem o risco de diversas doenças de grande incidência da população mundial (SARRIÁ *et al.*, 2016).

O café é uma das maiores fontes de substâncias fenólicas, sendo um produto natural de grande importância econômica, pela ampla distribuição de seu consumo, e pelas suas propriedades ativas como atraso na absorção de glicose, redução do risco de diabetes tipo 2, obesidade, aterosclerose e hipertensão. Essas propriedades são principalmente atribuídas aos ácidos clorogênicos, sendo o ácido 5-O-cafeoilquínico (5-ACQ) o mais importante dentre eles (REGAZONNI *et al.*, 2016; SARRIÁ *et al.*, 2016).

A ingestão de produtos obtidos a partir de extratos de grãos de café verde tem aumentado nos últimos anos por possuírem maiores concentrações de ácidos clorogênicos (ACGs), se comparados aos grãos torrados (SARRIÁ *et al.*, 2016). No entanto, as substâncias fenólicas são instáveis, podendo ser degradadas frente a diversas condições comumente encontradas no processamento, no armazenamento e em condições gastrointestinais (BENINCÁ, 2009; CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2000).

Aliados ao fato do 5-ACQ ser instável em meio gástrico, sofrer metabolismo extensivo após administração oral e ser mal absorvido no intestino, o uso de micropartículas para a proteção das substâncias ativas, o controle adequado do tempo de permanência intestinal combinado com liberação controlada, podem aumentar significativamente a estabilidade e biodisponibilidade dos ACGs (CADDEO *et al.*, 2014).

Na microencapsulação, o uso de polímeros naturais como agentes encapsulantes vem ganhando destaque por serem mais biocompatíveis, menos onerosos e tóxicos em comparação com outros polímeros, além de possuírem propriedades bioativas

que podem contribuir potencializando a propriedade biológica do ativo encapsulado (CADDEO *et al.*, 2014; RUTZ *et al.*, 2016).

A quitosana é um desses polímeros naturais utilizados para fins de microencapsulação. As micropartículas obtidas a partir dela não só protegem as substâncias encapsuladas da degradação, mas também controlam sua liberação e aumentam a absorção devido à propriedade mucoadesiva da quitosana que proporciona maior tempo de contato com a superfície mucosa (DUDHANI; KOSARAJU, 2010; KAŠPAR; JAKUBEC; ŠTĚPÁNEK, 2013).

Para a formação de micropartículas de quitosana podem ser usados vários agentes reticulantes, dentre eles destacam-se a goma xantana, que é um polissacarídeo de origem microbiana, e tripolifosfato de sódio que é um sal aniônico multivalente (KAŠPAR, JAKUBEC; ŠTĚPÁNEK, 2013). O tipo de agente reticulante impacta significativamente na estabilidade, na eficiência de encapsulamento e liberação das substâncias ativas das micropartículas, por isso é um ponto importante no processo de produção de micropartículas (WANG, JUNG; ZHAO, 2017).

Considerando a importância econômica do café e de suas propriedades bioativas, aliadas às altas taxas de degradação e baixa absorção do 5-ACQ, que é um de seus principais e mais importantes constituintes, este trabalho foi realizado visando à proteção do extrato de grãos de café verde por meio da microencapsulação em sistemas poliméricos naturais de quitosana com goma xantana e tripolifosfato de sódio a fim de promover maior estabilidade e biodisponibilidade dos ácidos clorogênicos, possibilitando maior eficácia e aplicabilidade do seu extrato.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos oriundos de seres vivos são denominados produtos naturais. Dentre os produtos naturais, estão os organismos inteiros, como plantas, animais e microrganismos; parte de organismos, por exemplo, folhas e flores de uma planta ou um órgão animal isolado; extrato de organismos ou parte deles e exsudatos, além de substâncias puras como alcaloides, flavonoides, substâncias fenólicas, dentre outras (SARKER; LATIF; GRAY, 2006).

A diversidade de espécies de plantas, animais, microrganismos e organismos marinhos resulta em grande variedade de metabólitos secundários, que desempenham papel fundamental no processo de descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos e na elaboração de novos produtos da área de cosméticos e alimentos (GUO, 2017). Cerca de metade dos produtos farmacêuticos em uso clínico são derivados de produtos naturais. Durante séculos, substâncias naturais, em particular as oriundas de plantas, têm sido usadas para prevenir e tratar enfermidades por atuarem eficazmente por meio de diversos mecanismos (CHEUKA *et al.*, 2017).

O termo produtos naturais refere-se, muitas vezes, aos metabólitos secundários, que são substâncias bioquimicamente produzidas, caracterizadas pela diversidade, distribuição restrita e alta especificidade (SARKER; LATIF; GRAY, 2006).

Os produtos naturais são sintetizados nos organismos vivos em rotas bioquímicas por catálise enzimática, o que contribui diretamente para a eficiência dos efeitos biológicos além de serem, muitas vezes, mais facilmente absorvidos do que as drogas sintéticas (CHEUKA *et al.*, 2017; GUO, 2017). As estruturas individuais, especificidade estereoquímica e os grupos multifuncionais dos produtos naturais são responsáveis pela forte ligação com os alvos farmacológicos e, conseqüentemente pela facilidade de propagação do estímulo (GUO, 2017).

As plantas medicinais e seus extratos são considerados como uma matriz complexa de substâncias, na qual a composição química muitas vezes é apenas parcialmente conhecida. Substâncias marcadoras são constituintes característicos da planta e que podem ajudar a determinar a identidade, padronização, estabilidade do produto e processamento do material botânico que são fundamentais para a garantia da qualidade dos extratos (OLIVEIRA *et al.* 2016).

Os extratos são preparações líquidas, pulverizadas ou concentradas e são comumente obtidas a partir de partes de plantas secas ou frescas por maceração ou percolação. Nas formas líquidas estão incluídas as tinturas, xaropes, óleos essenciais e nas

formulações sólidas, os grânulos, comprimidos e cápsulas com e sem revestimento (OLIVEIRA *et al.* 2016).

A produção de medicamentos fitoterápicos requer estudos prévios envolvendo aspectos botânicos, agrônômicos, químicos, estudos farmacológicos e toxicológicos, além do desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas, para garantia da eficácia do fitoterápico. A estabilidade dos extratos é limitada pela exposição ao oxigênio, umidade e luminosidade, sendo que o processamento inadequado das plantas pode ocasionar degradação dos seus constituintes, implicando na perda da atividade farmacológica (SERVAT, 2010).

Dentre as alternativas que podem ser utilizadas para preservar a integridade química e farmacológica do extrato vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e segurança, destacam-se a encapsulação em lipossomas, microemulsões, uso de micro e nano partículas poliméricas, podendo ser, em alguns casos, capazes de promover liberação controlada e direcionada do extrato, além possibilitar o seu emprego em outros produtos, processos e indústrias (SERVAT, 2010).

Nesse cenário, o desenvolvimento de fitomedicamentos com o uso racional de recursos naturais e conhecimentos técnicos podem contribuir para o tratamento mais eficiente de diversas enfermidades, possibilitando sua ampla utilização e acesso, além de permitirem o aumento da competitividade das indústrias, principalmente a farmacêutica, de países em desenvolvimento pela utilização de recursos naturais de alto valor biológico (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

## 2.2 CAFÉ

### 2.2.1 Gênero *Coffea*

Existem duas espécies principais de café com valor comercial que representam praticamente todo o café comercializado, a *Coffea arabica* L., conhecida como café arábica e a *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehener, também conhecida como café robusta. Ambas são do gênero *Coffea* e pertencem à família Rubiaceae. São importantes culturas de *commodities* produzidas em países tropicais (CASAS *et al.*, 2017; ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012).

O café arábica é produzido na América do Sul e nas terras altas e de montanha da África Oriental, sendo a principal espécie consumida e cultivada no Brasil. Os principais lugares de origem do café robusta são o Vietnã e as terras baixas da África Central e Ocidental, bem como do Sul da Ásia (CORRÊA *et al.*, 2016; JESZKA-SKOWRON; STANISZ; PENA, 2016).

As diferentes espécies de café apresentam condições de crescimento e composição química diferentes, o que interfere nas propriedades bioativas e sensoriais de seus grãos e infusões (WOLSKA *et al.*, 2017). Sendo, o café arábica caracterizado por sabor, qualidades aromáticas e valor de mercado superior ao robusta (CASAS *et al.*, 2017).

A composição química dos grãos de café sofre influência de fatores como a variedade genética, condições ambientais como altitude, temperatura e umidade e pelo processamento pós-colheita. As substâncias fenólicas são encontradas em maiores concentrações nos grãos de café verde, e especialmente sofrem variação de 7 a 10% de ácidos clorogênicos e 1% de cafeína para o café arábica e de 7 a 14% de ácidos clorogênicos e 2,5% de cafeína para o café robusta (SINISI *et al.*, 2016).

### **2.2.2 Composição química dos grãos de café verde**

O café é uma mistura complexa de substâncias químicas. Estudos fitoquímicos indicam que os grãos de café verde do tipo arábica consistem de 7-10% de ácido clorogênico, 1,0-2,2% de cafeína, 10-16% de lipídios com diterpenos especiais (cafestol e caveol), 0,7-1,0% de trigonelina, 45-52% de carboidratos, 11% de proteínas e 4,2-4,4% de minerais (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012; PAN *et al.*, 2016).

Os grãos de café verde são uma das principais fontes de substâncias de uma família de conjugados hidroxicinâmicos coletivamente referidos como ácidos clorogênicos, sendo a maior parte das substâncias fenólicas encontrados no café (CROZIER *et al.*, 2011). Muitos efeitos benéficos do café podem ser atribuídos aos ácidos clorogênicos, sendo o ácido 5-O-cafeoilquínico o mais importante e estudado entre eles (REGAZONNI *et al.*, 2016).

A cafeína é uma metilxantina classificada como pseudoalcaloide, sendo o componente do café mais estudado devido às suas propriedades biológicas de estimulação do sistema nervoso central e músculo cardíaco, atividade antioxidante e antibiótica (PAN *et al.*, 2016).

A fração lipídica dos grãos de café verde é composta principalmente por triacilgliceróis, esteróis e tocoferóis. Adicionalmente, o óleo de café apresenta uma fração insaponificável que contém cafestol e caveol, dois furanoditerpenos da família dos cauranos, de interesse devido as suas propriedades bioativas. Cafestol e caveol estão presentes na forma livre e esterificada com diferentes ácidos graxos (DURÁN *et al.*, 2017).

Os carboidratos são os principais constituintes do grão de café verde. Os carboidratos solúveis correspondem aos monossacarídeos (frutose, glucose, galactose, arabinose), oligossacarídeos (sucrose, rafinose, estaquiose) e polissacarídeos (polímeros de

galactose, manose e arabinose), e os insolúveis correspondem à celulose e hemicelulose (DURÁN *et al.*, 2017).

Em relação à composição mineral do grão de café verde, são encontrados principalmente potássio, cálcio e magnésio, com a presença de outros minerais em concentração traço. Dentre os ácidos voláteis encontrados no café estão o ácido acético, propanoico, isovalérico, hexanoico, decanoico e dentre os ácidos alifáticos não voláteis estão os ácidos cítrico, málico e quínico (DURÁN *et al.*, 2017).

No café torrado, devido ao processamento, são formadas outras substâncias bioativas como melanoidinas, carboidratos, e ácidos alifáticos (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012; PAN *et al.*, 2016). O processo de torrefação modifica fortemente a composição final do café, incluindo os ACGs. A torrefação pode contribuir com uma perda de 42-99% do conteúdo total de 5-ACQ. A perda elevada de ACGs durante o processamento pode comprometer os seus potenciais benefícios (GETACHEW; CHUN, 2016). Por isso, a ingestão de produtos de café verde tem aumentado nos últimos anos por possuir maior concentração de substâncias benéficas para a saúde quando comparado ao café torrado (SARRIÁ *et al.*, 2016).

### **2.2.3 Atividades biológicas do café**

Os polifenóis constituem um dos grupos mais importantes de metabólitos secundários do café, possuindo inúmeras propriedades bioativas, com destaque para a atividade antioxidante, reduzindo assim, o risco de diversas doenças de grande incidência da população mundial (JESZKA-SKOWRON; STANISZ; PENA, 2016).

O consumo regular de café pode reduzir o risco de Parkinson, Alzheimer, hipertensão, diabetes tipo 2, câncer, e restaurar a função hepática. Além disso, os grãos de café possuem propriedades anti-inflamatórias, de proteção contra radiação ultravioleta e atividade antibacteriana (KIATTISIN; NANTARAT; LEELAPORNPI SID, 2016).

Os grãos de café verde são fontes de ácidos fenólicos que representam uma classe importante de substâncias para promover ou manter condições saudáveis (REGAZONNI *et al.*, 2016). Muitas das atividades biológicas atribuídas para a proteção à saúde dos grãos de café verde são devidas à ação antioxidante de seus constituintes, principalmente as substâncias fenólicas, com destaque para os ácidos clorogênicos (JESZKA-SKOWRON; STANISZ; PENA, 2016).

Os antioxidantes são capazes de atrasar ou inibir a oxidação de forma eficaz por diversos mecanismos como impedimento da formação de radicais livres, reparo das lesões causadas pelo estresse oxidativo ou sequestro dos radicais livres produzidos pelo metabolismo celular (MOREIRA, 2013).



Embora, o corpo humano produza antioxidantes endógenos, é necessário o fornecimento adequado de antioxidantes exógenos (LOSADA-BARREIRO; DÍAZ, 2017; WOLSKA *et al.*, 2017). Com isso, a utilização de grãos de café verde seja em forma de extrato, cápsulas em produtos farmacêuticos e cosméticos ou na forma de infusões e em suplementação de alimentos, demonstra ser uma terapia eficaz para manter a saúde contra o estresse oxidativo e por consequência, para prevenção de inúmeras doenças (JESZKA-SKOWRON; STANISZ; PENA, 2016; WOLSKA *et al.*, 2017).

A vida aeróbica é caracterizada por uma produção contínua de radicais livres, tais como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que são geradas sob condições fisiológicas no metabolismo normal como parte de vários processos fisiológicos. Porém, quando há um desequilíbrio causado por uma superprodução de radicais livres gera-se um estresse oxidativo que causam efeitos nocivos com danos biológicos potenciais, gerando diminuição da defesa antioxidante ou um excesso de prooxidantes (LOSADA-BARREIRO; DÍAZ, 2017).

Muitos fatores, tais como condições ambientais, radiação UV, alimentação, estresse, poluentes, também são causas da formação de radicais livres. O estresse oxidativo pode induzir muitas doenças, como diferentes tipos de câncer, doença arterial coronariana, doenças do sistema nervoso, doenças pulmonares e artrite reumatoide. Além disso, desempenha papel importante no envelhecimento dos tecidos (KIATTISIN; NANTARAT; LEELAPORNPI SID, 2016).

A degradação e absorção de alimentos são fatores cruciais no desenvolvimento de várias doenças crônicas. O estado pós-prandial representa uma fase dinâmica de catabolismo e síntese. Sendo o epitélio gástrico um dos principais locais de produção de espécies reativas de oxigênio decorrentes de diversas atividades físicas, químicas e microbiológicas, que estão relacionados com patogênese de úlceras gastrointestinais e cânceres (FLORES *et al.*, 2014).

Os radicais livres são espécies químicas reativas com um único elétron não emparelhado em seus orbitais mais externos. Esta configuração eletrônica é altamente energética, tornando os radicais livres quimicamente instáveis e muito reativos. Os polifenóis funcionam como antioxidantes porque são excelentes doadores de hidrogênio que são aceitos por radicais livres para produzir espécies menos reativas (LOSADA-BARREIRO; DÍAZ, 2017).

#### **2.2.4 Aplicação industrial dos grãos de café**

O Brasil é um dos maiores produtores e um dos maiores mercados consumidores de café do mundo (CORRÊA *et al.*, 2016). O café é um produto muito

importante e ocupa o segundo lugar, depois do petróleo, entre todas as *commodities* (GETACHEW; CHUN, 2016). Cerca de 60 países tropicais e subtropicais produzem café extensivamente, sendo para alguns deles o principal produto de exportação agrícola (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012).

A importância econômica do café é devida principalmente à bebida, uma infusão preparada a partir do grão torrado e moído. A ampla distribuição do consumo de café afeta uma população demográfica mais ampla do que outros alimentos funcionais (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012).

Os efeitos protetores do café para a saúde têm impacto generalizado, considerando a alta ingestão de sua bebida, particularmente nos países industrializados. Em muitos países o café é a maior fonte de antioxidantes dietéticos por isso, seus efeitos benéficos para a saúde são de interesse do ponto de vista da saúde pública (SARRIÁ *et al.*, 2016).

Os extratos obtidos a partir dos grãos de café verde, não ganharam tanto destaque como a bebida dos grãos torrados, por apresentar sabor amargo e adstringente. Porém, os grãos de café verde possuem ampla aplicabilidade, sendo utilizados em diferentes formas farmacêuticas, em produtos dermocosméticos, como aditivos em alimentos processados, adubos, combustíveis, adsorventes e como fonte de enzimas. (CORRÊA *et al.*, 2016; CARVALHO; SILVA; HUBINGER, 2014; DURÁN *et al.*, 2017).

Existem no mercado diferentes marcas de cápsulas de extrato de grãos de café verde com alto valor agregado, dentre esses produtos comercializados está o Svetol® ([www.svetol.com](http://www.svetol.com)) que é um extrato de ácido clorogênico padronizado de grãos verdes de café descafeinado (teor total de ACGs de 45 a 50%), utilizado por ter efeitos de emagrecimento clinicamente comprovado, devido à diminuição da absorção intestinal de glicose (REGAZONNI *et al.*, 2016).

