

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

Filipe Soares Bertges

Biotransformação do café verde por *Aspergillus oryzae*: avaliação das alterações do perfil químico e da penetração cutânea

Juiz de Fora

2018

Filipe Soares Bertges

Biotransformação do café verde por *Aspergillus oryzae*: avaliação das alterações do perfil químico e da penetração cutânea

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais Bioativos

Orientadora: Profa. Dra. Maria Silvana Alves

Co-orientadoras: Profa. Dra. Mirian Pereira Rodarte

Profa. Dra. Fernanda Maria Pinto Vilela

Juiz de Fora

2018

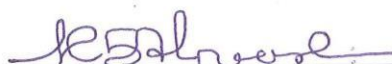
Filipe Soares Bertges

Biotransformação do café verde por *Aspergillus oryzae*: avaliação das alterações do perfil químico e da penetração cutânea

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais Bioativos

Aprovada em 30 de maio de 2018

BANCA EXAMINADORA



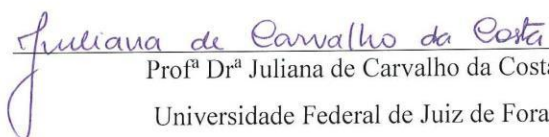
Prof^a Dr^a Maria Silvana Alves - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Thiago Barth

Universidade Federal do Rio de Janeiro - Campus Macaé



Prof^a Dr^a Juliana de Carvalho da Costa

Universidade Federal de Juiz de Fora

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

Bertges, Filipe Soares.

Biotransformação do café verde por *Aspergillus oryzae*: avaliação das alterações do perfil químico e da penetração cutânea / Filipe Soares Bertges. -- 2018.

84 f. : il.

Orientadora: Maria Silvana Alves

Coorientadoras: Mirian Pereira Rodarte, Fernanda Maria Pinto Vilela

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

1. *Coffea arabica*. 2. Antioxidantes. 3. Biotransformação. 4. *Aspergillus oryzae*. 5. Espectrometria de massas. I. Alves, Maria Silvana, orient. II. Rodarte, Mirian Pereira, coorient. III. Vilela, Fernanda Maria Pinto, coorient. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus;

À Medquímica Indústria Farmacêutica - Grupo Lupin, pela concordância e autorização para minha capacitação profissional;

À Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo 456366/2014-8), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (Processo CDS APQ 00949/14), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido;

À Profa. Dra. Maria Silvana Alves, por todo o apoio e por ter possibilitado a continuidade deste projeto;

À Profa. Dra. Maria da Penha Henriques do Amaral, pela oportunidade de aprendizado e de crescimento profissional, pelo apoio e incentivo sempre;

Às co-orientadoras deste projeto, Professoras Doutoras Fernanda Maria Pinto Vilela e Mirian Pereira Rodarte, pelo suporte, dedicação e pelos valiosos ensinamentos;

Aos Técnicos-Administrativos em Educação (TAEs) Carolina Miranda Gasparetto, lotada na Central Analítica de Bioprodutos e Bioprocessos (CENTRALBIO) / Faculdade de Farmácia / UFJF, pelo auxílio na execução das análises cromatográficas, Jésus de Paula Sarmiento, pelo suporte técnico no preparo dos extratos, e Arlem Martins de Rezende (colaborador terceirizado) e Sullivan Ramos Moreira, secretários do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, por todo auxílio administrativo prestado;

Ao Prof. Dr. Luís Roberto Batista, do Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, por ter cedido à cepa do fungo empregada na realização deste estudo;

À minha família e aos amigos que apoiam, torcem e vibram a cada conquista;

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigado!

RESUMO

O uso tópico de antioxidantes tem sido reconhecido como uma estratégia promissora de fotoproteção e prevenção do fotoenvelhecimento e câncer de pele. Os grãos de café verde (*Coffea arabica* L.) contêm uma mistura complexa de compostos fenólicos com comprovada atividade antioxidante. No entanto, grande parte desses compostos provenientes café possuem elevada massa molecular, baixa lipofilicidade, e muitas vezes estão ligados quimicamente à moléculas de açúcares, o que limita a penetração cutânea. No presente estudo, foi realizada a fermentação do café verde por *Aspergillus oryzae* com o objetivo de biotransformar os compostos fenólicos em moléculas mais lipofílicas e com menor massa molecular visando a maior penetração desses compostos na epiderme. A atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos de café não biotransformado e biotransformado durante 24, 36 e 48 horas foi avaliada pelos métodos do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH·) espectrofotométrico e em cromatografia de camada delgada (CCD). A quantificação de ácido clorogênico (5-ACQ), cafeína e ácido cafeico nos extratos foi realizada empregando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A caracterização química dos diferentes extratos foi realizada por meio da técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas com analisador quadrupolo-tempo de voo (CLUE-EM-Q-TOF). Os resultados das análises por CLAE, CCD e CLUE-EM-Q-TOF mostraram alterações quantitativas e qualitativas na composição química do café verde. Ficou evidenciada a quebra das ligações ésteres dos ácidos clorogênicos com consequente formação de ácidos quínico e cafeico no intervalo de 36 horas de fermentação em estado sólido, sem perda da atividade antioxidante. A biotransformação do café verde por *A. oryzae* se mostrou uma estratégia eficiente para promover alterações no perfil dos metabólitos secundários do café verde. Os resultados dos estudos de permeação e retenção *in vitro* mostraram que a cafeína foi o único composto capaz de permear e ficar retido na derme e na epiderme. A penetração da cafeína foi maior quando utilizada a formulação adicionada do extrato biotransformado em relação àquela acrescida do extrato não biotransformado. Os resultados obtidos reforçam a importância da realização dos estudos de penetração cutânea a fim de garantir a eficácia de formulações farmacêuticas e cosméticas.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. Antioxidantes. Biotransformação. *Aspergillus oryzae*. Espectrometria de Massas.

ABSTRACT

Topical antioxidants have been recognized as a promising strategy of photoprotection and prevention of photoaging and skin cancer. Green coffee beans (*Coffea arabica* L.) contain a complex blend of phenolic compounds with proven antioxidant activity. However, most of these coffee compounds have high molecular mass, low lipophilicity, and are often chemically bound to sugar molecules, which difficult the cutaneous penetration. In the present study, the green coffee fermentation was carried out by *Aspergillus oryzae* to biotransform phenolic compounds into molecules more lipophilic and with lower molecular mass targeting a greater penetration of them into epidermis. Antioxidant activity of the hydroethanolic extracts of non-biotransformed and biotransformed coffee for 24, 36 and 48 hours was evaluated by the 2, 2-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH·) spectrophotometric and thin layer chromatography (TLC) methods. The quantification of chlorogenic acid (5-CQA), caffeine and caffeic acid in the extracts was carried out using high-performance liquid chromatography (HPLC). The chemical characterization of the different extracts was performed using the ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with time-of-flight analyzer (UPLC-MS-Q-TOF). The results of the analyzes by HPLC, TLC and UPLC-MS-Q-TOF showed quantitative and qualitative changes in the chemical composition of green coffee. It was evidenced the breakage of the esters of chlorogenic acids with consequent formation of quinic and caffeic acids in the interval of 36 hours of solid state fermentation without loss of antioxidant activity. Biotransformation of green coffee by *A. oryzae* has shown to be an effective strategy to promote changes in the profile of secondary metabolites of green coffee. The *in vitro* permeation and retention results showed that caffeine was the only compound able to permeate and be retained in dermis and epidermis. Caffeine penetration was higher when the added formulation of the biotransformed extract was used than to to the non-biotransformed extract. The results reinforce the importance of conducting skin penetration studies in order to guarantee the efficacy of pharmaceutical and cosmetic formulations

Keywords: *Coffea arabica*. Antioxidants. Biotransformation. *Aspergillus oryzae*. Mass Spectrometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Imagem ilustrativa das estruturas do fruto do café.....	15
Figura 2 – Esquema representativo da classificação química dos compostos fenólicos	16
Figura 3 – Estruturas químicas dos derivados dos ácidos benzoico e cinâmico	17
Figura 4 – Imagem ilustrativa macroscópica (A) e microscópica (B) de <i>Aspergillus oryzae</i> ..	23
Figura 5 - Imagem ilustrativa da célula de difusão de Franz.....	26
Figura 6 – Imagem ilustrativa do processo de liofilização dos extratos.....	33
Figura 7 – Imagem ilustrativa do mecanismo de reação do DPPH• com uma substância antioxidante	34
Figura 8 – Imagem ilustrativa do teste de penetração cutânea em célula de Franz.....	38
Figura 9 – Espectro UV dos padrões de ácido clorogênico (5-ACQ), ácido cafeico e cafeína	39
Figura 10 – Cromatograma das soluções padrão de ácido clorogênico (5-ACQ), ácido cafeico (AC) e cafeína (CAF) analisados em 272 e 330 nm.....	40
Figura 11 - Cromatogramas obtidos nas análises por CLAE dos extratos hidroetanólicos de café verde não biotransformado (A) e biotransformado por 24 (B), 36 (C) e 48 horas (D) em 272 nm	42
Figura 12 – Cromatogramas obtidos nas análises por CLAE dos extratos hidroetanólicos de café verde não biotransformado (A) e biotransformado por 24 (B), 36 (C) e 48 horas (D) em 330 nm	43
Figura 13 – Fotografia das placas de cromatografia em camada delgada visualizadas em luz ultravioleta (UV) em 254 nm (esquerda) e revelada com solução de DPPH 0,2% visualizada em luz visível (direita).....	46
Figura 14 – Cromatogramas de íons totais dos extratos analisados por CLUE-EM-Q-TOF com ionização por electrospray em modo negativo	48
Figura 15 – Sobreposição dos cromatogramas de íons totais dos extratos analisados por CLUE-EM-Q-TOF com ionização por electrospray em modo negativo	49
Figura 16 – Sobreposição dos cromatogramas de íons totais dos extratos analisados por CLUE-EM-Q-TOF com ionização por electrospray em modo negativo	50
Figura 17 – Cromatogramas de íons totais dos extratos analisados por CLUE-EM-Q-TOF com ionização por electrospray em modo positivo	53
Figura 18 – Sobreposição dos cromatogramas de íons totais dos extratos analisados por CLUE-EM-Q-TOF com ionização por electrospray em modo positivo	54

Figura 19 – Sobreposição dos cromatogramas de íons totais dos extratos analisados por CLUE-EM-Q-TOF com ionização por electrospray em modo positivo	55
Figura 20 – Cromatogramas obtidos nas análises de permeação dos compostos na pele quando veiculados nas formulações placebo (A), adicionada do extrato de café verde não biotransformado (B) e biotransformado (C), em 272 nm.....	57
Figura 21 – Cromatogramas obtidos nas análises de permeação dos compostos na pele quando veiculados nas formulações placebo (A), adicionada do extrato de café verde não biotransformado (B) e biotransformado (C), em 330 nm.....	58
Figura 22 – Cromatogramas obtidos nas análises de retenção na derme e epiderme dos compostos na pele quando veiculados nas formulações placebo (A), adicionada do extrato de café verde não biotransformado (B) e biotransformado (C), em 272 nm.....	59
Figura 23 – Cromatogramas obtidos nas análises de retenção na derme e epiderme dos compostos na pele quando veiculados nas formulações placebo (A), adicionada do extrato de café verde não biotransformado (B) e biotransformado (C), em 330 nm.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das fases móveis utilizadas para quantificação de ácido 5-cafeoilquínico, ácido cafeico e cafeína no sistema de eluição por gradiente	32
Tabela 2 - Composição das fases móveis utilizadas no sistema de eluição por gradiente no método de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas com analisador Quadrupolo-Tempo-de-Voo (CLUE-EM-Q-TOF)	36
Tabela 3 - Equações das retas e coeficientes de correlação linear (r) obtidos a partir da curva de calibração das soluções de padrões de ácido clorogênico (5-ACQ), cafeína e ácido cafeico ..	40
Tabela 4 - Resultados das concentrações de ácido clorogênico (5-ACQ), cafeína e ácido cafeico nos extratos não biotransformados e biotransformados por 24, 36 e 48 horas.....	41
Tabela 5 - Caracterização dos compostos dos extratos de café não biotransformado e biotransformado por 24, 36 e 48 horas por CLUE-EM-Q-TOF em modo negativo	47
Tabela 6 - Caracterização dos compostos dos extratos de café não biotransformado e biotransformado por 24, 36 e 48 horas por CLUE-EM-Q-TOF em modo positivo	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 HISTÓRIA DO CAFÉ.....	13
2.2 O CAFÉ	14
2.3 PRINCIPAIS COMPOSTOS BIOATIVOS DO CAFÉ	16
2.4 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	18
2.5 BIOTRANSFORMAÇÃO	19
2.6 A ESPÉCIE <i>Aspergillus oryzae</i>	22
2.7 ESTUDOS DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA	24
3. OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 MATERIAL VEGETAL	30
4.2 PREPARO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS.....	30
4.3 BIOTRANSFORMAÇÃO DO CAFÉ VERDE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES).....	30
4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS	31
4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS.....	31
4.6 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	31
4.6.1 Padrões e solventes	31
4.6.2 Preparo dos padrões e amostras.....	31
4.6.3 Condições cromatográficas e determinação dos teores de ácido 5-cafeoilquínico, cafeína e ácido cafeico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	32
4.7 LIOFILIZAÇÃO DOS EXTRATOS.....	33
4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS	33
4.8.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) em espectrofotômetro	33
4.8.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) em cromatografia em camada delgada (CCD).....	35
4.9 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS DE CAFÉ POR CLUE-EM-Q-TOF.....	35
4.10 PREPARO DA FORMULAÇÃO TÓPICA	36

4.11 ESTUDO DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	37
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 BIOTRANSFORMAÇÃO DO CAFÉ VERDE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)	39
5.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	39
5.2.1 Determinação dos teores de ácido 5-cafeoilquínico, ácido cafeico e cafeína por CLAE	39
5.3 LIOFILIZAÇÃO DOS EXTRATOS.....	44
5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS	44
5.41 Atividade antioxidante pelo método 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) em espectrofotômetro	44
5.42 Atividade antioxidante pelo método 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) em cromatografia em camada delgada	45
5.5 Caracterização química dos extratos de café verde por CLUE-EM-Q-TOF.....	46
5.6 PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	56
6. CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS	64
APÊNDICE A - ESI(-) MS/MS dos compostos citados na Tabela 5.	74
APÊNDICE B - ESI(+) MS/MS dos compostos citados na Tabela 6.	80

1 INTRODUÇÃO

Os antioxidantes tópicos têm sido reconhecidos pelos dermatologistas como uma importante e promissora estratégia de fotoproteção e prevenção do fotoenvelhecimento e câncer de pele. Para tanto, as formulações cosméticas têm sido adicionadas de vitaminas, enzimas e compostos antioxidantes provenientes de fontes vegetais (FARRIS, 2007).

Considerando que a radiação ultravioleta (UV) é capaz de penetrar nas camadas mais profundas da pele, é de fundamental importância garantir que os compostos antioxidantes aplicados topicamente sejam capazes de atravessar o estrato córneo, principal barreira de penetração cutânea, e atingir as camadas mais profundas da pele, para efetivamente prevenir os danos induzidos pelos radicais livres (SAIJA et al., 2000).

A absorção de um composto através da pele é determinada por suas características físico-químicas, e a lipofilicidade é a característica principal que favorece a penetração cutânea (SHAHRZAD; BITSCH, 1996).

Os grãos de café verde (*Coffea arabica* L.) contêm uma mistura complexa de ácidos clorogênicos, que são compostos fenólicos com atividade antioxidante formados principalmente pela ligação éster dos ácidos ferúlico ou cafeico com o ácido quínico (WILLIAMSON; DIONISI; RENOUF, 2011). No entanto, os ácidos clorogênicos possuem elevada massa molecular, baixa lipofilicidade, e muitas vezes estão ligados quimicamente às moléculas de açúcares, o que limita a penetração cutânea (MANACH et al., 2004).

Processos biotecnológicos que rompem estas ligações químicas, de forma a isolar a molécula do polifenol das que lhe estão associadas, podem ser chamados de biotransformação. A biotransformação das fontes vegetais dos polifenóis leva ao aumento da concentração de compostos fenólicos livres e melhora a atividade funcional desses antioxidantes (FERREIRA et al., 2013).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo realizar a biotransformação do grão de café verde visando transformar os compostos fenólicos em moléculas menos polares e com menor massa molecular, possibilitando uma maior penetração dos mesmos na epiderme, potencializando a atividade antioxidante. Além disso foi realizada a avaliação do perfil químico dos extratos de café biotransformados e não biotransformado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRIA DO CAFÉ

A Lenda de Kaldi, registrada em manuscritos do Iêmen, do ano de 575, é considerada a primeira referência ao café. Segundo a lenda, Kaldi era um pastor de cabras do interior da Etiópia (nordeste da África), da região de Kafa, que observou que, após alimentar-se dos frutos do café, suas cabras apresentavam-se mais agitadas, subiam as montanhas com maior agilidade e possuíam maior resistência. Diante dessa observação, o pastor experimentou os frutos, confirmou a atividade estimulante e disseminou a informação (MARTINS, 2012).

Esta informação chegou aos monges do mosteiro, que passaram a fazer uso dos frutos considerados a fórmula ideal para deixá-los acordados durante as rezas e os longos períodos de meditação (BARTH, 2009). A polpa do café começou a ser consumida pelos etíopes principalmente na forma macerada, produzindo-se um suco que, quando fermentado, se transformava em uma bebida alcoólica. As folhas também eram mastigadas e consumidas na forma de chá (MARTINS, 2012).

Apesar de originar-se na África, os árabes foram os principais responsáveis por dominar as técnicas iniciais de plantio e preparação do produto. Por volta do ano 1000, os frutos começaram a ser consumidos na forma de infusão para fins medicinais, e somente no século XIV o processo de torrefação foi desenvolvido. O hábito de tomar café como bebida em ambiente doméstico ou em recintos coletivos teve início a partir de 1450 (MARTINS, 2012).

O café se disseminou por diversas partes do mundo durante o período de colonização, sendo os comerciantes holandeses os responsáveis pela introdução e cultivo da planta na Europa e América do Norte. Posteriormente, devido ao grande consumo, ocorreu a expansão para outros países, chegando ao centro e sul da América através da Guiana Francesa. Em 1727, o Brasil teve acesso ao cultivo da planta (BARTH, 2009; CHAPAGAIN; HOEKSTRA, 2007).

O café é a segunda mercadoria mais negociada no mundo atrás somente do petróleo, o que demonstra sua importância para a economia global. Mais de 90% da produção desse grão ocorre nos países em desenvolvimento, enquanto que a maior parte do consumo se dá naqueles industrializados (HUGHES et al., 2014).

No Brasil, o café é um importante produto de exportação, sendo o maior país exportador do mundo, representando aproximadamente 32% do mercado mundial, seguido por Vietnã (18%) e Colômbia (11%) (ICO, 2017; NISHIJIMA; SAES; POSTALI, 2012).

As exportações dos cafés do Brasil superaram o volume de 34 milhões de sacas de 60 kg em 2016, das quais 29,56 milhões foram de café verde da espécie *Coffea arabica* L., 580,31 mil sacas de café *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (robusta). A receita gerada foi de aproximadamente US\$ 5,4 bilhões em 2016, o que corresponde a 6,4% do total das exportações do agronegócio brasileiro no mesmo ano, que foi de US\$ 84,9 bilhões (EMBRAPA, 2017).

2.2 O CAFÉ

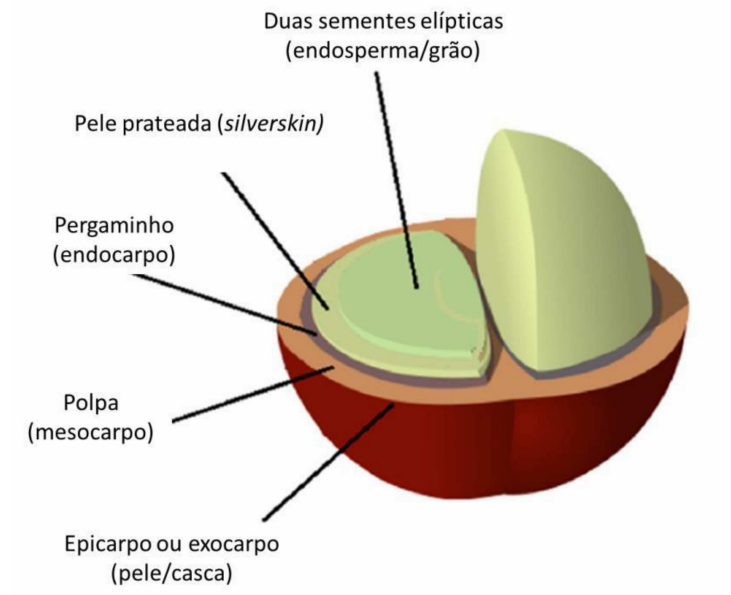
O cafeeiro faz parte do sub-reino Angiospermae, o que significa que a planta se reproduz por sementes situadas no ovário, na base da flor. Pertence à família botânica Rubiaceae, composta por cerca de 600 gêneros e mais de 13000 espécies aceitas (THE PLANT LIST, 2018).

O café está inserido no gênero *Coffea*, membro da família Rubiaceae mais importante economicamente (FARAH, SANTOS; 2015). Dentre as várias espécies de café, as mais exploradas comercialmente são *Coffea arabica* Linn (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (café robusta), sendo a espécie *Coffea arabica* responsável por cerca de 70% do mercado mundial desse grão (PRIVAT et al., 2008).

Os cafeeiros da espécie *C. arabica* alcançam até 6 m de altura, crescem bem em grandes altitudes e temperaturas amenas. É uma cultura perene, adaptada à zona tropical e subtropical, sendo cultivado em países em desenvolvimento da África, Ásia e América Latina (FARAH, SANTOS; 2015).

O fruto do café é composto pelo epicarpo ou exocarpo (pele/casca), polpa (mesocarpo), pergaminho (endocarpo), pele prateada (*silverskin*), e duas sementes elípticas (endosperma/grão). O epicarpo ou exocarpo é uma camada monocelular coberta por uma substância cerosa que protege o fruto. O mesocarpo compreende uma polpa carnuda e uma camada de pectina aderida ao pergaminho, que é um revestimento fino de polissacarídeo. A pele prateada ou *silverskin* é o revestimento das sementes constituído de polissacarídeos, especialmente celulose e hemicelulose, além de monossacarídeos, proteínas e polifenóis (Figura 1) (BRESCIANI et al., 2014; FARAH, SANTOS; 2015).

Figura 1 – Imagem ilustrativa das estruturas do fruto do café



Fonte: ADAPTADO DE FARAH; SANTOS, 2015

Após a colheita, os frutos podem passar por duas vias de processamento diferentes, a seca ou a úmida. Na via seca, os frutos são secos na sua forma íntegra, imediatamente após a colheita, em terreiro aberto ou em secador mecânico, originando o que é conhecido como café natural (DURÁN et al, 2017). O processamento por via úmida, que origina os cafés em pergaminho, pode ser realizado de diferentes formas, removendo-se a casca e parte da mucilagem mecanicamente dando origem ao café descascado, removendo-se a casca mecanicamente e a mucilagem por fermentação biológica originando o café despulpado, ou removendo-se a casca e a mucilagem mecanicamente dando origem ao café desmucilado (BORÉM, 2008; DURÁN et al., 2017).

Sob o ponto de vista químico, o cafeeiro produz vários metabólitos primários e secundários. Os principais metabólitos presentes nos grãos de café são os ácidos clorogênicos (ésteres de certos ácidos trans-cinâmicos e ácido quínico), cafeína, trigonelina e álcoois diterpenoides, tais como cafestol e caveol (ASHIHARA, 2015; RANHEIM; HALVORSEN, 2005).

Outros componentes encontrados no café pertencem à classe dos compostos fenólicos, incluindo os taninos, flavonoides (flavonas, antocianinas, proantocianidinas) e ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoico e ácidos hidroxicinâmicos) (PATHAK; AGRAWAL; DHIR, 2013).

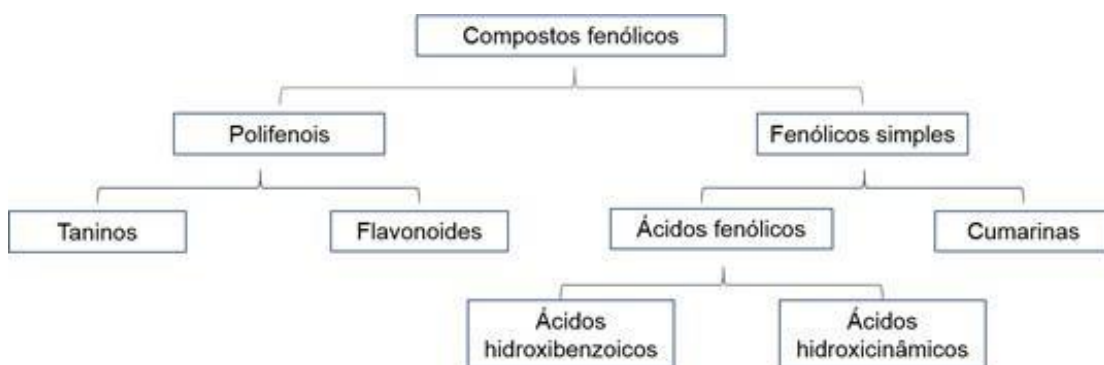
2.3 PRINCIPAIS COMPOSTOS BIOATIVOS DO CAFÉ

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas superiores geralmente envolvidos na defesa contra a radiação UV ou agressão por agentes patogênicos, e encontram-se presentes em uma ampla variedade de vegetais comumente consumidos, tais como frutas, legumes, cereais e leguminosas, e em bebidas, como vinho, chá e café (CHEYNIER, 2005; FARAH; DONANGELO, 2006; MANACH et al., 2004). A classificação básica dos compostos fenólicos é realizada de acordo com sua estrutura química básica (tipo e número de anéis de fenol), e substituições específicas na estrutura básica (MANACH et al., 2004).

O interesse nos compostos fenólicos tem crescido devido aos expressivos efeitos biológicos, incluindo as ações benéficas sobre doenças cardiovasculares e metabólicas, inflamação e câncer, estresse oxidativo, isquemia cerebral, obesidade e funcionamento do cérebro. Com relação específica ao cérebro, os polifenóis têm demonstrado prevenir a neuroinflamação (STREIT; MRAK; GRIFFIN, 2004), além de possuírem propriedade antioxidante e capacidade de modular níveis de neurotransmissores, como a serotonina e a noradrenalina (HALL et al., 2015; PATHAK; AGRAWAL; DHIR, 2013).

Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grupos principais, o dos compostos fenólicos simples e o dos polifenóis (Figura 2) (MAGNANI et al., 2014)

Figura 2 – Esquema representativo da classificação química dos compostos fenólicos



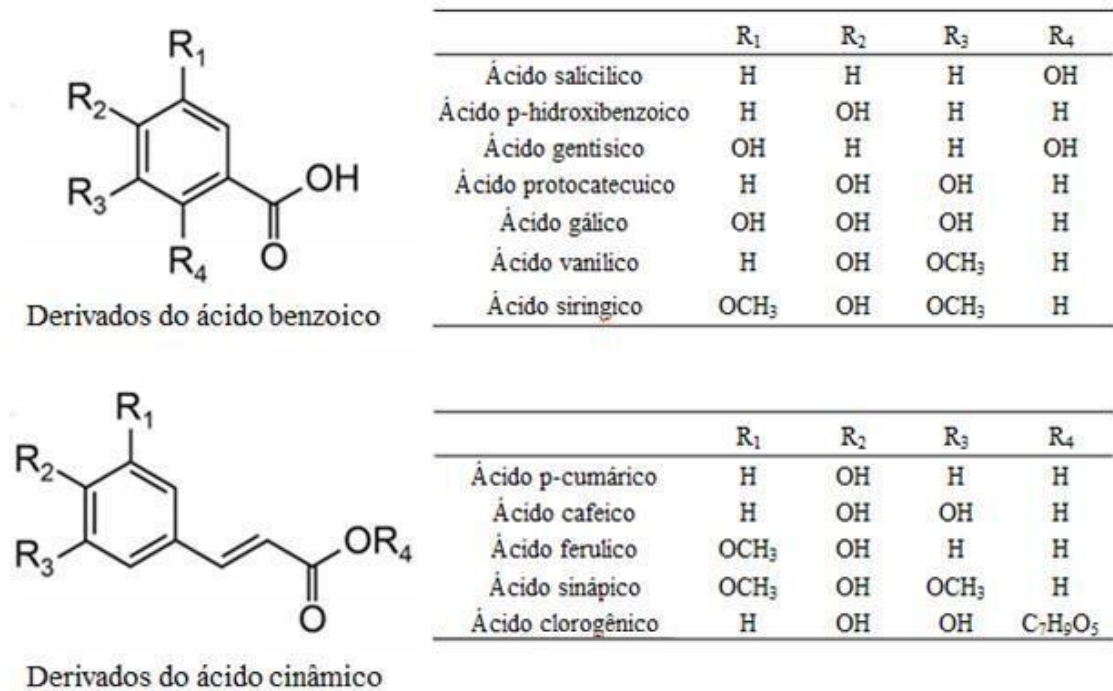
Fonte: ADAPTADO DE MAGNANI et al., 2014

Os ácidos fenólicos constituem uma classe importante de compostos fenólicos caracterizados pela presença de um anel benzênico, um grupo carboxílico e um ou mais grupos hidroxila ou metoxila, que conferem a propriedade antioxidante (MAGNANI et al., 2014). Estão normalmente presentes em produtos vegetais e alimentícios nas formas de ácidos solúveis

livres, solúveis conjugados que são esterificados em açúcares e componentes de baixo peso molecular, e formas ligadas insolúveis que são covalentemente ligadas (éster e eterificadas) ao componente estrutural da parede celular (BEI et al., 2017).

