UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Aplicação do óleo de café em formulações cosméticas: avaliação
da estabilidade e da eficácia fotoprotetora**

Tais Aleriana Lucon Wagemaker

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Aplicação do óleo de café em formulações cosméticas: avaliação
da estabilidade e da eficácia fotoprotetora**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
para obtenção do Título de Doutora em
Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientada: Tais Aleriana Lucon Wagemaker

Orientadora: Patricia Maria Berardo Gonçalves
Maia Campos

Ribeirão Preto
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Wagemaker, Tais Aleriana Lucon

Aplicação do óleo de café em formulações cosméticas: avaliação da estabilidade e da eficácia fotoprotetora. Ribeirão Preto, 2013. 99p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Patricia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos.

1. Óleo de café. 2. Cosméticos. 3. Fotoproteção.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tais Aleriana Lucon Wagemaker

Aplicação do óleo de café em formulações cosméticas: avaliação da estabilidade e da eficácia fotoprotetora

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Patricia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus queridos pais e à minha irmã pelo apoio, compreensão e incentivo.

Agradecimento

À Deus, pela saúde, força, coragem e determinação

Aos meus pais pelo apoio incondicional

À minha irmã pelos ensinamentos

À Tia Neile pelo apoio nas viagens

À Tia Olga pelas palavras doces nos momentos difíceis

À FAPESP e à CAPES pelas bolsas de estudo

À Profa. Patricia por ter acreditado no meu potencial desde o primeiro momento, pelos ensinamentos e pelo estágio em Lisboa

À Mariana, que além de toda ajuda, também é uma grande amiga

Às grandes amigas do laboratório Daiane e Jirrah, pelas conversas e ensinamentos

À Soninha por ter sido uma “irmã mais velha”, a Deidi pela paciência e alegria de viver e às duas por todos os ensinamentos e companheirismo

Às amigas do laboratório Josiane, Ana Flora, Mariane, Ananda, Carol e Karina

Às professoras Lorena e Gislaïne e aos alunos Silas, Flávio e Nelson

À Chemyunion e a Linax pelas amostras de óleo de café e a EVIC pela realização dos testes de FPS “in vivo”

Aos professores Luis Alexandre, Marco Andrey, André Baby, Maria Vitória, Greg, Jairo, Lusânia, Elaine, Maria José, Pedro e Gustavo e aos seus alunos e técnicos que de uma maneira ou de outra fizeram parte dos experimentos desenvolvidos neste trabalho: Fabiana, Henrique, José Orestes, Maria José, Jabor, Flávia, Soraia e Daniela

Ao seu Antonio e aos funcionários da FCFRP especialmente os da Pós-Graduação

A todos os fornecedores de matéria-prima

À Paula, Uni e D. Dina por tornarem minha estadia em Lisboa mais agradável

Ao professores Luis, Patrícia, Ana Sofia, Catarina Reis, Catarina Rosado e ao pessoal do laboratório CBIOS Luis, Ana Gomes, Ana Motta, Rita, Raquel e Graziela. À D. Filomena e aos funcionários da Universidade Lusófona