Os extratos de grãos de café verde também são frequentemente utilizados para enriquecimento de produtos alimentares como pães, biscoitos, queijos, dentre outros, com o intuito de prevenir mudanças oxidativas nos alimentos, adicionar propriedades bioativas de efeito benéfico à saúde humana, além de melhorar as características sensoriais dos produtos (BUDRYN; ZACZYNSKA; ORACZ, 2016).

### 2.3 ABSORÇÃO E DEGRADAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS

As substâncias fenólicas são metabólitos secundários de plantas e constituem um dos grupos de maior diversidade e de ampla distribuição. Os polifenóis possuem no mínimo um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2000).

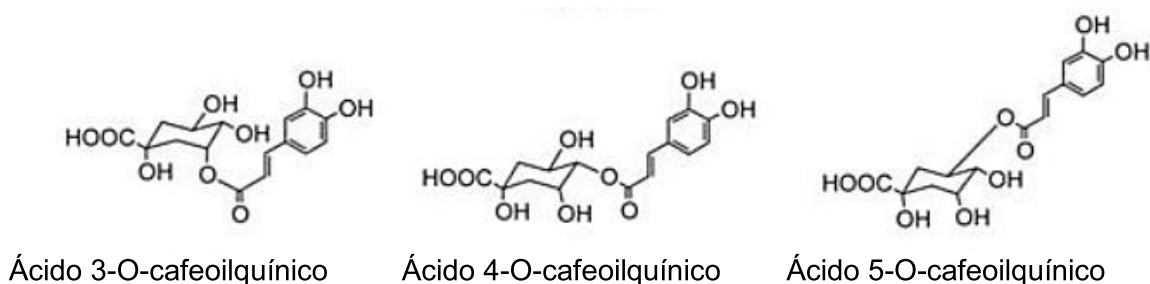
A ampla distribuição das substâncias fenólicas se deve ao fato de serem biossintetizados a partir de diferentes intermediários, possuindo rotas biogênicas alternativas (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

A maior parte das substâncias fenólicas não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob a forma de ésteres. Sendo assim, a maior classe das substâncias fenólicas são os ácidos fenólicos que são divididos em ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, sendo os ácidos hidroxicinâmicos a maior subclasse (MOREIRA, 2013).

Existem cinco grupos principais de ácidos hidroxicinâmicos formados principalmente pela esterificação do ácido quínico com um dos seguintes derivados do ácido cinâmico: ácido cafeico, ferúlico e p-cumárico. Esses grupos são os ácidos cafeoilquínicos, ácidos dicafeoilquínicos, feruloilquínicos, ácido p-cumaroilquínicos e o ácido cafeoilferuloilquínico (MOREIRA, 2013).

Dentre os ácidos fenólicos destacam-se os ácidos clorogênicos, que são os isômeros provenientes da esterificação em diferentes posições do ácido cafeico (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2002). A **Figura 1** apresenta os principais ácidos clorogênicos que são o ácido 5-O-cafeoilquínico (5-ACQ) e os seus isômeros ácido 3-O-cafeoilquínico (3-ACQ) e ácido 4-O-cafeoilquínico (4-ACQ) (CROZIER *et al.*, 2011).

Figura 1 – Estrutura química dos ácidos clorogênicos.



Fonte: Adaptado de (CROZIER *et al.*, 2011).

Os ácidos clorogênicos são caracterizados pela presença de apenas um grupo fenólico em sua estrutura molecular, o que os define como fenóis simples, porém suas propriedades químicas e biológicas são similares aos demais polifenóis (MARIA; MOREIRA, 2004).

### 2.3.1 Propriedades bioativas dos ácidos clorogênicos

Os ACGs possuem bioatividades bem documentadas tais como propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, quimiopreventivas, inibição da glicação e aterosclerose,

melhora na tolerância à glicose e efeitos anti-obesidade (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Os ácidos clorogênicos atrasam a absorção de glicose no intestino, melhoram o estado antioxidante do corpo e reduzem a oxidação de LDL (REGAZONNI *et al.*, 2016).

Segundo Sarriá *et al.*, (2016), alguns mecanismos sobre efeitos anti-obesidade atribuídos ao 5-ACQ foram estudados e dentre eles foi demonstrado que essa substância pode afetar a absorção de glicose no intestino por meio da inibição da glicose-6-fosfato translocase-1, uma enzima conhecida no transporte intestinal de glicose e na redução do transporte de sódio conduzido por gradiente. Outro possível mecanismo responsável pelos benefícios do ácido clorogênico e seus derivados no metabolismo da glicose é a diminuição da produção de glicose hepática por meio da inibição da glicose-6-fosfatase, devido a maior parte do ácido clorogênico absorvido intacto, ser extensivamente metabolizado no fígado (SARRIÁ *et al.*, 2016).

O 5-ACQ inibe a formação de substâncias N-nitrosas mutagênicas e carcinogênicas, pois são inibidores *in vitro* da reação de N-nitrosação. O ácido clorogênico pode inibir o dano do DNA *in vitro*. Portanto, há a associação inversa entre a ingestão de café e o câncer de cólon em alguns estudos epidemiológicos (OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2000).

Além disso, foi relatado o potencial efeito cardioprotetor do café que pode ser devido à propriedade anti-aterogênica dos ACGs, que são capazes de aumentar o efluxo de colesterol mediado por HDL dos macrófagos (REGAZONNI *et al.*, 2016).

A maioria dos resultados terapêuticos atribuídos aos ACGs é provavelmente devido à ação antioxidante destas substâncias a qual se deve aos seus altos potenciais como agentes redutores, sendo eliminadores eficazes de radicais livres (BENINCÁ, 2009).

### **2.3.2 Absorção dos ácidos clorogênicos**

À medida que passam ao longo do trato gastrointestinal, as substâncias fenólicas são extensivamente metabolizadas, e somente a fração absorvida intacta, entrará na circulação sanguínea e induzirá os efeitos biológicos esperados, já os seus metabólitos gerados possuem propriedades diferentes das substâncias de origem presentes na matriz alimentar. Portanto, uma compreensão mais profunda da biodisponibilidade de fenólicos é essencial para entender os mecanismos específicos pelos quais eles podem contribuir para a saúde (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Após a ingestão, uma pequena parte dos ACGs será absorvida intacta sendo a outra parte clivada nas esterificações por esterases microbianas. Estas substâncias são detectadas no plasma e na urina principalmente como conjugados de fase II (derivados de metila, glucuronídeo e sulfato) de ACGs, de ácidos cafeico e ferúlico. Supõe-se que os

metabólitos de aparecimento tardio, como os ácidos hidroxifenilpropionico, hipúrico e hidroxibenzóico, são absorvidos e produzidos no intestino grosso, após a metabolização pela microbiota (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Portanto, o aparecimento de ácido cafeico, ferúlico, isoferúlico inicialmente no plasma, tanto em forma livre quanto conjugado com ácido glucurônico ou sulfatos, indica que não apenas há a absorção, mas também a metabolização de ácidos clorogênicos por esterases e enzimas de fase II (COMT, sulfotransferases e UDP-glucuronosiltransferases) que começa no estômago e não ocorre apenas no fígado, rins, mucosa intestinal ou pela atividade da microbiota do cólon (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

A absorção dos ácidos clorogênicos é três vezes menor que a do próprio ácido cafeico. Segundo Olthof; Hollman; Katan (2000), isto é também suportado pelo fato de ter sido encontrada uma grande quantidade de ácido clorogênico ingerido inalterado em efluente de ileostomia. Assim, um terço do 5-ACQ e quase todo o ácido cafeico são absorvidos no intestino delgado dos seres humanos. Isto implica que parte dos ácidos clorogênicos entrará na circulação sanguínea e causará os efeitos esperados, mas a maior parte atingirá o cólon onde poderão ter outras propriedades bioativas como proteção contra câncer de cólon e efeito prebiótico (OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2000).

Devido ao fato do 5-ACQ ser instável em meio gástrico, ser mal absorvido no intestino, sofrer metabolismo extensivo de primeira passagem após administração oral e ser rapidamente eliminado, o controle adequado do tempo de permanência intestinal combinado com sistemas de liberação controlada, podem aumentar significativamente a biodisponibilidade dos ACGs (CADDEO *et al.*, 2014).

### **2.3.3 Degradação dos ácidos clorogênicos**

Os ácidos clorogênicos por serem substâncias aromáticas, apresentam intensa absorção na região do UV, e são instáveis principalmente em altas temperaturas, presença de luz e em valores de pH baixos e extremos (BENINCÁ, 2009; CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2002). Além disso, a reação de transesterificação pode ocorrer durante o armazenamento ou processamento, ocasionando o escurecimento de suas soluções e a perda da bioatividade (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2002; CHAO *et al.*, 2012).

A presença de um orto-di-hidroxifenol na molécula de ácido clorogênico torna mais provável sofrer oxidação rápida por irradiação gama ou estresse oxidativo (CHAO *et al.*, 2012). Embora se atribua as propriedades antioxidantes dos ACGs à estrutura catecol do anel fenil, a ligação dupla conjugada com o grupo catecol também é local para o ataque de radicais livres (CHAO *et al.*, 2012).

As substâncias fenólicas são instáveis, podendo ser degradadas frente a diversas condições comumente encontradas no processamento, no armazenamento e em condições gastrointestinais, devido ao pH e presença de outras substâncias (KUCK, 2016).

A microencapsulação é uma alternativa eficiente nos processamentos, para impedir que as substâncias encapsuladas reajam ou sofram influência do meio de produção, preservando assim as suas características químicas e reacionais (BUDRYN; ZACZYNSKA; ORACZ, 2016; RUTZ *et al.*, 2017).

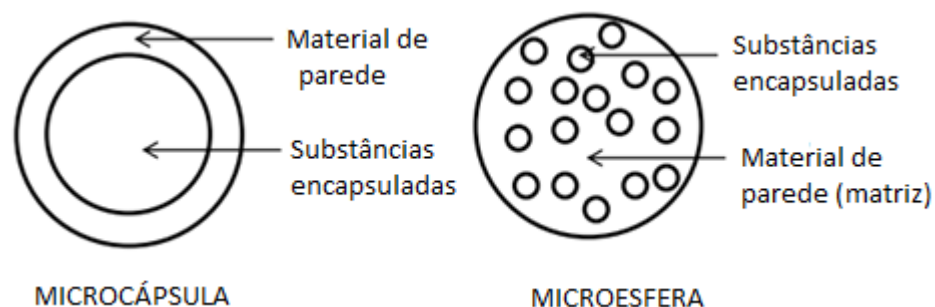
Portanto, a estabilização dos ácidos clorogênicos é uma das preocupações mais importantes para suas aplicações industriais (CHAO *et al.*, 2012). A microencapsulação de polifenóis tem sido proposta como uma alternativa para melhorar sua estabilidade, bioatividade, biodisponibilidade com intuito de melhorar sua eficiência e para estender sua aplicação (SHAO *et al.*, 2014).

## 2.4 MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação é uma tecnologia de revestimento de substâncias por meio de materiais encapsulantes, gerando micropartículas que podem ser consideradas formas farmacêuticas ou serem acondicionadas em uma forma farmacêutica secundária como suspensão, cápsula ou comprimido, ou serem adicionadas a um produto alimentar ou cosmético (ZHANG *et al.*, 2017).

As micropartículas podem ser divididas em dois grupos as microcápsulas e microesferas como demonstrado na **Figura 2**. O primeiro grupo é caracterizado por manter as substâncias encapsuladas concentradas na região central da micropartícula, formando um sistema reservatório, sendo elas completamente revestidas pelo material de parede. No segundo grupo a substâncias encapsuladas são dispersas ou dissolvidas em uma matriz formada pelo material encapsulante (ARAÚJO, 2011).

FIGURA 2- Morfologia das micropartículas.



FONTE: Adaptado de (VIEGAS, 2013).

Os materiais encapsulantes utilizados na microencapsulação são geralmente polímeros biodegradáveis que podem ser naturais, naturais modificados ou sintéticos. Os polímeros naturais são mais biocompatíveis, menos onerosos e tóxicos em comparação com outros polímeros, quando usados para microencapsulação (RUTZ *et al.*, 2016). Nesse contexto, o biopolímero quitosana tem posição de destaque (BARAKAT; ALMURSHEDI, 2011; CADDEO *et al.*, 2014; DHAWAN; SINGLA; SINHA, 2004; DUDHANI; KOSARAJUA, 2010; HU *et al.*, 2017).

Vários materiais podem ser encapsulados, como acidulantes, agentes aromatizantes, extratos vegetais, óleos essenciais, corantes, lipídios, vitaminas, minerais, enzimas, microrganismos (MANCONI *et al.*, 2010; RUTZ, 2013; SILVA *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2017).

Muitas vantagens podem ser alcançadas com a microencapsulação, tais como a proteção das substâncias encapsuladas dos fatores ambientais, a diminuição das perdas voláteis, a liberação controlada, a cobertura dos odores e sabores desagradáveis das substâncias encapsuladas, dispersão mais uniforme no trato gastrointestinal, absorção mais uniforme das substâncias (SILVA *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2017).

Outras vantagens dessas formas de dosagem multiparticuladas sobre as preparações não particuladas, incluem a facilidade do armazenamento, manuseio, transporte e formulação mais flexível por possibilitar o uso de diferentes processamentos físicos, conversão de moléculas líquidas ou gasosas em sólidas e inclusão de dois ou mais princípios ativos na mesma formulação quando estes são incompatíveis (ZHANG; ALSARRA; NEAU, 2002).

Para a caracterização das micropartículas e do processo de encapsulação são empregados alguns métodos, dentre os quais se destacam, para avaliação estrutural, a microscopia eletrônica de varredura, análise térmica, análise de diâmetro médio e de distribuição de tamanho, para análise das substâncias encapsuladas, a cromatografia e métodos espectroscópicos, perfil de liberação da micropartículas e atividades biológicas dos ativos encapsulados (ARAÚJO, 2011).

Vários métodos de encapsulação estão disponíveis, incluindo métodos físicos tais como secagem por pulverização, liofilização, revestimento em leito fluidizado, esferonização por extrusão e processos utilizando os fluidos supercríticos. Métodos físico-químicos usando resfriamento por spray, revestimento por fusão a quente, gelificação iônica, extração por evaporação de solvente e coacervação simples ou complexa. E métodos químicos por meio de policondensação interfacial, polimerização e reticulação interfacial. (ESTEVINHO *et al.*, 2013; WANG; JUNG; ZHAO, 2017).

### 2.4.1 Coacervação complexa

A coacervação é uma das mais antigas técnicas de encapsulamento, sendo a coacervação complexa um método que usa a combinação de polímeros como agentes encapsulantes. Neste método, a atração eletrostática é causada entre um mínimo de duas macromoléculas com cargas opostas, e a formação de coacervatos ocorre em um intervalo de pH estreito. Além disso, outras interações fracas, tais como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, contribuem para a formação do complexo (RUTZ *et al.*, 2017).

Essa interação forma complexos insolúveis e produz separação de fases. Os biopolímeros que se encaixam para coacervação, devem ter propriedades coloidais hidrofílicas, solubilidade em meio aquoso, densidade de carga adequada e cadeias lineares (YUAN *et al.*, 2017).

A coacervação por precipitação pode ser aplicada na preparação de partículas de quitosana em condições suaves (HU *et al.*, 2017). Atualmente, há interesse significativo na técnica de coacervação complexa devido à sua elevada capacidade de carga, liberação controlada e, especialmente, capacidades antioxidantes (YUAN *et al.*, 2017).

### 2.4.2 Gelificação iônica

Entre os métodos de obtenção de micropartículas de quitosana, o método de gelificação iônica com o tripolifosfato de sódio (TPP) é a abordagem mais utilizada e estudada (HEJJAJI; SMITH; MORRIS, 2017). Estudos têm relatado o uso de sulfato, citrato e TPP como sais de contra-íons para preparar micropartículas de quitosana por meio de reticulação iônica, sendo o TPP relatado como o mais popular (HEJJAJI; SMITH; MORRIS, 2017; YUAN; JACQUIER; O'RIORDAN, 2017).

Neste método, os polissacárideos sofrem gelificação e precipitam para formar micropartículas devido à complexação entre espécies opostamente carregadas (WANG; JUNG; ZHAO, 2017). As micropartículas de quitosana reticuladas iônicamente possuem maior sensibilidade ao inchamento a alterações de pH, em comparação com as micropartículas reticuladas covalentemente (ESTEVINHO *et al.*, 2013).

Este método é vantajoso, pois a reação é simples e não requer o uso de solventes orgânicos ou temperaturas elevadas. Outras vantagens são que o tamanho de partícula e a carga positiva que podem ser facilmente controlados nas formulações das micropartículas (HEJJAJI; SMITH; MORRIS, 2017). Esse método tem atraído grande interesse devido à facilidade de manuseio e controle, alta compatibilidade e baixa toxicidade (WANG; JUNG; ZHAO, 2017).



### 2.4.3 Liofilização

A liofilização é uma técnica de secagem por congelamento que é bem estabelecida para aplicação no processo de encapsulação, principalmente para materiais encapsulados termolábeis. Sendo uma operação multiestágio que inclui congelamento, secagem primária e secagem secundária. Essa técnica baseia-se na desidratação por sublimação de um produto, onde o fluido é congelado e, posteriormente, a água em forma de gelo cristalino é removida por sublimação, resultando em uma estrutura porosa e friável (PASRIJA *et al.*, 2015).

Nesse sentido, a liofilização possui uma série de vantagens que o torna um dos métodos mais utilizados para a conservação de materiais biológicos. O material permanece congelado até estar completamente seco, portanto elimina-se o encolhimento e a migração dos constituintes dissolvidos, retendo a forma original do material (PASRIJA *et al.*, 2015).

A liofilização é a técnica mais eficiente para proteger os ácidos clorogênicos contra a degradação, porque a baixa temperatura de processamento e a redução da umidade reduzem a perda de bioatividade melhor do que outros métodos, como atomização e evaporação de solvente (ROSA *et al.*, 2013).