Os ácidos fenólicos são classificados em ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos. Os ácidos hidroxibenzoicos mais comumente encontrados incluem os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e sirínico. Entre os ácidos hidroxicinâmicos, compostos que apresentam atividade antioxidante significativa, podem ser apontados os ácidos clorogênicos (ACG), cafeico, ferúlico, *p*-cumárico e sinápico (Figura 3) (BRAVO, 1998; SOARES, 2002).

Figura 3 – Estruturas químicas dos derivados dos ácidos benzoico e cinâmico



Fonte: ADAPTADO DE EGAWA et al., 2017

Os ACG e seus isômeros estão amplamente distribuídos no reino vegetal. São conhecidamente importantes antioxidantes naturais e estão presentes em grande concentração no café verde, representando até 12% dos sólidos totais dos grãos (CLIFFORD, 1999). Os ACG encontrados nos grãos de café verde incluem os ácidos cafeoilquínicos, feruloilquínicos (AFQ), *p*-cumaroilquínicos, dimetoxicinamoilquínicos, dicafeoilquínicos (diACQ), diferuloilquínicos, di-*p*-cumaroilquínicos, cafeoil feruloil, quínico, dimetoxicinamoil cafeoilquínico, dimetoxicinamoil feruloilquínico, *p*-cumaroil cafeoilquínico, *p*-cumaroil feruloilquínico e *p*-coumaroil dimetoxicinamoilquínico (ALONSO-SALCES et al., 2009).

A forma mais comum de ACG nos grãos de café é o ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ), que possui muitas propriedades biológicas, incluindo atividades antibacteriana, antioxidante e anticarcinogênica, particularmente efeitos hipoglicemiantes e hipolipidêmicos (MENG et al., 2013).

O ácido cafeico (AC), um membro importante da família dos ácidos fenólicos, tem sido amplamente estudado devido à sua importância na indústria farmacêutica e alimentícia, bem como a capacidade de suprimir o desenvolvimento de tumores. Dentre as atividades farmacológicas do ácido cafeico, estão incluídas a antioxidante, imunomoduladora, antiviral, anticarcinogênica e anti-inflamatória (ABDEL-MOTTALEB, 2016).

O ácido ferúlico possui diversos efeitos biológicos, incluindo efeito antioxidante, antialérgico, hepatoprotetor, anticancerígeno, anti-inflamatório, antimicrobiano, vasodilatador, antitrombótico e ajuda a aumentar a viabilidade dos espermatozoides, além de apresentar atividade fotoprotetora em protetores solares e loções para a pele (KUMAR; PRUTHI, 2014).

Além dos compostos fenólicos, a cafeína, uma metilxantina, também merece destaque. Entre as funções farmacológicas das metilxantinas no organismo humano são citadas a estimulação do sistema nervoso central e cardiovascular, o aumento da taxa metabólica, o efeito diurético e a capacidade antioxidante (BRENELLI, 2003; CARREGARO et al., 2001; DALY, 2007; GEORGE et al., 1999; RABELLO; FORTE; GALVÃO, 2000).

Foi demonstrado, também, que a ação antioxidante da cafeína assemelhou-se à da glutatona e que apresentou efetiva inibição sobre a peroxidação lipídica contra espécies reativas do metabolismo de oxigênio (DEVASAGAYAM et al., 1996).

2.4 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são comumente extraídos por meio de solventes orgânicos (líquido-líquido/sólido-líquido) a partir de materiais vegetais, empregando vários métodos convencionais de extração tais como maceração e extrações de Soxhlet, fluido supercrítico, alta pressão hidrostática (HHP) e assistida por micro-ondas. Entretanto, a maior parte destes compostos não é extraída facilmente utilizando métodos de extração convencionais por apresentarem-se principalmente como conjugados insolúveis com componentes de parede celular através de ligações éster, éter ou glicosídicas. A liberação completa de compostos fenólicos ligados à parede celular por meio de extração enzimática, pela ação de enzimas

hidrolíticas como α -amilase, celulase, xilanase e esterases, é uma técnica útil e favorável ao meio ambiente (DEY et al., 2016).

A extração e/ou produção de compostos bioativos por fermentação é também uma alternativa interessante que merece atenção, uma vez que esse processo é capaz de gerar extratos de melhor qualidade e de expressar maiores atividades sem a toxicidade associada aos solventes orgânicos (NIGAM, 2009).

O emprego de antioxidantes em nível industrial é uma prática corrente e justifica o estímulo à pesquisa de novas fontes naturais desses compostos. Os critérios empregados na seleção e utilização de antioxidantes são a facilidade de obtenção e de emprego, baixo custo, ausência comprovada de efeitos nocivos à saúde, termorresistência e neutralidade organoléptica (SILVA; NAVES, 2001). Estudos já comprovaram a atividade antioxidante de diversos produtos de origem vegetal, fontes de compostos fenólicos com potencial aplicação para uso industrial (NATELLA et al., 2002; OKAMURA et al., 2005).

2.5 BIOTRANSFORMAÇÃO

A biotransformação pode ser definida como um processo de transformação química catalisada por enzimas isoladas ou por micro-organismos. A biotransformação de compostos orgânicos pode empregar bactérias, fungos filamentosos ou leveduras, e tem despertado o interesse acadêmico, de indústrias alimentícias e químico-farmacêuticas. Apresenta vantagens em relação à síntese química por ocorrer em condições suaves, sendo ecologicamente aceitável e não havendo, na maioria dos casos, necessidade de proteção de outros grupos funcionais (BIER, 2011).

O processo de biotransformação tem sido utilizado para reações orgânicas estereo, quimio e regioseletivas com facilidade comparável à síntese química clássica. É eficaz nas reações em locais quimicamente inacessíveis, o que de outro modo seria difícil com outros procedimentos sintéticos clássicos. Além disso, este bioprocessos tem recebido grande atenção devido à potencial conversão de resíduos agroindustriais de baixo custo, bem como plantas, em uma grande variedade de compostos de maior valor comercial (MADEIRA JUNIOR; TEIXEIRA; MACEDO, 2015; ZAFAR; AHMED; KHAN, 2016).

Os bioprocessos podem ocorrer na presença ou ausência de água livre no meio de cultura desde que o substrato possua umidade suficiente para suportar o crescimento e o metabolismo do micro-organismo, sendo denominados como fermentação submersa (FS) ou fermentação em

estado sólido (FES), respectivamente (RAVICHANDRAN; VIMALA, 2012; SINGHANIA et al., 2010; SINGHANIA et al., 2009).

A FS é definida como fermentação na presença de excesso de água, utilizando substratos líquidos de fluxo livre, tais como melão e caldos, onde os compostos bioativos são secretados diretamente no caldo de fermentação. Os substratos são utilizados com bastante rapidez, tornando necessária a substituição/suplementação com nutrientes. Esta técnica de fermentação é mais adequada para micro-organismos como bactérias que requerem alto teor de umidade. Uma vantagem adicional da técnica é que a purificação de produtos é mais fácil. Quase todas as instalações de produção de enzimas em grande escala estão usando a tecnologia da FS devido a um melhor monitoramento e facilidade de manuseio (RAVICHANDRAN; VIMALA, 2012; SINGHANIA et al., 2010).

A FES é definida como o processo de fermentação que envolve a matriz sólida e é realizada em ausência ou quase ausência de água livre; contudo, o substrato deve possuir umidade suficiente para suportar o crescimento e o metabolismo do micro-organismo. A principal vantagem da utilização destes substratos é que os resíduos ricos em nutrientes podem ser facilmente reutilizados. Nesta técnica de fermentação, os substratos são utilizados de forma muito lenta e constante. Assim, esta técnica suporta a liberação controlada de nutrientes. A FES é mais adequada para técnicas de fermentação envolvendo fungos e micro-organismos que requerem menor conteúdo de umidade. Organismos que necessitam de alta atividade de água como as bactérias não são recomendados para processos em estado sólido (RAVICHANDRAN; VIMALA, 2012; SINGHANIA et al., 2009).

Dentre as principais vantagens da FES destacam-se a alta produtividade biotecnológica, maior estabilidade e alta concentração do produto, crescimento de micro-organismos em substratos não solúveis em água e geração de menor quantidade de resíduos líquidos (SINGHANIA et al., 2009). Suas principais desvantagens são a formação de um gradiente de temperatura ao longo do substrato fermentado e a dificuldade em controlar o pH e a quantidade de água, o que resulta em uma mobilidade reduzida de nutrientes derivados do movimento reduzido da água no substrato (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012; SINGHANIA et al., 2009).

No entanto, há um grande interesse na FES entre pesquisadores e indústrias, particularmente devido ao fato de ser um processo geralmente mais barato e com maior produtividade do que as FS (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012; SINGHANIA et al., 2009). Este processo desperta maior interesse econômico em países como o Brasil, com abundância em biomassa e resíduos agroindustriais de baixo custo (CASTILHO; MEDRONHO; ALVES, 2000).

Diversos resíduos incluindo a polpa e a casca do café, bagaço de cana de açúcar, polpas e cascas de frutas, entre outros, têm sido utilizados como suporte e/ou substratos para a produção de compostos valiosos por FES como enzimas, ácidos orgânicos, antimicrobianos, compostos aromatizantes e bioativos (MARTINS et al., 2011).

Fatores importantes devem ser muito bem avaliados na FES. Parâmetros físico-químicos e bioquímicos como temperatura, tamanho de partícula, pH, atividade de água, nível de oxigênio e concentração de nutrientes e produtos afetam significativamente o crescimento celular e a formação de produto (PANDEY, 2003).

O nível de umidade do substrato é um dos fatores que mais influenciam o processo e varia de acordo com a natureza do substrato, tipo de produto final e necessidade do micro-organismo (LONSANE et al., 1985). Para cada espécie de micro-organismo utilizado, existe um valor ótimo de umidade do substrato para o crescimento celular. Portanto, a adição de água ou solução de nutrientes ao meio pode ser utilizada de forma a alcançar os níveis ideais para o desenvolvimento do cultivo (CORREIA, 2004).

Outro parâmetro crítico a ser considerado na FES é a temperatura, uma vez que esses processos caracterizam-se por ser exotérmicos e a maioria dos substratos possui baixa umidade térmica, o que pode gerar gradientes de temperatura no biorreator. A germinação de esporos, crescimento e formação de produtos por fungos filamentosos é diretamente influenciada pela temperatura (ROCHA, 2010).

O pH também é um fator relevante para os processos em estado sólido. Entretanto, o controle e monitoramento deste parâmetro em estado sólido não é fácil de ser realizado. Uma forma de minimizar variações bruscas do pH é a utilização de substratos com boa capacidade tampicante ou a adição de soluções tampão na etapa de umidificação do substrato (DEL BIANCHI; MORAES; CAPALBO; 2001; PANDEY, 2003).

Uma variedade de micro-organismos incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias pode ser usada nos processos de FES. Entretanto, devido ao baixo teor de umidade no meio de fermentação, os fungos filamentosos e as leveduras têm sido mais empregados nestes processos devido à habilidade de crescerem em ambientes com essas características (MARTINS et al., 2011).

Os fungos filamentosos têm recebido grande atenção devido à habilidade de produzirem enzimas termoestáveis de alto valor científico e comercial, tais como amilases, pectinases, xilanases, celulasas, quitinases, proteases, lipases, β -galactosidases, entre outras (CHRISTAKOPOULOS; MACRIS; KEKOS, 1990).

Os fungos filamentosos tornaram-se amplamente utilizados para a produção comercial de ácidos orgânicos. Como exemplo, pode-se citar a produção do ácido cítrico por *Aspergillus niger* (SANDHYA; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2005).

A escolha do resíduo como substrato e do micro-organismo para a fermentação é importante e interfere no processo de obtenção de diferentes compostos fenólicos através da fermentação. Pesquisadores relataram o efeito de três diferentes micro-organismos na fermentação de farelo de aveia como fonte de compostos fenólicos. Após a FES, os ácidos fenólicos, cafeico e ferúlico, respectivamente, apresentaram 230 e 790% de aumento para *Aspergillus oryzae* var. Efuses, 170 e 450% para *Aspergillus niger*, e 37 e 0% para *Aspergillus oryzae*. De acordo com as análises, os compostos fenólicos em maiores quantidades são os ácidos cafeico e ferúlico, que estão na forma esterificada. Com a hidrólise por micro-organismos, estes compostos aumentaram a solubilidade e facilitaram sua extração, mostrando grande vantagem sobre outros processos que utilizam altas temperaturas e, portanto, geram altos custos de energia. Esta diferença nos resultados obtidos dos compostos fenólicos está relacionada com a atividade metabólica e os vários tipos de enzima de cada micro-organismo (MADEIRA JUNIOR; TEIXEIRA; MACEDO, 2015).

2.6 A ESPÉCIE *Aspergillus oryzae*

Os fungos são um grupo de micro-organismos eucariotos morfologicamente complexos e amplamente distribuídos no mundo. Possuem um papel importante na natureza por serem decompositores biológicos. Dentre os fungos, os ascomicetos e os basidiomicetos saprófitos são os mais eficientes na decomposição da biomassa lignocelulósica e conseguem se adaptar às diferentes fontes de carbono e nitrogênio (BOUWS; WATTENBERG; ZORN, 2008).

O filo Ascomiceto se diferencia pela reprodução, onde há produção de esporos em ascos (esporângios). A maior parte dos Ascomicetas são filamentosos, ou seja, exibem formas estruturais distintas durante seu ciclo de vida. A estrutura vegetativa básica é a hifa, um filamento tubular originado da germinação do esporo reprodutivo. O crescimento da hifa produz micélios. Quando o micélio se encontra em culturas líquidas, ele apresenta diferentes formas, entre filamentos de micélios dispersos às massas miceliais densas. O crescimento em forma de hifas permite ao organismo colonizar e utilizar eficientemente o substrato (MONCLARO, 2014; PAPAGIANNI, 2004).

O gênero *Aspergillus* compreende um grupo de fungos filamentosos no qual foram identificadas muitas espécies. Muitas delas são de fungos patogênicos produtores de

aflatoxinas, tais como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, e *Aspergillus parasiticus*. Por outro lado, muitas espécies de *Aspergillus* possuem grande importância industrial (DE VRIES; VISSER, 2001).

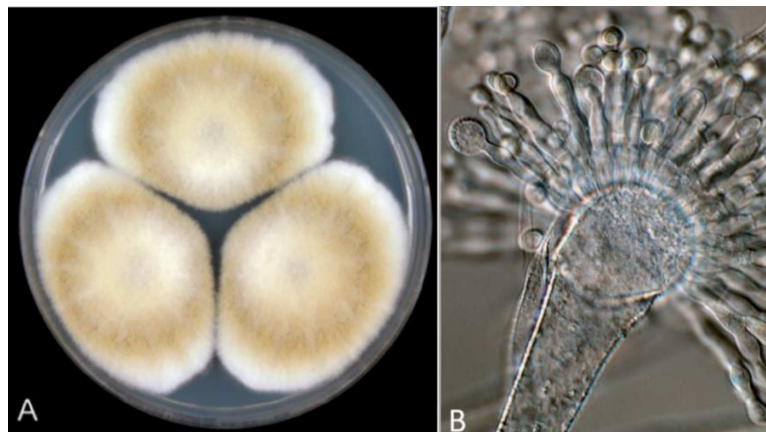
Dentre as espécies amplamente utilizadas na indústria destaca-se a *Aspergillus oryzae*. Apesar de *A. oryzae* e *A. flavus* pertencerem ao mesmo grupo *flavus*, do subgênero *Circundati*, *A. oryzae*, diferentemente do *A. flavus*, não produz aflatoxinas. O longo histórico de uso na indústria alimentícia para produção de alimentos fermentados tradicionais, tais como saquê (vinho de arroz), miso (pasta de soja) e *shoyu* (molho de soja) por mais de 1.000 anos tem provado sua segurança (MACHIDA et al., 2005; ODA et al., 2006).

Tanto *A. oryzae* quanto as enzimas por ele produzidas estão na lista da *Food and Drug Administration* (FDA) como *Generally Recognized as Safe* (GRAS), e a segurança desse fungo é também garantida pela Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO, 1988).

A. oryzae pode ser cultivado tanto em estado sólido quanto em cultura submersa. O cultivo em estado sólido aproxima-se mais das condições naturais do que o crescimento em uma cultura submersa, resultando em uma produção enzimática até 500 vezes mais eficiente, como observado na produção de quimosina pela cultura de *A. oryzae* em estado sólido no farelo de trigo (ODA et al., 2006; TSUCHIYA et al., 1994).

A. oryzae é um fungo filamentosso aeróbico. Nos estágios iniciais de seu crescimento, as colônias possuem coloração branca que, posteriormente, tornam-se esverdeadas. Os esporos assexuais (conídios) são facilmente formados e liberados no ar (Figura 4) (BARBESGAARD; HELDT-HANSEN; DIDERICHSEN, 1992).

Figura 4 – Imagem ilustrativa macroscópica (A) e microscópica (B) de *Aspergillus oryzae*



Fonte: ADAPTADO DE VARGA; FRISVAD; SAMSON, 2011

2.7 ESTUDOS DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA

A pele está envolvida em vários processos físicos e bioquímicos, sendo o mais importante deles a função protetora, prevenindo tanto a passagem de substâncias exógenas estranhas como a perda de líquidos do corpo. É dividida basicamente em três regiões funcionalmente distintas: epiderme, derme e hipoderme (SINGH; KUMAR, 2014).

A epiderme é a camada mais externa da pele, sendo avascularizada e constituída de um epitélio estratificado, escamoso e queratinizado. A epiderme está apoiada sobre a membrana basal que é aderida a derme, sendo essa membrana basal responsável pelo fornecimento de nutrientes. A diferenciação das células presentes na camada basal conduz à formação do estrato córneo, que é a camada mais externa da pele, constituído por queratinócitos e corneócitos (queratinócitos maduros) e responsável pela baixa permeabilidade cutânea (GOMES; REIS, 2003).

O estrato córneo é de grande importância para os estudos de penetração cutânea, uma vez que, pela estrutura e composição, é a principal barreira limitante à difusão percutânea de compostos. É formado por uma estrutura bifásica de lipídioproteína onde os corneócitos ficam dispersos em uma matriz rica em lipídios não polares como ceramidas, ácidos graxos livres, esteroides e triacilglicerois (GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008).

A derme possui espessura maior que a epiderme, sendo constituída por fibroblastos, colágeno e elastina, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e terminações nervosas, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (BARRY, 1983; CHIEN, 1992). A presença de elevado volume sanguíneo na pele age como condição *sink* [condição de não saturação do sistema dinâmico (SILVA et al., 2010)] para moléculas que sofreram difusão e atingiram os capilares, mantendo baixas as concentrações de substâncias que penetraram na derme, maximizando o gradiente de concentração na epiderme e promovendo, dessa forma, a absorção percutânea (AULTON, 2002). A hipoderme é constituída principalmente por adipócitos que atuam na proteção mecânica e regulação térmica da pele (NIELLOUD; MARTI-MESTRES, 2000).

A pele é um tecido altamente metabólico e atua na proteção física, microbiológica e bioquímica para os órgãos internos, sendo provida com grande número de mecanismos de defesa antioxidante (KOHEN; GATI, 2000). Os mecanismos de defesa antioxidante podem ser sistemas enzimáticos tais como catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, e não enzimáticos tais como glutathione, α -tocoferol, ácido ascórbico e β -caroteno (STEENVOORDEN et al., 2001).

Sob tensão normal de oxigênio, tais mecanismos são suficientes para manter a homeostasia, removendo os radicais livres produzidos. No entanto, sob circunstâncias que promovam aumento no estresse oxidativo tais como a exposição à radiação UV, poluentes e cigarro, a concentração de radicais livres aumenta incontrolavelmente, rompendo o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante no organismo em favor do primeiro (SIERENS et al., 2001).

Tem sido demonstrado que muitos agentes com propriedade antioxidante exercem efeitos anti-inflamatório e anti-carcinogênico na pele. Isto sugere a possibilidade de agentes específicos serem endereçados a alvo definido e a eventos moleculares estabelecidos para prevenção e tratamento de uma variedade de desordens da pele humana. Estes agentes, sozinhos ou em formulações, poderiam ser utilizados como quimioprotetores. Para isso, os compostos bioativos devem permear pelo estrato córneo e atingir as camadas profundas da pele sem atingir a circulação sistêmica (MARTI-MESTRES et al., 2007).

A penetração de um composto na pele é determinada por suas propriedades físico-químicas, em particular ao peso molecular e a lipofilicidade, que possui grande importância nos processos de permeação cutânea. Para uma boa penetração no estrato córneo e epiderme, o ideal é que o composto apresente boa solubilidade tanto em água quanto em óleo, apresentando um coeficiente de partição octanol-água (logP) entre 1 e 2, e massa molecular de até 500 Da. Além disso, mesmo com essas características, a penetração ainda pode ser aumentada pelo uso de formulações tópicas (HUBER et al., 2014).

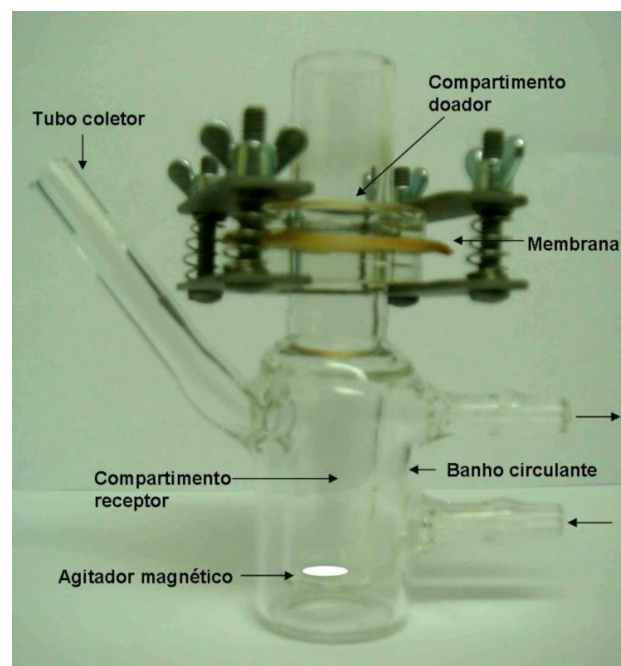
As principais vias pelas quais um composto atravessa o estrato córneo são pela difusão ao redor dos corneócitos permanecendo dentro da matriz lipídica (via intercelular), atravessando os corneócitos (via transcelular) ou estabelecendo uma rota paralela na qual os compostos podem ser absorvidos pelo folículo piloso, glândulas sebáceas e sudoríparas (via apêndices). Entretanto, a penetração via apêndices é considerada pequena uma vez que os apêndices representam somente aproximadamente 0,1% da superfície corporal (MOSER et al. 2001).

No que diz respeito às propriedades de absorção e penetração cutânea das substâncias na pele, métodos *in vitro* e *in vivo* são adequados. No entanto, os experimentos *in vitro* são preferidos por razões éticas e de disponibilidade. O método de difusão em célula de Franz tem sido muito utilizado na quantificação da penetração de compostos na pele (VARVARESOU, 2006).

A célula de difusão clássica consiste em um compartimento doador (superior) e outro receptor (inferior) que são separados pela amostra de pele. O compartimento receptor é preenchido por um fluido, geralmente um tampão adicionado de um agente tensoativo, que

simula a circulação sanguínea (Figura 5). A amostra teste é colocada sobre o disco de pele e a difusão através da pele é medida no compartimento receptor e nas diferentes camadas da pele. A permeação de compostos que saem do compartimento doador e passam para o receptor geralmente é determinada pela quantificação empregando-se técnicas analíticas seletivas e de alta sensibilidade, geralmente a CLAE, uma vez que a quantidade da substância a ser analisada normalmente é muito pequena (MOSER et al., 2001).

Figura 5 - Imagem ilustrativa da célula de difusão de Franz



Fonte: VILELA, 2010

A melhor e mais relevante fonte de pele a ser utilizada nos experimentos é, sem dúvida, a pele humana. Entretanto, devido a questões éticas e dificuldade de obtenção, modelos animais têm sido sugeridos como substitutos. O modelo de pele de orelha de porco tem sido amplamente utilizado por ser de fácil obtenção em abatedouros, possuir características bioquímicas e histológicas similares e fornecer resultados comparáveis à pele humana (CHAMBIN; BEVAN; TEILLAUD, 1993; GODIN; TOUITOU, 2007). Devido ao fato de que a difusão passiva é a principal rota de penetração, a viabilidade da pele não é requisito para o teste de penetração cutânea (DIEMBECK et al., 1999).

Diferentes constituintes do café têm sido sugeridos como potencialmente quimioprotetores em diferentes sistemas químicos e biológicos principalmente pela propriedade antioxidante dos compostos, capazes de proteger contra a radiação UVB, neutralizar os radicais

livres, sendo empregados principalmente como protetores solares e na prevenção do envelhecimento da pele (HERMAN; HERMAN, 2013).

A cafeína é um dos constituintes do café que tem seu uso cosmético aumentado devido às propriedades biológicas de redução da celulite e gordura subcutânea uma vez que estimula a degradação de gorduras durante a lipólise por meio da inibição da atividade da fosfodiesterase. Além disso, a cafeína tem sido utilizada em cosméticos com o objetivo de retardar o fotoenvelhecimento da pele e também estimular o crescimento de cabelos devido à inibição da atividade da 5- α -redutase, enzima que converte a testosterona em di-hidrotestosterona (DHT), que é responsável pela calvície (HERMAN; HERMAN, 2013). O uso da cafeína em produtos cosméticos destinados a redução de olheiras também já tem efeito comprovado (AMNUAIKIT; MANEENUAN; BOONME, 2011).

Os ácidos clorogênicos, cafeico e ferúlico também têm ganhado destaque nos produtos cosméticos. O ácido ferúlico é um potente antioxidante capaz de proteger as membranas celulares contra a peroxidação lipídica, sequestrar radicais livres e absorver a radiação UV. Observou-se que a combinação de ácido ferúlico com outros antioxidantes como o ácido ascórbico e o α -tocoferol em formulações cosméticas promoveu um efeito sinérgico contra o estresse oxidativo na pele e tem potencial para ser usado contra o fotoenvelhecimento e prevenção do câncer de pele (LIN et al., 2005).

O ácido cafeico também é um potente antioxidante com atividade comprovada por vários métodos quantitativos quando comparados a antioxidantes como o butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), α -tocoferol e Trolox. A incorporação do ácido cafeico em formulações tópicas também tem sido indicada para a prevenção dos danos induzidos pela radiação UV e prevenção do fotoenvelhecimento e câncer de pele (MAGNANI et al., 2014).

Foi demonstrada uma melhor penetração do ácido ferúlico (massa molecular: 194 g/mol e logP: 1,51) em células intestinais (linhagem Caco-2) quando comparada ao ácido clorogênico (massa molecular: 354 g/mol e logP: -0,48), atribuída principalmente a menor massa molecular do ácido ferúlico e maior lipofilicidade (FARREL et al., 2012).

Em um estudo realizado, soluções aquosas de ácidos cafeico e ferúlico foram testadas topicamente em pH 3 e 7,2 e foi observada a permeação cutânea. A lipofilicidade do ácido ferúlico é maior que do ácido cafeico (massa molecular: 180 g/mol e logP: 1,15) e atribuiu-se este fato à sua maior penetração através do estrato córneo, reduzindo o eritema induzido pelos raios UV (SAIJA et al., 2000).

Finalmente, o cenário mercadológico promissor do uso do café na aplicação cosmética pode ser exemplificado pelo lançamento do *Coffeeberry*[®], um extrato produzido pelo

laboratório Stiefel (Stiefel Laboratories, Inc., Atlanta, GA) a partir de grãos de café verde, uma vez que a atividade antioxidante desses grãos é maior do que daqueles maduros. O *Coffeeberry*[®] contém polifenóis como ACG, proantocianidinas condensadas e ácidos quínico e ferúlico. Foi também demonstrada a capacidade do extrato em regular a expressão de genes responsáveis pela síntese do colágeno e de inibir a sínteses das metaloproteinases, enzimas que atuam na degradação dessa substância. O mesmo laboratório lançou a linha de produtos chamada *RevaleSkin*[™] (Stiefel Laboratories, Atlanta, GA), que contém o *Coffeeberry*[®], constituída por um produto de limpeza da pele, um creme para noite e outro para uso diário, garantindo uma linha de cuidados antioxidantes para a pele e de proteção contra as radiações UVA e UVB (FARRIS, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral potencializar a atividade antioxidante e a penetração cutânea de metabólitos secundários presentes no extrato hidroetanólico de café verde obtido por meio da biotransformação dos grãos por *Aspergillus oryzae*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Abaixo, seguem os objetivos específicos norteados pela proposta geral supramencionada:

- a) Realizar a biotransformação de grãos de café verde *Coffea arabica* L. por *Aspergillus oryzae* em diferentes tempos de fermentação e obter os extratos hidroetanólicos;
- b) Determinar os teores de ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ), ácido cafeico e cafeína nos extratos hidroetanólicos não biotransformado e biotransformado;
- c) Realizar a secagem dos extratos empregando a técnica de liofilização;
- d) Avaliar a atividade antioxidante dos extratos pelos métodos de DPPH· espectrofotométrico e de CCD;
- e) Caracterizar quimicamente os diferentes extratos liofilizados por CLUE-EM-Q-TOF;
- f) Incorporar o extrato biotransformado liofilizado selecionado em formulação tópica do tipo gel-creme;
- g) Avaliar a penetração do 5-ACQ, ácido cafeico e cafeína *in vitro* utilizando células de Franz.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

O café verde (*Coffea arabica* L.) (Rubiaceae) foi adquirido da Cooperativa dos Cafeicultores das Matas de Minas, Viçosa, Minas Gerais, em outubro de 2015 e o material vegetal foi armazenado sob refrigeração (2-8 °C). Os grãos foram moídos em moinho de facas (SOLAB, modelo SL30). Em seguida, foi realizada a padronização da granulometria do material utilizando tamis de malha nº 20.