À Cássia, Nilson e Guerreiro pelos ensinamentos e pela patente

Aos professores Brito e Márcia pela amizade e pelas cartas de recomendação

Aos meus avós que infelizmente não estão mais entre nós

Ao Carlos e família

Aos meus médicos Dr. Hamilton, Dr. Marques, Dra. Ana Helena

RESUMO

WAGEMAKER, T.A.L. **Aplicação do óleo de café em formulações cosméticas: avaliação da estabilidade e da eficácia fotoprotetora.** 99f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O óleo de café é uma mistura de compostos lipofílicos rico em triglicerídeos de ácidos graxos essenciais, em especial o ácido linoleico. Devido a sua rica composição e ao alto teor de materiais insaponificáveis, o óleo de café extraído dos grãos sem torrefação, possui propriedades emolientes, hidratantes e de proteção contra radiação solar. Desta forma, este trabalho teve como objetivo desenvolver formulações cosméticas estáveis contendo óleo de café e avaliar o potencial fotoprotetor destas. Para isso foram avaliadas diversas combinações de matérias-primas para elaboração de formulação em cremes e géis-cremes das quais foram selecionadas as mais estáveis, por meio de testes de centrifugação, determinação do pH e avaliação organoléptica, para avaliação do comportamento reológico e da presença de cristais líquidos durante 90 dias de armazenamento. As formulações a base de álcool cetearyl alcohol e cetareth-20 foram as mais estáveis e que apresentaram maior FPS pelos métodos espectrofotométricos de avaliação do fator de proteção solar sendo que as formulações contendo 5 e 10% de óleo foram as melhores na otimização destes dois parâmetros. Estas formulações foram então aplicadas no dorso de animais de experimentação diariamente durante 5 dias e, após este período de tratamento, os animais foram irradiados. No local de aplicação das formulações foram realizadas medidas de biofísica da pele, pelas quais pôde se observar uma menor perda transepidérmica de água para as formulações contendo óleo de café. Além disso, o número de células de queimadura solar contados por análise histológica foi significativamente menor para as formulações contendo filtro e óleo de café em relação à pele sem tratamento, indicando que o óleo de café foi capaz de proteger as células da epiderme contra os efeitos danosos da radiação ultravioleta. Tal efeito protetor pode ser devido, não somente à alta concentração de materiais insaponificáveis que conseguem absorver a radiação UV-B, mas também, à alta concentração de ácidos graxos essenciais que podem auxiliar na reposição, equilíbrio e manutenção da barreira cutânea. Além de ensaios para avaliar a eficácia fotoprotetora “in vitro” e “in vivo”, foram também realizados ensaios de toxicidade “in vitro” em *Artemia salina*, redução do MTT em cultura de queratinócitos e testes clínicos em voluntários, os quais mostraram que o óleo de café e as formulações desenvolvidas não apresentaram toxicidade e irritabilidade dérmica nas concentrações e condições de estudo. Por fim, no que concerne à avaliação sensorial, foram realizados dois painéis sensoriais, em Portugal e no Brasil. Em ambos os locais, maioria das voluntárias percebeu a pele macia e hidratada após a aplicação destas formulações. Ainda nesse sentido, em Lisboa, a maioria das voluntárias percebeu um filme oleoso deixado na pele, o que pode ser um efeito positivo, considerando o uso das formulações em países de clima frio e para pele seca. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que as formulações desenvolvidas foram estáveis, seguras e eficazes tanto para o equilíbrio e manutenção da barreira cutânea quanto para proteção da pele contra radiação ultravioleta, indicando que o óleo de café destaca-se dentre os ingredientes cosméticos utilizados em produtos hidratantes e fotoprotetores por possuir propriedades multifuncionais extremamente importantes e requeridas para a indústria e os consumidores como hidratação, melhora da barreira cutânea e potencial fotoprotetor.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, fotoproteção, toxicidade, cosméticos, sensorial

ABSTRACT

WAGEMAKER, T.A.L. **Application of green coffee oil in cosmetic formulations: evaluation of stability and photoprotective efficacy.** 99f. Thesis (Doutoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Coffee oil is a mixture of lipophilic ingredients rich in essential fatty acids, mainly linoleic acid. Due to its rich composition and high unsaponifiable matter content, the coffee oil extracted from unroasted coffee beans presents important cosmetic properties such as emolliency, moisturizing and UVB radiation protective effects. Thus, the aim of this study was to develop stable cosmetic formulations containing coffee oil and to evaluate their safety and photoprotective efficacy. For this, several combinations of cosmetic raw materials were used to prepare emulsions and gel creams. The formulations that did not suffer phase separation in centrifugation tests and did not present changes in pH and organoleptic characteristics, were chosen for evaluation of rheological behavior and liquid crystal presence during 90 days. The formulations composed by cethearyl alcohol and cetearth-20 were the most stable and presented the highest sun protection factor (SPF). The formulations containing 5 and 10% of coffee oil optimized these two parameters: stability and SPF. The formulations containing coffee oil and the vehicle were applied on the dorsum of the animals once a day for 5 days as a treatment. After this period, the animals were irradiated. On the irradiated local, transepidermal water loss measurements were lower on the region where the formulations containing coffee oil were applied. The sunburn cells number analyzed by histological tests was also significantly lower for the groups treated with coffee oil formulations comparing to the untreated group which indicates that the coffee oil was able to protect the epidermis against the deleterious effects of UV radiation. This photoprotective effect could be due to as high amount of unsaponifiable matter that are able to absorb UVB radiation as high concentration of essential fatty acids that can help in recovering, balance and keeping of skin barrier. In terms of safety assays, the brine shrimp, MTT reduction in keratinocyte cell culture and clinical assays showed that the developed formulations are devoid of considerable toxicity in these experimental conditions. Finally, the sensory properties evaluation were performed using two panels: one in Portugal and other in Brazil. The majority of volunteers perceived smooth and moisturized skin after applying coffee oil formulations in both countries. In Lisbon, the majority of volunteers also perceived an oily film on skin, which can be a positive effect taking into account the use of developed formulations in cold countries and dry skin. Thus, we concluded that the developed formulations were stable, safe and showed efficacy in keeping the cutaneous barrier balance as well as protecting the skin against UV radiation effects. This indicates that the coffee oil highlights among the cosmetic ingredients used in moisturizers and sunscreens due to its multifunctional important and desirable properties for cosmetic industry and consumers such as: hydration, skin barrier improvement and photoprotective effects. This indicates that the coffee oil is a multifunctional active ingredient and has desirable properties for cosmetic industry and consumers such as: emollience, hydration, skin barrier improvement and photoprotective effects.