A microencapsulação por liofilização protege a substância numa matriz polimérica, inibindo modificações físico-químicas, mantendo a sua bioatividade, e controlando a sua liberação. Além disso, esse processo de secagem facilita o armazenamento, manuseio, transporte e conservação (ROSA *et al.*, 2013).

### 2.4.4 Aplicação industrial da microencapsulação

A microencapsulação tem sido amplamente utilizada em uma variedade de campos, tais como medicina, farmácia, biotecnologia e alimentos. Sua vasta aplicabilidade se deve às inúmeras combinações entre os métodos de encapsulação, os diferentes materiais encapsulantes e as substâncias encapsuladas, que podem ser alterados e manipulados de acordo com o interesse de cada setor industrial (ZHANG *et al.*, 2017).

Essa abordagem tecnológica tem sido explorada pelas indústrias farmacêutica (68%), alimentos (13%), cosméticos (8%), têxtil (5%), biomédica (3%), agricultura (2%) e eletrônicas (1%). No entanto, as indústrias farmacêuticas e alimentares são as principais forças motrizes nos avanços da microencapsulação (SILVA *et al.*, 2014).

Tanto para a indústria farmacêutica quanto para a de alimentos, a microencapsulação possui as vantagens de permitir potencializar sabores e aromas específicos ou mascarar odores e sabores indesejáveis. Por não necessitar de novas linhas de alimentação e fases de incorporação, as micropartículas beneficiam o processo produtivo

por permitir o uso de técnicas que eliminam *downtime* em linhas de produtos (BUDRYN; ZACZYNSKA; ORACZ, 2016).

Atualmente, a pesquisa sobre microencapsulação para fins farmacêuticos é focada em encontrar novos sistemas de entrega de fármacos e vacinas, reduzindo as reações adversas e efeitos colaterais, sendo adequado para o modo de administração requerido, permitindo a entrega específica do local, uma possível liberação controlada e sustentada de substâncias. Alguns dos fármacos que utilizam essa tecnologia são comprimidos acetaminofeno, com a finalidade de mascaramento do sabor, suspensão injetável de bromocriptina, e cápsulas de leuprorelina para liberação controlada (SILVA *et al.*, 2014; WANG; JUNG; ZHAO, 2017).

Na indústria alimentícia os ingredientes funcionais e os ingredientes bioativos são encapsulados para preservar sua estabilidade durante o processamento e armazenamento de alimentos, aumentando a *shelf life do produto*. Adicionalmente, também é utilizada para evitar interações indesejadas entre outros ingredientes presentes na matriz dos alimentos, como é o caso da interação das substâncias fenólicas com componentes proteicos, que podem limitar a funcionalidade dessas substâncias, além de diminuir a absorção (BUDRYN; ZACZYNSKA; ORACZ, 2016).

As substâncias com propriedades benéficas a saúde humana são as mais comumente microencapsuladas na indústria de alimentos, muitas dessas substâncias apresentam capacidade antioxidante, podendo ser usadas como ingredientes ativos ou suplementos (ESTEVINHO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014).

## 2.5 SISTEMAS POLIMÉRICOS NATURAIS

A utilização de polímeros naturais como veículos para a administração de substâncias vem gerando grande interesse, principalmente pela sua biocompatibilidade (MANCONI *et al.*, 2010). Além disso, os polímeros naturais, tais como quitosana, pectina, galactomanano, goma de guar e goma xantana podem melhorar o tempo de residência da micropartícula no trato gastrointestinal, conduzindo assim a uma maior biodisponibilidade oral de substâncias pouco absorvíveis devido à sua capacidade de aderir à camada de muco e proporcionar a liberação controlada do fármaco (CADDEO *et al.*, 2014).

Os polímeros naturais, tais como os polissacarídeos, tem estruturas diversas com diferentes propriedades biológicas, o que pode contribuir potencializando a propriedade biológica do ativo encapsulado, além de servirem para uma variedade de propósitos devido as suas características distintivas, incluindo o seu comportamento pseudoplástico, capacidade de gelificação, capacidade de ligação química e biodegradabilidade (KIM *et al.*, 2016).

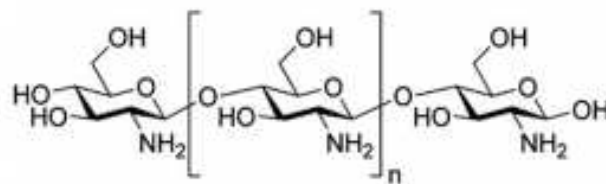
A escolha do material de parede deve ser baseada na não reatividade do material de revestimento com o material a ser encapsulado na técnica que será utilizada para a formação das microcápsulas e no mecanismo ideal de liberação (RUTZ, 2013).

Embora um único polímero possa ser utilizado para microencapsulação, na maior parte dos casos, um único agente encapsulante não possui todas as propriedades de um material de parede ideal e, assim, recomenda-se uma combinação de polímeros (RUTZ *et al.*, 2016).

### 2.5.1 Quitosana

A quitosana, também denominada como quitina desacetilada é um polissacarídeo hidrofílico, obtido pela desacetilação da quitina, sendo o segundo polissacarídeo mais abundante, junto à celulose (WANG; JUNG; ZHAO, 2017). A quitina é um componente básico das cutículas protetoras de caranguejos, camarões, lagostas e paredes celulares de alguns fungos, sendo um homopolímero linear composto por unidades de N-acetil-D-glucosamina ligadas por ligações  $\beta$ -1,4. Enquanto, que a quitosana compreende copolímeros de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina e difere no grau de N-acetilação (40-98%) e peso molecular (50-2000 kDa) como demonstra a **Figura 3** (ESTEVINHO *et al.*, 2013; KAŠPAR; JAKUBEC; ŠTĚPÁNEK, 2013).

Figura 3 – Estrutura química da quitosana



Fonte: (BARAKAT; ALMURSHEDI, 2011).

O polissacarídeo quitosana apresenta propriedades químicas e biológicas que permitem sua ampla utilização para vários fins, tais como formação de soluções, géis, filmes e fibras. Além disso, as vantagens da biodegradabilidade, baixa toxicidade e biocompatibilidade, tornam esse polímero um grande potencial para aplicações biomédicas e farmacêuticas (HU *et al.*, 2017).

A quitosana é uma base fraca com um valor de pKa do resíduo de glucosamina de cerca de 6,2-7,0 e, portanto, é insolúvel em valores de pH neutros e alcalinos. Em meio ácido, os grupos amino do polímero são protonados, resultando num polissacarídeo solúvel, carregado positivamente, que tem uma densidade de carga elevada (uma carga para cada

unidade de glucosamina) (KAŠPAR; JAKUBEC; ŠTĚPÁNEK, 2013; KIM *et al.*, 2016). Em solução, apresenta comportamento pseudoplástico e a viscosidade aumenta com a redução de temperatura e com o aumento do grau de desacetilação (WEI; GAO, 2016).

Dentre as inúmeras propriedades biológicas descritas para a quitosana, destacam-se a capacidade antioxidante, antimicrobiana, inibição da formação de biofilmes, antiinflamatória e cicatrizante, que permitem com que a quitosana contribua com atividades bioativas importantes, além de suas propriedades físicas para a elaboração de micropartículas (TAVARIA *et al.* 2013).

Devido à carga positiva dos grupos amino livres na quitosana, ela reage com ânions negativamente carregados. Este fato é utilizado para a formação de micropartículas de quitosana reticuladas por ânions bivalentes e polivalentes. As micropartículas feitas de quitosana pura não podem ser mantidas em suspensão em meio aquoso durante muito tempo devido ao seu inchaço e dissolução, sendo inadequadas para efeitos de sistemas de administração controlada de fármacos (KAŠPAR; JAKUBEC; ŠTĚPÁNEK, 2013).

A quitosana é uma das substâncias mais utilizadas para fins de microencapsulação, suas micropartículas não só protegem as moléculas do fármaco da degradação, mas também melhoram sua absorção e biodisponibilidade (DHAWAN; SINGLA; SINHA, 2004). A utilização de micropartículas de quitosana como sistemas de administração controlada para fármacos convencionais, fármacos proteicos e produtos naturais, como as substâncias fenólicas, tem atraído atenção crescente desde o início da década de 1990 (ESTEVINHO *et al.*, 2013; RUTZ *et al.*, 2016; RUTZ *et al.*, 2017; YUAN; JACQUIER; O'RIORDAN, 2017; ZHANG *et al.*, 2017).

Os sistemas de liberação mucoadesivos têm sido alvo de grande interesse por serem considerados uma forma promissora para prolongar o tempo de residência das formulações na camada mucosa, permitindo a otimização da liberação das substâncias ativas onde deve ocorrer o efeito terapêutico, e/ou o íntimo contato da formulação com o local de absorção (MAZZARINO, 2013).

Os sistemas mucoadesivos podem ser destinados a diferentes regiões do corpo, pois as células secretoras de muco são amplamente disseminadas em diferentes locais do corpo incluindo a mucosa nasal, ocular, bucal, gastrointestinal e o trato respiratório (DHAWAN; SINGLA; SINHA, 2004; MAZZARINO, 2013).

Entre os polímeros mucoadesivos, a quitosana tem sido amplamente investigada devido as suas propriedades biocompatíveis e sua capacidade de interagir com as superfícies mucosas. A molécula linear de quitosana apresenta flexibilidade de cadeia para interpenetração e emaranhamento. Sendo suas propriedades de mucoadesão devidas à atração eletrostática entre suas cargas positivas e o grupo ácido siálico negativamente carregado da mucina (DUDHANI; KOSARAJU, 2010).

Essa propriedade mucoadesiva da quitosana permite reduzir a frequência de administração de doses e aumentar a absorção das substâncias ativas por meio da abertura das junções celulares facilitando a permeabilidade (DUDHANI; KOSARAJU, 2010; KIM *et al.*, 2016).

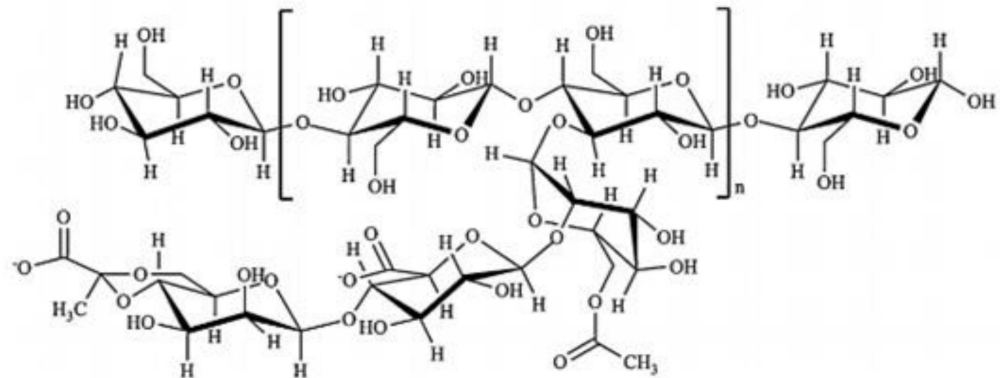
Consequentemente, as micropartículas de quitosana carregadas positivamente também possuem propriedade de adsorver com a glicoproteína do muco, e podem regular a liberação de substâncias ativas no trato gastrointestinal, conduzindo assim a uma biodisponibilidade oral aumentada das substâncias encapsuladas (DHAWAN; SINGLA; SINHA, 2004).

### 2.5.2 Goma Xantana

A goma xantana é uma goma industrial classificada como heteroexopolissacarídeo ramificado, aniônico, produzido por fermentação, empregando a bactéria *Xanthomonas campestris* (BRANDÃO *et al.*, 2008). Devido às suas propriedades reológicas e biológicas, a goma xantana destaca-se industrialmente, visto que suas soluções possuem alta viscosidade em baixas concentrações, estabilidade em uma ampla faixa de temperatura, pH e concentração de sais, além de possuir atividade antioxidante (NERY; ESPERIDIÃO; DRUZIAN, 2008; XIONG *et al.*, 2013).

A goma xantana possui estrutura primária formada por unidades repetidas de pentassacarídeos, cuja massa molar varia de 13.000.000 a 50.000.000 Da. A cadeia linear é formada por duas unidades de glicose, e o trissacarídeo das ramificações por duas unidades de manose e uma unidade de ácido glicurônico. Como demonstrado na **Figura 4**, em aproximadamente metade das unidades de D-manose terminal, um resíduo de ácido pirúvico está ligado nas posições 4 e 6. A unidade de D-manose não terminal carrega um grupo acetil na posição 6 (NERY; ESPERIDIÃO; DRUZIAN, 2008).

Figura 4 - Estrutura química de goma xantana.

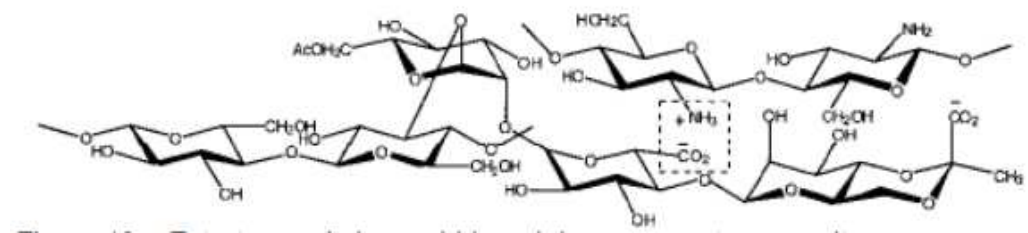


FONTE: (FENG; WANG; LEI, 2014).

A sua natureza aniônica é atribuível aos grupos ácido pirúvico e ácido glucurônico nas cadeias laterais (KIM *et al.*, 2016). Em pH aproximado de 4,5, os resíduos acetil e piruvil são desprotonados, aumentando a densidade de carga ao longo das cadeias de xantana e permitindo o seu uso como agente reticulante da quitosana (BUENO *et al.*, 2013).

O sistema quitosana e goma xantana é formado por meio das interações iônicas entre os grupamentos amino presentes na estrutura da quitosana e dos grupamentos carboxílicos presentes na estrutura da goma xantana como demonstrado na **Figura 5** (RUTZ, 2013).

Figura 5 – Estrutura do sistema quitosana e goma xantana.



Fonte: (RUTZ, 2013).

As micropartículas obtidas a partir de quitosana e goma xantana apresentam cinética de inchaço sensível ao pH e, portanto, possuem alto potencial para a administração de substâncias bioativas em condições gastrointestinais por meio de sistemas de liberação controlada (LUO; WANG, 2013).

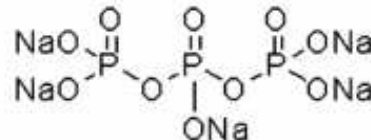
## 2.6 AGENTES RETICULANTES

O tipo de agente reticulante impacta significativamente na estabilidade, na eficiência de encapsulamento e liberação das substâncias ativas das micropartículas (WANG; JUNG; ZHAO, 2017). Dependendo da natureza do agente de reticulação, as principais interações que formam a rede (quitosana / agente de reticulação) são ligações covalentes ou iônicas (ESTEVINHO *et al.*, 2013).

Muitos poliânions de diferentes categorias foram investigados para formar complexos com quitosana, incluindo polímeros naturais (goma xantana, alginato, pectina, carragenina, celulose, colágeno, etc.) polímeros sintéticos, ânions metálicos, e sais inorgânicos como o tripolifosfato de sódio (KAŠPAR; JAKUBEC; ŠTĚPÁNEK, 2013; LUO; WANG, 2013).

O tripolifosfato de sódio é um sal metálico, aniônico e multivalente, utilizado como agente de ligação cruzada que promove a complexação com um polímero carregado positivamente, principalmente a quitosana, em um processo de gelificação iônica. O TPP é considerado biocompatível e bem tolerado e a rede formada é reversível (ESTEVINHO *et al.*, 2013). Sua estrutura química é demonstrada na **Figura 6** (RUTZ *et al.*, 2017).

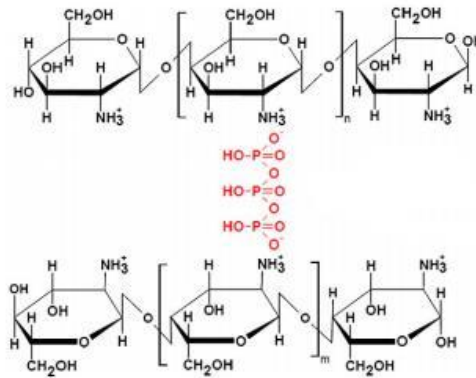
Figura 6 - Estrutura química do tripolifosfato de sódio.



Fonte: (UR-REHMAN; TAVELIN; GRÖBNER, 2011)

A reticulação iônica pode ocorrer dentro da rede por meio de interações entre as cargas negativas do TPP e os grupos amino positivamente carregados de moléculas de quitosana como demonstrado na **Figura 7** (HEJJAJI; SMITH; MORRIS, 2017).

Figura 7 - Estrutura do sistema quitosana e tripolifosfato de sódio



Fonte: (KAŠPAR; JAKUBEC; ŠTĚPÁNEK, 2013).

Para a preparação de micropartículas de quitosana e TPP diversos parâmetros experimentais devem ser avaliados e estudados para que os complexos formados tenham as características desejadas. Nesse sentido, estudos demonstram que o tamanho e estabilidade dessas partículas sofrem o impacto de diversos fatores como o tipo de quitosana (peso molecular, grau de desacetilação), concentração, razão entre quitosana e TPP, pH, força iônica, além de variáveis do processo como velocidade de agitação, velocidade de adição de TPP e temperatura (KAŠPAR; JAKUBEC; ŠTĚPÁNEK, 2013; RÁZGA *et al.*, 2016).