4.2 PREPARO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS

A cepa *Aspergillus oryzae* CCDCA 102604, isolada de amostras de pimenta do reino, foi obtida da Coleção de Culturas de Micro-organismos do Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras. Este Departamento é credenciado como fiel depositária de amostras pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético do Ministério do Meio Ambiente.

A manutenção do fungo se deu por repique em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) inclinado (HiMedia, Índia) previamente esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Os repiques foram realizados em cabine de segurança biológica e mantidos em estufa a 25 °C em aerobiose por 7 dias (PALMIERI, 2017). Em seguida, com o auxílio de alça microbiológica, esporos presentes na superfície do meio foram transferidos para tubos de ensaio 13 x 100 mm contendo 10 mL de solução salina estéril. A concentração celular do inóculo foi obtida por contagem em câmara de Neubauer e a suspensão de esporos foi ajustada para uma concentração de 1×10^7 esporos/mL (GEORGETTI et al, 2009).

4.3 BIOTRANSFORMAÇÃO DO CAFÉ VERDE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

Os ensaios para FES foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 10 g de café verde moído. Os frascos contendo o café foram umedecidos com 1 mL de água destilada de forma homogênea e esterilizados por calor úmido a 121 °C por 15 minutos.

Ao café resfriado foi adicionado 1 mL da suspensão de esporos padronizada (1×10^7 esporos/mL) e, para que todo o inóculo fosse absorvido pelo café de forma uniforme, foi feita

uma homogeneização com auxílio de bastão de vidro estéril. As amostras inoculadas foram incubadas a 25 °C por 24, 36 e 48 horas. Os cultivos foram feitos em triplicata, assim como o controle, ao qual foi adicionado 1 mL de solução salina em substituição à suspensão de esporos (PALMIERI, 2017).

4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS

Após a biotransformação por 24, 36 e 48 horas, os cultivos foram interrompidos com a adição de 70 mL de etanol 80% (v/v) a cada frasco Erlenmeyer, seguido de agitação em *shaker* a 200 rpm por 2 horas a 25 °C. Os extratos hidroetanólicos controle e biotransformados foram filtrados à vácuo em papel de filtro de 12,5 µm, acondicionados em frascos de vidro âmbar e mantidos refrigerados (2-8 °C).

4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS

Os teores de sólidos totais dos extratos hidroetanólicos (mg de sólidos totais/mL de extrato) foram determinados em balança com sistema de aquecimento por infravermelho, na qual os extratos obtidos foram submetidos à temperatura de 130 °C até peso constante. Os teores de sólidos totais foram considerados para o cálculo da concentração dos diferentes extratos.

4.6 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

4.6.1 Padrões e solventes

Os reagentes utilizados foram metanol grau CLAE (J.T. Baker, EUA), água ultrapurificada em sistema Milli-Q (Millipore[®]) e ácido fosfórico P.A. (Quimex[®], pureza de 85%). Todos os solventes foram previamente filtrados em membrana PVDF de 0,45 µm com o auxílio de um sistema acoplado à bomba de vácuo e degaseificados durante 15 minutos com o auxílio de banho de ultrassom. Os padrões de ácido cafeico (pureza ≥ 98%), 5-ACQ (pureza ≥ 95%) e cafeína (pureza ≥ 99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil).

4.6.2 Preparo dos padrões e amostras

Os padrões de 5-ACQ e cafeína foram diluídos em água/metanol (95:5 v/v) nas concentrações 25, 50, 100, 150 e 200 µg/mL. O padrão de ácido cafeico foi diluído em 100% de metanol nas concentrações 0,5, 2,0, 25,0, 50,0, 100,0 e 150,0 µg/mL. As triplicatas dos extratos hidroetanólicos de café não biotransformado e biotransformado por 24, 36 e 48 horas foram diluídos em água/metanol (95:5 v/v) até a obtenção da concentração de 2 mg/mL.

Todas as soluções de padrões e amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 10000 rpm e filtradas em filtros PVDF de 0,45 µm acoplados às seringas.

4.6.3 Condições cromatográficas e determinação dos teores de ácido 5-cafeoilquínico, cafeína e ácido cafeico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A quantificação de 5-ACQ, ácido cafeico e cafeína realizada por CLAE utilizando-se aparelho modular da marca Waters® composto por uma bomba binária modelo 1525, detector de arranjo de diodos (DAD) modelo 2998 e injetor automático modelo 2707. Os dados coletados das amostras e padrões foram tratados e analisados utilizando o *software* Empower® 3.

Foi empregada a técnica de cromatografia de fase reversa utilizando uma coluna C18 modelo Promosil® (Agela Technologies) de 150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm. As fases móveis utilizadas foram uma combinação de água ultrapurificada acidificada com 0,1% de ácido fosfórico (Fase móvel A) e metanol (Fase móvel B) seguindo o gradiente de eluição conforme Tabela 1. A vazão utilizada durante a análise foi de 1 mL/minuto e a coluna cromatográfica foi mantida em forno de aquecimento a 30 °C (PALMIERI, 2017).

Tabela 1 - Composição das fases móveis utilizadas para quantificação de ácido 5-cafeoilquínico, ácido cafeico e cafeína no sistema de eluição por gradiente

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	95	5
20	60	40
30	0	100
40	0	100
50	95	5

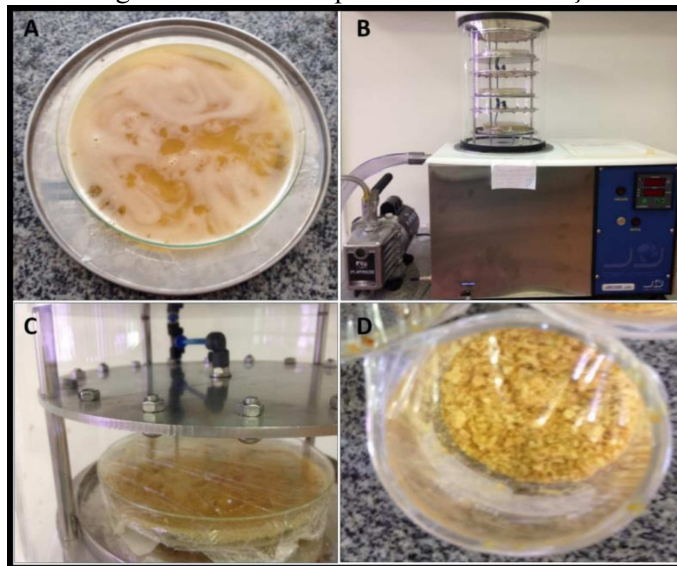
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

Os picos foram detectados através de detector de arranjo de diodos em dois diferentes comprimentos de onda, 272 e 330 nm. A identificação foi feita por comparação dos tempos de retenção obtidos das amostras e dos padrões analisados nas mesmas condições e pelos espectros de absorção obtidos.

4.7 LIOFILIZAÇÃO DOS EXTRATOS

As triplicatas de extratos hidroetanólicos obtidos após cada tempo do processo de biotransformação foram reunidas e rotaevaporadas a 40 °C para retirada do solvente utilizando rotaevaporador (Buchi®, modelo V300). Após evaporação do solvente, as amostras foram congeladas em *ultrafreezer* a -56 °C e liofilizadas na faixa de temperatura de -45 a -50 °C e pressão de 150-200 mmHg (JJCientífica®, modelo LJJ104F, São Carlos, SP) (Figura 6).

Figura 6 – Imagem ilustrativa do processo de liofilização dos extratos



Extrato rotaevaporado (A), processo de liofilização (B,C), e extrato seco liofilizado (D).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

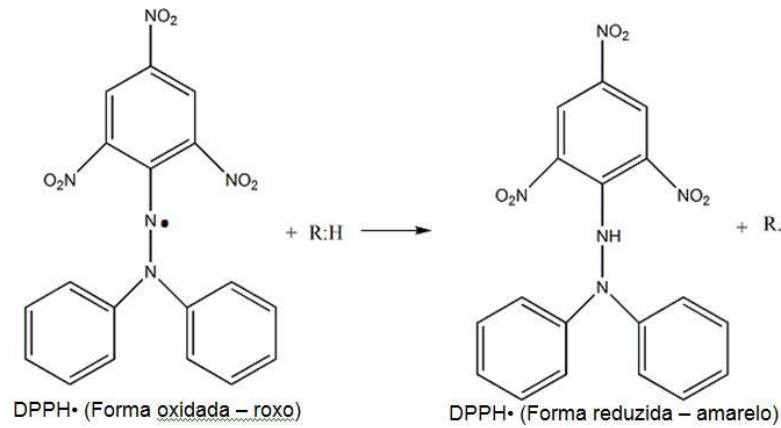
4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS

4.8.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) em espectrofotômetro

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada empregando-se o método DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), que avalia a capacidade dos compostos antioxidantes presentes nas amostras em sequestrar o radical estável DPPH• (Figura 7). A solução de DPPH• em sua forma oxidada possui coloração roxa e quando o radical transfere seu elétron, devido à redução promovida pela espécie antioxidante, essa solução se descolore até atingir coloração amarela

clara de forma estequiométrica ao número de moléculas de radicais DPPH• reduzidas. A reação é monitorada pelo decréscimo da absorbância (BLOIS, 1958).

Figura 7 – Imagem ilustrativa do mecanismo de reação do DPPH• com uma substância antioxidante



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

Para a avaliação da atividade antioxidante, os diferentes extratos liofilizados obtidos foram inicialmente diluídos em etanol 80%, seguidos de uma segunda diluição em etanol 100% a fim de se obter cinco concentrações (10, 20, 40, 60 e 80 µg/mL).

A critério de comparação foi avaliada também a atividade antioxidante do padrão de quercetina nas concentrações de 1, 2, 4, 6 e 8 µg/mL.

O ensaio consistiu da adição de 1 mL da solução etanólica de DPPH• (0,45 mM) a 4 mL das preparações dos extratos liofilizados e ao padrão de quercetina nas concentrações acima citadas. A análise foi acompanhada de um controle positivo que continha todos os constituintes do meio reacional, exceto a amostra, e do branco que continha todos os constituintes do meio reacional, exceto a solução do DPPH•. Após 30 minutos da reação as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (Micronal; modelo B582) no comprimento de onda de 517 nm.

A atividade antioxidante foi expressa pela porcentagem de redução da absorbância da amostra, no meio reacional, em relação à absorbância do controle positivo, como demonstrado pela fórmula abaixo. A partir dos percentuais de inibição obtidos foram calculados os valores de CE₅₀ para cada extrato, isto é, a concentração eficaz de extrato capaz de reduzir em 50% a absorbância do controle positivo.

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{absorbância controle positivo} - \text{absorbância amostra})}{\text{absorbância controle positivo}} \times 100$$

4.8.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) em cromatografia em camada delgada (CCD)

Os extratos liofilizados e os padrões de quercetina, 5-ACQ, ácido cafeico e cafeína foram diluídos em metanol a fim de se atingir as concentrações de 2 mg/mL para os extratos e 200 µg/mL para os padrões. Aliquotas de 10 µL das amostras foram aplicadas diretamente em placas de sílica gel Alugram[®] Xtra SIL G/UV254 (Macherey-Nagel) e evaporadas sob fluxo de ar. Foi utilizado o sistema eluente constituído por acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (100:11:11:10, v/v/v/v). O cromatograma foi desenvolvido em cuba de vidro com atmosfera saturada.

As placas foram removidas da cuba, secas com ar quente e visualizadas em luz UV 254 nm. Em seguida, a placa foi borrifada com solução de DPPH• 0,2%. As bandas com atividade sequestradora do radical DPPH foram observadas como bandas amareladas no fundo roxo da placa cromatográfica. A identificação dos compostos presentes nos extratos foi feita com base na comparação dos fatores de retenção (Rf) das amostras com o Rf dos padrões de 5-ACQ, cafeína e ácido cafeico. Foi utilizado como controle positivo o padrão de quercetina, comprovadamente um potente antioxidante.

4.9 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS DE CAFÉ POR CLUE-EM-Q-TOF

As análises foram realizadas na Central Analítica de Bioprodutos e Bioprocessos (CENTRALBIO) da Faculdade de Farmácia da UFJF utilizando o equipamento UPLC Acquity Xevo G2-S Q-TOF UPLC-MS (Waters, USA). O sistema é composto de um UPLC Acquity acoplado a um espectrômetro de massas quadrupolo do tipo *time of flight* (Q-ToF).

As amostras foram eluídas utilizando a coluna ACQUITY UPLC[®] BEH C18 (1.7 µm, 100 mm x 2.1 mm) (Waters, USA) a uma temperatura de 45 °C no forno de colunas. As amostras foram mantidas a 18 °C no injetor automático e o volume de injeção utilizado foi de 4,2 µL. O fluxo de análise utilizado foi de 0,306 mL/min com um tempo total de 13,6 minutos. A fase móvel A constituída de água acidificada (0,1% ácido fórmico) e a fase móvel B de metanol. A Tabela 2 abaixo contém detalhes sobre o gradiente utilizado durante a realização da análise:

Tabela 2 - Composição das fases móveis utilizadas no sistema de eluição por gradiente no método de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas com analisador Quadrupolo-Tempo-de-Voo (CLUE-EM-Q-TOF)

Tempo (minutos)	Fluxo (mL/min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)	Curva
0,00	0,306	95,0	5,0	6
5,44	0,306	60,0	40,0	6
8,16	0,306	0,0	100,0	6
10,88	0,306	0,0	100,0	6
13,60	0,306	95,0	5,0	1

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

A detecção por espectrometria de massas foi conduzida através da ionização por *electrospray* (ESI) utilizando o modo de detecção msE em modo negativo e positivo. As amostras foram detectadas utilizando duas funções: a) função 1, com baixa energia de ionização (6 eV), e b) função 2, aplicando uma rampa crescente de energia de colisão de 15 a 35 eV, que induz a fragmentação dos íons precursores, possibilitando a análise e elucidação de compostos em uma única injeção de amostras complexas. A faixa de relação massa/carga (m/z) monitorada foi de 100-900 Da.

Os seguintes parâmetros foram utilizados nos modos negativo e positivo: voltagem do capilar 3.00 kV, cone de amostragem 40 V, fonte de temperatura 150 °C, temperatura de dessolvatação 500 °C, fluxo de gás de dessolvatação 1000 L/h, fluxo de gás do cone 50 L/h. O *software* Masslynx v 4.1 foi utilizado para analisar os dados.

4.10 PREPARO DA FORMULAÇÃO TÓPICA

Foi preparada uma formulação do tipo gel creme a partir da mistura na proporção 1:1 (p/p) do gel base de hidroxietilcelulose com o creme base de cera auto-emulsificadora não iônica adquiridos em uma farmácia de manipulação (Juiz de Fora, MG). O gel base constituiu-se do polímero hidroxietilcelulose (Natrosol®) 2% (p/p), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1% (p/p), metilparabeno, propilparabeno, butilparabeno e fenoxietanol (Phenova) 0,3% (p/p), propilenoglicol 5% (p/p), imidazolidinil uréia 0,3% e água purificada q.s.p.

O creme base constituiu-se de EDTA dissódico, estearato de octila, cera autoemulsionante não iônica (Polawax NF), propilenoglicol, conservantes metilisotiazolinona e metilcloroisotiazolinona, BHT, ciclometicona e água purificada. A concentração dos ingredientes não foi fornecida pelo fabricante.

Os extratos de café biotransformado e não biotransformado liofilizados foram umectados em água purificada (q.s.p.) e incorporados no gel creme na concentração de 5% (p/p).

4.11 ESTUDO DE PERMEACÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

Os estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro* foram realizados com o objetivo de avaliar a penetração da cafeína, ácido cafeico e 5-ACQ na pele de orelha de porco tratada com formulações contendo extratos biotransformado ou não biotransformado. Foi feito também um controle com a formulação gel creme placebo.

Os experimentos foram conduzidos utilizando pele de orelha de porco, obtidas em abatedouro local (Juiz de Fora, MG). As orelhas foram lavadas com água corrente e a pele da porção externa da orelha foi cuidadosamente removida com a ajuda de bisturi. Vasos sanguíneos, gordura e pêlos foram removidos, sendo que somente o estrato córneo, a derme e a epiderme foram isoladas. As peles de orelha de porco foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o ensaio, por um período máximo de 30 dias.

Os estudos de penetração foram conduzidos utilizando-se células de Franz com compartimento de solução receptora com capacidade para 12 mL e área de difusão de $1,77\text{ cm}^2$. O meio receptor consistiu de um tampão fosfato 150 mM (pH 7,2) com 0,5% de polissorbato 20 (Tween 20[®]) mantido a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob constante agitação de 500 rpm em barra magnética.

A pele de orelha de porco foi colocada na parte superior da célula receptora, com o estrato córneo voltado para o compartimento doador e a derme voltada para o compartimento receptor da célula de difusão (Figura 8). Todo o cuidado foi tomado para se evitar a formação de bolhas de ar entre a pele e a solução receptora. Foi colocada sobre a pele 150 mg da formulação a ser testada. As células foram protegidas da luz com papel alumínio. Os experimentos foram realizados em quadruplicata.

Figura 8 – Imagem ilustrativa do teste de penetração cutânea em célula de Franz



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

Ao final de 12 horas, a solução receptora foi coletada, as peles de orelha de porco foram retiradas e limpas com algodões umedecidos com água destilada. A camada mais externa da epiderme, correspondente ao estrato córneo, foi retirada pressionando-se uniformemente 15 fitas adesivas tipo “durex” (*tape stripping*). As fitas foram descartadas. A pele remanescente (epiderme viável + derme) foi pesada, picotada e transferida para tubos de ensaio contendo 5 mL de metanol. Em seguida, a pele foi submetida à ultrassom por 30 minutos, agitada em vórtex por 1 minuto e posteriormente centrifugada durante 15 minutos a 3000 rpm. Os sobrenadantes obtidos foram recolhidos e filtrados em membranas com poros de 0,45 μm . A cafeína, o ácido cafeico e o 5-ACQ foram analisados na solução receptora e na epiderme e derme por CLAE utilizando-se o procedimento analítico descrito anteriormente.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa de estatística GraphPadPrism[®] (versão 6.0). Os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão (DP), comparando os diferentes grupos por análise de variância (ANOVA), seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 BIOTRANSFORMAÇÃO DO CAFÉ VERDE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

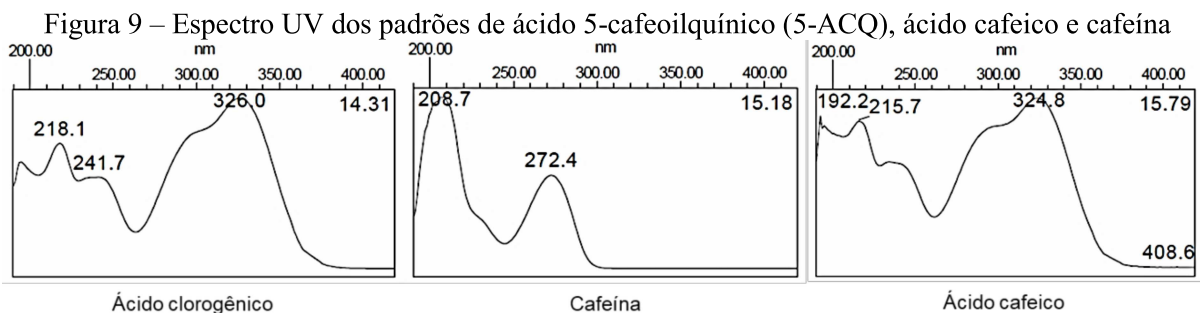
Ao final dos diferentes tempos de fermentação de 24, 36 e 48 horas e após a extração dos compostos fenólicos, foram obtidos os diferentes extratos hidroetanólicos.

Os extratos foram avaliados quanto ao teor de sólidos totais em balança de infravermelho. O extrato de café não biotransformado (controle) apresentou teor médio de sólidos totais de $1,98 \pm 0,33\%$ enquanto os extratos de café biotransformados por 24, 36 e 48 horas apresentaram valores de $2,11 \pm 0,05\%$, $1,31 \pm 0,10\%$ e $1,55 \pm 0,01\%$, respectivamente.

5.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

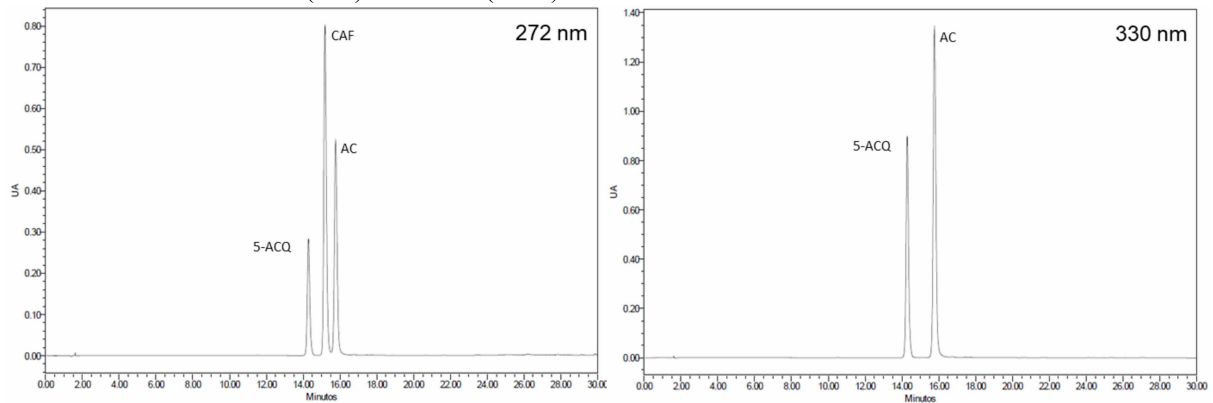
5.2.1 Determinação dos teores de ácido 5-cafeoilquínico, ácido cafeico e cafeína por CLAE

O sistema gradiente utilizado resultou na separação dos picos de interesse. A identificação dos compostos presentes nos extratos foi feita com base na comparação dos tempos de retenção e espectro UV dos compostos com os padrões de ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ), cafeína e ácido cafeico (Figuras 9 e 10).



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

Figura 10 – Cromatograma das soluções padrão de ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ), ácido cafeico (AC) e cafeína (CAF) analisados em 272 e 330 nm



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

O método analítico apresentou linearidade na faixa de concentração utilizada ($r > 0,990$) (BRASIL, 2017). As equações das retas e coeficientes de correlação linear (r) estão apresentados na Tabela 3. As retas obtidas foram utilizadas para a quantificação do 5-ACQ, cafeína e ácido cafeico nos extratos.

Tabela 3 - Equações das retas e coeficientes de correlação linear (r) obtidos a partir da curva de calibração das soluções de padrões de ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ), cafeína e ácido cafeico

Padrão	Comprimento de onda (nm)	Equação da reta	Coefficiente de correlação linear (r)
5-ACQ	330	$y = 152087,09x + 209455,07$	0,9998
Ácido cafeico	330	$y = 266449,19x + 377407,93$	0,9987
Cafeína	272	$y = 137372,48x - 450811,87$	0,9992

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

As análises cromatográficas por CLAE dos diferentes extratos demonstraram concentrações similares de 5-ACQ, cafeína e ácido cafeico nos extratos não biotransformados e biotransformados por 24 horas. Nos extratos de café biotransformados por 36 horas foi possível verificar alterações significativas nas concentrações desses compostos em relação ao controle. Ocorreu uma redução na concentração de 5-ACQ acompanhada de um expressivo aumento de ácido cafeico, que provavelmente está relacionado com a ação das esterases produzidas pelo fungo, capazes de clivar as ligações entre as moléculas dos ácidos cafeico e quínico que formam o 5-ACQ. No tempo de 36 horas também houve aumento significativo da cafeína.

A biotransformação do café por 48 horas promoveu a degradação quase total do 5-ACQ em relação aos outros tempos. A cafeína e o ácido cafeico também apresentaram reduções nas

respectivas concentrações quando comparadas ao tempo de 36 horas, o que sugere uma ação exaustiva das enzimas produzidas pelo fungo sobre os compostos presentes no café verde (Tabela 4 e Figuras 11 e 12).

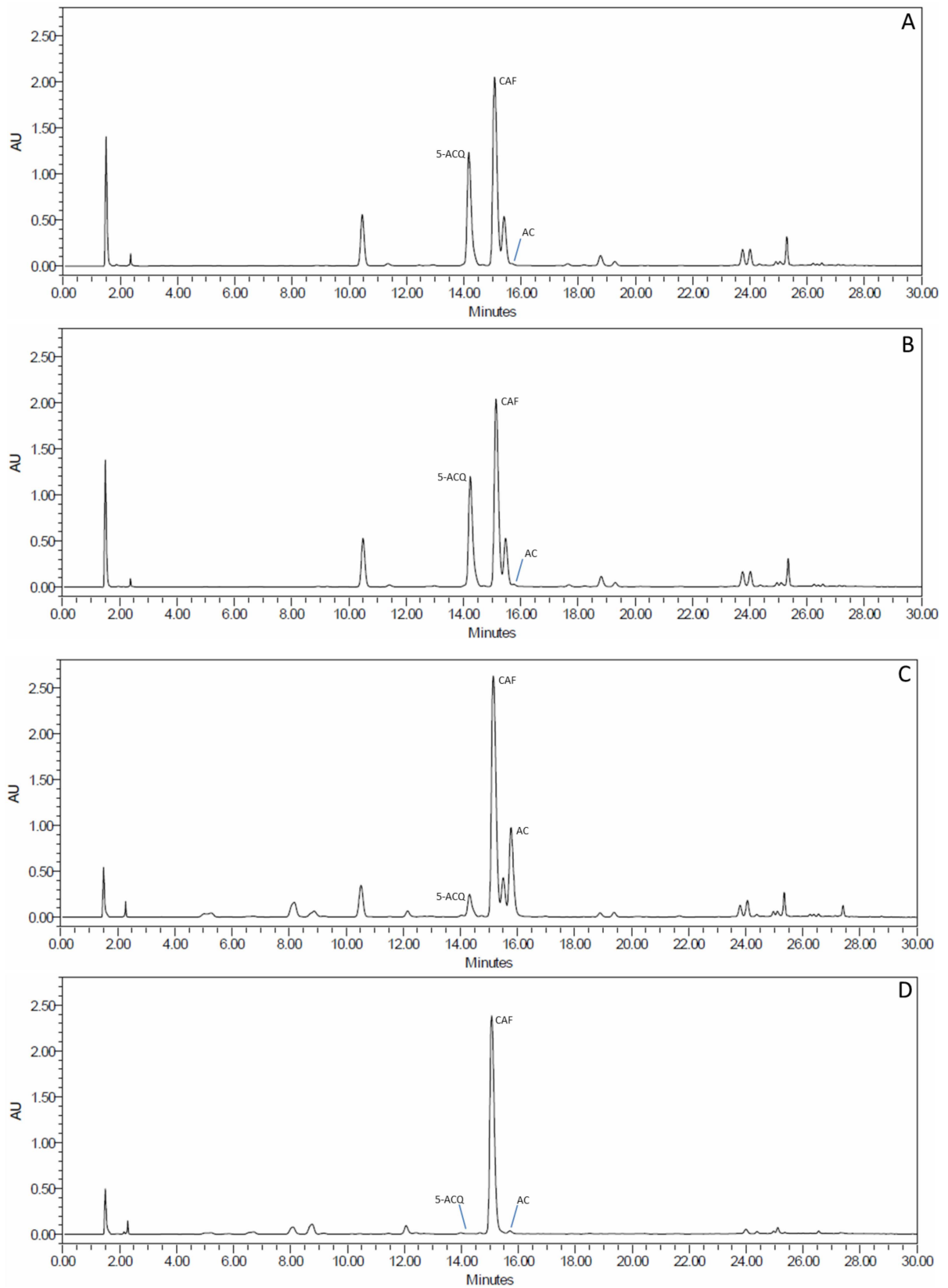
Tabela 4 Resultados das concentrações de ácido clorogênico (5-ACQ), cafeína e ácido cafeico nos extratos não biotransformados e biotransformados por 24, 36 e 48 horas

Extrato	Concentração (µg/mL)		
	5-ACQ	Ácido cafeico	Cafeína
Controle	238,51 ± 5,07 ^a	0,60 ± 0,11 ^a	152,09 ± 6,66 ^a
24 horas	236,51 ± 4,11 ^a	0,96 ± 0,12 ^a	149,27 ± 3,94 ^a
36 horas	47,15 ± 9,07 ^b	97,42 ± 5,98 ^b	213,59 ± 4,78 ^b
48 horas	0,45 ± 0,33 ^c	2,89 ± 1,07 ^a	192,70 ± 6,54 ^c

Os valores representam a média ± DP (n = 3). Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes (p < 0,05, ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey).

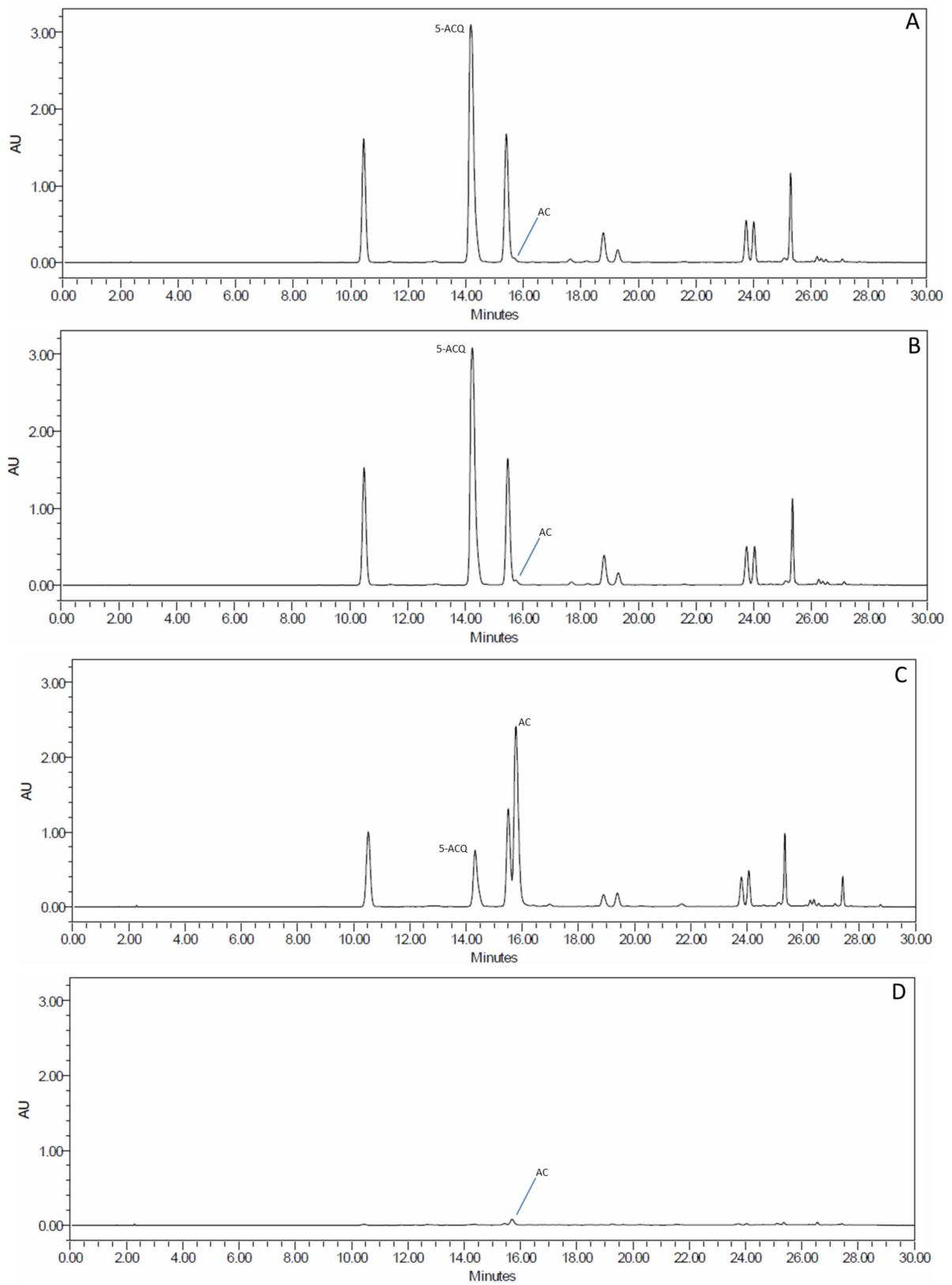
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

Figura 11 - Cromatogramas obtidos nas análises por CLAE dos extratos hidroetanólicos de café verde não biotransformado (A) e biotransformado por 24 (B), 36 (C) e 48 horas (D) em 272 nm



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

Figura 12 – Cromatogramas obtidos nas análises por CLAE dos extratos hidroetanólicos de café verde não biotransformado (A) e biotransformado por 24 (B), 36 (C) e 48 horas (D) em 330 nm



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

5.3 LIOFILIZAÇÃO DOS EXTRATOS

Após determinação dos teores de 5-ACQ, cafeína e ácido cafeico as réplicas dos extratos foram reunidas e submetidas ao processo de rotaevaporação do solvente seguido de liofilização. Os rendimentos de extrato seco liofilizado obtidos a partir de 30 g de café verde foram de 5,88 (19,63%), 4,59 (15,29%), 2,78 (9,28%) e 2,98 g (9,94%), para os extratos de café verde não biotransformado e biotransformados por 24, 36 e 48 horas, respectivamente. Sugere-se que o crescimento da biomassa do fungo esteja relacionado com o maior consumo de compostos presentes no café verde resultando em menor rendimento dos extratos liofilizados.

5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS

541 Atividade antioxidante pelo método 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) em espectrofotômetro

Os valores calculados de CE_{50} para os extratos não biotransformado (controle) e biotransformados nos tempos de 24, 36 e 48 horas foram, respectivamente, 43,9, 45,2, 43,4 e 170,8 $\mu\text{g/mL}$. O padrão de quercetina, substância conhecidamente antioxidante, apresentou CE_{50} igual a 5,8 $\mu\text{g/mL}$.

Apesar dos resultados das análises por CLAE terem demonstrado alterações quantitativas nos perfis cromatográficos dos diferentes extratos, não houve diferença na atividade antioxidante dos extratos não biotransformado (43,9 $\mu\text{g/mL}$) e biotransformados por 24 (45,2 $\mu\text{g/mL}$) e 36 (43,4 $\mu\text{g/mL}$) horas.

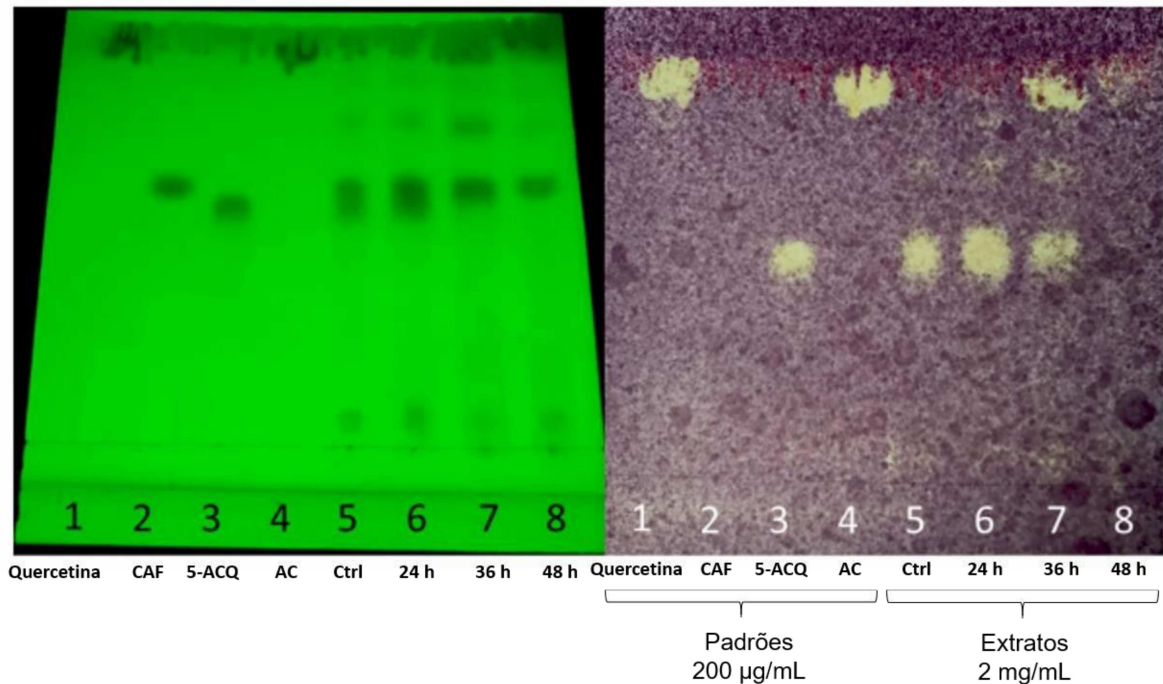
A redução do 5-ACQ observada nas análises por CLAE no tempo de 36 horas foi acompanhada do aumento de ácido cafeico, o que possivelmente contribuiu para a manutenção da atividade antioxidante, uma vez que esse composto possui comprovada capacidade antioxidante. O aumento da CE_{50} no extrato biotransformado por 48 horas corrobora os resultados cromatográficos por CLAE que claramente demonstraram a degradação do 5-ACQ e do ácido cafeico.

542 Atividade antioxidante pelo método 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) em cromatografia em camada delgada

A bioautografia dos extratos liofilizados foi realizada utilizando sistema eluente que resultou na separação dos compostos de interesse. Vários compostos responderam positivamente ao revelador DPPH•, apresentando coloração amarela. A placa cromatográfica revelada com DPPH• demonstrou que os compostos com maior contribuição para atividade antioxidante dos extratos investigados foram o 5-ACQ e o ácido cafeico. A cafeína foi visualizada somente durante a exposição da CCD à luz UV em 254 nm, uma vez que o composto apresentou baixa atividade antioxidante frente ao DPPH•.

De forma semelhante aos resultados obtidos nas análises por CLAE, a bioautografia demonstrou a manutenção da concentração de 5-ACQ no tempo de 24 horas quando comparada ao café verde não biotransformado seguida de redução parcial e total nos tempos de 36 e 48 horas, respectivamente. Considerando-se as intensidades das bandas, o ácido cafeico teve resposta antioxidante semelhante ao padrão de quercetina, apresentando aumento significativo da concentração no tempo de 36 horas, seguido de redução da concentração no tempo de 48 horas (Figura 13).

Figura 13 – Fotografia das placas de cromatografia em camada delgada visualizadas em luz ultravioleta (UV) em 254 nm (esquerda) e revelada com solução de DPPH 0,2% visualizada em luz visível (direita)



Foram aplicados na placa 10 µl dos extratos (2 mg/mL) e padrões (200 µg/mL). As manchas de 1-4 são referentes aos padrões de quercetina, cafeína (CAF), ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) e ácido cafeico (AC), respectivamente. As manchas de 5-8 são referentes aos extratos de café verde não biotransformado (Ctrl) e biotransformado por 24, 36 e 48 horas, respectivamente.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

5.5 Caracterização química dos extratos de café verde por CLUE-EM-Q-TOF

As amostras foram analisadas no equipamento CLUE-EM-Q-TOF, no qual a caracterização dos compostos foi realizada por meio da interpretação de seus espectros de massa e dos padrões de fragmentação obtidos, levando em consideração os dados fornecidos pela literatura, comparação do tempo de retenção e espectro de massas dos padrões de ácido quínico, ácido cafeico, cafeína e 5-ACQ.

Na análise em modo negativo de ionização, foram detectados nas diferentes amostras de forma majoritária compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos ácidos hidroxicinâmicos (Figuras 14, 15 e 16). As substâncias identificadas estão descritas na Tabela 5.

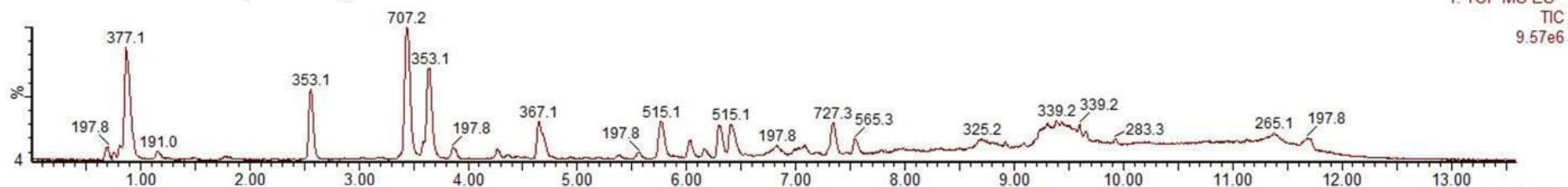
Tabela 5 - Caracterização dos compostos dos extratos de café não biotransformado e biotransformado por 24, 36 e 48 horas por CLUE-EM-Q-TOF em modo negativo

Composto proposto	Tempo de retenção (min)	Massa molecular (Da)	[M-H] ⁻	MS/MS (m/z)	Fórmula molecular	Controle	24 h	36 h	48 h	Referência
Ácido quínico	0,881	192	191,06	127	C ₇ H ₁₂ O ₆	✓	✓	✓	✓	CÁDIZ-GURREA et al., 2013; Padrão
Ácido cítrico	1,154	192	191,02	111	C ₆ H ₈ O ₇	✓	✓	✓	✓	CÁDIZ-GURREA et al., 2013
Ácido protocatecuico	2,398	154	153,02	109	C ₇ H ₆ O ₄			✓		RAMESHKUMAR et al., 2013
Ácido 3-o-cafeoilquínico (3-ACQ)	2,568	354	353,09	191, 179, 135	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	✓	✓	✓	✓	NCUBE et al., 2014; WILLEMS et al., 2016
Ácido 5-o-cafeoilquínico (5-ACQ)	3,442	354	353,09	191	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	✓	✓	✓	✓	NCUBE et al., 2014; WILLEMS et al., 2016; Padrão
Ácido feruloilquínico (isômero)	3,596	368	367,10	193, 134	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	✓	✓	✓	✓	NCUBE et al., 2014; CÁDIZ-GURREA et al., 2013
Ácido 4-o-cafeoilquínico (4-ACQ)	3,642	354	353,09	191, 179, 173, 135	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	✓	✓	✓	✓	NCUBE et al., 2014; WILLEMS et al., 2016
Ácido cafeico	3,842	180	179,04	135	C ₉ H ₈ O ₄	✓	✓	✓	✓	RAMESHKUMAR et al., 2013; Padrão
Ácido feruloilquínico (isômero)	4,647	368	367,11	191, 173	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	✓	✓	✓		NCUBE et al., 2014; CÁDIZ-GURREA et al., 2013
Ácido feruloilquínico (isômero)	4,694	368	367,11	191, 173	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	✓	✓	✓		NCUBE et al., 2014; CÁDIZ-GURREA et al., 2013
Ácido feruloilquínico (isômero)	5,383	368	367,11	191, 161	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	✓				NCUBE et al., 2014; CÁDIZ-GURREA et al., 2013
Ácido dicafeoilquínico (isômero)	5,764	516	515,12	353, 191, 179, 173, 135	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	✓	✓	✓	✓	CÁDIZ-GURREA et al., 2013
Ácido dicafeoilquínico (isômero)	6,402	516	515,12	353, 191, 179, 173, 135	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	✓	✓	✓		CÁDIZ-GURREA et al., 2013
Desconhecido	7,131	208	207,07	179, 161, 135	C ₁₁ H ₁₂ O ₄			✓		SUN et al., 2007

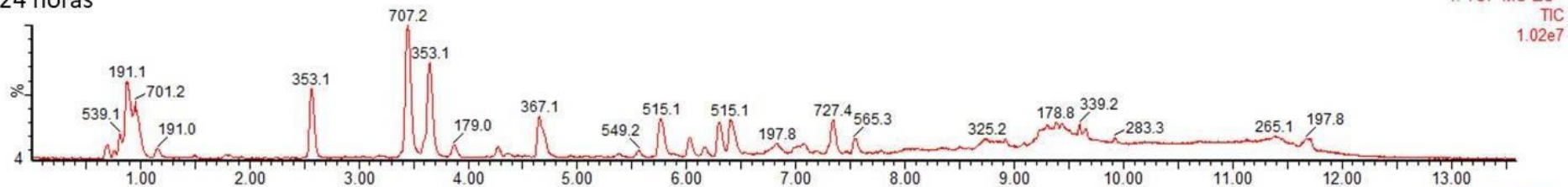
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

Figura 14 – Cromatogramas de íons totais dos extratos analisados por CLUE-EM-Q-TOF com ionização por *electrospray* em modo negativo

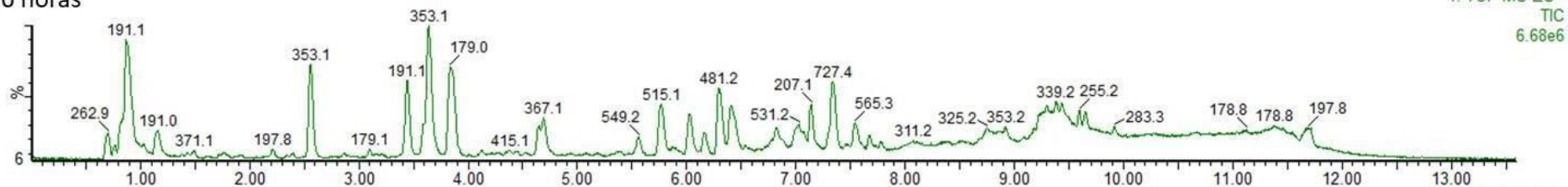
Não biotransformado (controle)



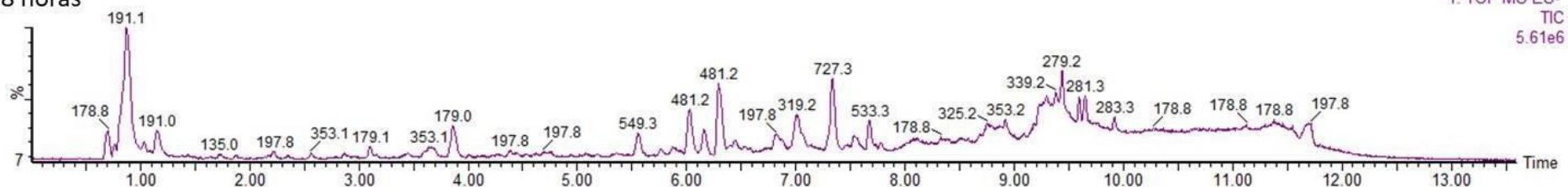
24 horas



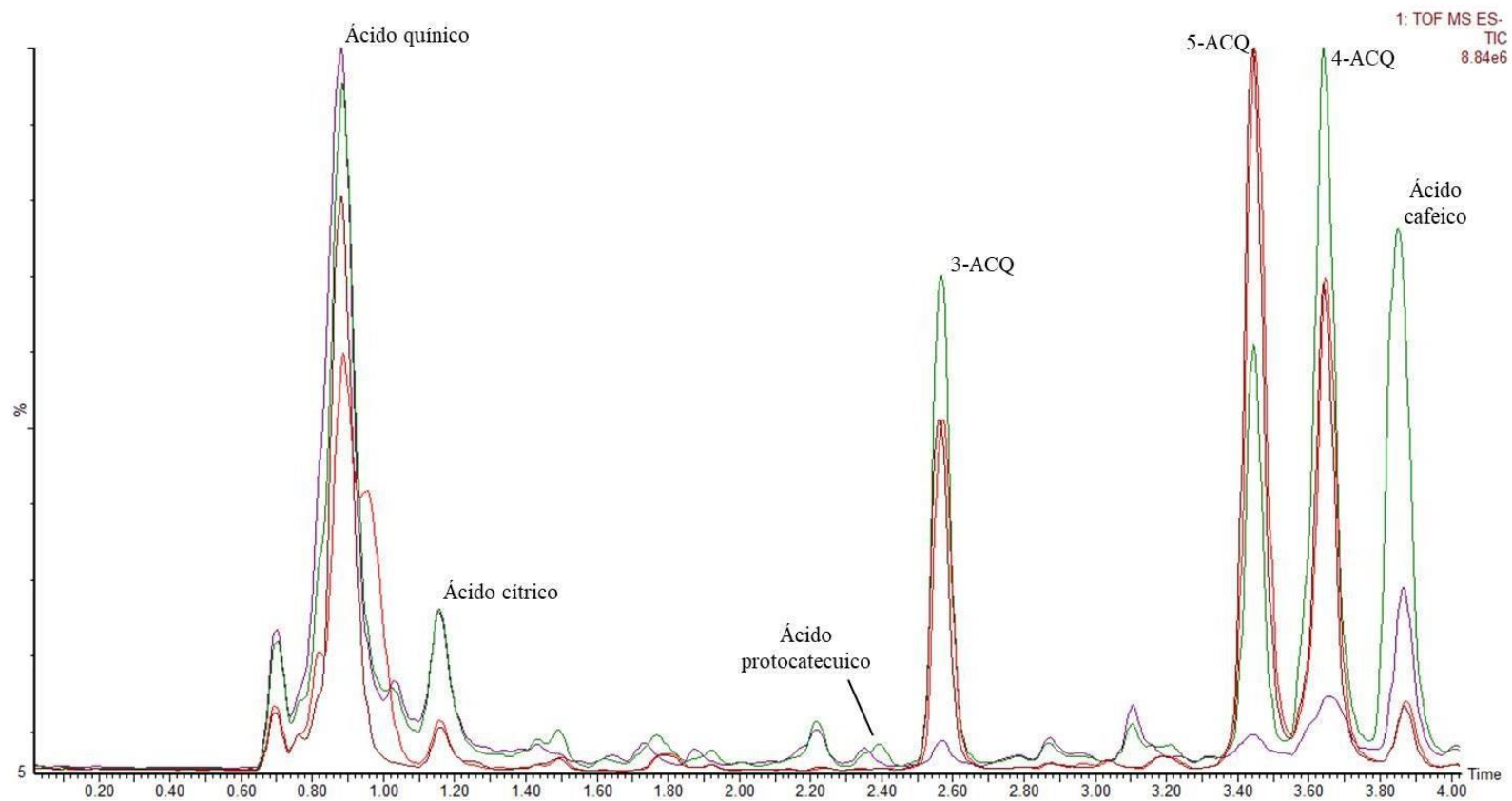
36 horas



48 horas

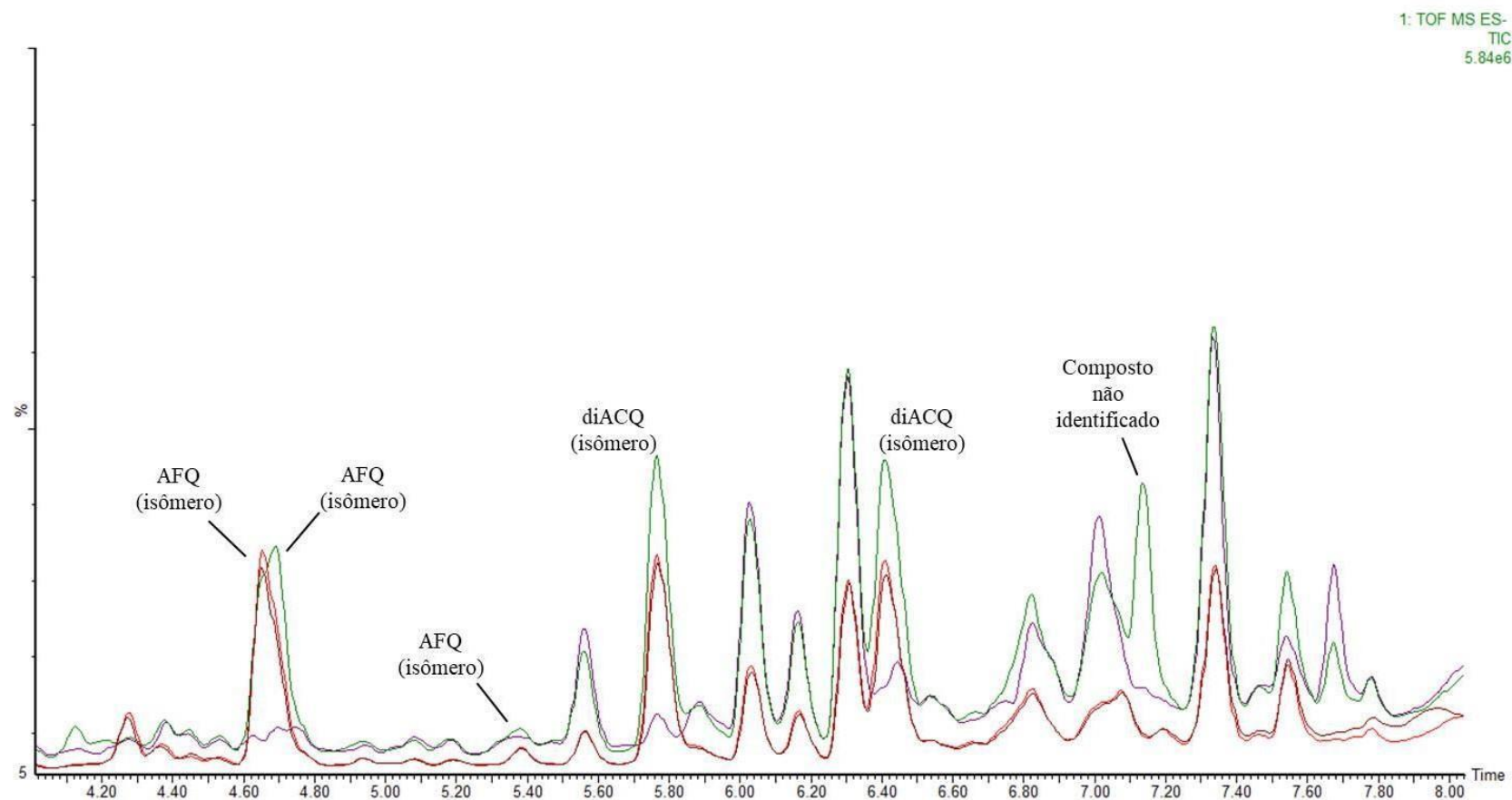


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

Figura 15 – Sobreposição dos cromatogramas de íons totais dos extratos analisados por CLUE-EM-Q-TOF com ionização por *electrospray* em modo negativo

(Vinho) Extrato não biotransformado, (Vermelho) Extrato biotransformado por 24 horas, (Verde) Extrato biotransformado por 36 horas e (Roxo) Extrato biotransformado por 48 horas.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

Figura 16 – Sobreposição dos cromatogramas de íons totais dos extratos analisados por CLUE-EM-Q-TOF com ionização por *electrospray* em modo negativo

(Vinho) Extrato não biotransformado, (Vermelho) Extrato biotransformado por 24 horas, (Verde) Extrato biotransformado por 36 horas e (Roxo) Extrato biotransformado por 48 horas.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Os resultados mostraram perfis químicos semelhantes dos extratos não biotransformado e biotransformado por 24 horas. No tempo de 36 horas ficou evidenciado o aumento dos ácidos quínico, cítrico, protocatecuico, 3-cafeoilquínico e 4-cafeoilquínico. Ocorreu também o aumento do ácido cafeico e isômeros do ácido dicafeoilquínico. No mesmo tempo foi observada a redução do 5-ACQ. Somente no extrato de café biotransformado por 36 horas foi detectado um composto não identificado, com tempo de retenção de 7,131 minutos, com íon molecular com m/z de 207 e fragmentos majoritários 179, 161 e 135, sugerindo que seja o composto ácido dimetilcafeico (SUN et al., 2007).

No tempo de 48 horas também ocorreu aumento dos ácidos quínico e cítrico em relação ao extrato de café não biotransformado, acompanhado da degradação quase total de todos os demais compostos avaliados.

Analisados conjuntamente, os resultados da análise em modo de ionização negativo sugerem a ação das enzimas (principalmente esterases) produzidas por *A. oryzae* a partir de 24 horas de FES, atuando principalmente na quebra das ligações ésteres dos ácidos clorogênicos cafeoilquínicos e feruloilquínicos, levando a um aumento dos ácidos cafeico e quínico. A atuação exaustiva dessas enzimas sobre os compostos presentes no café promoveu a degradação quase total dos mesmos conforme observado no extrato fermentado por 48 horas (BEL-RHLID et al., 2013).

Na análise em modo positivo de ionização, foram detectados nas diferentes amostras de forma majoritária compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos ácidos hidroxicinâmicos, as metilxantinas cafeína e teofilina, além do composto trigonelina (Figuras 17, 18 e 19). As substâncias identificadas estão descritas na Tabela 6.

Os resultados mostraram perfis químicos semelhantes dos extratos não biotransformado e biotransformado por 24 horas. No tempo de 36 horas ficou evidenciada a formação de teofilina, o aumento da cafeína e a redução da trigonelina e do 5-ACQ.

No tempo de 48 horas também houve aumento da teofilina e uma pequena redução de cafeína, acompanhado da degradação quase total dos isômeros do ácido clorogênico, ácido feruloilquinico e dicafeoilquinico.

É importante ressaltar o aumento de um composto não identificado, com tempo de retenção de 2,205 minutos, com íon molecular com m/z de 154 e fragmentos majoritários 126, 110 e 108, no extrato biotransformado após 36 horas.