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar micropartículas poliméricas naturais contendo extrato de grãos de café verde (*Coffea arabica* L.).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato hidroalcoólico de grãos de café verde;
- Caracterizar o extrato quanto à atividade antioxidante e concentração de 5-ACQ;
- Preparar micropartículas de quitosana com goma xantana e TPP como agentes reticulantes, utilizando os processos de coacervação complexa e gelificação iônica, respectivamente, seguidos de liofilização;
- Avaliar as características morfológicas das micropartículas de quitosana e do extrato quanto ao tamanho e forma;
- Desenvolver metodologia de HPLC para quantificação de 5-ACQ nas micropartículas;
- Analisar a eficiência de encapsulamento do 5-ACQ nas micropartículas de quitosana;
- Avaliar as características físico-químicas das micropartículas de quitosana e do extrato por espectroscopia de infravermelho com transformada de *fourier* e análise termogravimétrica;
- Determinar o perfil de liberação de 5-ACQ *in vitro* em fluidos gastrointestinais simulados;
- Avaliar a interação das micropartículas de quitosana com a mucina.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE

Foram utilizados grãos de café beneficiados (*Coffea arabica* L.), adquiridos da Cooperativa dos Cafeicultores das Matas de Minas, Viçosa, Minas Gerais. Os grãos de café verde foram moídos em moinho de facas micro (MSSL-030) e tamisados (granulação de 840  $\mu\text{m}$  /malha nº 20).

### 4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE

Para a obtenção do extrato de grãos de café verde adicionou-se 30g dos grãos moídos e tamisados, em 70 mL de solução hidroalcoólica na proporção 80% de etanol:água, e promoveu-se a extração por agitação em agitador orbital (*shaker*), durante 2 horas, 200 rpm a 25 °C. Posteriormente, o extrato foi filtrado sob bomba de vácuo por meio de funil de Büchner e vidraria de kitassato, utilizando papel de filtro, tipo millex 14  $\mu\text{m}$ .

O extrato bruto obtido, após o processo de extração, foi concentrado sob vácuo em evaporador a 40 °C, congelado a -80 °C e liofilizado (JJCIENÉTICA<sup>®</sup>, JJ04) por 24 horas. Após a liofilização, o extrato foi mantido em dessecador, e armazenado em frasco âmbar hermeticamente fechado (LAINE *et al.*, 2008; RUTZ, 2013).

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE

#### 4.3.1 Método de sequestro de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

A atividade antioxidante do extrato de grãos de café verde frente ao radical DPPH foi realizada de acordo com Blois (1958) e modificações. A amostra foi adicionada em placa de 96 poços nas concentrações de 250 a 0,49  $\mu\text{g/mL}$  (diluições sucessivas). Para isso, foram transferidos para um poço da placa 100  $\mu\text{L}$  de uma solução 1 mg/mL em metanol (Biotec<sup>®</sup>) e foram realizadas 10 diluições sucessivas 1:2 em metanol. Posteriormente foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  de solução de DPPH (20  $\mu\text{g/mL}$ ) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) em metanol.

Para o preparo do branco foram utilizados todos os reagentes, exceto a amostra, a qual foi substituída por metanol. A Quercetina (Dinâmica<sup>®</sup>) foi utilizada como substância de referência. A placa foi incubada por 30 min ao abrigo da luz e em sequência a absorbância foi determinada a 517 nm. Os resultados foram expressos na forma de concentração do extrato necessária para inibir metade da formação do radical livre ( $\text{CE}_{50}$ ).

### 4.3.2 Sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante pelo método do descoloramento do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico foi realizada segundo Marco (1968) com modificações. Para o preparo da emulsão, foram utilizados 30  $\mu$ L de ácido linoleico, 265  $\mu$ L de Tween 40, 100  $\mu$ L de solução de  $\beta$ -caroteno em diclorometano (10  $\mu$ g/mL) e 500 $\mu$ L de diclorometano. A mistura foi submetida a nitrogênio gasoso por 50 minutos a fim de obter a completa evaporação do diclorometano. Adicionou-se 40 mL de água destilada previamente oxigenada (30 minutos), com o propósito de se obter uma solução emulsionada com densidade óptica na faixa de 0,6-0,7 nm. O extrato foi solubilizado em metanol na concentração de 222  $\mu$ g/mL. 20  $\mu$ L do extrato foram transferidos para microplaca de 96 poços e a cada amostra foram adicionados 250  $\mu$ L da emulsão. A absorbância das amostras e do controle (sem adição de antioxidante) foi medida a 470 nm ao longo de 2 horas a 45°C. Realizou-se 9 leituras, com 15 minutos de intervalo entre cada uma delas. A atividade antioxidante foi calculada por meio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(A_{CI} - A_{CF})(A_{AI} - A_{AF})}{(A_{CI} - A_{CF})} \times 100$$

Onde  $A_{CI}$  e  $A_{AI}$  representam a absorbância inicial do controle e da amostra respectivamente. E  $A_{CF}$  e  $A_{AF}$  são as absorbâncias finais do controle e da amostra respectivamente.

### 4.3.3 Quantificação de 5-ACQ por Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Os reagentes utilizados foram metanol grau HPLC (J.T. Baker, EUA), água deionizada ultrapurificada em sistema Milli-Q (Millipore®) e ácido fosfórico de alta pureza P.A. (marca Quimex e pureza de 85%). Todos os solventes foram filtrados em membrana de 0,45  $\mu$ m com o auxílio de um sistema acoplado a bomba de vácuo e degaseificados durante 15 minutos em banho de ultrassom a 45 °C. O padrão de ácido clorogênico (pureza  $\geq 95\%$ ) foi adquirido da Sigma-Aldrich.

Antes das injeções, todas as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 10000 rpm e filtrados em filtros de 0,45 micras acoplados a seringas. Foi utilizado um HPLC Agilent Technologies Série 1200, constituído de uma bomba quaternária, detector de arranjo de diodos - ultravioleta (DAD – UV) e injetor automático. Os dados coletados das amostras e padrões foram tratados e analisados utilizando o software ChemStation. A cromatografia foi

realizada em coluna de fase reversa de sílica C18 Zorbax (Agilent Technologies®) de 250 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm.

O eluente utilizado foi preparado utilizando água ultrapurificada acidificada com 0,1% de ácido fosfórico (Solvente A) e metanol (Solvente B). Primeiramente a coluna foi equilibrada por 20 minutos com a fase móvel, composta 95% do solvente A e por 5% do solvente B. Após a injeção de 20 µL das amostras e padrões, a eluição das substâncias ocorreu com um gradiente de concentração dos solventes de forma que a concentração do solvente B aumentou de 5% para 40% em 20 minutos e de 40% para 100% em 10 minutos, permanecendo em 100% por 10 minutos. O fluxo de eluição foi de 0,8 mL/minuto (CRUZ, 2017).

O padrão de ácido clorogênico e o extrato foram diluídos em água destilada. O extrato de grãos de café verde foi analisado em triplicata na concentração de 1 mg/ mL. Foram preparadas soluções do padrão nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 300 µg/ mL para construção da curva de calibração através do método do padrão externo. A equação da curva de calibração obtida foi  $y = 49,475x - 676,06$  com  $R^2 = 0,9935$ . Os padrões de ácido clorogênico e os extratos foram analisados em 330 nanômetros.

#### 4.4 PREPARO DAS MICROPARTÍCULAS

##### 4.4.1 Soluções estoque

Preparou-se a solução estoque de quitosana, dissolvendo-se 6,5 g de quitosana (1% m/v) em 300 mL de solução de ácido acético 1% v/v por agitação, durante 1 hora, até completa dissolução (ESTEVINHO *et al.*, 2013). Em seguida, ajustou-se o pH para 5,6 com hidróxido de sódio 0,5 M, e completou-se com água destilada até 650 mL (RUTZ *et al.*, 2017).

Posteriormente, preparou-se a solução estoque de goma xantana (1% m/v) na qual se adicionou 3,0 g de goma de xantana em 300 mL de solução de ácido acético com pH 6,5 sob agitação de 200 rpm por 1 hora, até completa dissolução (CADDEO *et al.*, 2014).

Para a produção da solução estoque de tripolifosfato de sódio, adicionou-se 0,36 g de TPP em 90 mL de solução de hidróxido de sódio 0,5M com pH 9,0, seguindo a proporção de 1:10 m/m com a quitosana (ESTEVINHO *et al.*, 2013), sendo o volume da solução final na proporção 1:4 com a solução de quitosana (HEJAJI; SMITH; MORRIS, 2017).

Nas soluções de goma xantana, para produção de micropartículas com extrato, foram adicionados 1,0 g de extrato de grãos de café verde seguindo a proporção de 1:1 m/m

com o material encapsulante (quitosana e goma xantana), seguidos de agitação em vortex por 15 minutos (ESTEVINHO *et al.*, 2013).

Nas soluções de TPP, para produção de micropartículas com extrato, foram adicionados 0,9 g de extrato de grãos de café verde na proporção de 1:1 m/m com quitosana, seguidos de agitação em vortex por 15 minutos (ESTEVINHO *et al.*, 2013).

#### **4.4.2 Obtenção das micropartículas**

Para o preparo das micropartículas, realizou-se a adição das soluções de agentes reticulantes (goma xantana ou TPP) por gotejamento nas soluções de quitosana sob contínua agitação por 2h a 1200 rpm em agitador magnético, seguida de 5 minutos, a 13500 rpm em Ultra-Turrax. As micropartículas com adição de extrato de grãos de café verde foram produzidas de forma semelhante. As micropartículas foram preparadas em triplicata (ESTEVINHO *et al.*, 2013).

Para o processo de liofilização, as soluções foram centrifugadas a 7000xg por 10 minutos, para a retirada do sobrenadante e de substâncias não encapsuladas. O sobrenadante foi armazenado sob refrigeração para a análise da eficiência de encapsulamento. Em seguida, os precipitados foram submetidos ao congelamento a -80°C, e liofilizados. Todas as amostras foram mantidas em dessecador, e armazenadas em frascos âmbar (LAINE *et al.*, 2008; RUTZ, 2013).

### **4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS**

#### **4.5.1 Tamanho de partícula**

A distribuição do tamanho de partícula foram medidas diretamente por espalhamento dinâmico de luz utilizando o equipamento LS 13320 Laser Diffraction Particle Size Analyser (Beckman Coulter). Foram utilizados 50 mL de solução das micropartículas de quitosana com e sem adição de extrato de grãos de café verde, antes do processo de liofilização. O tamanho das partículas foi descrito usando o diâmetro médio ponderado pelo volume. A intensidade da luz dispersa foi transformada no fator de difusão (HEJJAJI; SMITH; MORRIS, 2017).

#### **4.5.2 Análise morfológica**

A análise morfológica do extrato e das micropartículas de quitosana com goma xantana e quitosana com TPP, com e sem adição de extrato de grãos de café verde foi

realizada com o auxílio de microscópio eletrônico de varredura JEOL modelo TM3000. As amostras foram fixadas em um suporte metálico com auxílio de uma fita dupla-face de carbono. A visualização foi realizada no aumento de 200x.

#### 4.5.3 Eficiência de encapsulamento do 5-ACQ

O teor de 5-ACQ encapsulado foi calculado a partir dos resultados das análises de HPLC pelo método descrito no item 4.3.4. As amostras foram obtidas retirando-se alíquotas de 1 mL dos sobrenadantes dos meios de produção das micropartículas com adição de extrato, seguidas de centrifugação e filtração.

A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada por método indireto, a partir da diferença entre a quantidade total de 5-ACQ adicionada na preparação das micropartículas e a quantidade dessa substância encontrada livre no meio aquoso do processo de produção. Para a quantificação, utilizou-se a equação abaixo, onde QT é a quantidade total de 5-ACQ adicionada e QL é a quantidade livre no sobrenadante (RUTZ *et al.*, 2016).

$$EE(\%) = \frac{QT - QL}{QT} \times 100$$

#### 4.5.4 Análise espectroscópica

As análises por espectroscopia na região do infravermelho médio das micropartículas com e sem extrato de grãos de café foram realizadas no modo de transmitância, utilizando o espectrômetro FTIR-MIR, modelo Vertex 70, com acessório ATR, Bruker® com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. O espectro foi obtido pelo Software OPUS® 6,5 nos números de ondas compreendidos na faixa de 400-3500 cm<sup>-1</sup>, com 64 leituras (scans). Essa análise também foi realizada com o extrato de grãos de café verde como controle (RUTZ, 2013).

#### 4.5.5 Análise Termogravimétrica

As análises termogravimétricas e de análise térmica diferencial acopladas ao FT-IR (TGA/DTA/FT-IR) foram realizadas utilizando equipamento em Analisador Térmico simultâneo acoplado ao FT-IR Tensor 27 da marca Bruker e uma termobalança STA 449 F3 Jupiter da marca NETZSCH. As amostras do extrato de grãos de café verde e das micropartículas com e sem adição de extrato foram submetidas a uma taxa de aquecimento

de 10°C por minuto até temperatura de 500°C. Um cadinho de alumínio foi utilizado na análise e o gás inerte foi o nitrogênio (DHANKA; SHETTY; SRIVASTAVA, 2017).

#### 4.5.6 Perfil de liberação de 5-ACQ encapsulado

Soluções de ácido cítrico 0,1M e fosfato dissódico, foram misturadas, a fim de se obter soluções com pH final de 2,0 e 7,4 para a simulação de fluido gástrico e intestinal, respectivamente (CADDEO *et al.*, 2014; RUTZ *et al.*, 2016).

Para a análise do perfil de liberação, foram pesadas 50 mg das micropartículas com extrato de grãos de café verde, adicionou-se 10 mL das soluções ácida ou básica, seguida de incubação a 37 °C sob agitação de 100 rpm em *shaker*. Foram retiradas alíquotas de 1,0 mL, nos tempos 20, 60, 120 minutos para o meio ácido e 120, 240, 360, 480 minutos para o meio básico, com reposição imediata do meio (RUTZ, 2013). As alíquotas foram submetidas à centrifugação de 7000xg por 10 minutos, sendo o sobrenadante destinado à quantificação de 5-ACQ pelo método descrito no item 4.3.4.

#### 4.5.7 Mucoadesividade

As propriedades mucoadesivas das micropartículas foram avaliadas por um método previamente descrito por Cerchiara *et al.*, (2015) com algumas modificações. 1 mg das micropartículas de quitosana com goma xantana e quitosana com TPP sem extrato foram dispersas na solução de mucina (1 mg / mL) com fosfato dissódico (0,05 M, pH 7,4), por agitação em vortex. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 2h. Em seguida, as dispersões foram centrifugadas a 7000xg por 10 minutos, e o sobrenadante foi usado para a medição do conteúdo de mucina livre. A mucina livre remanescente no sobrenadante foi determinada a 261 nm por espectrofotometria UV. Os resultados foram expressos em porcentagem de mucina aderida as micropartículas, baseados na curva de calibração da mucina construída com concentrações variando entre (0,166 e 1,0 mg / mL).

### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa de estatística GraphPad Prism® (versão 6.0). Os resultados foram expressos pela média  $\pm$  erro padrão da média, comparando os diferentes grupos de acordo com o método de análise de variância ANOVA, seguido de teste t de Student. Foram consideradas diferenças significativas os valores de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE

#### 5.1.1 Atividade antioxidante do extrato de grãos de café verde

A atividade antioxidante frente ao radical DPPH e a % de inibição da co-oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico do extrato de grãos de café estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1- Atividade antioxidante do extrato de grãos de café verde

	Extrato de grãos de café verde	Quercetina
Atividade antioxidante CE <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) frente ao radical DPPH	3,80 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	1,19 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
% de inibição da co-oxidação do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico	33,47 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	73,12 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>

Os valores correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média. Médias na mesma linha seguidas de letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ ). CE<sub>50</sub>, concentração do extrato necessária para inibir metade da formação do radical livre.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

O CE<sub>50</sub> do extrato de grãos de café verde frente ao radical DPPH foi de 3,80 $\pm$ 0,09 ( $\mu\text{g/mL}$ ) e da quercetina foi de 1,19 $\pm$ 0,04 ( $\mu\text{g/mL}$ ). A diferença estatística ( $p < 0,05$ ) encontrada entre o extrato e a quercetina demonstraram maior capacidade antioxidante da quercetina que é uma substância padrão amplamente estudada e de eficiência comprovada (KIATTISIN; NANTARAT; LEELAPORNPID, 2016). Porém, os resultados foram tão próximos que demonstraram a eficiente atividade antioxidante do extrato em meio hidrofílico.

Kiattisin; Nantarat; Leelapornpid (2016) relatam ter encontrado um CE<sub>50</sub> de 5,00 ( $\mu\text{g/mL}$ ) em um extrato de grãos de café verde obtidos por maceração estática em etanol. A concentração do extrato de grãos de café verde necessária para inibir metade da atividade do radical livre DPPH é baixa, demonstrando alta capacidade antioxidante do extrato obtido neste trabalho.

A porcentagem de inibição do sistema de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico pelo extrato de grãos de café verde foi de 33,47 $\pm$ 0,08% que apesar de ter sido significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que o resultado obtido para quercetina (73,12 $\pm$ 0,15%) representa uma taxa de inibição considerável. Os ácidos hidroxicinâmicos, incluindo os ácidos clorogênicos, por estarem na forma esterificada na natureza possuem maior



solubilidade lipídica do que na forma livre. Com isso, várias dessas substâncias estão sendo utilizados como antioxidantes para preservar sistemas lipofílicos. Compreender a propriedade antioxidante do extrato de grãos de café verde em meio lipofílico, permite entender seus mecanismos de captação de radicais livres de uma forma mais abrangente e completa (RAZZAGHI- ASL *et al.*, 2013).

As soluções hidroalcoólicas e os álcoois (principalmente metanol e etanol) são os solventes mais indicados para otimização da extração de ácidos clorogênicos, que juntamente com temperaturas amenas, formam as condições ideais para extração deste grupo de substâncias (DAWIDOWICZ; TYPEK, 2015). As altas temperaturas comumente empregadas nos processos de extração podem decompor as substâncias fenólicas, produzindo pelo menos 20 substâncias diferentes, as quais podem não ter as mesmas propriedades ativas das substâncias originais (CROZIER *et al.* 2011; WIANOWSKA; TYPEK; DAWIDOWICZ, 2015).