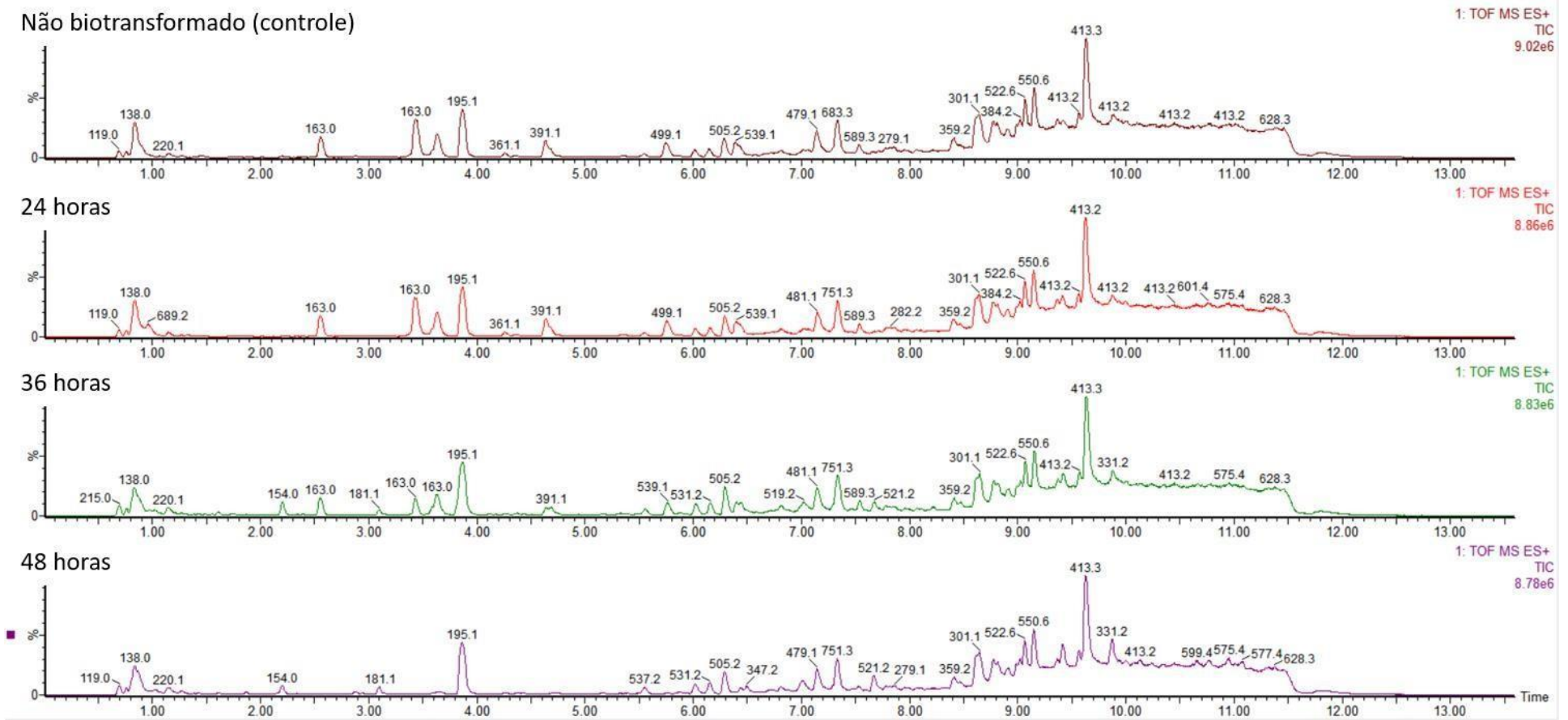
Tabela 6 - Caracterização dos compostos dos extratos de café não biotransformado e biotransformado por 24, 36 e 48 horas por CLUE-EM-Q-TOF em modo positivo

Composto proposto	Tempo de retenção (min)	Massa molecular (Da)	m/z (Adutos)	MS/MS (m/z)	Fórmula molecular	Controle	24 h	36 h	48 h	Referência
Trigonelina	0,843	137	138,04 ([M+H] ⁺)	110, 104	C ₇ H ₁₂ O ₆	✓	✓	✓	✓	GARRETT et al., 2012;
Ácido 3-o-cafeoilquínico	2,568	354	377,05 ([M + Na] ⁺)	163, 135, 117	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	✓	✓	✓	✓	GARRETT et al., 2012;
Teofilina	3,099	180	181,06 ([M+H] ⁺)	124	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂			✓	✓	IFTIKHAR; BRAJTER-TOTH, 2015
Ácido 5-o-cafeoilquínico	3,442	354	377,07 ([M + Na] ⁺)	163, 145, 135, 117	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	✓	✓	✓	✓	GARRETT et al., 2012; Padrão
Ácido feruloilquínico (isômero)	3,596	368	391,06 ([M + Na] ⁺)	215, 177, 145, 117	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	✓	✓	✓	✓	GARRETT et al., 2012; KUHNERT et al., 2010
Ácido 4-o-cafeoilquínico	3,642	354	377,05 ([M + Na] ⁺)	163, 135, 117	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	✓	✓	✓	✓	GARRETT et al., 2012;
Ácido cafeico	3,842	180	181,03 ([M+H] ⁺)	163, 135, 117	C ₉ H ₈ O ₄	✓	✓	✓	✓	GARRETT et al., 2012; LIM et al., 2015; Padrão
Cafeína	3,865	194	195,07 ([M+H] ⁺)	138, 123, 110	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	✓	✓	✓	✓	GARRETT et al., 2012; BIER; HARTMANN; HOLSCHBACH, 2013
Ácido feruloilquínico (isômero)	4,636	368	391,06 ([M + Na] ⁺)	215, 177, 145, 117	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	✓	✓	✓		GARRETT et al., 2012; KUHNERT et al., 2010
Ácido feruloilquínico (isômero)	4,690	368	391,08 ([M + Na] ⁺)	215, 177, 145, 117	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	✓	✓	✓		GARRETT et al., 2012; KUHNERT et al., 2010
Ácido dicafeoilquínico (isômero)	5,764	516	539,09 ([M + Na] ⁺)	377, 163	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	✓	✓	✓	✓	TOLONEN et al., 2002
Ácido dicafeoilquínico (isômero)	6,402	516	539,09 ([M + Na] ⁺)	377, 163	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	✓	✓	✓		TOLONEN et al., 2002

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

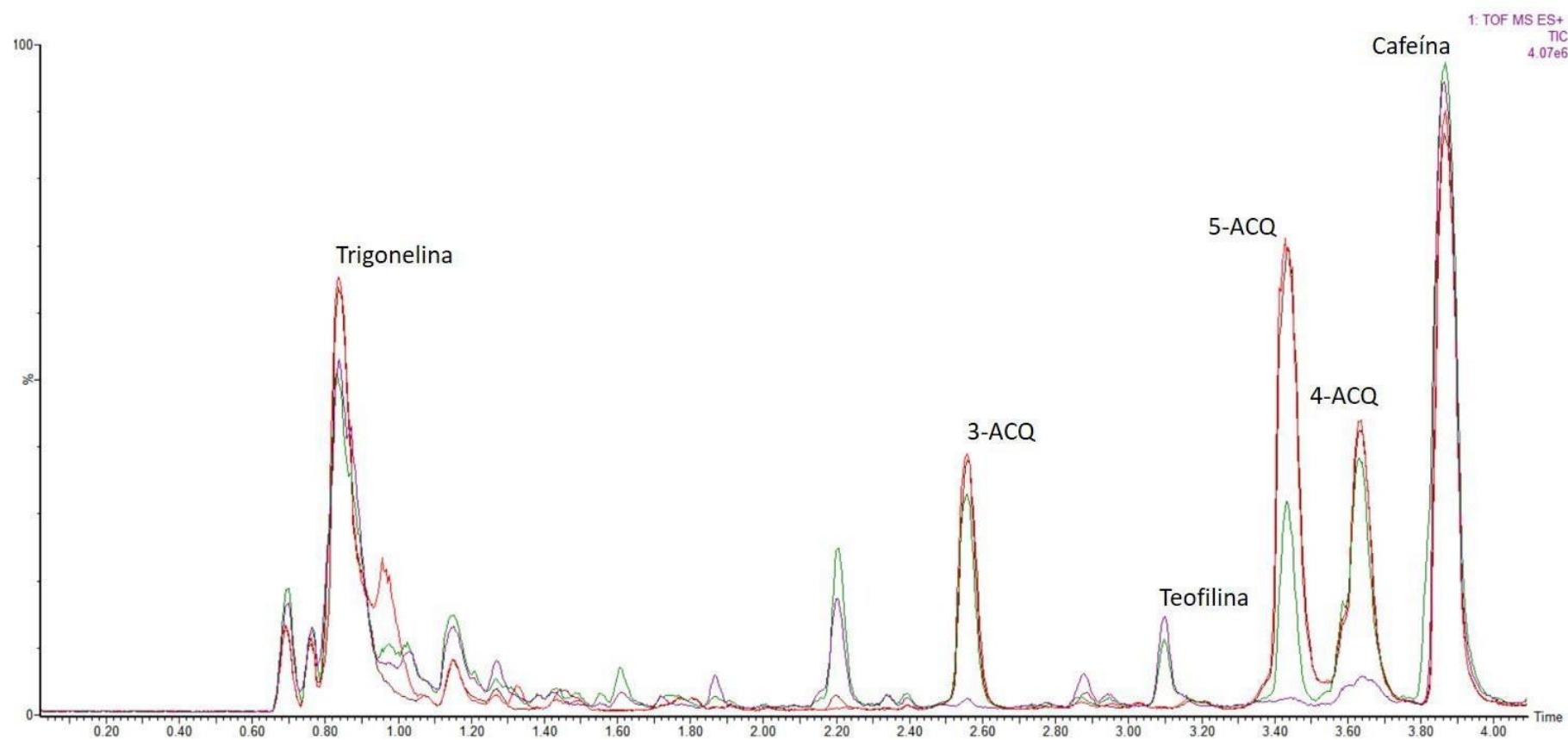
Figura 17 – Cromatogramas de íons totais dos extratos analisados por CLUE-EM-Q-TOF com ionização por *electrospray* em modo positivo

Não biotransformado (controle)



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

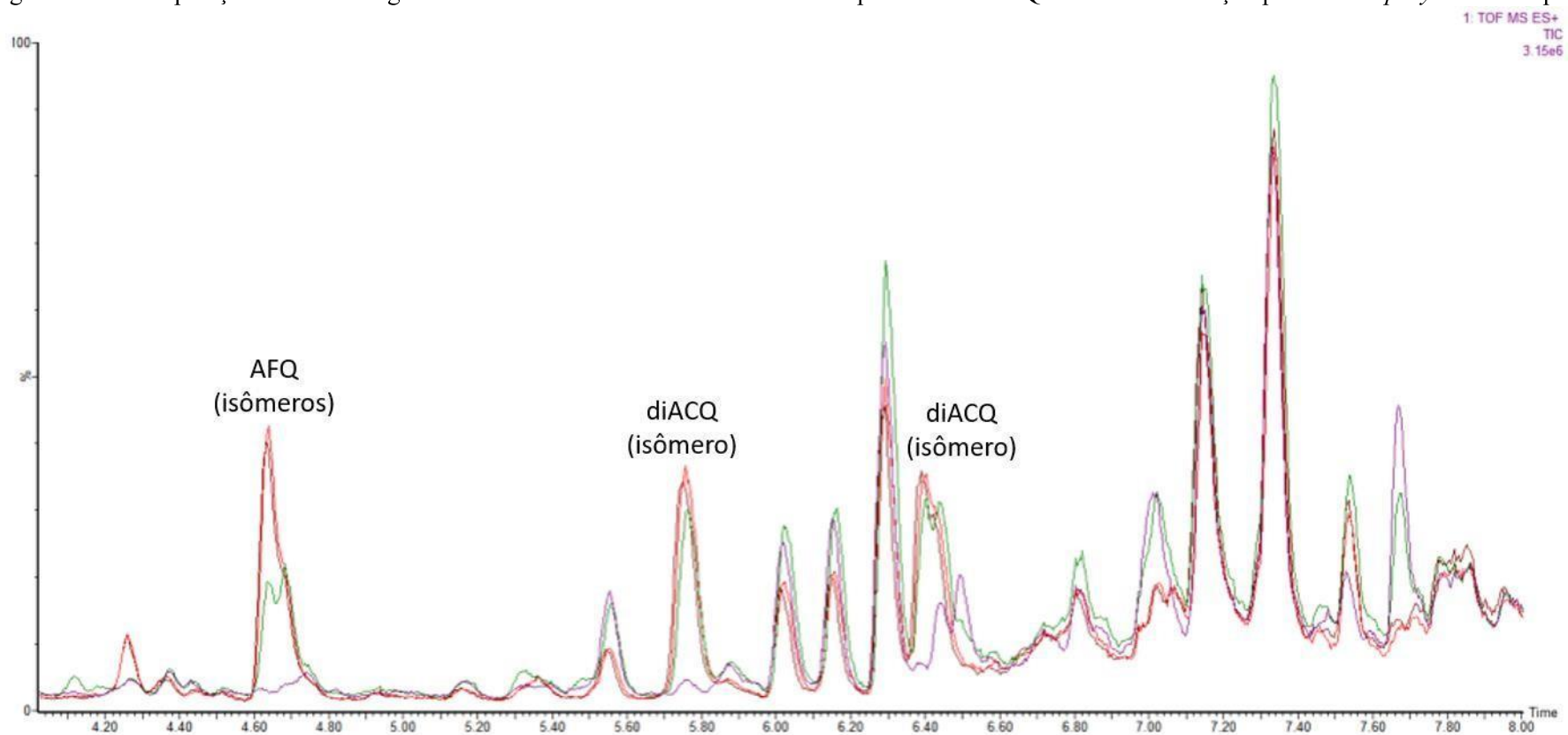
Figura 18 – Sobreposição dos cromatogramas de íons totais dos extratos analisados por CLUE-EM-Q-TOF com ionização por *electrospray* em modo positivo



(Vinho) Extrato não biotransformado, (Vermelho) Extrato biotransformado por 24 horas, (Verde) Extrato biotransformado por 36 horas e (Roxo) Extrato biotransformado por 48 horas.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

Figura 19 – Sobreposição dos cromatogramas de íons totais dos extratos analisados por CLUE-EM-Q-TOF com ionização por *electrospray* em modo positivo



(Vinho) Extrato não biotransformado, (Vermelho) Extrato biotransformado por 24 horas, (Verde) Extrato biotransformado por 36 horas e (Roxo) Extrato biotransformado por 48 horas.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2018

5.6 PERMEACÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

Nas condições experimentais empregadas a cafeína foi o único composto capaz de reter-se na epiderme e derme e também atingir a solução receptora. Em ambos os casos, quando considerada a retenção e a penetração da cafeína, foi observada maior quantidade desse composto na pele e na solução receptora quando utilizada a formulação adicionada do extrato biotransformado em relação à formulação adicionada do extrato não biotransformado (Figuras 20, 21, 22 e 23). A quantificação da cafeína não foi realizada uma vez que as áreas dos picos obtidos apresentaram-se inferiores ao intervalo linear avaliado. Além disso, substâncias presentes na pele ou na formulação co-eluíram com a cafeína na análise da epiderme e derme (Figura 22). Vale ressaltar que, para formulações cosméticas, não é interessante que ocorra a passagem do composto ativo para a solução receptora. As análises cromatográficas revelaram que não houve a retenção e penetração dos ácidos 5-ACQ e cafeico ou essas quantidades foram muito pequenas para serem detectadas pelo método de CLAE desenvolvido.

É importante considerar que a concentração dos compostos nas formulações não foi o fator determinante para a penetração dos mesmos, uma vez que no extrato controle o 5-ACQ foi o composto presente em maior concentração seguido da cafeína e do ácido cafeico, e no extrato biotransformado a cafeína estava presente em maior concentração seguida do ácido cafeico e 5-ACQ. Em ambos os casos, somente a cafeína foi detectada na pele e no fluido receptor.

Figura 20 – Cromatogramas obtidos nas análises de permeação dos compostos na pele quando veiculados nas formulações placebo (A), adicionada do extrato de café verde não biotransformado (B) e biotransformado (C), em 272 nm

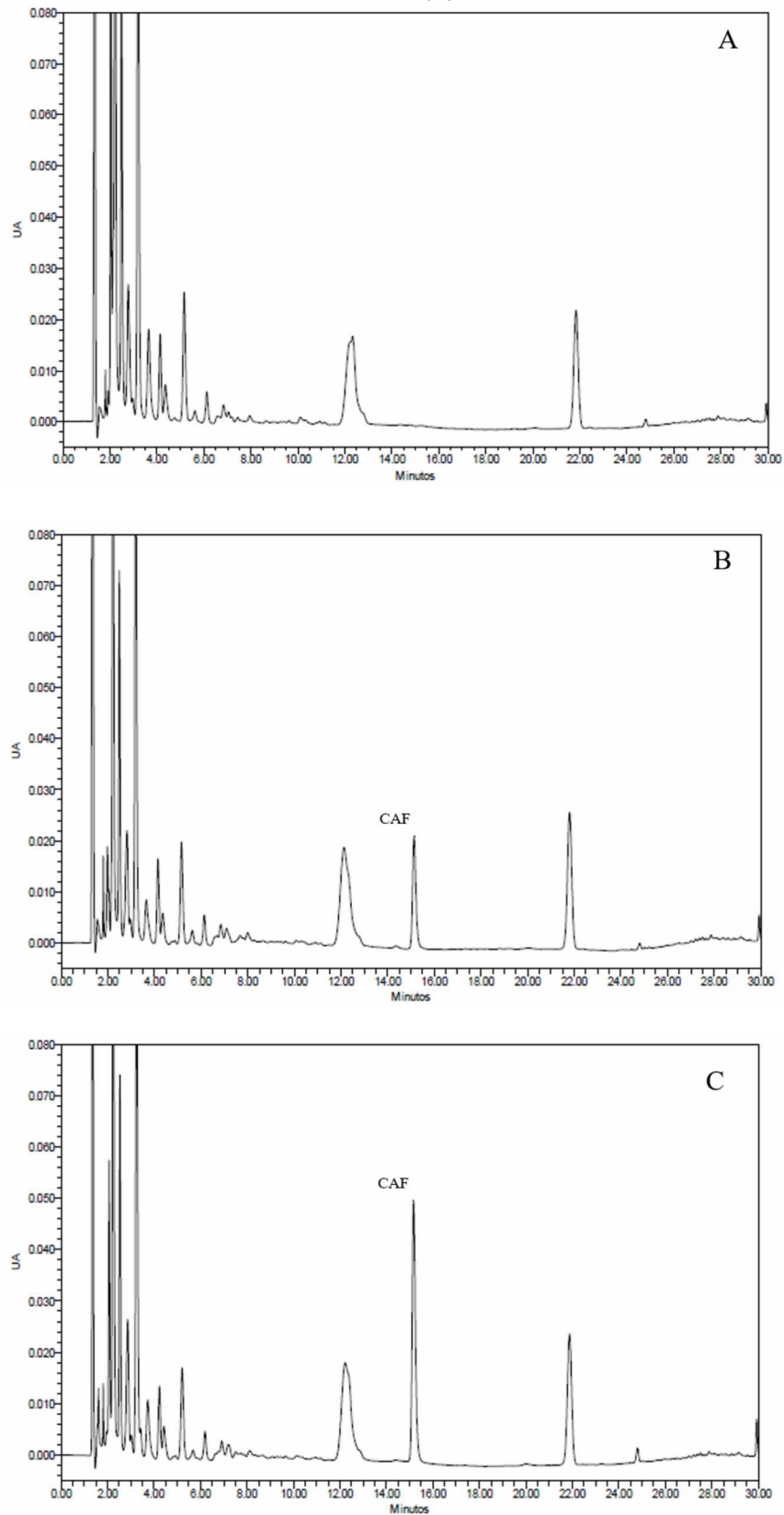


Figura 21 – Cromatogramas obtidos nas análises de permeação dos compostos na pele quando veiculados nas formulações placebo (A), adicionada do extrato de café verde não biotransformado (B) e biotransformado (C), em 330 nm

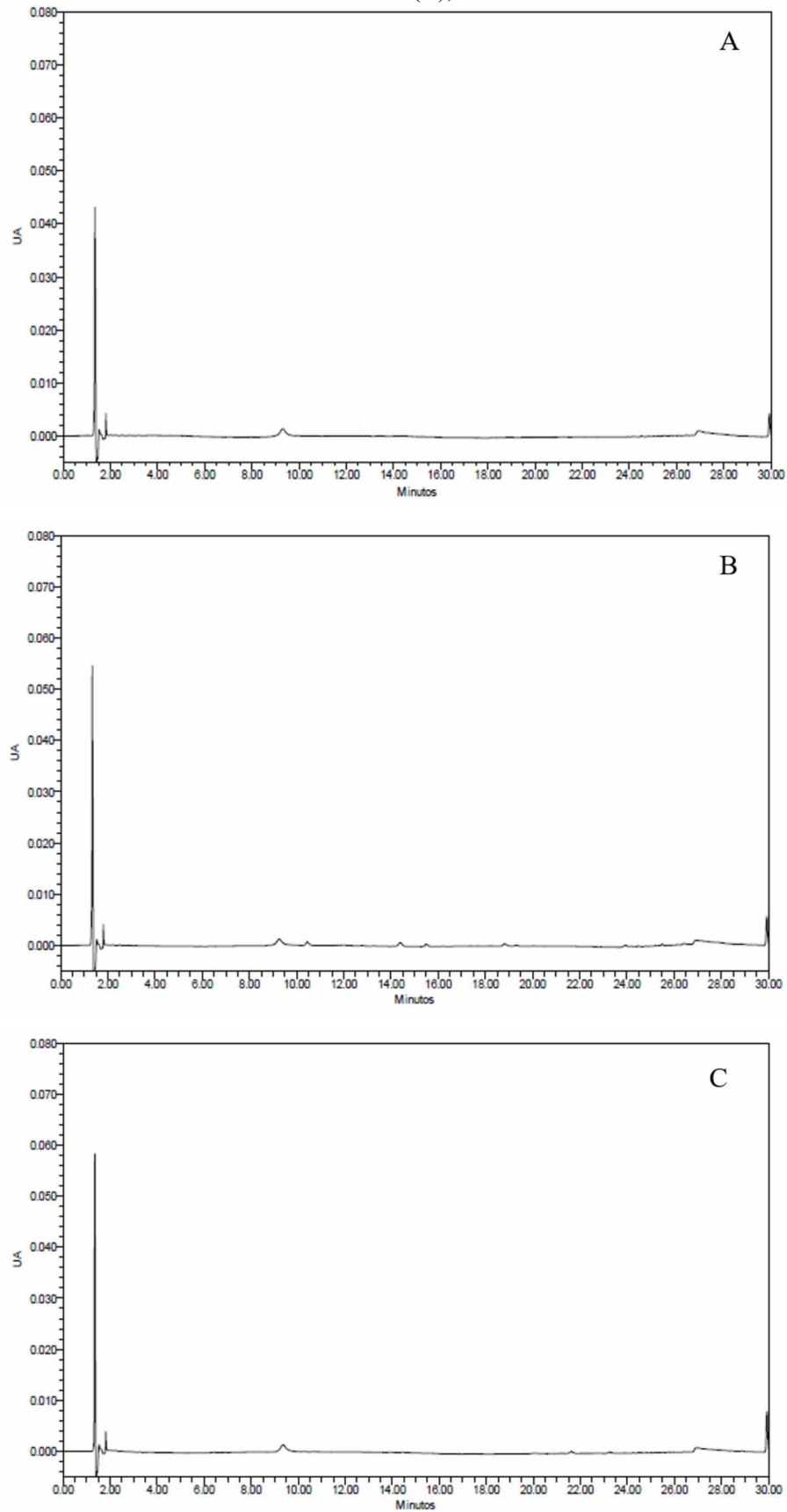


Figura 22 – Cromatogramas obtidos nas análises de retenção na derme e epiderme dos compostos na pele quando veiculados nas formulações placebo (A), adicionada do extrato de café verde não biotransformado (B) e biotransformado (C), em 272 nm

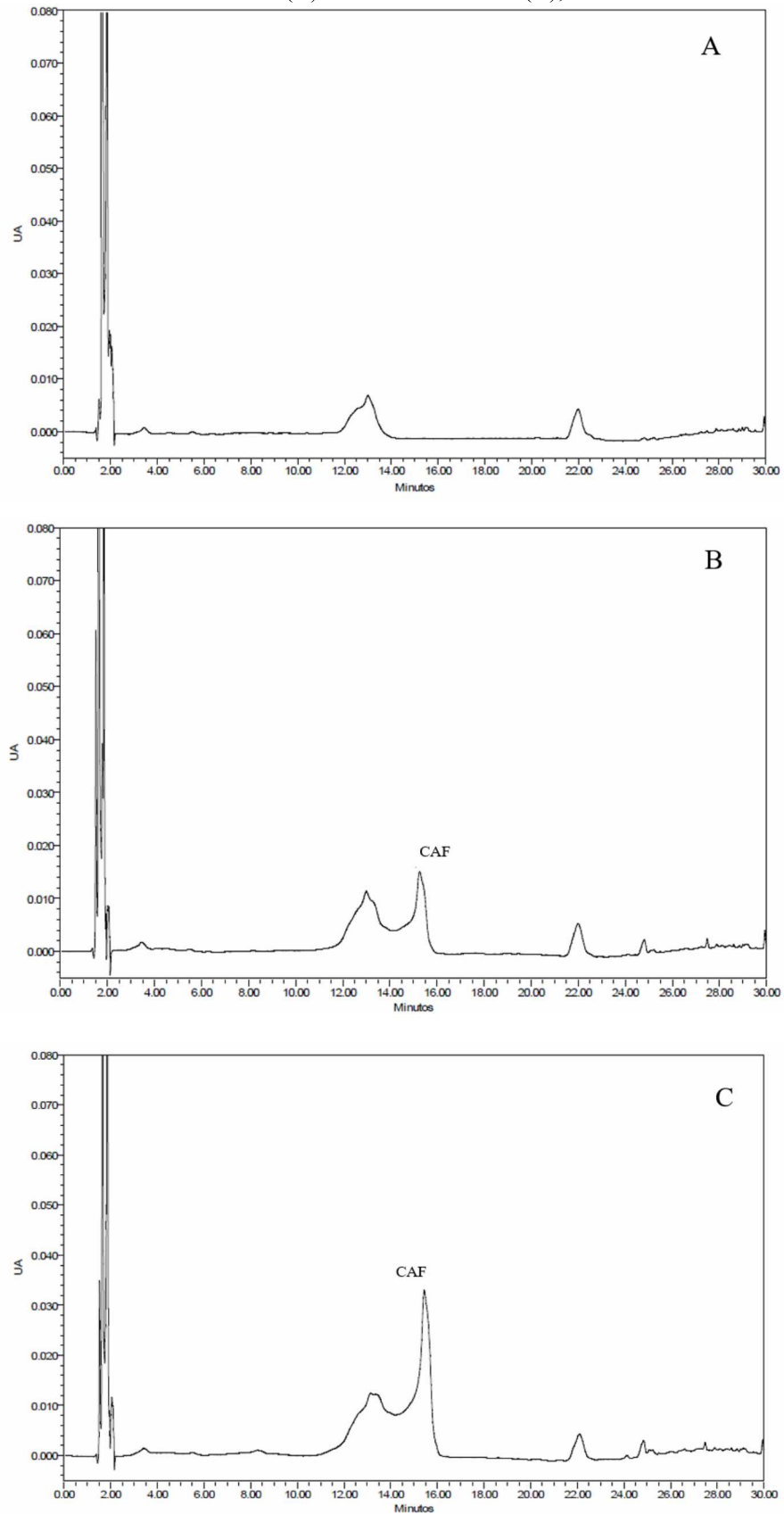
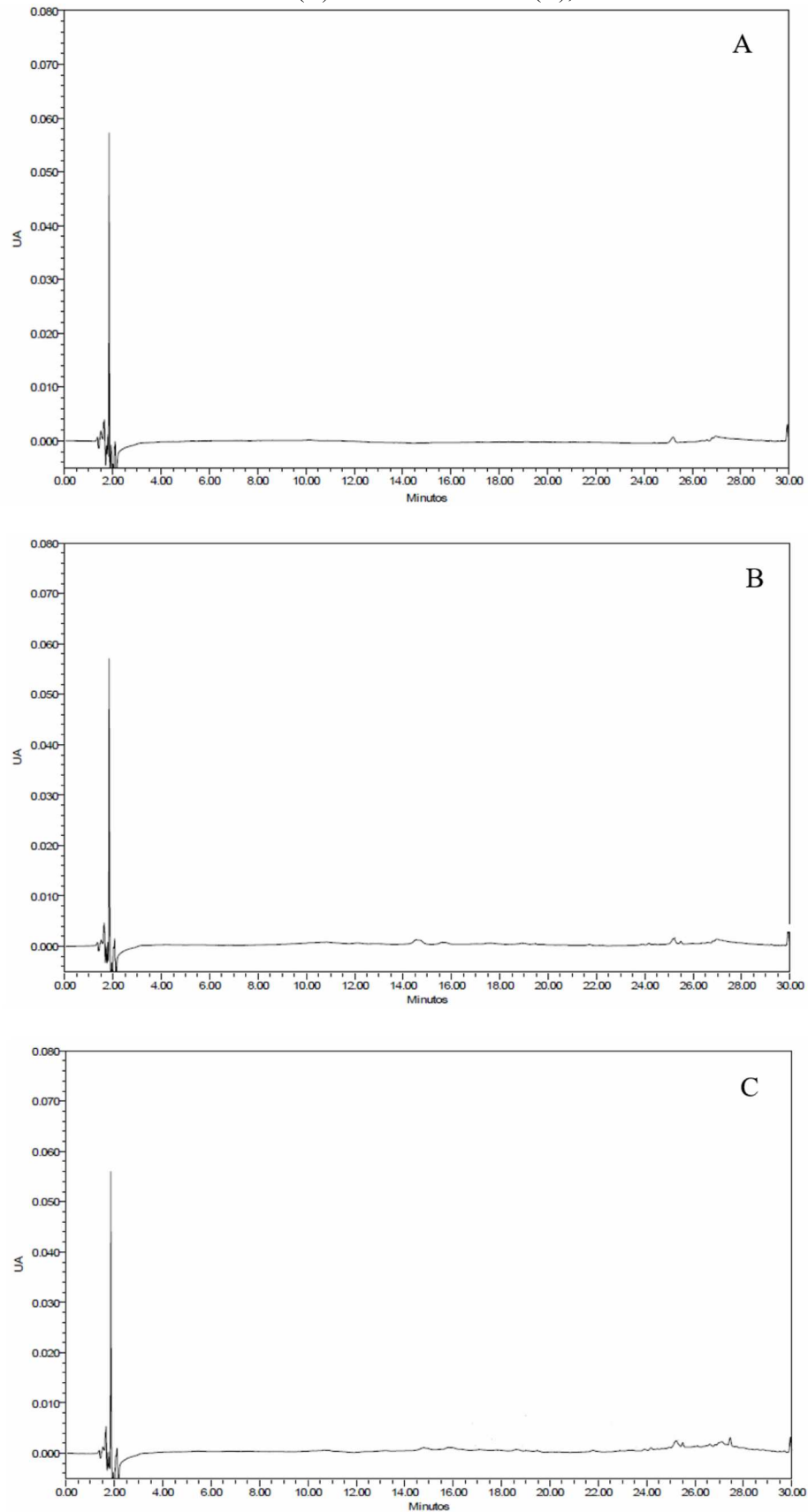


Figura 23 – Cromatogramas obtidos nas análises de retenção na derme e epiderme dos compostos na pele quando veiculados nas formulações placebo (A), adicionada do extrato de café verde não biotransformado (B) e biotransformado (C), em 330 nm



Dados da literatura demonstram que os ácidos cafeico e clorogênico não tem uma boa capacidade de penetração cutânea como a cafeína (VAN DE SANDT et al., 2004). Estudos que avaliaram a penetração dos ácidos cafeico e clorogênico na pele, dissolvidos em solução contendo promotores de penetração cutânea, verificaram que esses compostos foram capazes de atravessar o estrato córneo e atingir todas as camadas da pele, sem diferença significativa na penetração dos mesmos (MARTI-MESTRES et al., 2007).

Extratos vegetais que possuem compostos antioxidantes têm sido considerados como novas alternativas para o desenvolvimento de produtos cosméticos visando a proteção da pele contra os danos oxidativos produzidos principalmente após a exposição à radiação UV. Entretanto, para que esses antioxidantes tenham ação devem ser capazes de atravessar o estrato córneo, atingir a epiderme e derme sem que ocorra a permeação para a circulação sistêmica (MARTI-MESTRES et al., 2007). Desta forma, estudos de penetração cutânea são muito importantes para garantir a segurança e a eficácia de produtos farmacêuticos ou cosméticos contendo diferentes ingredientes ativos.

Quando estes extratos são incorporados em formulações, a penetração das substâncias ativas na pele é muito influenciada pelo veículo, que tem a capacidade de promover ou reduzir a penetração cutânea (DAL BELO et al., 2009). A correta seleção da base semissólida assim como seus componentes é fundamental para a penetração efetiva da substância ativa. Considerar as propriedades do composto ativo, da base semissólida e das camadas da pele a serem atingidas pode ajudar a prever a penetração na pele e absorção de compostos ativos (JANKOWSKI; DYJA; SARECKA-HUJAR, 2017).

Fatores como o peso molecular e a lipofilicidade da substância, o tipo de formulação e carreador utilizado, a integridade da pele, o grau de hidratação do estrato córneo, a atividade metabólica da pele, o coeficiente de partição entre o veículo e o estrato córneo e as características físico-químicas da substância ativa são fatores capazes de influenciar a liberação do fármaco na pele após a administração tópica. Entretanto, a dificuldade em prever a penetração cutânea está no fato de que as características da substância, do veículo e da pele devem ser considerados como um sistema multifatorial complexo, e não separadamente. A retenção e a penetração cutânea podem ser influenciadas tanto por interações entre os componentes da formulação e a pele, tanto pelas interações entre os componentes da formulação e o composto ativo (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; JANKOWSKI; DYJA; SARECKA-HUJAR, 2017).

No presente estudo foi utilizada uma emulsão do tipo O/A, isto é, a fase externa da emulsão é aquosa. A taxa de liberação de substâncias ativas de natureza hidrofílica como a

caféina e o 5-ACQ e moderadamente hidrofílicas como o ácido cafeico geralmente aumenta quando bases de caráter mais hidrofílicas são utilizadas (hidrofóbica < emulsão < hidrofílica) (DANIELS; KNIE, 2007). Entretanto, a formulação gel creme utilizada não foi adequada para a veiculação dos compostos ativos na pele, uma vez que não propiciou a penetração dos compostos fenólicos na epiderme e também por ter promovido a penetração da caféina até a solução receptora. Diante disso, sugere-se que o uso de promotores químicos de absorção cutânea e de formas mais promissoras como as microemulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas sejam estratégias interessantes que poderiam auxiliar no aumento e controle da penetração dos compostos antioxidantes do café verde na pele.

Pesquisadores confirmaram a penetração cutânea do ácido cafeico em pele de orelha de porco quando veiculado na forma de lipossomas após 7 horas da aplicação. Nesse mesmo tempo, o ácido cafeico na forma livre não foi capaz de penetrar na pele (KATUWAVILA et al., 2016). Kitagawa et al. (2011) indicaram que o uso de uma microemulsão do tipo O/A como veículo propiciou uma penetração eficiente do 5-ACQ. Outro estudo indicou também o potencial do uso de uma microemulsão para promover a penetração da caféina na pele, resultando na penetração 1,3 vezes maior do que as formas gel e emulsão (BOELZINGER et al., 2008). Além disso, o uso de carreadores lipídicos nanoestruturados já foi reportado como uma forma promissora para a penetração cutânea da caféina (RODRIGUES et al., 2016).

Os resultados obtidos no presente estudo reforçam a necessidade dos estudos de penetração visando verificar se os compostos ativos permaneceram na pele para exercer seus efeitos locais ou fornecendo subsídios para otimizar a eficácia do produto, bem como para evidenciar um potencial risco de absorção sistêmica.

6. CONCLUSÕES

As análises empregando os métodos de CLAE, CCD e CLUE-EM-Q-TOF mostraram o potencial do *Aspergillus oryzae* para ser empregado na biotransformação de compostos fenólicos, resultando em alterações quantitativas e qualitativas na composição química do café verde. Ficou evidenciada a quebra das ligações ésteres dos ácidos clorogênicos com consequente formação dos ácidos quínico e cafeico no intervalo de 36 horas de FES, sem perda da atividade antioxidante.

Os resultados dos estudos de permeação e retenção *in vitro* mostraram que a cafeína foi o único composto capaz de ficar retido na derme e epiderme. A penetração da cafeína foi maior quando utilizada a formulação adicionada do extrato biotransformado em relação à formulação adicionada do extrato não biotransformado. Entretanto, mesmo após a biotransformação por 36 horas pelo *A. oryzae*, que resultou na quebra das ligações ésteres dos ácidos clorogênicos gerando aumento do ácido cafeico (menor peso molecular), não houve a penetração dos compostos fenólicos na epiderme. Esse resultado reforça a importância do desenvolvimento de formulações tópicas adequadas e da realização dos estudos de penetração cutânea para garantir a penetração dos compostos ativos garantindo assim a eficácia das mesmas, bem como para evidenciar um potencial risco de absorção sistêmica.

REFERÊNCIAS

ABDEL-MOTTALEB, M. S. A. DFT studies of caffeic acid antioxidant: molecular orbitals and composite reactivity maps correlation with photophysical characteristics and photochemical stability. **Journal of Chemistry**, v. 2016, p. 1–8, 2016.

ALONSO-SALCES, R. M.; SERRA, F.; RENIERO, F.; HÉBERGER, K. Botanical and geographical characterization of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*): chemometric evaluation of phenolic and methylxanthine contents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4224–4235, 2009.

AMNUAIKIT, T.; MANEENUAN, D.; BOONME, P. Evaluation of caffeine gels on physicochemical characteristics and in vivo efficacy in reducing puffy eyes. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, p. 56-59, 2011.

ASHIHARA, H. **Plant biochemistry: Trigonelline biosynthesis in *Coffea arabica* and *Coffea canephora***. In: Coffee in health and disease prevention. (ed. by Preedy, V.R.), p.19-28. Elsevier, London, 2015.

AULTON, M. E. Transdermal drug delivery. In: BARRY, B. **Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design**. 2 ed. London: Churchill Livingstone, 2002. Capítulo 33, p. 499-533.

BARBESGAARD, P.; HELDT-HANSEN, H. P.; DIDERICHSEN, B. On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 569–572, 1992.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 175–185, 2012.

BARRY, B. W. **Dermatological formulations: percutaneous absorption**. New York: M. Dekker, 1983.

BARTH, G. M. P. A leitura do café: suas possíveis relações matemáticas e a perspectiva de gênero / The reading of coffee: its possible gender. **Educar**, v. 35, p. 153–164, 2009.

BEI, Q.; LIU, Y.; WANG, L.; CHEN, G.; WU, Z. Improving free, conjugated, and bound phenolic fractions in fermented oats (*Avena sativa* L.) with *Monascus anka* and their antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 185–194, 2017.

BEL-RHLID, R.; THAPA, D.; KRAEHENBUEHL, K.; HANSEN, C. E.; FISCHER, L. Biotransformation of caffeoyl quinic acids from green coffee extracts by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. **AMB Express**, v. 3, p. 1-7, 2013.

BIER, M. C. J. **Produção de compostos de aroma através da biotransformação do limoneno por fermentação em estado sólido utilizando resíduo natural de laranja como substrato**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2011.

BIER, D.; HARTMANN, R.; HOLSCHBACH, M. Collision-induced dissociation studies of caffeine in positive electrospray ionisation mass spectrometry using six deuterated

isotopomers and one N1-ethylated homologue. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 27, p. 885–895, 2013.

BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199–1200, 1958.

BOLZINGER, M. A.; BRIANCON, S.; PELLETIER, J.; FESSI, H.; CHEVALIER, Y. Percutaneous release of caffeine from microemulsion, emulsion and gel dosage forms. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 446-451, 2008.

BORÉM, F. M. **Pós-colheita do café**. Lavras: UFLA, 2008. v. 1, p. 631.

BOUWS, H.; WATTENBERG, A.; ZORN, H. Fungal secretomes - nature's toolbox for white biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 381–388, 2008.

BRASIL. Resolução RDC n 166 de 24 de julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>. Acesso em: 20 de agosto de 2017.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317–333, 1998.

BRENELLI, E. C. S. A extração de cafeína em bebidas estimulantes: uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. **Química Nova**, v. 26, p. 136–138, 2003.

BRESCIANI, L.; CALANI, L.; BRUNI, R.; BRIGHENTI, F.; DEL RIO, D. Phenolic composition, caffeine content and antioxidant capacity of coffee silverskin. **Food Research International**, v. 61, p. 196-201, 2014.

CÁDIZ-GURREA, M.L.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; JOVEN, J.; SEGURA-CARRETERO, A. Comprehensive characterization by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS from an *Eryngium bourgatii* extract and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Research International**, v. 50, p. 197-203, 2013.

CARREGARO, A. B.; WOODS, W.E.; TOBIN, T.; QUEIROZ-NETO, A. Comparison of the quantification of caffeine in human plasma by gas chromatography and ELISA. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 821–824, 2001.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 45–50, 2000.

CHAMBIN O, BEVAN B, TEILLAUD E (eds). 1993. **Pig Skin as an Animal Model for in Vitro Percutaneous Absorption Studies**. STS Publishing: Cardiff; 111–116.

CHAPAGAIN, A. K.; HOEKSTRA, A. Y. The water footprint of coffee and tea consumption in the Netherlands. **Ecological Economics**, v. 64, p. 109–118, 2007.

CHEYNIER, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. **The American**

Journal of Clinical Nutrition, v. 81, p. 223S–229S, 2005.

CHIEN, W. Y. **Novel drug delivery systems**. Drug and the pharmaceutical sciences, v. 50. New York: M Dekker, 1992.

CHRISTAKOPOULOS, P.; MACRIS, B.; KEKOS, D. Exceptionally thermostable α -galactosidase and β -galactosidase from *Aspergillus niger* separated in one step. **Process Biochemistry**, v. 25, p. 210–212, 1990.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 362–372, 1999.

CORREIA, R. T. P. **Estudo do cultivo semi-sólido em resíduo de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus***. 2004. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2004.

DAL BELO, S. E.; GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; MARTY, J. P. Skin penetration of epigallocatechin-3-gallate and quercetin from green tea and *Ginkgo biloba* extracts vehiculated in cosmetic formulations. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 22, p. 299-304, 2009.

DALY, J. W. Caffeine analogs: biomedical impact. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 2153–2169, 2007.

DANIELS, R.; KNIE, U. Galenics of dermal products – vehicles, properties and drug release. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 5, p. 367-383, 2007.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 497–522, 2001.

DEL BIANCHI, V. L., MORAES, I. O., CAPALBO, D. M. F. **Biotechnologia industrial: Fermentação em Estado Sólido**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, vol.2, 2001.

DEVASAGAYAM, T. P.; KAMAT, J. P.; MOHAN, H.; KESAVAN, P. C. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1282, p. 63–70, 1996.

DEY, T. B.; CHAKRABORTY, S.; JAIN, K. K.; SHARMA, A.; KUHAD, R. C. Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 53, p. 60–74, 2016.

DIEMBECK, W.; BECK, H.; BENECH-KIEFFER, F.; COURTELLEMONT, P.; DUPUIS, J.; LOVELL, W.; PAYE, M.; SPENGLER, J.; STEILING, W. Test guidelines for *in vitro* assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 191-205, 1999.

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 de Química**, v. 9, p. 107-134, 2017.

EGAWA, T.; TSUDA, S.; OSHIMA, R.; GOTO, A.; MA, X.; GOTO, K.; HAYASHI, T. Regulatory mechanism of skeletal muscle glucose transport by phenolic acids. In: SOTO-HERNANDEZ, M.; PALMA-TENANGO, M.; GARCIA-MATEOS, M. R. **Phenolic Compounds - Biological Activity**. 1 ed. p. 169-171, v. 3, Intech, 2017.

EMBRAPA. **Brasil bate mais um recorde na exportação de café**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/01/brasil-bate-mais-um-recorde-na-exportacao-de-cafe>>. Acesso em: 1 maio. 2017.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization/World Health Organisation. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **WHO Technical Report Series**, v. 759, p. 16-17, 1988.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 23–36, 2006.

FARAH, A.; SANTOS, T. F. **The coffee plant and beans: An introduction**. In: **Coffee in health and disease prevention**. (ed. by Preedy, V.R.), p. 5-10. Elsevier, London, 2015.

FARREL, T. L.; POQUET, L.; DEW, T. P.; BARBER, S.; WILLIAMSON, G. Predicting phenolic acid absorption in Caco-2 cells: a theoretical permeability model and mechanistic study. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 40, p. 397-406, 2012.

FARRIS, P. Idebenone, green tea, and Coffeeberry extract: new and innovative antioxidants. **Dermatologic Therapy**, v.5, p. 322-329, 2007.

FERREIRA, L. R.; MACEDO, J. A.; RIBEIRO, M. L.; MACEDO, G. A. Improving the chemopreventive potential of orange juice by enzymatic biotransformation. **Food Research International**, v. 51, p. 526-535, 2013.

GARRETT, R.; VAZ, B. G.; HOVELL, A. M. C.; EBERLIN, M. N.; REZENDE, C. M. Arabica and Robusta Coffees: identification of major polar compounds and quantification of blends by direct-infusion electrospray ionization-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 4253-4258, 2012.

GEORGE, K. C.; HEBBAR, S. A.; KALE, S. P.; KESAVAN, P. C. Caffeine protects mice against whole-body lethal dose of gamma-irradiation. **Journal of Radiological Protection**, v. 19, p. 171–176, 1999.

GEORGETTI, S.R. et al. Enhanced in vitro and in vivo antioxidant activity and mobilization of free phenolic compounds of soybean flour fermented with different β -glucosidase-producing fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 459–466, 2009.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 1152-1161, 2007.

GOMES, M. J. V. M.; REIS, A. M. M. **Ciências farmacêuticas: uma abordagem em farmácia hospitalar**. 1ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. p. 60

GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; LOPEZ, R. F. V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Química Nova**, v. 31, p. 1490-1498, 2008.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

HALL, S.; DESBROW, B.; ANOOPKUMAR-DUKIE, S.; DAVEY, A.K., ARORA, D.; McDERMOTT, C.; SCHUBERT, M. M.; PERKINS, A.V.; KIEFEL, M. J.; GRANT, G. D. A review of the bioactivity of coffee, caffeine and key coffee constituents on inflammatory responses linked to depression. **Food Research International**, v. 76, p. 626–636, 2015.

HERMAN, A.; HERMAN, A. P. Caffeine's mechanisms of action and its cosmetic use. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 26, p. 8-14, 2013.

HUBER, P.; ADLHART, C.; LUGINBUHL, V.; MORF, F.; OPITZ, S.; YERETZIAN, O. Coffee based polyphenols with potential in skin care: antioxidant activity and skin penetration assessed by *in vivo* Raman spectroscopy. **Household and Personal Care Today**, v. 9, p. 28-34, 2014.

HUGHES, S. R. ; LÓPEZ-NÚÑEZ, J. C.; JONES, M. A.; MOSER, B. R.; COX, E. J.; LINDQUIST, M.; GALINDO-LEVA, L. A.; RIAÑO-HERRERA, N. M.; RODRIGUEZ-VALENCIA, N.; GAST, F.; CEDEÑO, D. L.; TASAKI, K.; BROWN, R. C.; DARZINS, A.; BRUNNER, L. Sustainable conversion of coffee and other crop wastes to biofuels and bioproducts using coupled biochemical and thermochemical processes in a multi-stage biorefinery concept. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 8413–8431, 2014.

IFTIKHAR, I.; BRAJTER-TOTH, A. Solution or gas phase? Oxidation and radical formation in electrospray ionization mass spectrometry (ESI MS). **Electroanalysis**, v. 27, p. 2872 – 2881, 2015.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO). **Statistics. Historical Data**. Disponível em: <[http://www.ico.org/historical/1990 onwards/PDF/2a-exports.pdf](http://www.ico.org/historical/1990%20onwards/PDF/2a-exports.pdf)>. Acesso em: 30 abr. 2017.

JANKOWSKI, A.; DYJA, R.; SARECKA-HUJAR, B. Dermal and transdermal delivery of active substances from semisolid bases. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 79, p. 488-500, 2017.

KATUWAVILA, N. P.; PERERA, A. D. L. C.; KARUNARATNE, V.; AMARATUNGA, G. A. J.; KARUNARATNE, D. N. Improved delivery of caffeic acid through liposomal encapsulation. **Journal of Nanomaterials**, v. 2016, p. 1-7, 2016.

KITAGAWA, S.; YOSHII, K.; MORITA, S.; TERAOKA, R. Efficient topical delivery of chlorogenic acid by an oil-in-water microemulsion to protect skin against UV-induced damage. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, p. 793-796, 2011.

KOHEN, R.; GATI, I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. **Toxicology**, v. 148, p. 149-157, 2000.

KUMAR, N.; PRUTHI, V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. **Biotechnology Reports**, v. 4, p. 86–93, 2014.

KUHNERT, N.; JAISWAL, R.; MATEI, M. F.; SOVDAT, T.; DESHPANDE, S. How to distinguish between feruloyl quinic acids and isoferuloyl quinic acids by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, p. 1575-1582, 2010.

LIN, F.; LIN, J.; GUPTA, R. D.; TOURNAS, J. A.; BURCH, J. A.; SELIM, M. A.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; GRICHNIK, J. M.; ZIELINSKI, J.; PINNELL, S. R. Ferulic acid stabilizes a solution of vitamins C and E and doubles its photoprotection of skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 125, p. 826–832, 2005.

LIN, Y.; XU, W.; HUANG, M.; XU, W.; LI, H.; YE, M.; ZHANG, X.; CHU, K. Qualitative and quantitative analysis of phenolic acids, flavonoids and iridoid glycosides in yinhua kanggan tablet by UPLC-QqQ-MS/MS. **Molecules**, v. 20, p. 12209-12228, 2015.

LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 258–265, 1985.

MACHIDA, M. et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. **Nature**, v. 438, p. 1157–1161, 2005.

MADEIRA JUNIOR, J. V.; TEIXEIRA, C. B.; MACEDO, G. A. Biotransformation and bioconversion of phenolic compounds obtainment: an overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, p. 75–81, 2015.

MAGNANI, C.; ISAAC, V. L. B.; CORREA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Caffeic acid: a review of its potential use in medications and cosmetics. **Analytical Methods**, v. 6, p. 3203-3210, 2014.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSV, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727–47, 2004.

MARTI-MESTRES, G.; MESTRES, J. P.; BRES, J.; MARTIN, S.; RAMOS, J.; VIAN, L. The “*in vitro*” percutaneous penetration of three antioxidant compounds. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331, p. 139–144, 2007.

MARTINS, A. L. **História do café**. 2 edição. São Paulo: Contexto, 2012.

MARTINS, S.; MUSSATO, S. I.; MARTINEZ-AVILA, G.; MONTANEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 365-373, 2011.

MENG, S.; CAO, J.; FENG, Q.; PENG, J.; HU, Y. Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: a Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–11, 2013.

- MONCLARO, A. V. **Caracterização de múltiplas formas de xilanases produzidas por *Aspergillus oryzae* quando crescido em Brasília / DF.** [s.l.] Universidade de Brasília, 2014.
- MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 103-112, 2001.
- NATELLA, F.; NARDINI, M.; GIANNETTI, I.; DATTILO, C.; SCACCINI, C. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6211-6216, 2002.
- NCUBE, E. N.; MHLONGO, M. I.; PIATER, L. A.; STEENKAMP, P. A.; DUBERY, I. A.; MADALA, N. E. Analyses of chlorogenic acids and related cinnamic acid derivatives from *Nicotiana tabacum* tissues with the aid of UPLC-QTOF-MS/MS based on the in-source collision-induced dissociation method. **Chemistry Central Journal**, v. 8, p. 1-10, 2014.
- NIELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, G. Use of emulsions as topical drug delivery systems. In: SMITH, E. W.; MALBACH, H. I.; SURBER, C. **Pharmaceutical Emulsions and Suspensions**. 1 ed. New York: Marcel Dekker, Inc. 2000. capítulo 7, p. 259-270.
- NIGAM, P. S. **Production of bioactive secondary metabolites**. In: Nigam, P. S., Pandey, A. editors. *Biotechnology for agro-industrial residues utilization*. 1ª ed. Netherlands: Springer, 2009. p. 129-145.
- NISHIJIMA, M.; SAES, M. S. M.; POSTALI, F. A. S. Análise de concorrência no mercado mundial de café verde. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 50, p. 69-82, 2012.
- ODA, K.; KAKIZONO, D.; YAMADA, O.; LEFUJI, H.; AKITA, O.; IWASHITA, K. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3448-3457, 2006.
- OKAMURA, S.; SUZUKI, K.; YANASE, M.; KOIZUMI, M.; TAMURA, H. The effects of coffee on conjugation reactions in human colon carcinoma cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 271-274, 2005.
- PALMIERI, M. G. S. **Atividade antioxidante de extratos de café verde biotransformado pelo fungo *Aspergillus oryzae***. 2017. Dissertação (Mestrado acadêmico). Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Juiz de Fora. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2017.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.
- PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 189-259, 2004.
- PATHAK, L.; AGRAWAL, Y.; DHIR, A. Natural polyphenols in the management of major depression. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 22, p. 863-80, 2013.

PRIVAT, I.; FOUCRIER, S.; PRINS, A.; EPALLE, T.; EYCHENNE, M.; KANDALAFT, L.; CAILLET, V.; LIN, C.; TANKSLEY, S.; FOYER, C.; McCARTHY, J. Differential regulation of grain sucrose accumulation and metabolism in *Coffea arabica* (Arabica) and *Coffea canephora* (Robusta) revealed through gene expression and enzyme activity analysis. **New Phytologist**, v. 178, p. 781–797, 2008.

RABELLO, G. D.; FORTE, L. V.; GALVÃO, A. C. R. Avaliação clínica da eficácia da combinação paracetamol e cafeína no tratamento da cefaleia tipo tensão. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 58, p. 90–98, 2000.

RAMESHKUMAR, A.; SIVASUDHA, T.; JEYADEVI, R.; SANGEETHA, B.; ASEERVATHAM, G. S. B.; MAHESHWARI, M. Profiling of phenolic compounds using UPLC–Q-TOF-MS/MS and nephroprotective activity of Indian green leafy vegetable *Merremia emarginata* (Burm. f.). **Food Research International**, v. 50, p. 94–101, 2013.

RANHEIM, T.; HALVORSEN, B. Coffee consumption and human health - beneficial or detrimental? - Mechanisms for effects of coffee consumption on different risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, p. 274–284, 2005.

RAVICHANDRAN, S.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **International Journal of Science and Nature**, v. 3, p. 480–486, 2012.

ROCHA C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspegillus niger* em fermentação em estado sólido**. 2010. 161 f. Dissertação. Pós-graduação em engenharia química. Pesquisa e desenvolvimento de processos químicos. Faculdade de engenharia química, da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

RODRIGUES, F.; ALVES, A. C.; NUNES, C.; SARMENTO, B.; AMARAL, M. H.; REIS, S.; OLIVEIRA, M. B. Permeation of topically applied caffeine from a food by-product in cosmetic formulations: Is nanoscale *in vitro* approach an option? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 20, p. 496–503, 2016.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; PASQUALE, A. D.; UCCELLA, N.; BARBUZZI T.; PAOLINO D.; BONINA F. *In vitro* and *in vivo* evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 199, p. 39–47, 2000.

SANDHYA, C.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. **Microbial Enzymes and Biotransformations**. Totowa, NJ: Humana Press, v. 17, 2005.

SHAHRZAD, S.; BITSCH, I. Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A.**, v. 741, p. 223–231, 1996.

SILVA, J. A.; APOLINÁRIO, A. C.; SOUZA, M. S. R.; DAMASCENO, B. P. G. L.; MEDEIROS, A. C. D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o

desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, p. 125-131, 2010.

SIERENS, J.; HARTLEY, J. A.; CAMPBELL, M. J.; LEATHEM, A. J. C.; WOODSIDE, J. V. Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 485, p. 169-176, 2001.

SILVA, C. R. M.; NAVES, M. M. V. Suplementação de vitaminas na prevenção de câncer. **Revista de Nutrição**, v. 14, p. 135-143, 2001.

SINGH, S.; KUMAR, S. Numerical study on triple layer skin tissue freezing using dual phase lag bio-heat model. **International Journal of Thermal Sciences**, v. 86, p. 12-20, 2014.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 541–549, 2010.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13–18, 2009.

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

STEENVOORDEN, D. P. T.; BEIJERSBERGEN, V.; HANEGOUWEN, G. M. J.; STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 17, p. 463-516, 2001.

STREIT, W. J.; MRAK, R. E.; GRIFFIN, W. S. T. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. **Journal of Neuroinflammation**, v. 1, p. 1-14, 2004.

SUN, J., LIANG, F., BIN, Y., LI, P., DUAN, C. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. **Molecules**, v. 12, p. 679–693, 2007.

THE PLANT LIST. **Rubiaceae**. Disponível em:

<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Rubiaceae/>. Acesso em: 05 maio 2018.

TOLONEN, A.; JOUTSAMO, T.; MATTLA, S.; KAMARAÍNEM, T.; JALONEN, J. Identification of isomeric dicaffeoylquinic acids from *Eleutherococcus senticosus* using HPLC-ESI/TOF/MS and ¹H-NMR methods. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 316-328, 2002.

TSUCHIYA, K.; NAGASHIMA, T.; YAMAMOTO, Y.; GOMI, K.; KITAMOTO, K.; KUMAGAI, C.; TAMURA, G. High level secretion of calf chymosin using a glucoamylase-prochymosin fusion gene in *Aspergillus oryzae*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, p. 895–899, 1994.