A utilização de processos de extração, como o deste trabalho, que possibilitam a utilização de solventes menos agressivos e que sejam usados em menores quantidades tem ganhado destaque. Pois se tratam de técnicas de menor impacto ambiental quando comparados com técnicas de extração consolidadas, como por exemplo, maceração e por soxhlet, que na maioria das vezes utilizam grande quantidade de solvente e alguns solventes mais tóxicos, como hexano, diclorometano, dentre outros. Outras vantagens do método utilizado neste trabalho são o tempo operacional reduzido, maior rendimento e qualidade do extrato (WIANOWSKA, TYPEK; DAWIDOWICZ, 2015).

Os resultados obtidos nas análises antioxidantes demonstram que os grãos de café verde possuem alta capacidade antioxidante tanto em meio aquoso, quanto em meio lipofílico. Os ácidos fenólicos são as substâncias da classe dos fenóis que estão em maiores concentrações nos grãos de café verde, e por possuírem propriedades antioxidantes reconhecidas, eles se tornam os maiores responsáveis por essa atividade. Porém, a atividade antioxidante do café não se deve apenas a eles, mas também a outras substâncias fenólicas como as proantocianidinas, flavonóides, além de outros constituintes, como os minerais e os diterpenos (DURÁN *et al.*, 2017; PAN *et al.*, 2016).

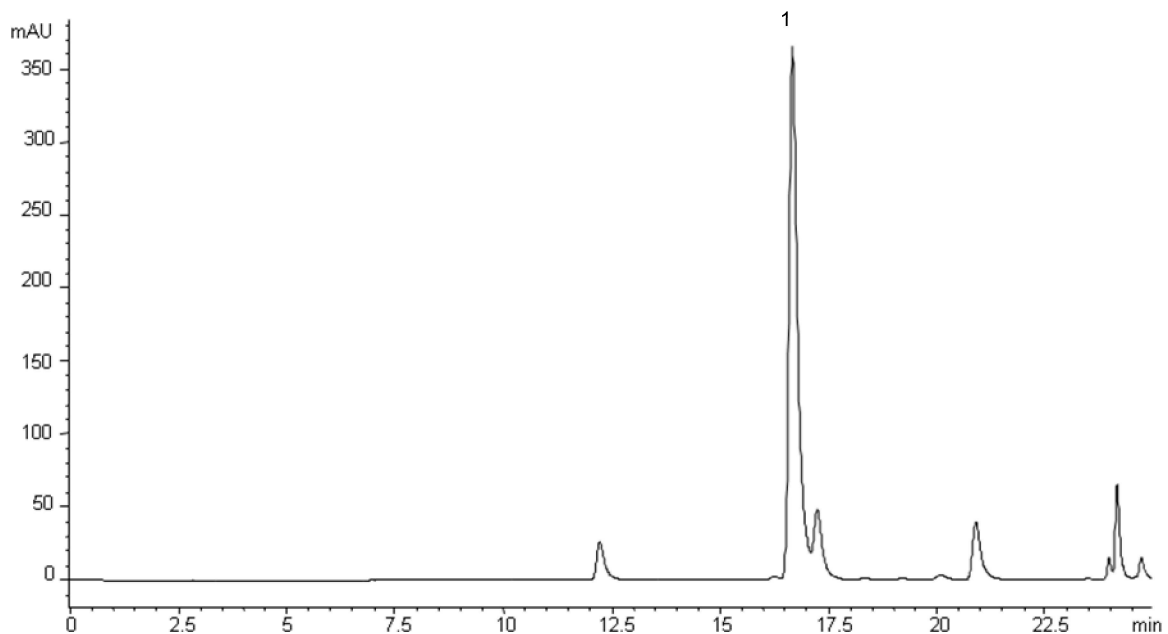
A determinação da atividade antioxidante de extratos é influenciada pelo método empregado, com isso, a realização de mais de um tipo de análise antioxidante é recomendada, uma vez que os princípios dos métodos variam de acordo com a matriz reacional (MOREIRA, 2013). A utilização de diferentes métodos pode diminuir a interferência de outras substâncias nessas análises, como as proteínas e açúcares, que estão presentes no café em grandes quantidades (MOREIRA, 2013; REGAZONNI *et al.*, 2016).

Esses resultados reforçam a necessidade de mais estudos que garantam maior eficácia, estabilidade e aplicabilidade do extrato de grãos de café verde devido à importância de suas propriedades bioativas, que principalmente são atribuídas a ação atividade antioxidante de seus constituintes (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012; PAN *et al.*, 2016).

### 5.1.2 Quantificação de 5-ACQ por Cromatografia líquida de alta eficiência

O perfil cromatográfico obtido por HPLC do extrato de grãos de café verde está apresentado na **Figura 8**.

Figura 8 - Perfil cromatográfico do extrato de grãos de café verde.

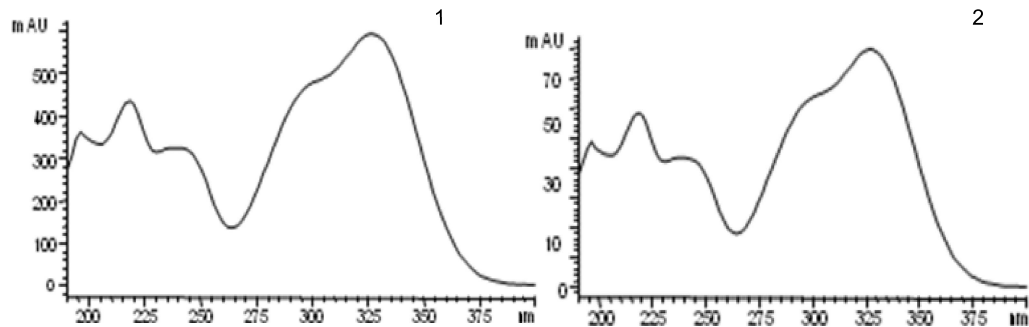


(1):5-ACQ; Coluna de fase reversa C18, fase móvel: gradiente de concentração dos solventes água ultrapurificada acidificada com 0,1% de ácido fosfórico e metanol com fluxo de 0,8 ml/minuto.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

No cromatograma obtido pelo método de HPLC os sinais com tempos de retenção de 16,69 e 17,26 minutos não tiveram a separação completa, pois se tratam isômeros de 5-ACQ como demonstrado pelos seus espectros na **Figura 9**.

Figura 9 – Espectros de absorção dos ácidos clorogênicos



1, 2 -Espectros de absorção no uv dos picos nos tempos de retenção de 16,69 e 17,26 minutos respectivamente.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

O método utilizado por este trabalho para a quantificação de 5-ACQ no extrato de grãos de café foi eficaz, pois houve a separação dos ácidos clorogênicos dos demais constituintes do extrato.

A concentração de 5-ACQ do extrato de grãos de café verde foi de  $110,15 \pm 16,76 \mu\text{g}/\text{mg}$ . Getachew; Chun (2016) relatam ter encontrado 39,33 a  $70,71 \mu\text{g}/\text{mg}$  de 5-ACQ em extratos obtidos por hidrólise com água supercrítica de grãos de café verde (*Coffea arabica* L.) de diferentes origens.

O presente trabalho quantificou o 5-ACQ nos grãos de café verde e apresentou concentração superior aos valores relatados por Getachew; Chun (2016). Essa análise demonstra a eficiência do processo extrativo utilizado, e que os grãos de café utilizados são fontes de grande quantidade de 5-ACQ.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

### 5.2.1 Tamanho de partícula

Os tamanhos médios ponderados das partículas de quitosana reticuladas com goma xantana e TPP, com e sem adição de extrato de grão de café verde estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2- Tamanho médio das partículas de quitosana

Amostra	Tamanho médio das partículas ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ EPM
Q/GX	1113 $\pm$ 7,81 <sup>a</sup>
Q/GX/E	515,93 $\pm$ 1,24 <sup>b</sup>
Q/TPP	244,65 $\pm$ 19,02 <sup>c</sup>
Q/TPP/E	498,85 $\pm$ 14,21 <sup>d</sup>

EPM: Erro padrão da média; Q/GX: micropartículas de quitosana e goma xantana; Q/GX/E: micropartículas de quitosana e goma xantana com adição de extrato; Q/TPP: micropartículas de quitosana e TPP; Q/TPP/E: micropartículas de quitosana e TPP com adição de extrato. Os valores correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média. Médias na coluna seguidas de letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ ).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A análise de tamanho de partícula demonstrou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os sistemas poliméricos propostos neste trabalho. As micropartículas de quitosana e goma xantana obtiveram maior tamanho médio (1104 - 514,17  $\mu\text{m}$ ) em relação as que utilizaram o tripolifosfato de sódio como agente reticulante (258,1 - 313,6  $\mu\text{m}$ ).

Observa-se nos resultados, que o tamanho das partículas depende do processo de obtenção utilizado na sua produção. Provavelmente, isso se deve as diferenças químicas e físicas entres os agentes reticulantes e suas interações com a quitosana, visto que a goma xantana é um biopolímero com alto peso molecular, maior do que o sal iônico TPP que é uma molécula de baixo peso molecular (FENG; WANG; LEI, 2014; UR-REHMAN; TAVELIN; GRÖBNER, 2011).

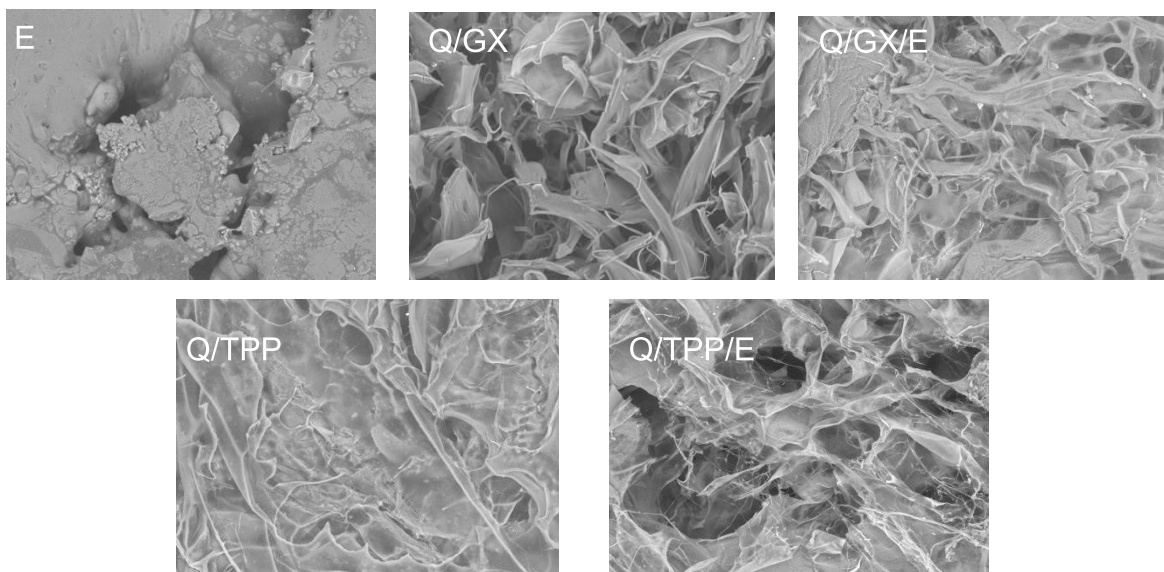
Após a adição de extrato, os sistemas poliméricos tiveram comportamentos diferentes, pois as micropartículas de quitosana e TPP tiveram seu tamanho aumentado de 258,1 para 313,6  $\mu\text{m}$  e as micropartículas de quitosana e goma xantana diminuíram de 1104 para 514,17  $\mu\text{m}$ . Possivelmente, isso se deve a existência de sítios protonados da quitosana nas micropartículas de Q/GX, devido ao impedimento estérico, que após a inclusão do extrato, rico em espécies aniônicas, favorecem a interação eletrostática e aumentam a reticulação do sistema, o que contribui para a redução de diâmetro das partículas. E este fenômeno não ocorre nas micropartículas de Q/TPP, pois os sítios de ligação da quitosana já estão reticulados com o TPP, gerando uma estrutura compacta e que ao se adicionar o extrato promove o aumento do tamanho médio da partícula, como já descrito por Cerchiara *et al.* (2015).

A distribuição do tamanho de partícula em produtos na forma de pó influencia em várias propriedades do material, afetando a resistência mecânica, densidade, solubilidade e características térmicas e elétricas (PAPINI, 2003).

### 5.2.2 Análise morfológica

Na **Figura 10** estão expostas as eletromicrografias, obtidas por MEV, do extrato de grãos de café verde e das micropartículas de quitosana e goma xantana com e sem adição de extrato de grãos de café verde e quitosana e TPP com e sem adição de extrato de grãos de café verde.

Figura 10 – Eletromicrografias do extrato de grãos de café verde e das micropartículas de quitosana



E: extrato de grãos de café verde; Q/GX: micropartículas de quitosana e goma xantana; Q/GX/E: micropartículas de quitosana e goma xantana com adição de extrato; Q/TPP: micropartículas de quitosana e TPP; Q/TPP/E: micropartículas de quitosana e TPP com adição de extrato. Eletromicrografias em aumento de x200.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A eletromicrografia do extrato de grãos de café verde permite perceber uma superfície deformada, com presença de rugosidades, demonstrando ser uma forma densa, com a presença de aglomerados.

As micropartículas obtidas neste trabalho possuem estrutura irregular, escamosa e friável com poros, devido à sublimação da água pela liofilização. A agregação das partículas após a liofilização se deve ao maior contato destas partículas durante o congelamento e em alguns casos elas podem se fundir.

A obtenção das micropartículas de quitosana por coacervação complexa com a goma xantana e por gelificação iônica com o TPP propostas neste trabalho, proporcionou a formação de uma estrutura em formato de rede polimérica que foi independente do método, agente reticulante e adição de extrato grãos de café verde.

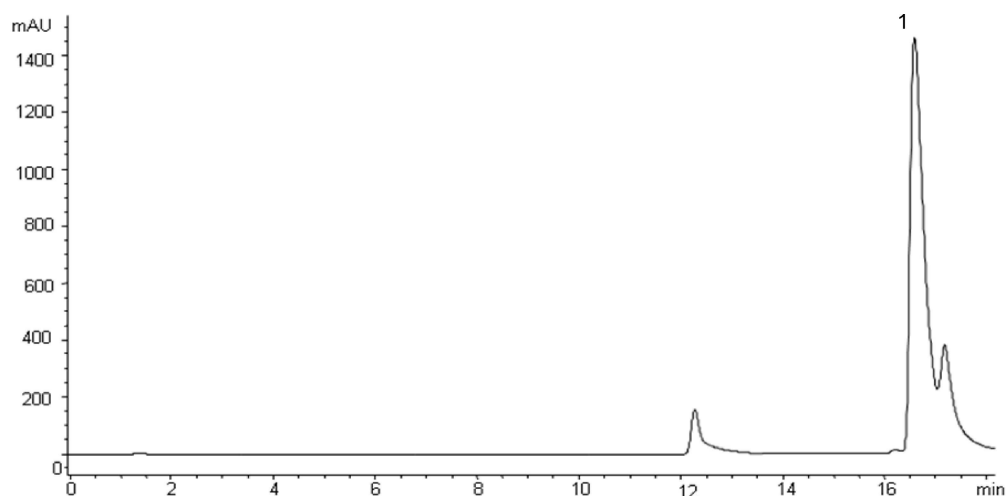
Este resultado é semelhante aos de outros estudos sobre micropartículas de quitosana com essas características, especialmente nos trabalhos que combinaram métodos de encapsulamento que promovem a precipitação das micropartículas de quitosana seguidos de liofilização. (KIM *et al.*, 2016 ; RUTZ *et al.*, 2016; RUTZ *et al.*, 2017; WANG; JUNG; ZHAO, 2017).

As micropartículas de quitosana, principalmente liofilizadas apresentam forte tendência à aglomeração, permanecendo unidos por atrações de origem eletrostática. Na técnica de análise de tamanho de partícula por difração a laser as partículas estavam dispersas em um fluido, e nesses casos sua área de superfície específica acentua a atuação das forças superficiais com o solvente aquoso. Essa interação, afeta diretamente o estado de dispersão das partículas, evitando a formação de agregados ou aglomerados fracos (DUDHANI; KOSARAJU, 2010; PAPINI, 2003). Com isso, a microscopia eletrônica de varredura, neste trabalho, nos fornece informações sobre a estrutura das micropartículas e suas possíveis interações e não sobre as estruturas individualizadas.

### 5.2.3 Eficiência de encapsulamento do 5-ACQ

Os perfis cromatográficos dos sobrenadantes obtidos no processo de obtenção das micropartículas de quitosana com goma xantana e quitosana com TPP, para a análise por método indireto da eficiência de encapsulamento estão apresentados na **Figura 11 e 12** respectivamente.