VAN DE SANDT, J. J. M.; VAN BURGSTEDEN, J. A.; CAGE, S.; CARMICHAEL, P. L.; DICK, I.; KENYON, S.; KORINTH, G.; LARESE, F.; LIMASSET, J. C.; MAAS, W. J. M.;

MONTOMOLI, L.; NIELSEN, J. B.; PAYAN, J. P.; ROBINSON, E.; SARTORELLI, P.; SCHALLER, K. H.; WILKINSON, S. C.; WILLIAMS, F. M. *In vitro* prediction of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid, a multi centre comparison study. **Regulatory and Toxicology Pharmacology**, v. 39, p. 271-281, 2004.

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. **Studies in Micology**, v. 69, p. 57-80, 2011.

VARVARESOU, A. Percutaneous absorption of organic sunscreens. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 5, p. 53-57, 2006.

VILELA, F. M. P. **Avaliação da segurança *in vivo* de filtros solares em formulação fotoprotetora**. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

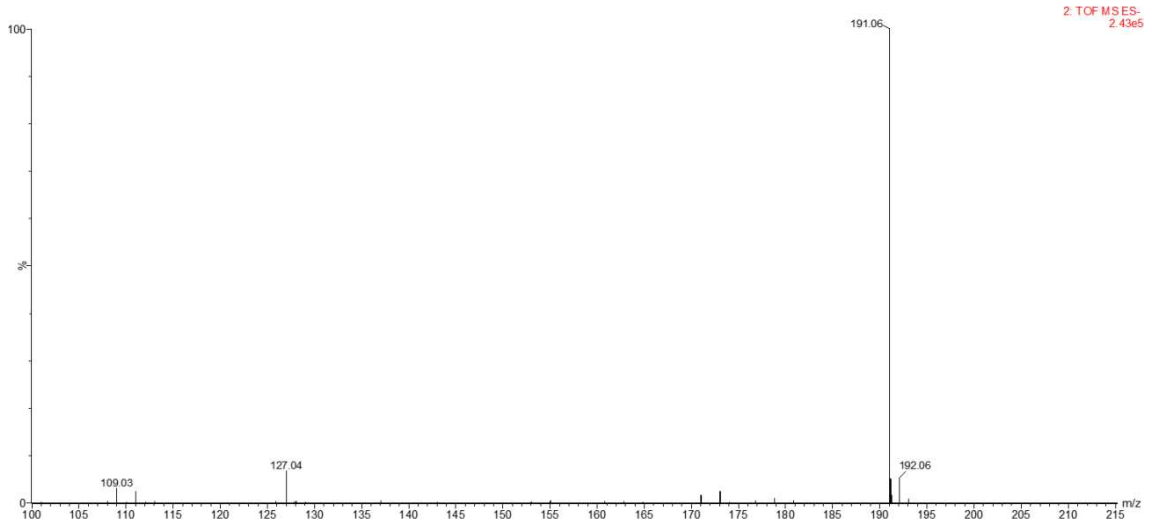
WILLEMS, J. L.; KHAMIS, M. M.; SAEID, W. M.; PURVES, R. W.; KATSELIS, G.; LOW, N. H.; EL-ANEED, A. Analysis of a series of chlorogenic acid isomers using differential ion mobility and tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 933, p. 164-174, 2016.

WILLIAMSON, G.; DIONISI, F.; RENOUF, M. Flavanols from green tea and phenolic acids from coffee: critical quantitative evaluation of the pharmacokinetic data in humans after consumption of single doses of beverages. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, p. 864–873, 2011.

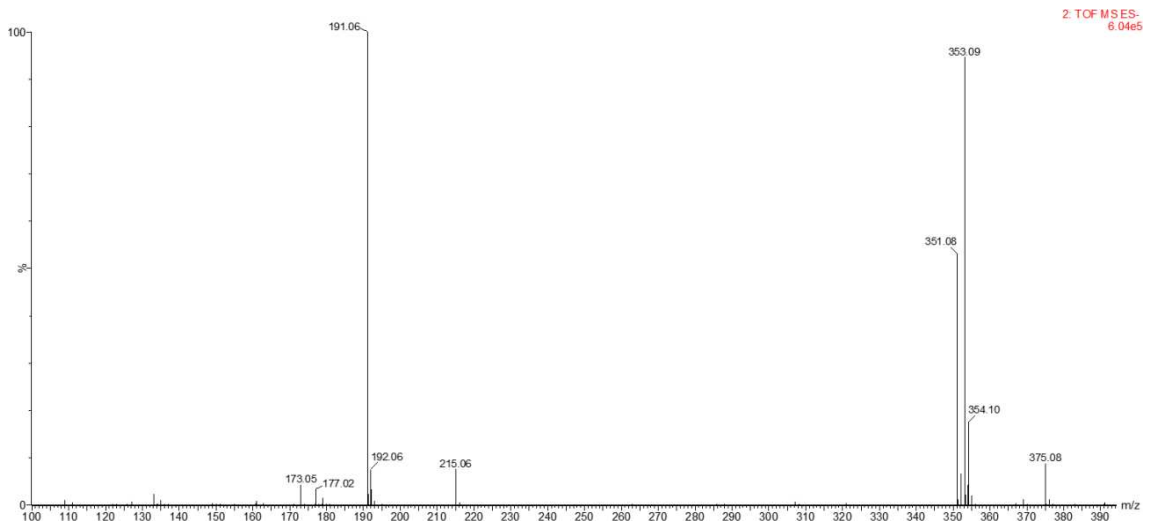
ZAFAR, S.; AHMED, R.; KHAN, R. Biotransformation: a green and efficient way of antioxidant synthesis. **Free Radical Research**, v. 50, p. 939–948, 2016.

APÊNDICE A - ESI(-) MS/MS dos compostos citados na Tabela 5.

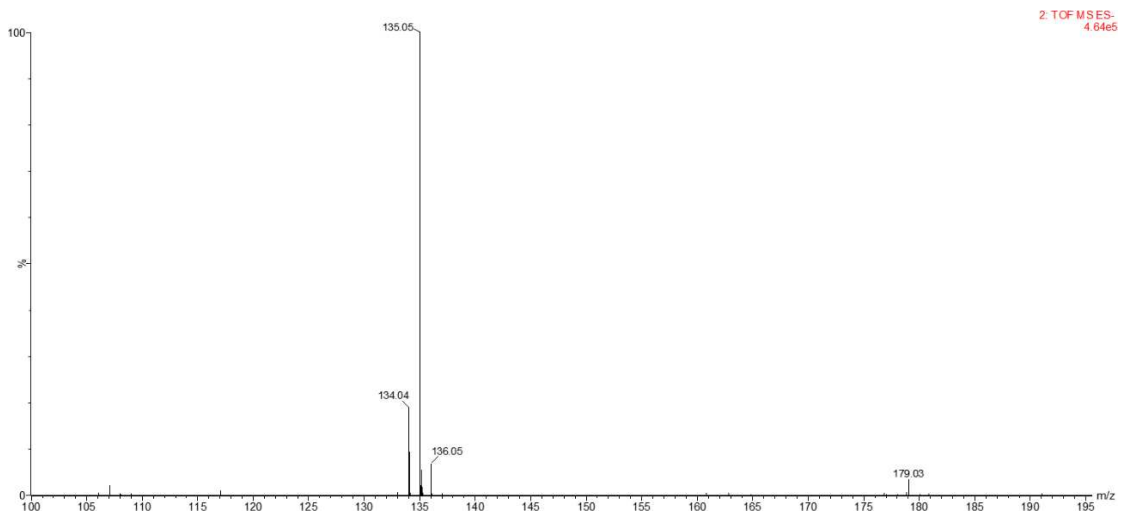
m/z 191 – Ácido Quínico (Padrão)



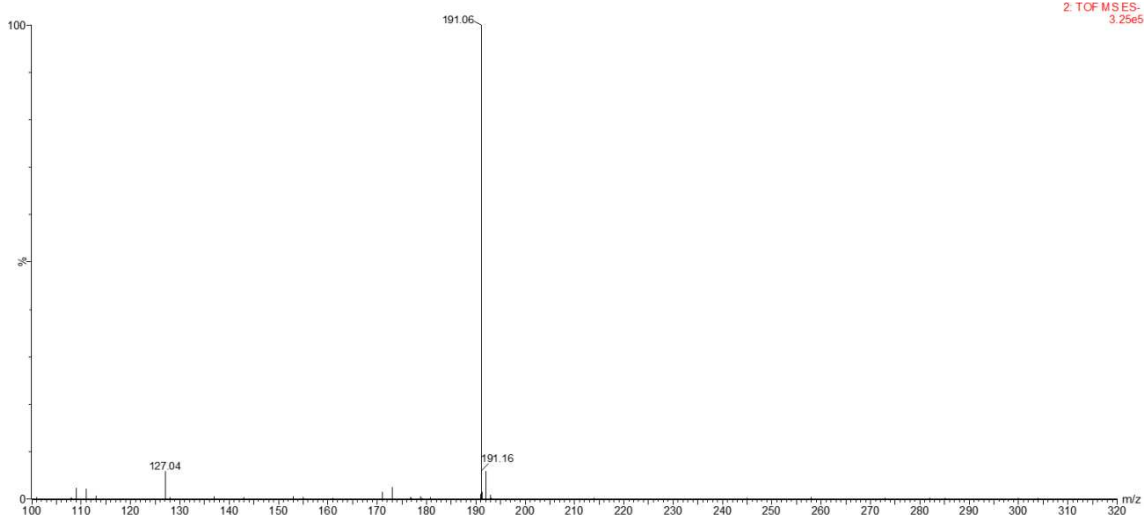
m/z 353 – Ácido 5-o-cafeoilquínico (Padrão)



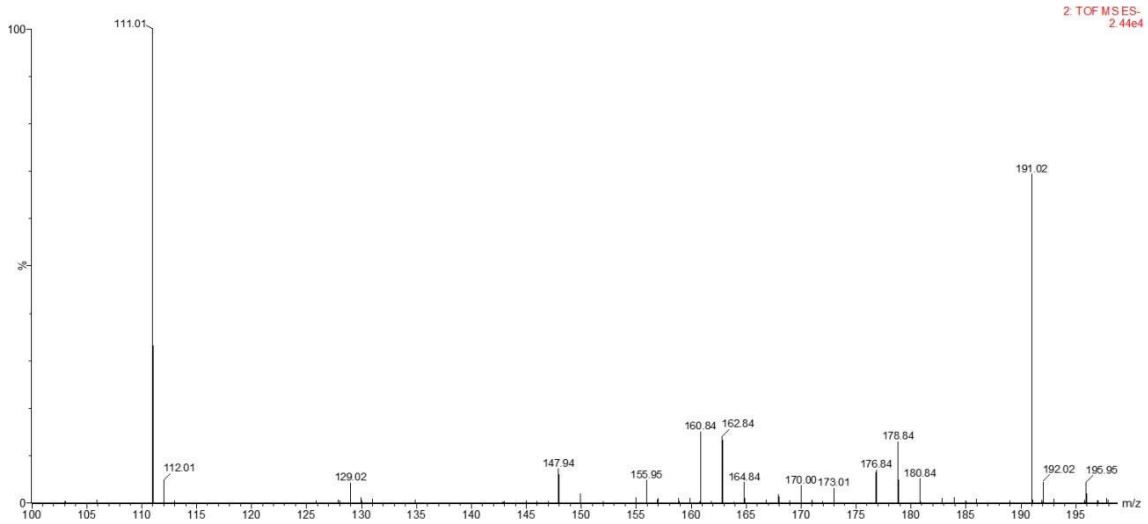
m/z – Ácido cafeico (Padrão)



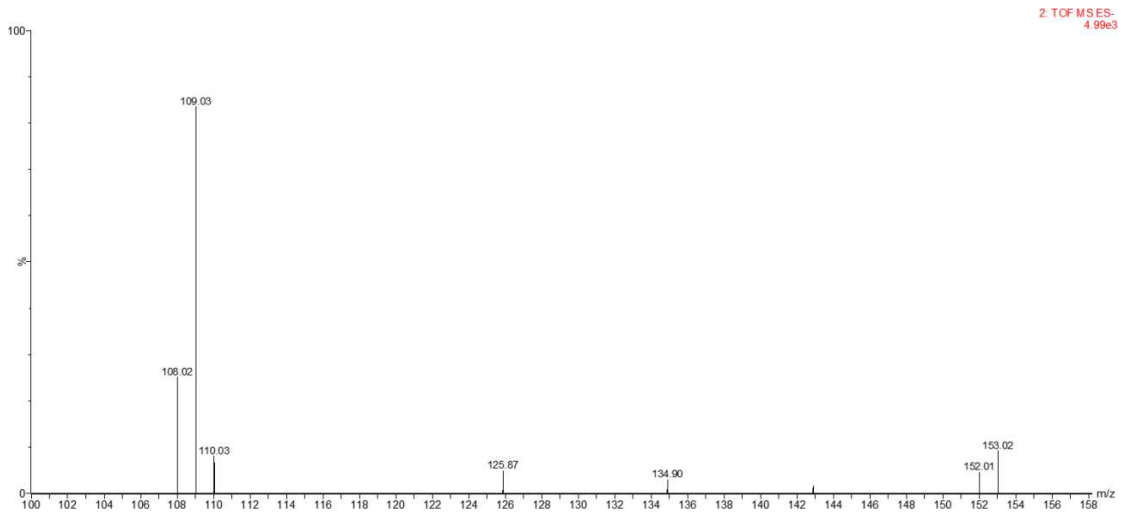
m/z 191 – Ácido Quínico



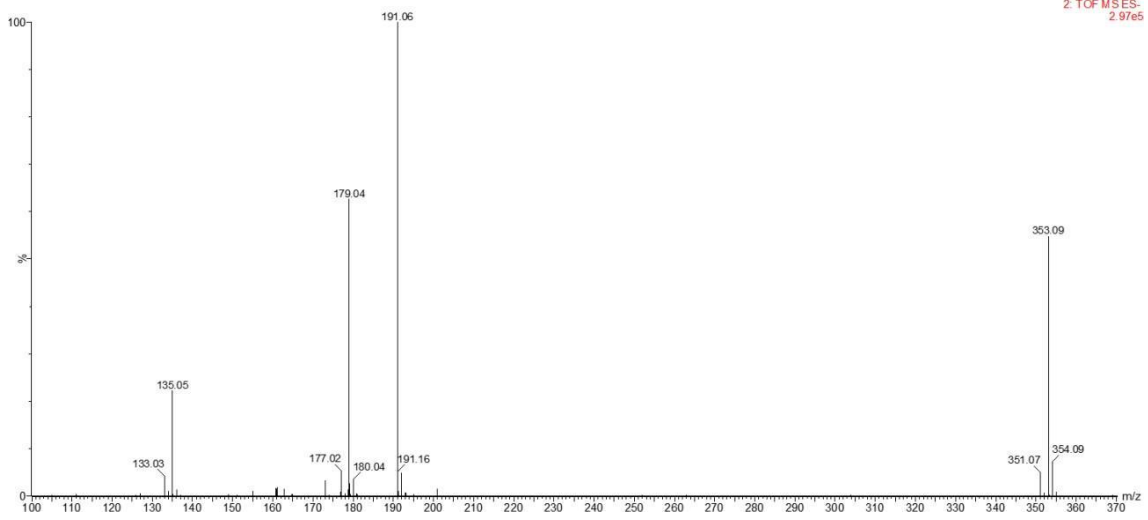
m/z 191 – Ácido Cítrico



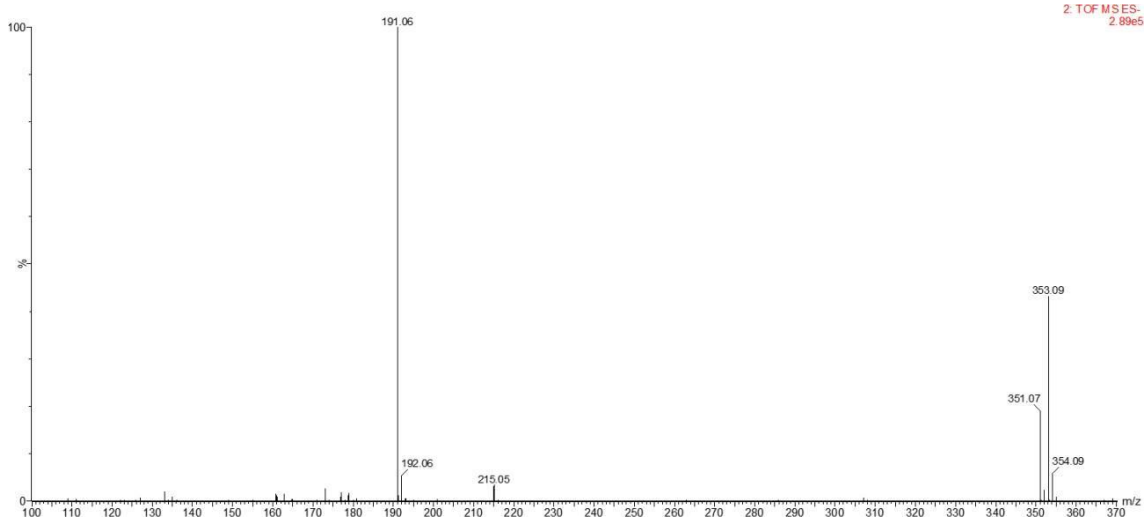
m/z 153 – Ácido protocatecuico



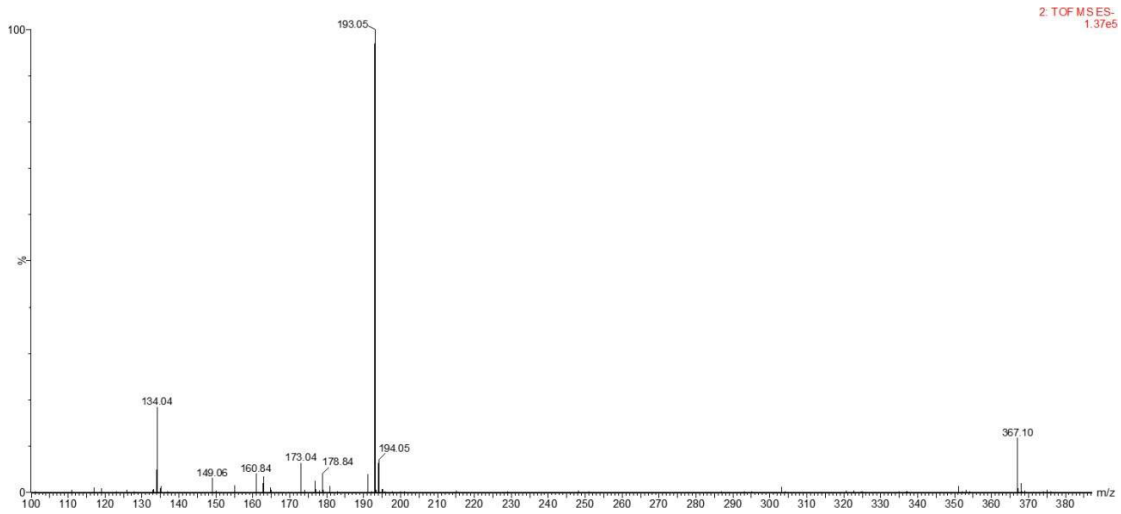
m/z 353 – Ácido 3-o-cafeoilquínico



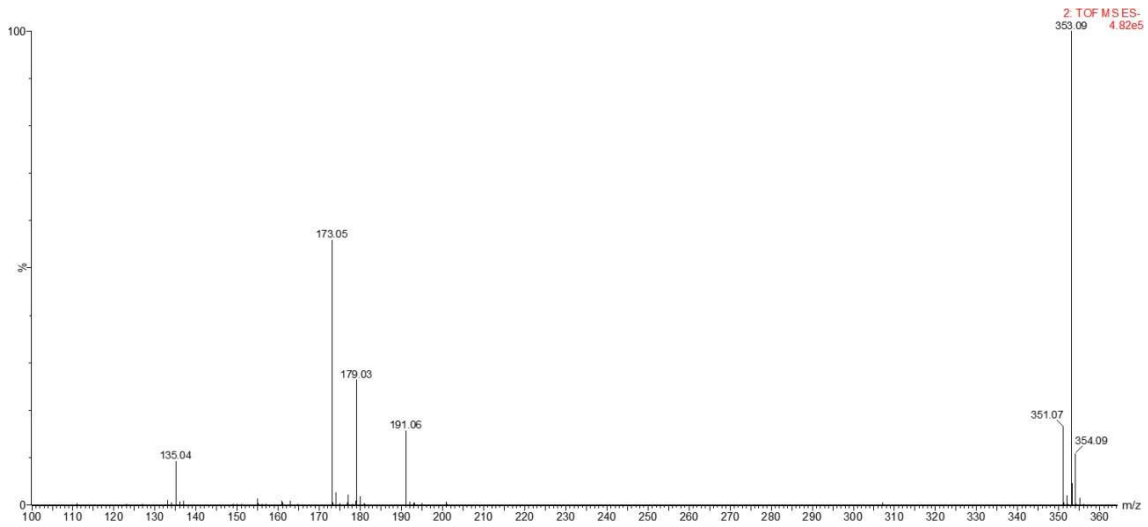
m/z 353 – Ácido 5-o-cafeoilquínico



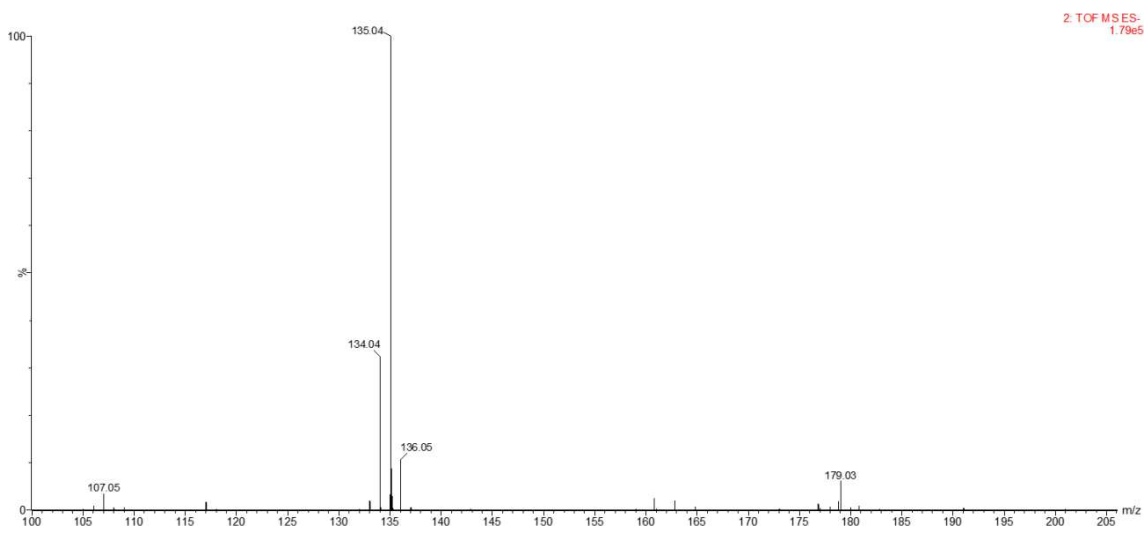
m/z 367 – Ácido feruloilquínico (isômero)



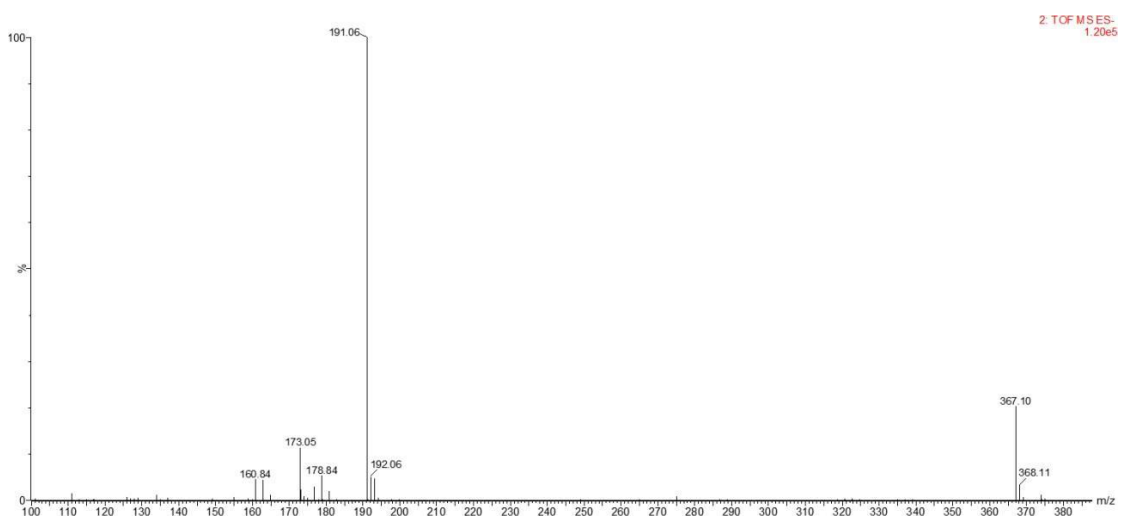
m/z 353 – Ácido 4-o-cafeoilquínico



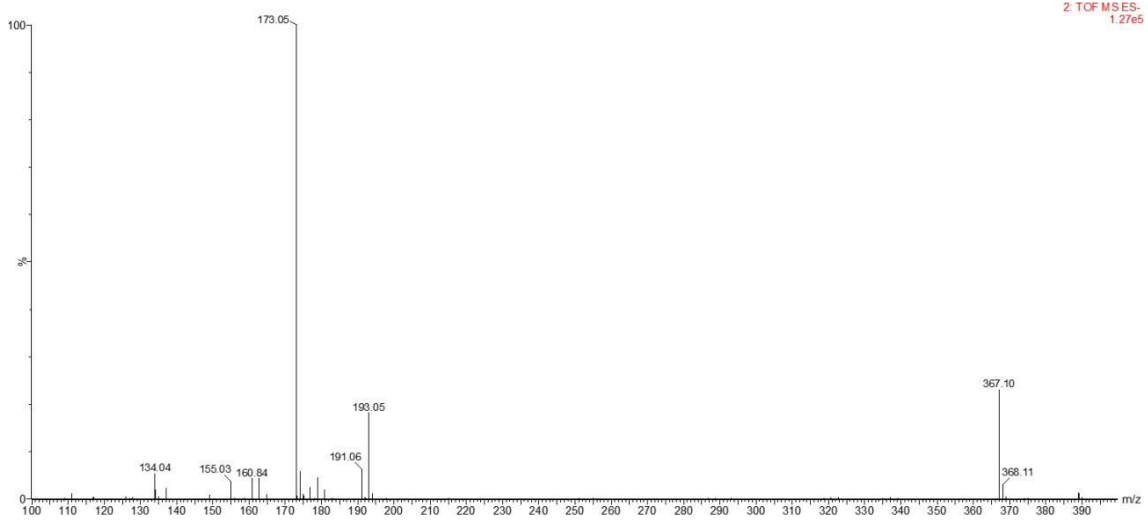
m/z 179 – Ácido cafeico



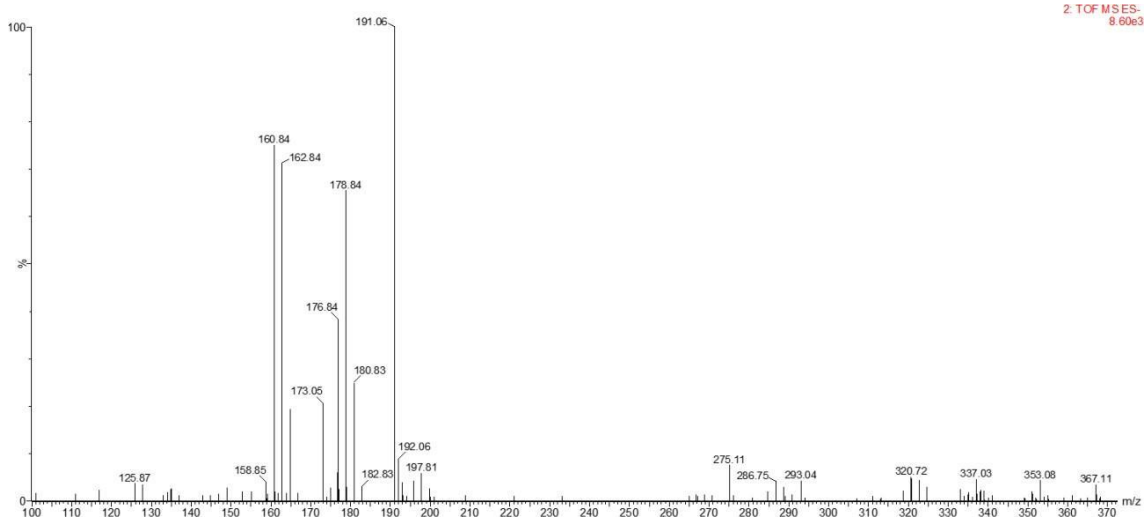
m/z 367 – Ácido feruloilquínico (isômero)