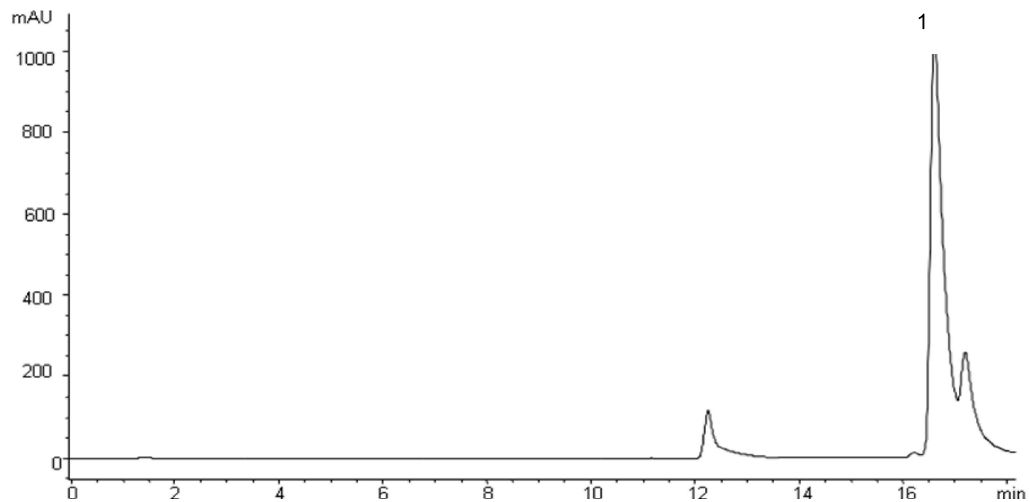
FIGURA 11 – Perfil cromatográfico do sobrenadante do processo de obtenção das micropartículas quitosana e goma xantana.



(1):5-ACQ; Coluna de fase reversa C18, fase móvel: gradiente de concentração dos solventes água ultrapurificada acidificada com 0,1% de ácido fosfórico e metanol com fluxo de 0.8 mL/min.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

FIGURA 12– Perfil cromatográfico do sobrenadante do processo de obtenção das micropartículas quitosana e TPP.



1):5-ACQ; Coluna de fase reversa C18, fase móvel: gradiente de concentração dos solventes água ultrapurificada acidificada com 0,1% de ácido fosfórico e metanol com fluxo de 0,8 mL/min.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Nos cromatogramas obtidos é possível visualizar a separação dos picos de 5-ACQ das demais substâncias presentes, e que não houve a interferência das moléculas dos sistemas poliméricos e de outros constituintes nessa análise, demonstrando ser um método eficaz para análise dessas substâncias bioativas em micropartículas de quitosana.

Os resultados referentes à eficiência de encapsulamento pelo método indireto de 5-ACQ nas micropartículas com extrato de quitosana com goma xantana e quitosana com TPP estão dispostos na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Eficiência de encapsulamento de 5-ACQ nas micropartículas de quitosana

Amostra	Eficiência de encapsulamento de 5-ACQ (%)
Q/GX	62,70 ± 5,20 <sup>a</sup>
Q/TPP	74,04 ± 8,65 <sup>b</sup>

Média ± Erro padrão da média. Q/GX: micropartículas de quitosana e goma xantana; Q/TPP: micropartículas de quitosana e TPP.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

As micropartículas de quitosana com goma xantana e quitosana com TPP obtiveram, respectivamente, taxa de encapsulamento de 5-ACQ de 62,70±5,2% e 74,04±8,65 %. A eficiência de encapsulamento do extrato de grãos de café verde foi influenciada pelo agente reticulante utilizado, sendo as micropartículas de quitosana com TPP as que obtiveram maiores taxas ( $p < 0,05$ ) de encapsulamento do 5-ACQ.

A utilização de quitosana, goma xantana e TPP para microencapsulação de extrato de grãos de café verde, conforme realizada neste trabalho, ainda não foi descrita na literatura científica. Outros trabalhos utilizaram esses sistemas poliméricos para encapsular outras substâncias.

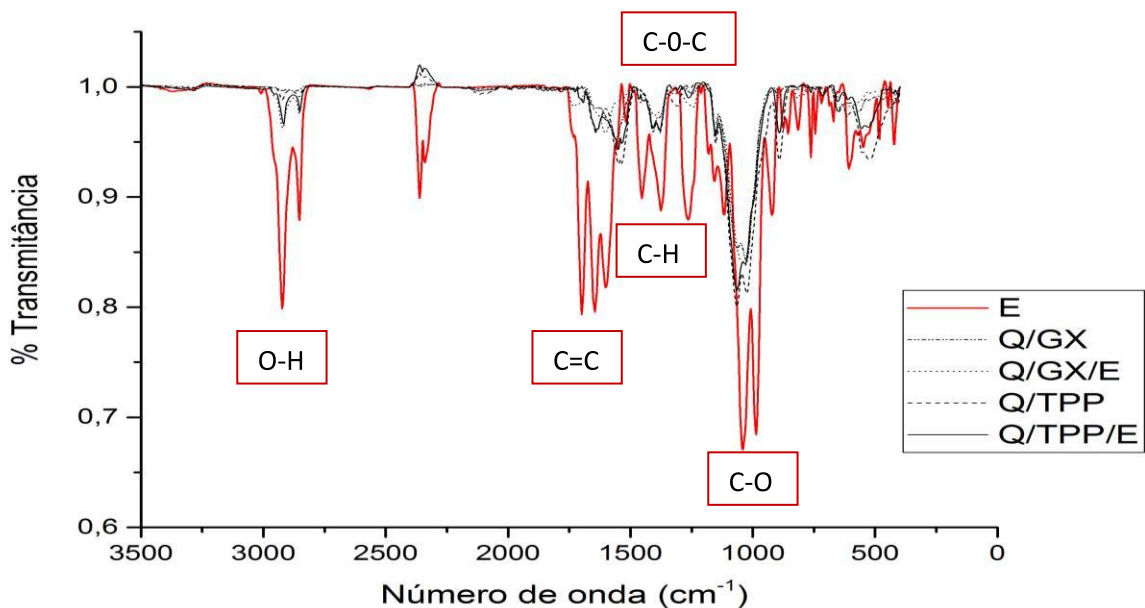
Caddeo *et al.* (2014) e Rutz *et al.* (2017) estudaram micropartículas de quitosana e goma xantana e relatam ter encontrado eficiências de encapsulamento de  $63 \pm 7\%$  para quercetina e  $62,41\%$  para carotenoides. Yuan; Jacquier; O'riordan (2017) estudaram micropartículas de quitosana com diferentes concentrações de TPP e relatam ter obtido eficiências de encapsulamento entre  $50 \pm 1\%$  e  $71.6 \pm 0.7\%$  para albumina de soro bovino.

Estes resultados corroboram com dados relatos na literatura e demonstram que ambos os sistemas poliméricos naturais utilizados neste trabalho são capazes de microencapsular eficazmente o 5-ACQ presente nos grãos de café verde, e que o agente reticulante utilizado interfere na eficiência de encapsulamento.

#### 5.2.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

O perfil espectroscópico do extrato de grão de café verde é constituído por picos de absorbância nos números de onda de  $3000, 1600, 1450, 1250, 1050 \text{ cm}^{-1}$ , como demonstrado na **Figura 13**.

Figura 13 – Espectro FTIR-MIR do extrato e das micropartículas de quitosana



E: extrato de grãos de café verde; Q/GX: micropartículas de quitosana e goma xantana; Q/GX/E: micropartículas de quitosana e goma xantana com adição de extrato; Q/TPP: micropartículas de quitosana e TPP; Q/TPP/E: micropartículas de quitosana e TPP com adição de extrato.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR



A banda larga observada entre  $3000\text{ cm}^{-1}$  é relativa à deformação axial da ligação O-H. Pode-se concluir, que o extrato de grãos de café verde apresenta em sua constituição substâncias hidroxiladas como carboidratos e substâncias fenólicas incluindo os ácidos clorogênicos (ROSA, 2010).

Em torno do número de onda de  $1600\text{ cm}^{-1}$ , os picos de absorbância correspondem à banda de estiramento da ligação C=C de substâncias aromáticas. Essas vibrações podem estar relacionadas ao alongamento do anel benzeno (SHAO *et al.*, 2014). O extrato de grãos de café verde é importante fonte de algumas substâncias aromáticas como as substâncias fenólicas que são um grupo extenso e heterogêneo (ROSA, 2010).

É possível identificar também picos na região característica de carboidratos devido à deformação assimétrica da ligação C-H  $sp^3$  alifáticas, no número de onda próximo a  $1450\text{ cm}^{-1}$  (ROSA, 2010).

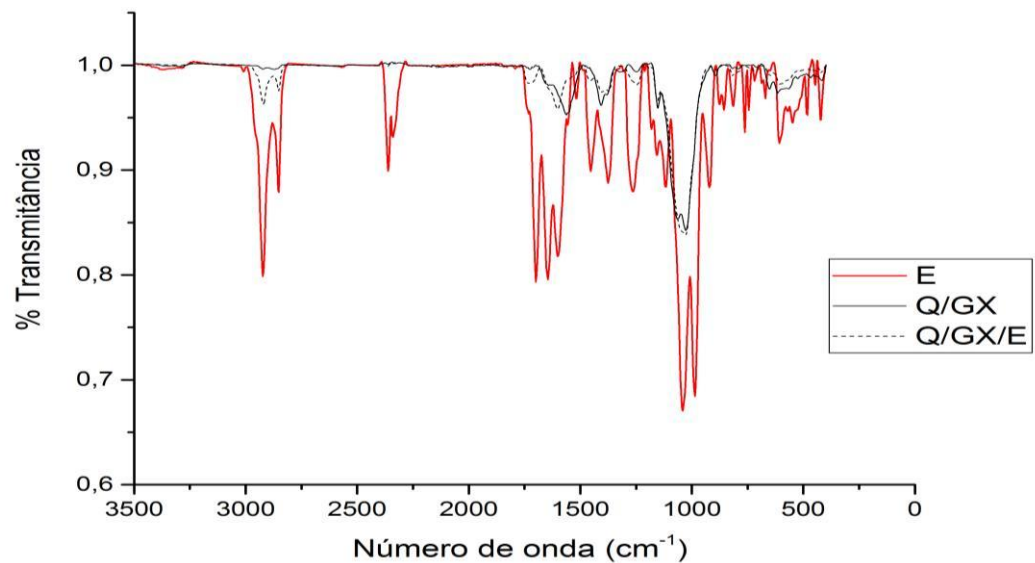
Em aproximadamente  $1250\text{ cm}^{-1}$ , o extrato absorve na banda de deformação axial assimétrica da ligação C-O-C, a qual indica a presença de ésteres ou éteres (ROSA, 2010). Possivelmente, houve absorção neste número de onda devido aos grãos de café serem fontes de substâncias fenólicas que são encontradas sob a forma de ésteres na natureza (MOREIRA, 2013).

A larga banda observada em torno de  $1050\text{ cm}^{-1}$  está relacionada com vibrações esqueléticas envolvendo estiramento C-O que são características de carboidratos (KIM *et al.* 2016). A presença desta alta absorção neste número de onda era esperada, pois os carboidratos são os principais constituintes do grão de café verde, correspondendo de 45 a 52% (DURÁN *et al.*, 2017).

Apenas um pico de absorção do extrato de grãos de café verde foi detectado nas microencapsulações do extrato, porém sua energia de absorção foi diminuída. Esta análise demonstra que é possível detectar a presença de extrato de grãos de café verde na superfície das micropartículas, mas também comprova o aprisionamento do extrato pelas micropartículas de quitosana. Esta análise demonstra que os sistemas poliméricos obtidos neste trabalho se tratam de microesferas, nas quais a substâncias encapsuladas estão dispersas na matriz encapsulante (VIEGAS, 2013).

Em todos os espectros das micropartículas com e sem adição do extrato observam-se picos de absorção distintos dos encontrados no espectro do extrato de grãos de café verde, próximos aos números de onda de  $1500$  e  $1050\text{ cm}^{-1}$ , como demonstrado nas **Figuras 14 e 15**.

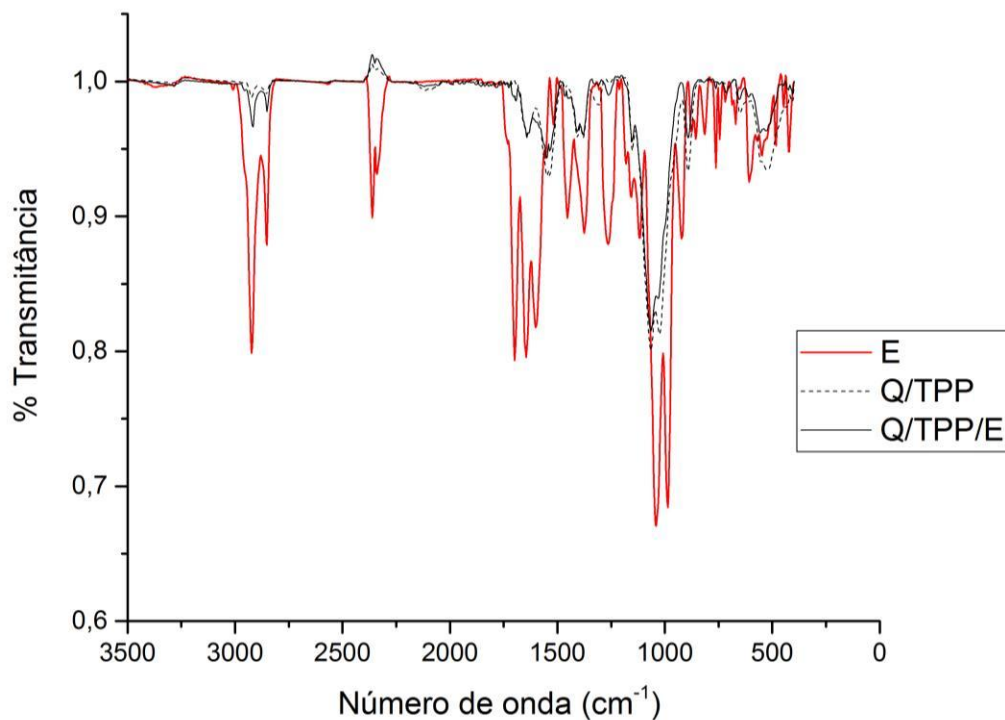
Figura 14 – Espectro FTIR-MIR do extrato e das micropartículas de quitosana e goma xantana



E: extrato de grãos de café verde; Q/GX: micropartículas de quitosana e goma xantana; Q/GX/E: micropartículas de quitosana e goma xantana com adição de extrato;

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Figura 15 – Espectro FTIR-MIR do extrato e das micropartículas de quitosana e



TPP

E: extrato de grãos de café verde; Q/TPP: micropartículas de quitosana e TPP; Q/TPP/E: micropartículas de quitosana e TPP com adição de extrato.

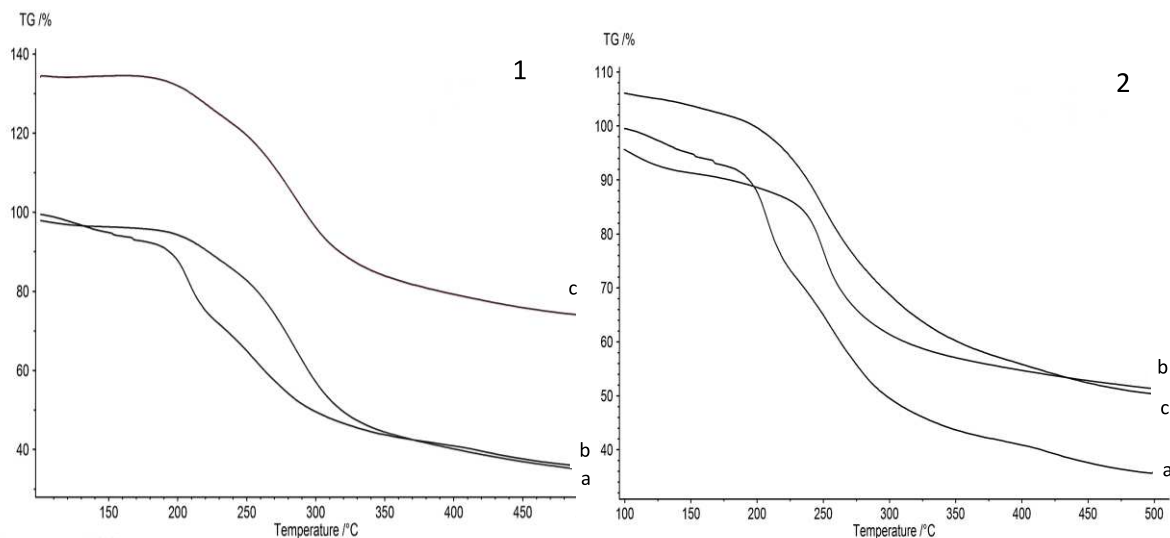
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Próximo ao número de onda de  $1500\text{ cm}^{-1}$ , a banda é referente à amida secundária, e esta ligação está relacionada com os grupos amino da quitosana que estão envolvidos na reticulação com o tripolifosfato de sódio ou com a goma xantana (BARAKAT; ALMURSHEDI, 2011; DUDHANI; KOSARAJU, 2010). O segundo pico próximo a  $1050\text{ cm}^{-1}$ , é um dos picos de maior intensidade das micropartículas, e assim como no espectro do extrato de grãos de café verde, está relacionado com a presença de carboidratos (KIM *et al.* 2016). Esta alta absorção observada é devido à quitosana ser um polissacarídeo, no qual os carboidratos fazem parte de sua estrutura fundamental.

### 5.2.5 Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica foi realizada no extrato livre e nas micropartículas de quitosana com e sem adição de extrato, as curvas estão apresentadas na **Figura 16**.

FIGURA 16 – Curvas termogravimétricas do extrato livre e das micropartículas de quitosana com e sem adição de extrato.



(1) a = extrato de grãos de café verde; b= Q/GX: micropartículas de quitosana e goma xantana sem extrato; c = Q/GX/E: micropartículas de quitosana e goma xantana com extrato; (2) a= extrato de grãos de café verde; b= Q/TPP: micropartículas de quitosana e TPP sem extrato; c= Q/TPP/E: micropartículas de quitosana e TPP com extrato;

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Na análise termogravimétrica do extrato de grãos de café verde são observados três principais eventos de perda de massa, sendo o primeiro entre 100 e 170 °C relacionado à perda de água que corresponde a 9,51% da massa total. Entre 171 e 185 °C, há uma perda de massa de 18,21% devido à queima de substâncias hidroxiladas e substâncias

fenólicas incluindo os ácidos clorogênicos. Em sequência, há uma perda maior de massa de 33,08% na faixa de 185 a 410°C que corresponde aos carboidratos.

Entre as curvas referentes às micropartículas em que a goma xantana é o agente reticulante obteve-se um perfil semelhante no qual ocorreu uma perda rápida de massa de 65,27% para as micropartículas sem adição de extrato e 60,64% com adição de extrato, entre 200 e 350° C. Esta acentuada perda está relacionada principalmente à desidratação dos anéis sacarídeos, despolimerização e decomposição das unidades acetiladas (CALIJA *et al.*, 2017). Portanto, o deslocamento para a direita da curva da micropartícula de quitosana e goma xantana com extrato e o desaparecimento dos eventos observados no extrato de grãos de café verde livre demonstram maior estabilidade do complexo em relação ao extrato não encapsulado.

O termograma de TGA das micropartículas de quitosana com TPP sem adição de extrato exibiu um evento inicial que é atribuído à perda de água ligada (9,25%). Seguido de degradação com 32,16% de perda de peso, entre 150 e 260 °C devido à degradação dos componentes orgânicos das partículas como os carboidratos e decomposição das unidades acetiladas (CALIJA *et al.*, 2017). Esta sucessão de degradação térmica não foi observada nas partículas de quitosana e TPP após a adição de extrato, que sofreram apenas um evento de perda de massa de 55, 64%.

Estes resultados sugerem que a interação do extrato e o sistema polimérico de quitosana e TPP melhoraram a estabilidade térmica das partículas e diminuem os sítios de ligação disponíveis para a ligação com a água (DHANKA *et al.*, 2017). É possível observar o deslocamento para a direita da curva TGA da micropartícula de quitosana e TPP com extrato e o desaparecimento dos eventos observados no extrato de grãos de café verde, o que está relacionado com maior estabilidade do complexo em relação ao extrato não encapsulado.

### **5.2.6 Perfil de liberação do 5-ACQ**

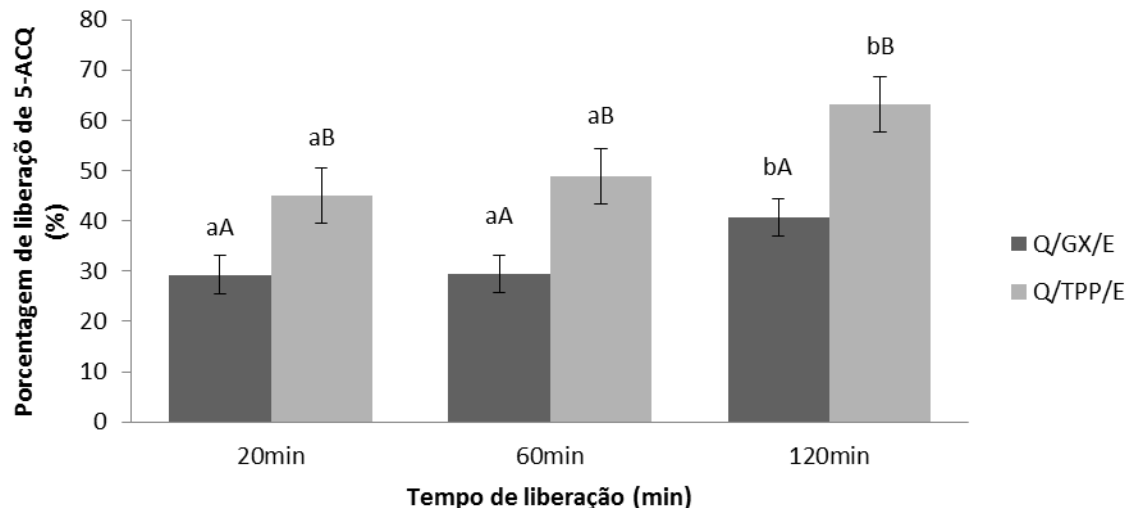
Vários fatores afetam a liberação da substância encapsulada, como variação de temperatura e pH, dissolução do material da parede, difusão, erosão e permeabilidade seletiva. A melhor maneira de promover a liberação de micropartículas poliméricas obtidas por coacervação complexas e gelificação iônica é variando o pH do meio de dissolução (KIM *et al.*, 2016; RUTZ *et al.* 2017).

O grau de protonação dos grupamentos aminos da quitosana é maior a um pH mais baixo, possibilitando interações iônicas com água, o que resulta em enfraquecimento da resistência mecânica e química das micropartículas. O aumento do pH do meio de dissolução promove a desprotonação da quitosana, reduzindo as ligações iônicas com os

agentes reticulantes e com o extrato, resultando em inchaço, dissolução e erosão do sistema polimérico (KIM *et al.*, 2016; RUTZ *et al.* 2017).

O perfil de liberação de 5-ACQ nas micropartículas de quitosana em fluido gástrico simulado está apresentado na **Figura 17**.

Figura 17- Perfil de liberação de 5-ACQ das micropartículas de quitosana em fluido gástrico simulado



Q/GX/E: micropartículas de quitosana e goma xantana com adição de extrato; Q/TPP/E: micropartículas de quitosana e TPP com adição de extrato. Letras minúsculas iguais para a mesma amostra, não diferem entre si ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas iguais para o mesmo tempo de liberação, não diferem entre si ( $p < 0,05$ ).

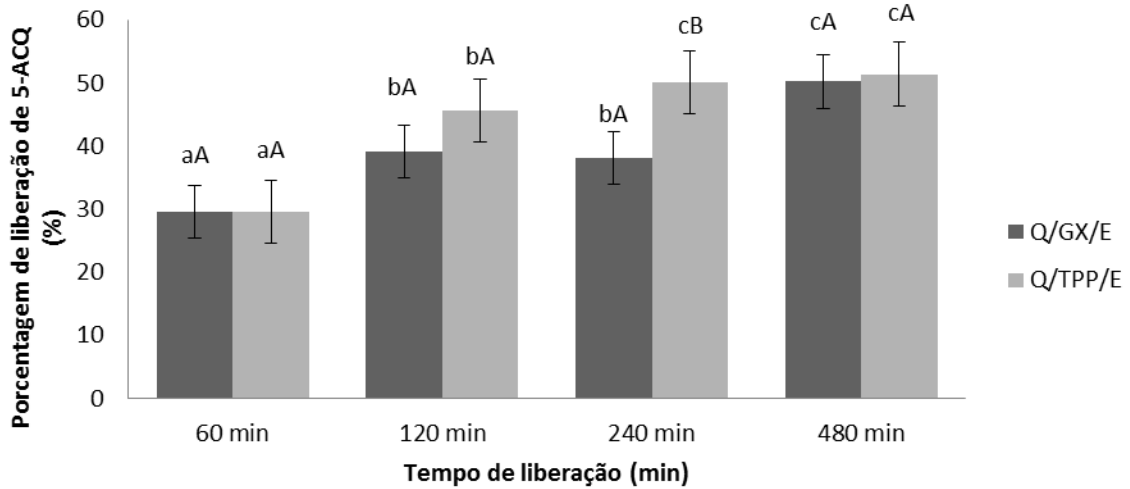
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Em fluido gástrico simulado, as micropartículas de quitosana com goma xantana e quitosana com TPP obtiveram uma liberação sustentada de 5-ACQ de  $29,28 \pm 3,2\%$  e  $45,02 \pm 4,7\%$ , respectivamente, até os 60 minutos. Alcançando taxas máximas de  $40,61 \pm 5,2$  e  $63,10 \pm 3,5\%$  aos 120 minutos, respectivamente. Em todos os tempos analisados, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na liberação de 5-ACQ entre os dois sistemas poliméricos.

Este resultado demonstra que o tipo de agente reticulante da quitosana impacta significativamente na liberação das substâncias encapsuladas em fluido gástrico simulado (WANG; JUNG; ZHAO, 2017). As micropartículas de quitosana com TPP possuem maior sensibilidade ao inchaço e a alterações de pH, pois a reticulação acontece por meio de interações iônicas, em comparação com as micropartículas de quitosana e goma xantana que são reticuladas covalentemente (ESTEVINHO *et al.*, 2013).

O perfil de liberação de 5-ACQ nas micropartículas de quitosana em fluido intestinal simulado está apresentado na **Figura 18**.

Figura 18- Perfil de liberação de 5-ACQ das micropartículas em fluido intestinal simulado



Q/GX/E: micropartículas de quitosana e goma xantana com adição de extrato; Q/TPP/E: micropartículas de quitosana e TPP com adição de extrato. Letras minúsculas iguais para a mesma amostra, não diferem entre si ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas iguais para o mesmo tempo de liberação, não diferem entre si ( $p < 0,05$ ).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

As micropartículas de quitosana com goma xantana e quitosana e TPP obtiveram taxas de liberação de 5-ACQ sem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre si, em todos os tempos analisados, em fluido intestinal simulado. Com exceção do tempo de 240 minutos no qual as micropartículas de quitosana e TPP obtiveram maiores taxas. A porcentagem de liberação final de 5-ACQ foi de aproximadamente 50% para ambos os sistemas poliméricos.

Em pH básico, o comportamento das micropartículas foi semelhante, pois é a quitosana que sofre mudança para seu estado não ionizado, impedindo a interação com o agente reticulante. Este fenômeno acontece em ambos os tipos de micropartículas estudadas neste trabalho, nos quais a quitosana é o principal agente encapsulante (KIM *et al.*, 2016; RUTZ *et al.* 2017).

Apesar da não liberação completa do 5-ACQ em fluido intestinal simulado até os 480 minutos de análise, para ambos os sistemas poliméricos, as propriedades mucoadesivas da quitosana proporcionam tempo prolongado de residência das micropartículas no meio intestinal, o que possivelmente possibilitará maiores taxas de liberação em tempos posteriores (DUDHANI; KOSARAJU, 2010).

Manconi *et al.*, (2010) obtiveram taxas de liberação de C-ficocianina em microcomplexos de quitosana e goma xantana liofilizados de 49% em fluido gástrico simulado e 68% para fluido intestinal simulado, após 240 minutos. Rutz *et al.* (2016) obtiveram liberação de 53% de óleo de palma em micropartículas de quitosana e TPP liofilizadas, sob condições gástricas simuladas, e 67% sob condições intestinais simuladas,

aos 240 minutos de análise. Os resultados obtidos para o perfil de liberação de 5-ACQ apresentados por este trabalho se assemelham a dados relatos na literatura para os mesmos sistemas poliméricos, com algumas variações por se tratarem de diferentes substâncias encapsuladas e tempos de análise.

Para a melhor estabilização e biodisponibilidade do 5-ACQ, espera-se que as micropartículas liberem pequenas quantidades da substância em condições gástricas, e sob condições intestinais, a liberação deve ser gradual e completa, possibilitando maior eficácia e aplicabilidade do extrato de grãos de café verde (CHAO *et al.*, 2012; OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2000). As micropartículas de quitosana e goma xantana, neste trabalho, obtiveram os parâmetros de liberação gastrointestinais mais próximos do perfil ideal. O que corrobora com Luo e Wang, (2013) que relatam que esse sistema polimérico é uma matriz de liberação sustentada promissora, de alta aplicabilidade (LUO; WANG, 2013).

### 5.2.7 Teste *in vitro* de interação com mucina

A capacidade das micropartículas de se ligarem a mucina foi utilizada para estimar suas propriedades mucoadesivas, como demonstrado na **Tabela 4**.

Tabela 4- Porcentagem de mucoadesividade das micropartículas

Amostra	Mucoadesividade (%)
Q/GX	83,58 ± 0,11 <sup>a</sup>
Q/TPP	87,19± 0,02 <sup>a</sup>

Q/GX: micropartículas de quitosana com goma xantana; Q/TPP: micropartículas de quitosana com TPP. Os valores correspondem à média ± erro padrão da média. Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si ( $p < 0,05$ ).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Os resultados do teste *in vitro* de interação com mucina demonstraram que as micropartículas possuem alta capacidade mucoadesiva. Para as micropartículas de quitosana com goma xantana a porcentagem de mucina que interagiu com as partículas foi de 83,58 ± 0,11% e para as micropartículas de quitosana com TPP foi de 87,19± 0,02 %, e não houve diferença significativa entre elas ( $p < 0,05$ ).

Cerchiara *et al.*, (2015), obtiveram para nanopartículas e micropartículas de quitosana, aproximadamente 91-96% e 87-93%, respectivamente de interação de mucina com as partículas. Andersen *et al.*, (2015) obtiveram de 70% a 80%, aproximadamente, de eficácia de ligação de lipossomas contendo quitosana à mucina. Esta análise demonstra que os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os relatados na literatura.

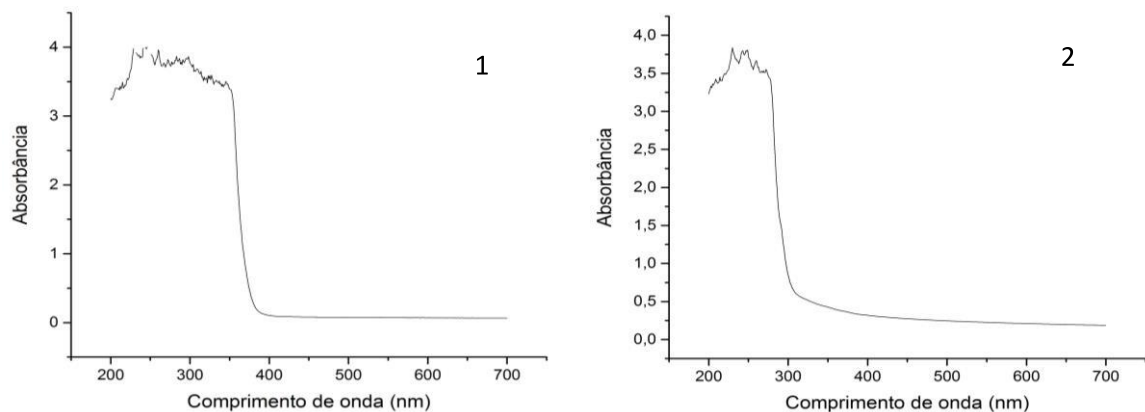
As promissoras propriedades mucoadesivas das micropartículas de quitosana foram provavelmente devidas às interações entre os íons carregados negativamente da mucina (ácido sulfônico e resíduos de ácido siálico) e os grupos amino carregados positivamente na superfície da partícula (CERCHIARA *et al.*, 2015; DUDHANI; KOSARAJU, 2010).

Micropartículas com esta propriedade melhoram a biodisponibilidade de substâncias com características de baixa absorção. Isto ocorre devido ao tempo de contato prolongado que elas proporcionam entre o sistema polimérico e a superfície da camada mucosa (DUDHANI; KOSARAJU, 2010).

Pelo 5-ACQ ser mal absorvido no intestino, sofrer metabolismo após administração oral, o controle adequado do tempo de permanência intestinal combinado com sistemas de liberação controlada proporcionados pelas micropartículas mucoadesivas de quitosana, podem aumentar significativamente a biodisponibilidade dos ACGs (CADDEO *et al.*, 2014). Tal fato pode possibilitar o uso efetivo dos extratos de grãos de café verde com intuito profilático e curativo, tendo em vista suas propriedades ativas de grande interesse atual, como diminuição na absorção de glicose, redução do risco de diabetes tipo 2, obesidade, aterosclerose, hipertensão dentre outras.

Na análise *in vitro* de interação das micropartículas de quitosana com a mucina, não foi possível realizar esta análise para o extrato livre e para as micropartículas com adição de extrato. Isto ocorreu, pois a mucina absorve energia somente nos mesmos números de onda que o extrato de grãos de café verde, como demonstrado na **Figura 19**. Isso impediu a análise, pois impossibilitou a quantificação da mucina livre em soluções em que o extrato estava presente.

Figura 19 – Espectros de absorção da mucina e do extrato de grãos de café verde.



1- Espectro de absorção do extrato de grãos de café verde; 2- Espectro de absorção da mucina;

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR



## 6 CONCLUSÃO

O método extrativo utilizado neste trabalho foi eficiente para a extração das substâncias fenólicas dos grãos de café verde. O extrato obtido possui alta concentração de 5-ACQ e capacidade antioxidante tanto em meio aquoso, quanto em meio lipofílico.

As metodologias propostas para o preparo das micropartículas de quitosana com goma xantana e quitosana com TPP foram eficientes para microencapsular o extrato de grãos de café verde. As micropartículas de quitosana e goma xantana obtiveram maior tamanho médio em relação as que utilizaram o tripolifosfato de sódio. As partículas apresentaram-se irregulares, escamosas e friáveis, independente do agente reticulante utilizado e da adição ou não do extrato de grãos de café verde.

Na quantificação de 5-ACQ encapsulado e na forma livre, não houve interferência de outros constituintes das amostras, demonstrando ser um método eficaz para análise dessa substância bioativa. A eficiência de encapsulamento de 5-ACQ foi influenciada pelo agente reticulante utilizado, sendo as micropartículas de quitosana e TPP as que obtiveram maiores taxas.

A utilização da espectroscopia demonstrou que os sistemas poliméricos obtidos neste trabalho se tratam de microesferas e o aprisionamento do extrato pelas micropartículas. As análises térmicas demonstram maior estabilidade do extrato encapsulado em relação ao extrato livre, em ambos os sistemas poliméricos propostos.

O perfil de liberação do 5-ACQ em fluido gástrico simulado foi influenciado pelo agente reticulante utilizado, sendo as micropartículas de quitosana e TPP as que liberaram maior porcentagem. A liberação em fluido intestinal simulado foi de forma gradual e semelhante para ambos os sistemas poliméricos. Sendo, as micropartículas de quitosana e goma xantana, neste trabalho, obtiveram os parâmetros de liberação gastrointestinais mais próximos do perfil ideal.