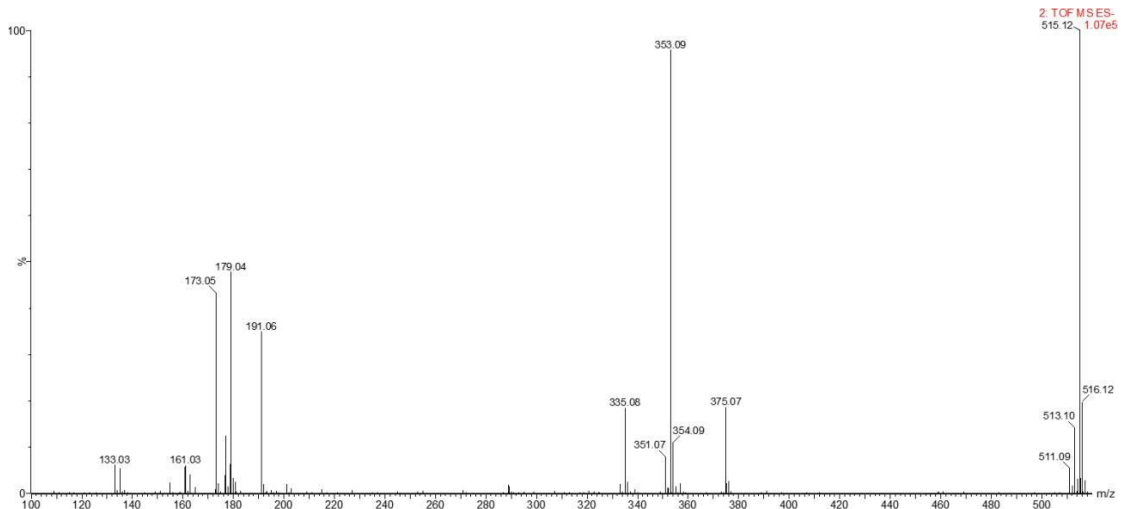
m/z 367 – Ácido feruloilquínico (isômero)



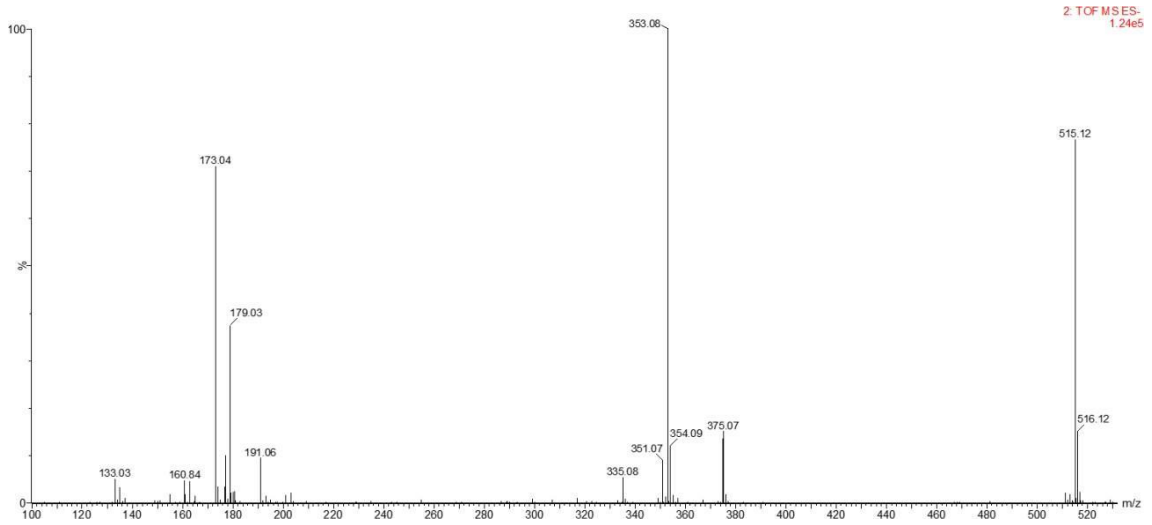
m/z 367 – Ácido feruloilquínico (isômero)



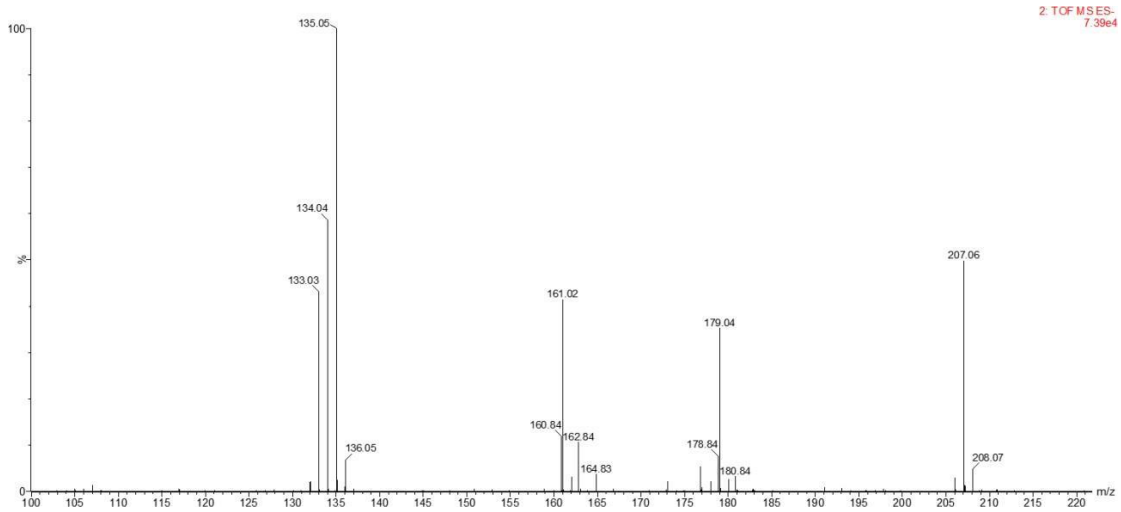
m/z 515 – Ácido dicafeoilquínico (isômero)



m/z 515 – Ácido dicafeoilquínico (isômero)



m/z 207 – Desconhecido (Ácido dimetilcafeico)

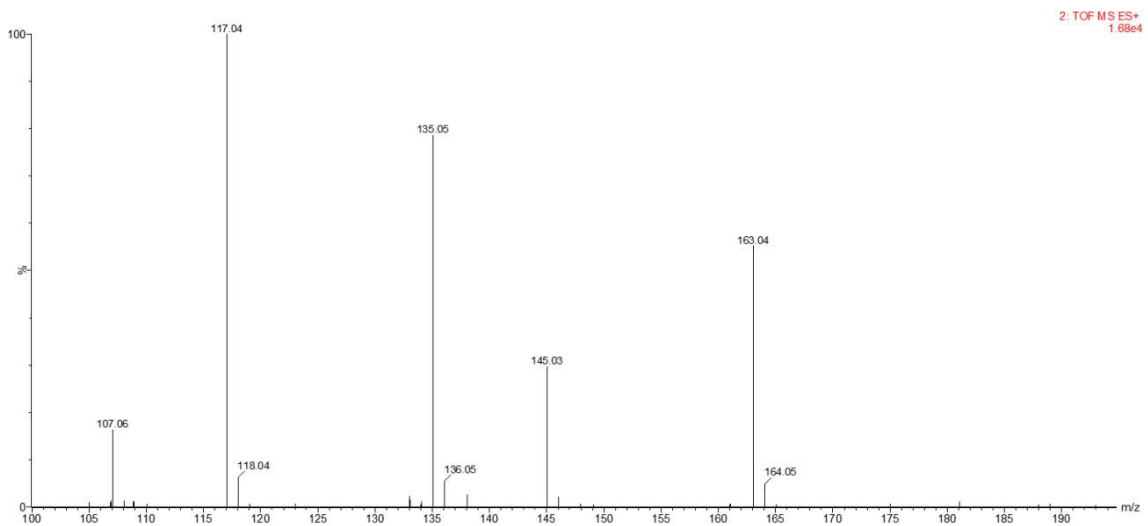


APÊNDICE B - ESI(+) MS/MS dos compostos citados na Tabela 6.

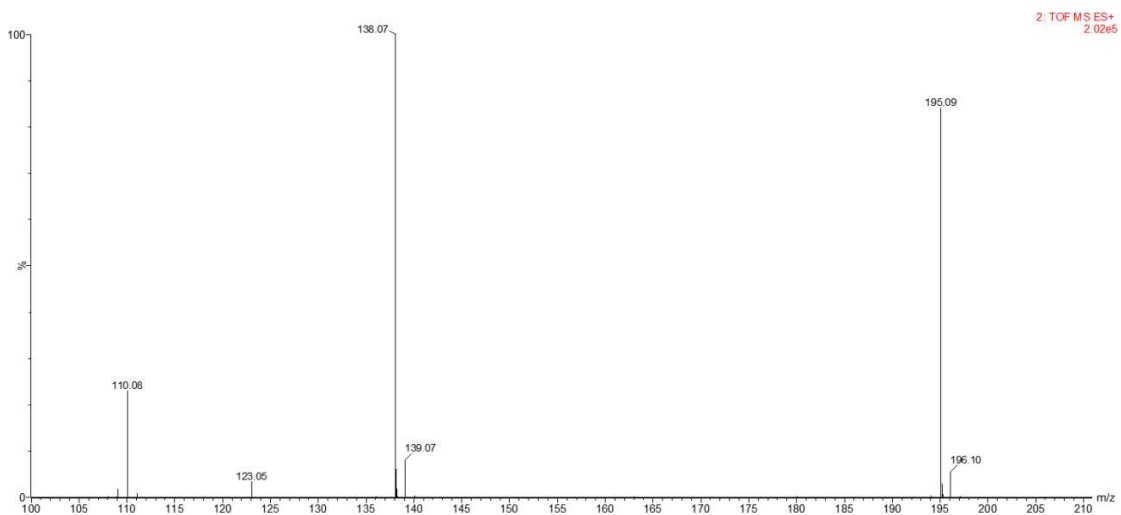
m/z 377 – 5-ACQ (Padrão)



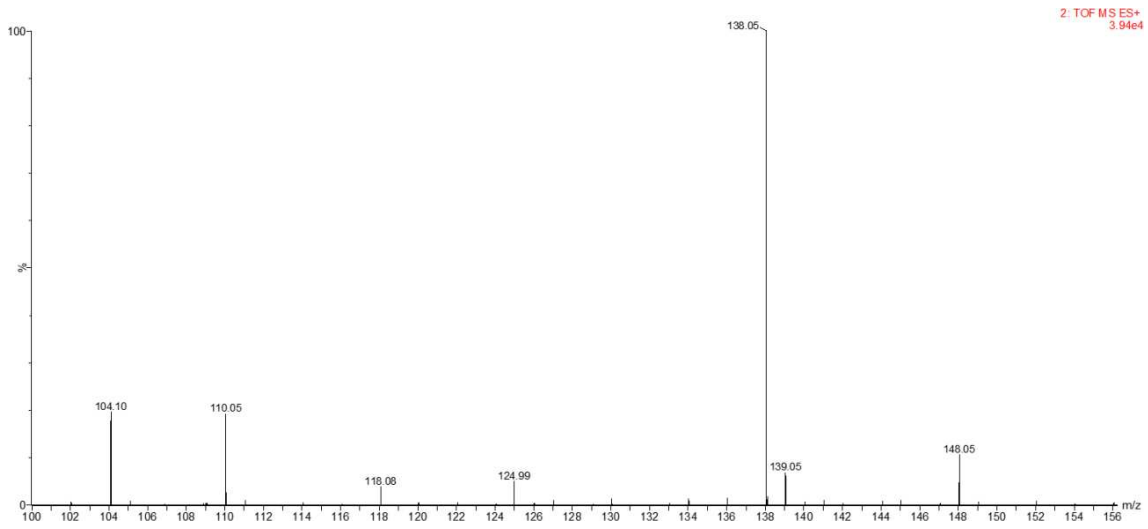
m/z 181 – Ácido cafeico (Padrão)



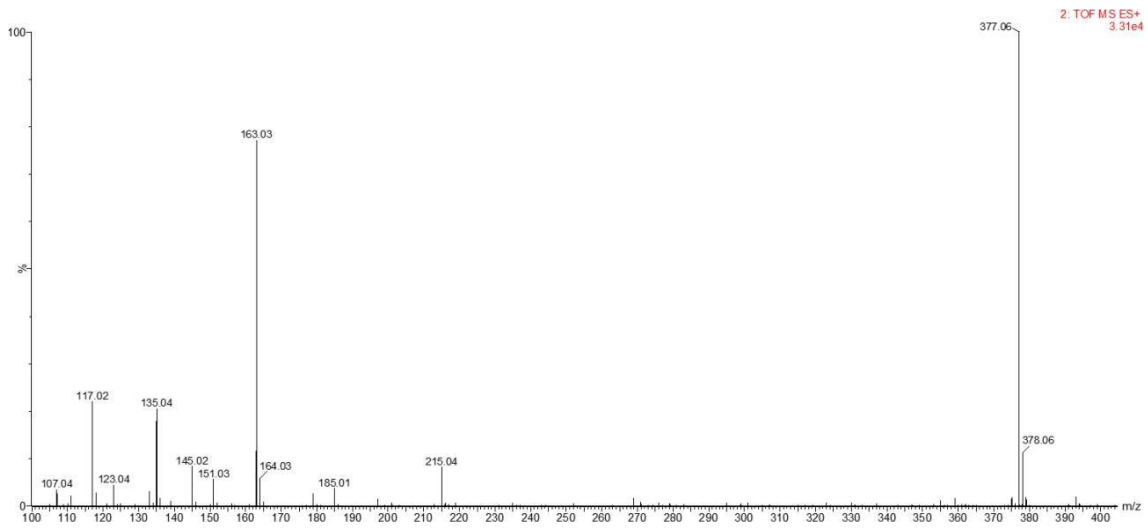
m/z 195 – Cafeína (Padrão)



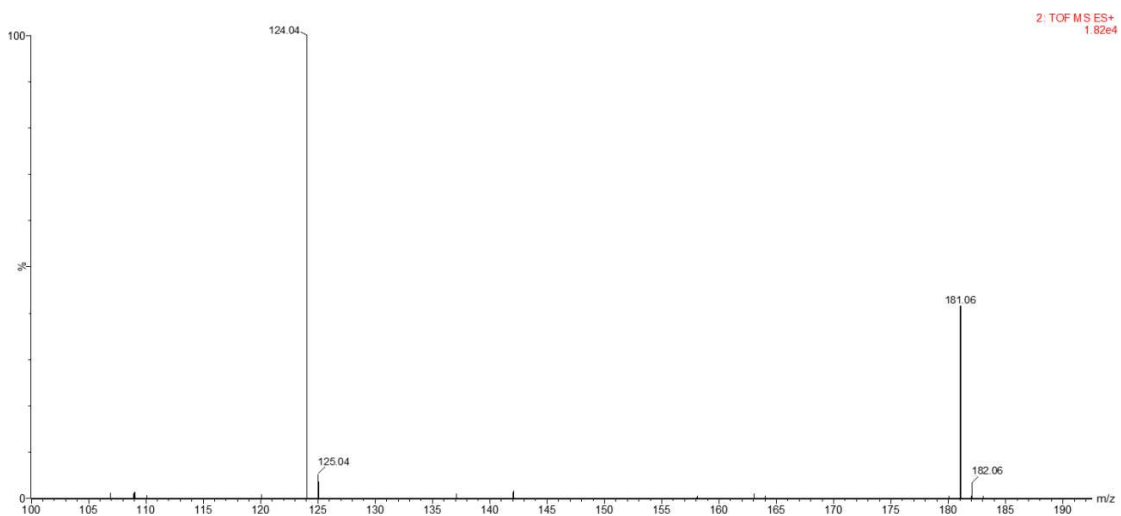
m/z 138 – Trigonelina

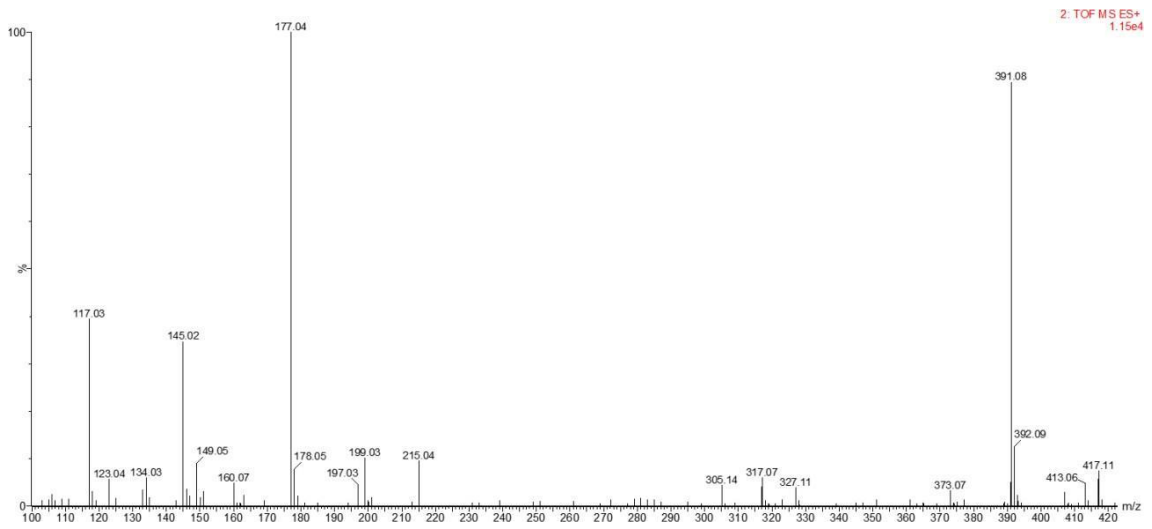
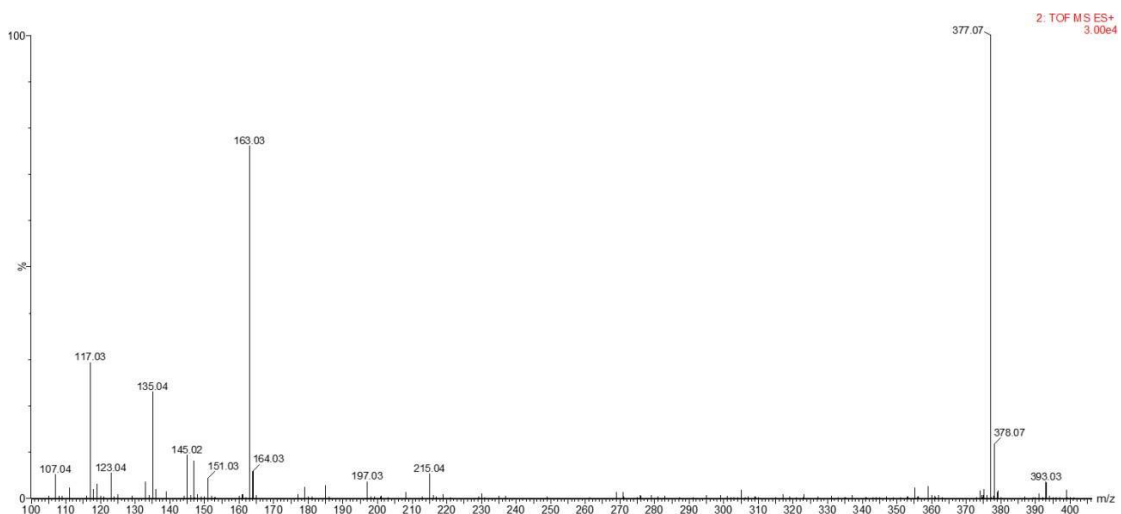


m/z 377 – 3-ACQ

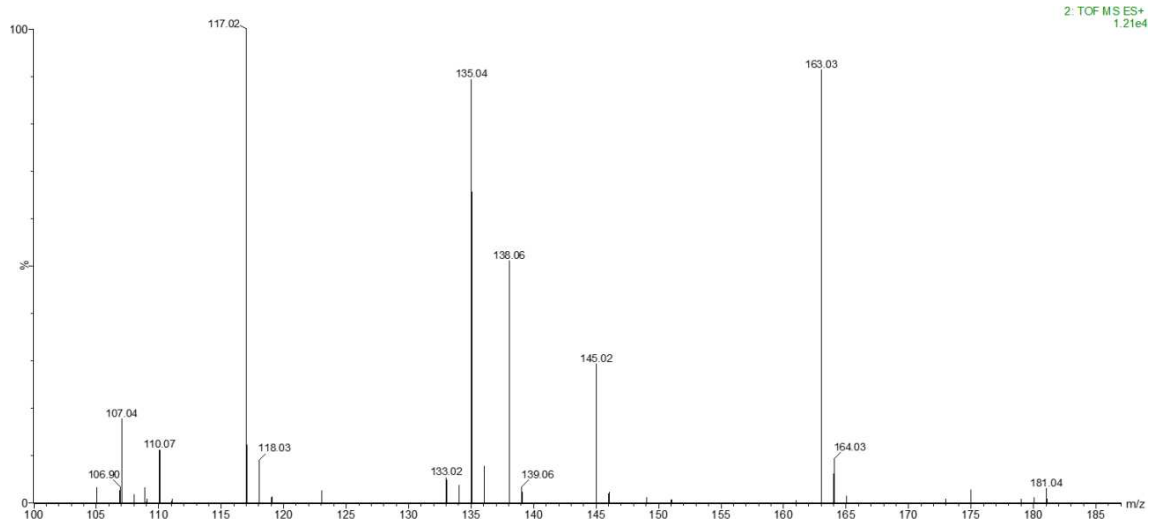


m/z 181 – Teofilina

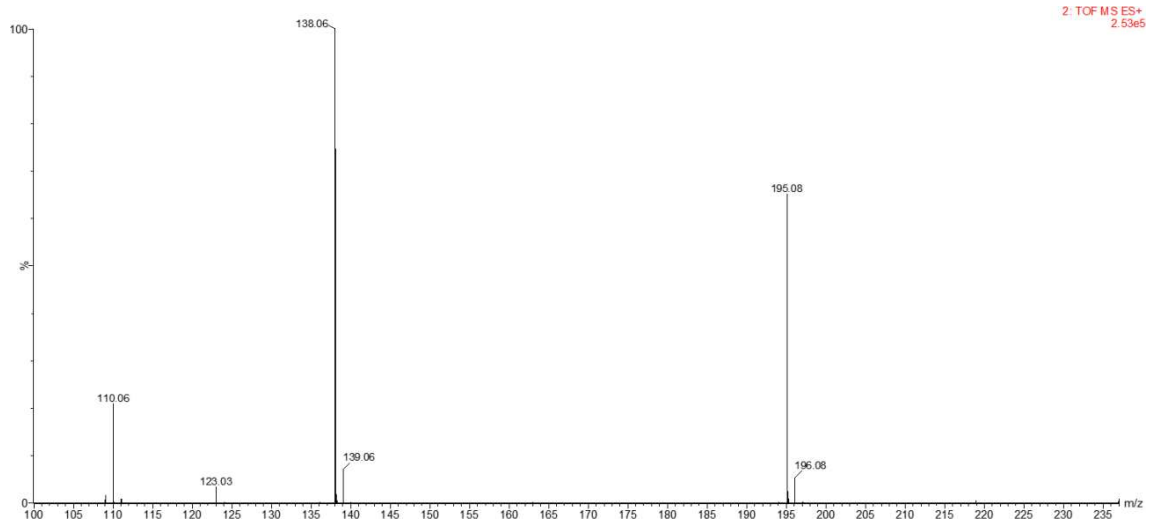


m/z 377 – 5-ACQ m/z 391 – Ácido feruloilquínico (isômero) m/z 377 – 4-ACQ

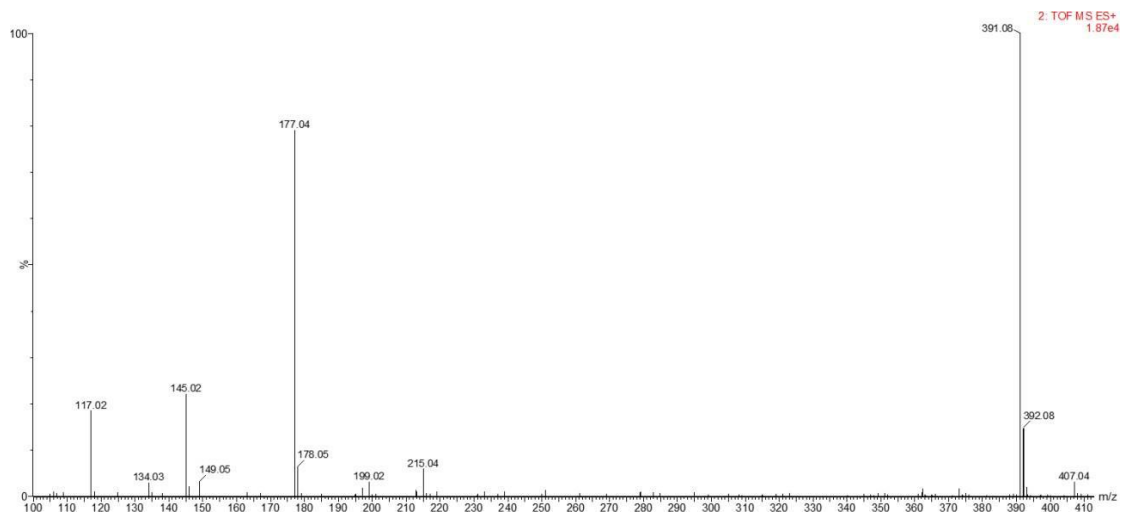
m/z 181 – Ácido cafeico



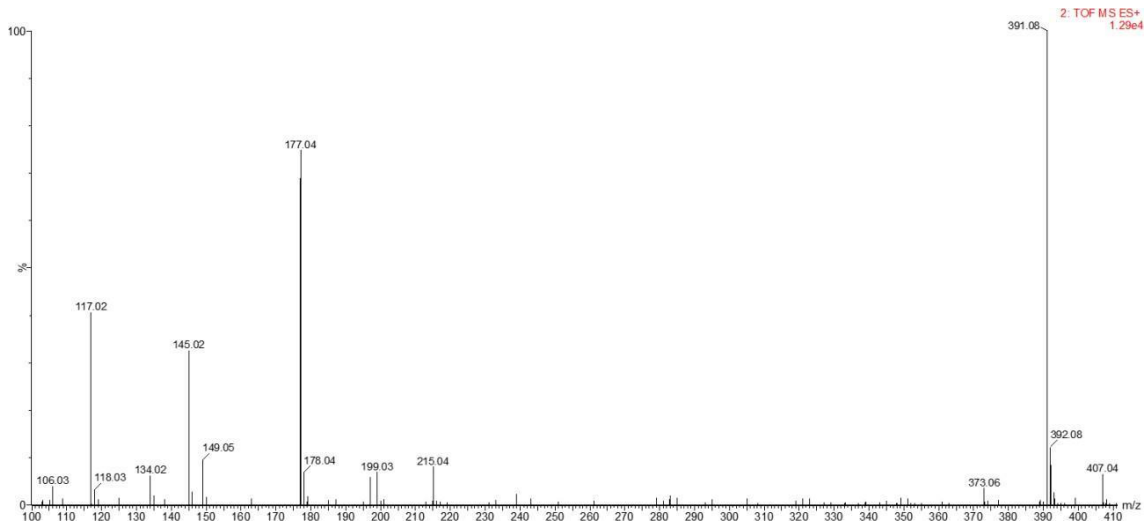
m/z 195 – Cafeína



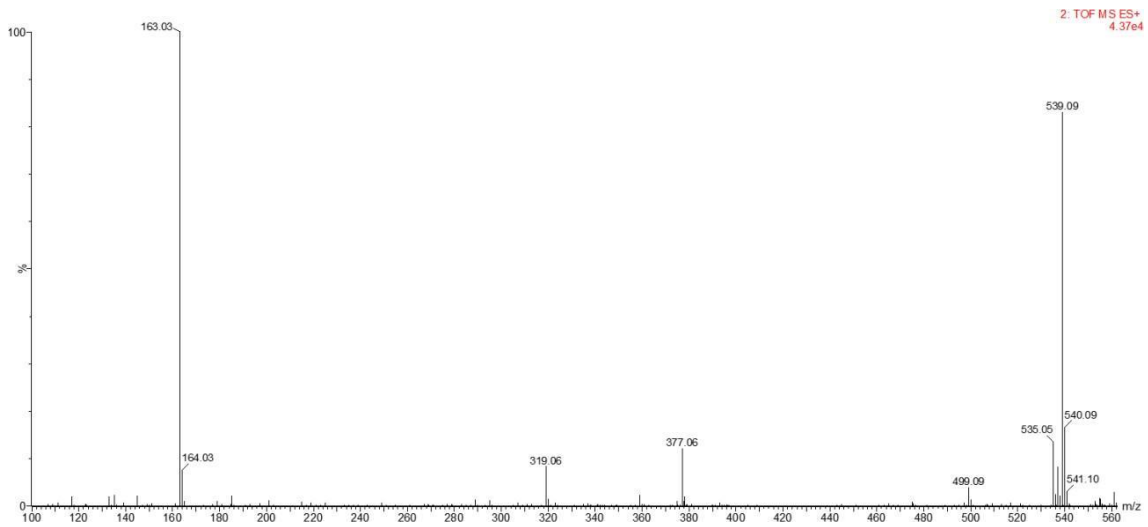
m/z 391 - Ácido feruloilquínico (isômero)



m/z 391 - Ácido feruloilquínico (isômero)



m/z 539 - Ácido dicafeoilquínico (isômero)



m/z 539 - Ácido dicafeoilquínico (isômero)