A interação das micropartículas de quitosana com a mucina demonstraram que todas as micropartículas propostas possuem alta capacidade mucoadesiva, com comportamento semelhante independente do agente reticulante utilizado.

Por meio deste trabalho foi possível desenvolver micropartículas poliméricas naturais contendo extrato de grãos de café verde que possuem promissoras propriedades de aumentar a estabilidade e biodisponibilidade do ácido 5-O-cafeoilquínico, e com isso, possibilitam maior eficácia e aplicabilidade do extrato.

## 7 REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, T.; BLEHER, S.; FLATEN, G. E.; THO, I.; MATTSSON, S.; ŠKALKO-BASNET, N.; Chitosan in Mucoadhesive Drug Delivery: Focus on Local Vaginal Therapy. **Marine Drugs**, n. 13, p.222-236, 2015.
- ARAÚJO, A.L.; **Microencapsulação do ferro através da técnica de coacervação complexa**. 2011. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.
- BARAKAT, N. S.; ALMURSHEDI, A. S.; Design and development of gliclazide-loaded chitosan for oral sustained drug delivery: In vitro/in vivo evaluation. **Journal of Microencapsulation**, v.2, n. 28, p. 122–133, 2011.
- BENINCÁ, C.; **Estabilidade do ácido 5-O-cafeoilquínico: relação entre a cinética química e o processamento de erva-mate**. 2009. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, 2009.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.
- BRANDÃO, L. V.; NERY, T. B. R.; MACHADO, B. A. S.; ESPERIDIÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I.; Produção de goma xantana obtida a partir do caldo de cana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 217-222, 2008.
- BUDRYN, G.; ZACZYNSKA, D.; ORACZ, J.; Effect of addition of green coffee extract and nanoencapsulated chlorogenic acids on aroma of different food products. **LWT - Food Science and Technology**, n. 73, p. 197-204, 2016.
- BUENO, V. B.; BENTINI, R.; CATALANI, L. H.; PETRI, D. F. S.; Synthesis and swelling behavior of xanthan-based hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, n.92, p. 1091–1099, 2013.
- CADDEO, C.; NA'CHER, A.; DI'EZ-SALES, O.; MERINO-SANJUA'N, M.; FADDA, A. M.; MANCONI, M.; Chitosan–xanthan gum microparticle-based oral tablet for colon-targeted and sustained delivery of quercetin. **Journal of microencapsulation**, 2014.

CASAS, M. I.; VAUGHAN, M. J.; BONELLO, P.; GARDENER, B. M.; GROTEWOLD E.; ALONSO, A. P.; Identification of biochemical features of defective *Coffea arabica* L. beans. **Food Research International**, n. 95, p. 59–67, 2017.

ČALIJA, B.; MILIĆ, J.; IJEVIĆ, J. J.; DAKOVIĆ, A.; KRAJIŠNIK, D.; Ionically cross-linked chitosan–halloysite composite microparticles for sustained drug release. **Clay Minerals**, n. 52, p. 413–426, 2017.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. ; FENÓLICOS SIMPLES E HETEROSÍDIOS. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO. JOÃO, C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; Farmacognosia da planta ao medicamento. 2ª e.d. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2000. Capítulo 20, p.433-447.

CARVALHO, A.G.S.; SILVA, V.M.; HUBINGER, M.D.; Microencapsulation by spray drying of emulsified green coffee oil with two-layered membranes. **Food Research International**, n. 61, p. 236–245, 2014.

CERCHIARA, T.; ABRUZZO, A.; DI CAGNO, M.; BIGUCCI, F.; BAUER-BRANDL , A.; PAROLIN, C.; VITALI, B.; GALLUCCI, M.C.; LUPPI, B.; Chitosan based micro- and nanoparticles for colon-targeted delivery of vancomycin prepared by alternative processing methods. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** , n.92, p. 112–119, 2015.

CHAO, J.; WANG, H.; ZHAO, W.; ZHANG, M.; ZHANG, L.; Investigation of the inclusion behavior of chlorogenic acid with hydroxypropyl—cyclodextrin. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 50, p. 277–282, 2012.

CHEUKA, P. M.; MAYOKA, G.; MUTAI, P.; CHIBALE, K.; The Role of Natural Products in Drug Discovery and Development against Neglected Tropical Diseases. **Molecules**, v. 22, n. 58, 2017.

CORRÊA, J. L. G.; MENDONÇA, K. S.; RODRIGUES, L. R.; RESENDE, M. L. V.; ALVES, G. E.; Spray drying of coffee leaf extract. **Coffee Science**, v. 11, n. 3, p. 359 - 367, 2016.

CROZIER, T. W. M.; STALMACH, A.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A.; Espresso coffees, caffeine and chlorogenic acid intake: potential health implications. **Food and Function**, 2011.

DHANKA, M.; SHETTY, C.; SRIVASTAVA, R.; Methotrexate loaded gellan gum microparticles for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.

DAWIDOWICZ, A. L.; TYPEK, R.; Thermal transformation of trans-5-O-caffeoylquinic acid (trans-5-CQA) in alcoholic solutions. **Food Chemistry**, n. 167, p. 52–60, 2015.

DHAWAN, S.; SINGLA, A. K.; SINHA, V. R.; Evaluation of Mucoadhesive Properties of Chitosan Microspheres Prepared by Different Methods. **AAPS PharmSciTech**, v.4 n. 5, 2004.

DING, M.; BHUPATHIRAJU, S. N.; CHEN, M.; DAM, R. M. V.; HU, F. B.; Caffeinated and Decaffeinated Coffee Consumption and Risk of Type 2 Diabetes: A Systematic Review and a Dose-Response Meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 37, 2014.

DUDHANI, A. R.; KOSARAJUA, S. L.; Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, n. 81, p. 243–251, 2010.

DURÁN, C. A. A.; TSUKUI, A.; SANTOS, F. K. F.; MARTINEZ, S. T.; BIZZO, H. R.; REZENDE, C. M.; Café: Aspectos Gerais e seu Aproveitamento para além da Bebida. **Revista Virtual Química**, v. 9, n. 1, p.107-134, 2017.

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

ESTEVINHO, B. M. A. N.; ROCHA, F. A. N.; SANTOS, L. M. S.; ALVES, M. A. C.; Using water-soluble chitosan for flavour microencapsulation in food industry. **Journal of Microencapsulation**, p. 1–9, 2013.

FENG, E.; MA, G.; WANG, H.; LEI, Z.; Preparation and properties of organo-inorganic composite superabsorbent based on xanthan gum and loess. **Carbohydrate polymers**, n.111, p. 463-468, 2014.

FLORES, F. P.; SINGH, R. K.; KERR, W. L.; PEGG, R. B.; KONG, F.; Total phenolics content and antioxidant capacities of microencapsulated blueberry anthocyanins during in vitro digestion. **Food Chemistry**, n.153, p. 272–278, 2014.

GETACHEW, A. T.; CHUN, B. S.; Influence of hydrothermal process on bioactive compounds extraction from green coffee bean. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, n. 38, p. 24–31, 2016.

GUO, Z.; The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v.7,n.2, p. 119–136, 2017.

HEJAJI, E. M.A.; SMITH, A. M.; MORRIS, G. A.; Designing chitosan-tripolyphosphate microparticles with desired size for specific pharmaceutical or forensic applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, n.95, p. 564-573, 2017.

HU, Y.; WU, T.; WU, C.; FU, S.; YUAN, C.; CHEN, S.; Formation and optimization of chitosan-nisin microcapsules and its characterization for antibacterial activity. **Food Control**, n. 72, p. 43-52, 2017.

JESZKA-SKOWRON, M.; STANISZ, E.; PENA, M. P.; Relationship between antioxidant capacity, chlorogenic acids and elemental composition of green coffee. **LWT - Food Science and Technology**, n. 73, p. 243-250, 2016.

KAŠPAR, O.; JAKUBEC, M.; ŠTĚPÁNEK, F.; Characterization of spray dried chitosan–TPP microparticles formed by two- and three-fluid nozzles. **Powder Technology**, n. 240, p. 31–40, 2013.

KIATTISIN, K.; NANTARAT, T.; LEELAPORNPID, P.; Evaluation of antioxidant and anti-tyrosinase activities as well as stability of green and roasted coffee bean extracts from *Coffea arabica* and *Coffea canephora* grown in Thailand. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 8, n.10, p. 182-192, 2016.

KIM, J.; HWANG, J.; SEO, Y.; JO, Y.; SON, J.; CHOI, J.; Engineered chitosan-xanthan gum biopolymers effectively adhere to cells and readily release incorporated antiseptic molecules in a sustained manner. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 2016.

KUCK, L. S.; **Microencapsulamento de compostos bioativos da uva (*Vitis labrusca* L.) e efeito do tratamento pós-colheita com UV-C em uvas Bordô**. 2016. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.

LAINÉ, P.; KYLLI, P.; HEINONEN, M.; JOUPPILA, K.; Storage stability of microencapsulated Cloudberry (*Rubus chamaemorus*) Phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 56, p. 11251–11261, 2008.

LOSADA-BARREIRO, S.; BRAVO-DÍAZ, C.; Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, n.133, p. 379-402, 2017.

LUO, Y.; WANG, Q.; Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2013.

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

MARCO, G. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.45, p.594- 598, 1968.

MANCONI, M.; MURA, S.; MANCA, M. L.; FADDA, A. M.; DOLZ, M.; HERNANDEZ, M. J.; CASANOVAS, A.; DÍEZ-SALES, O.; Chitosomes as drug delivery systems for C-phycoerythrin: Preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 392, p. 92–100, 2010.

MAZZARINO, L.; **SISTEMAS NANOESTRUTURADOS DECORADOS COM QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO BUCAL DA CURCUMINA**, 2013. Tese (Doutorado em Farmácia e em Sciences des Polymères) – Universidade Federal de Santa Catarina e à Université de Grenoble, 2013.

MOREIRA, M. E. C; **Avaliação do potencial farmacológico de café (*Coffea arabica L.*) verde e torrado**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

NERY, T. B. R.; ESPERIDIÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I.; Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1937-1941, 2008.

OLIVEIRA, D. M.; SAMPAIO, G. R.; PINTO, C. B.; CATHARINO, R. R.; BASTOS, D. H. M.; Bioavailability of chlorogenic acids in rats after acute ingestion of maté tea (*Ilex paraguariensis*) or 5-caffeoylquinic acid. **European Journal of Nutrition**, 2016.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C.H.; KATAN, M. B.; Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans. **The Journal of Nutrition**, 2000.

PAN, M.; TUNG, Y.; YANG, G.; LIA, S.; HOE, C.; Molecular mechanisms of the anti-obesity effect of bioactive compounds in tea and coffee. : **Food & Function**, n. 7, p. 4481-4491, 2016.

PAPINI, C.J.; 2003. **ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA**. Dissertação (Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear) – Universidade de São Paulo, 2003.

PASRIJA, D.; EZHILARASI, P.N.; INDRANI, D.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; Microencapsulation of green tea polyphenols and its effect on incorporated bread quality. **LWT - Food Science and Technology**, n. 64, p. 289-296, 2015.

RÁZGA, F.; VNUKOVÁ, D.; NÉMETHOVÁ, V.; MAZANCOVÁ, P.; LACÍK, I.; Preparation of chitosan-TPP sub-micron particles: Critical evaluation and derived recommendations. **Carbohydrate Polymers**, 2016.

RAZZAGHI-ASL, N.; GARRIDO, J.; KHAZRAEI, H.; BORGES, F.; FIRUZI, O.; Antioxidant Properties of Hydroxycinnamic Acids: A Review of Structure-Activity Relationships. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n.36, 2013.

REGAZZONI, L.; SALIGARI, F.; MARINELLO, C.; ROSSONI, G.; ALDINI, G.; CARINI, M.; ORIOLI, M.; Coffee silver skin as a source of polyphenols: High resolution mass

spectrometric profiling of components and antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, n. 20, p. 472–485, 2016.

ROSA, G.M.; **Análise química e atividade antioxidante de quatro amostras de café (*Coffea arábica*) comerciais**. 2010. Dissertação (Mestre em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, 2010.

ROSA, C. G.; BORGES, C. D.; ZAMBIAZI, R. C.; NUNES, M. R.; BENVENUTTI, E. V.; LUZ, S. R.; D'AVILA, R. F.; RUTZ, J. K.; Microencapsulation of gallic acid in chitosan, - cyclodextrin and xanthan. **Industrial Crops and Products**, n. 46, p. 138–146, 2013.

RUTZ, J. K.; **Caracterização e microencapsulação de suco de pitanga roxa (*Eugenia uniflora L.*)**. 2013. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas, 2013.

RUTZ, J. K.; BORGES, C. D.; ZAMBIAZI, R. C.; ROSA, C. G.; SILVA, M. M.; Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food. **Food Chemistry**, n. 202, p. 324–333, 2016.

RUTZ, J. K.; BORGES, C. D.; ZAMBIAZI, R. C.; CRIZEL-CARDOZO, M. M.; KUCK, L. S.; NOREÑA, C. P.Z.; Microencapsulation of palm oil by complex coacervation for application in food systems. **Food Chemistry**, n. 220, p. 59–66, 2017.

SARKER, S.D.; LATIF, Z.; GRAY, A.I; NATURAL PRODUCTS ISOLATION. In: SARKER, S.D.; LATIF, Z.; GRAY, A.I; **Methods in Biotechnology, Natural Products Isolation**. 2<sup>a</sup> e.d. Totowa/New Jersey: Ed. Humana Press, 2006. Capítulo1, p.1-26.

SARRIÁ, B.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, S.; SIERRA-CINOS, J. L.; GARCÍA-DIZ, L.; MATEOS, R.; BRAVO-CLEMENTE, L.; Regularly consuming a green/roasted coffee blend reduces the risk of metabolic syndrome. **European Journal of Nutrition**, 2016.

SERVAT, L.; SPINDOLA, H. M.; RODRIGUES, R. A. F.; FOGLIO, M. A.; Microencapsulação: uma Alternativa Promissora para Preservação de Produtos Naturais. **Revista Fitos**, v.5, n.2, 2010.

SILVA, P. T.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R.; HOLKEM, A. T.; SCHWAN, C. L.; WIGMANN,É. F.; BASTOS, J. O.; SILVA, C. B.; Microencapsulation: concepts, mechanisms,



methods and some applications in food technology. **Ciência Rural**, v.44, n.7, p.1304-1311, 2014.

SHAO, P.; ZHANG, J.; FANG, Z.; SUN, P.; Complexing of chlorogenic acid with  $\beta$ -cyclodextrins: Inclusion effects, antioxidative properties and potential application in grape juice. **Food Hydrocolloids**, n. 41, p. 132-139, 2014.

SINGLETON, V.L.; ROSSI JR, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-58, 1965.

SINISI, V.; STEVAERT, A.; BERTI, F.; FORZATO, C.; BENEDETTI, F.; NAVARINI, L.; CAMPS, A.; PERSOONS, L.; VERMEIRE, K.; Chlorogenic Compounds from Coffee Beans Exert Activity against Respiratory Viruses. **Planta Medica**, 2016.

TAVARIA, F. K.; COSTA, E. M.; PINA-VAZ, I.; CARVALHO, M. F.; PINTADO, M. M.; A quitosana como biomaterial odontológico: estado da arte. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v.29, n. 1, p. 110-120, 2013.

UR-REHMAN, T.; TAVELIN, S.; GRÖBNER, G.; Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 409, p. 19–29, 2011.

VIEGAS, J. S.; **Encapsulação de um extrato hidroalcoólico de Rosa micrantha Borrer ex Sm para fins alimentares**. 2013. Dissertação (Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar) – Instituto Politécnico de Bragança, 2013.

XIONG, X.; LI, M.; XIE, J.; XUE, B.; SUN, T.; Preparation and antioxidant activity of xanthan oligosaccharides derivatives with similar substituting degrees. **Food Chemistry**, n.164, p. 7–11, 2014.

WANG, W.; JUNG, J.; ZHAO, Y.; Chitosan-cellulose nanocrystal microencapsulation to improve encapsulation efficiency and stability of entrapped fruit anthocyanins. **Carbohydrate Polymers**, n.157, p. 246–1253, 2017.

WEI, Z.; GAO, Y.; Evaluation of structural and functional properties of chitosan–chlorogenic acid complexes. **International Journal of Biological Macromolecules**, n.86, p.376–382, 2016.

WIANOWSKA ,D.; TYPEK, R.; DAWIDOWICZ, A. L.; Chlorogenic Acid Stability in Pressurized Liquid Extraction Conditions. **Journal of AOAC International**, v. 98, n. 2, 2015

WOLSKA, J.; JANDA, K.; JAKUBCZYK, K; SZYMKOWIAK, M; CHLUBEK, D.; GUTOWSKA, I.; Levels of Antioxidant Activity and Fluoride Content in Coffee Infusions of Arabica, Robusta and Green Coffee Beans in According to their Brewing Methods. **Biological Trace Element Research**, 2017.

YUAN, D.; JACQUIER, J. C.; O'RIORDAN, E. D.; Entrapment of protein in chitosan-tripolyphosphate beads and its release in an in vitro digestive model. **Food Chemistry**, n.229, p. 495–501, 2017.

YUAN, Y.; KONG, Z.; SUN, Y.; ZENG, Q.; YANG, X.; Complex coacervation of soy protein with chitosan: Constructing antioxidant microcapsule for algal oil delivery. **LWT - Food Science and Technology**, n. 75, p. 171-179, 2017.

ZHANG, H.; ALSARRA, I. A.; NEAU, S. H.; An in vitro evaluation of a chitosan-containing multiparticulate system for macromolecule delivery to the colon. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 239, p. 197–205, 2002.

ZHANG, S.; CHEN, J.; YIN, X.; WANG, X.; QIU, B.; ZHU, L.; LIN, Q.; Microencapsulation of tea tree oil by spray-drying with methyl cellulose as the emulsifier and wall material together with chitosan/alginate. **Journal of Applied Polymer Science**, 2017.