Keywords: *Coffea arabica*, photoprotection, toxicity, cosmetics, sensorial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotos de <i>A. Salina</i> (BUSTOS-OBREGON e VARGAS, 2010)	12
Figura 2- Corte de pele humana mostrando as três camadas: derme, epiderme e hipoderme, e seus anexos (PORTAL EDUCAÇÃO, 2009)	14
Figura 3. Questionário de avaliação das propriedades sensoriais	33
Figura 4. Viscosidade aparente das formulações a base de *C contendo 0; 2,5; 5; 10 e 15% de óleo de café em função do período a 25° C (média de 3 repetições).....	44
Figura 5. Viscosidade aparente das formulações a base de *C contendo 0; 2,5; 5; 10 e 15% de óleo de café em função do período a 45° C (média de 3 repetições).....	44
Figura 6. Viscosidade aparente das formulações a base de *R contendo 0; 2,5; 5; 10 e 15% de óleo de café em função do período a 25° C (média de 3 repetições).....	45
Figura 7. Viscosidade aparente das formulações a base de *R contendo 0; 2,5; 5; 10 e 15% de óleo de café em função do período a 45° C (média de 3 repetições).....	46
Figura 8. Viscosidade aparente das formulações a base de *U contendo 0 (U0), 2,5 (U2), 5 (U5), 10 (U10) e 15% (U15) de óleo de café em função do período a 25° C (média de 3 repetições).....	47
Figura 9. Viscosidade aparente das formulações a base de *U contendo 0 (U0), 2,5 (U2), 5 (U5), 10 (U10) e 15% (U15) de óleo de café em função do período a 45° C (média de 3 repetições).....	47
Figuras 10 e 11. Tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para as formulações a base de *R contendo 0 ; 2,5; 5; 10 e 15% armazenadas a 25° (10a e 10b) e 45° C (11a e 11b) no tempo inicial de armazenamento (a) e após 90 dias de armazenamento (b)	48 e 49
Figuras 12 e 13. Tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para as formulações a base de *C contendo 0; 2,5; 5,0; 10,0 e 15% armazenadas a 25° (12a e 12b) e 45° C (13a e 13b) no tempo inicial de armazenamento (a) e após 90 dias de armazenamento (b)	50 e 51
Figuras 14. Tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para as formulações a base de *U contendo 0; 2,5; 5,0; 10,0 e 15% armazenadas a 25° após 28 dias de armazenamento.....	52
Figura 15. Fotos obtidas por microscopia de luz polarizada mostrando a presença de cristais líquidos nas formulações sem óleo de café a base das 3 ceras autoemulsionantes: *C (A e B), *R (C e D) e *U (E e F) nos períodos inicial de estudo e após 90 dias de armazenamento a temperatura ambiente	53

Figura 16. Curva dose-resposta de óleo de café para atividade antioxidante pelo método do DPPH.....	54
Figura 17. Curva dose-resposta do BHT para atividade antioxidante pelo método do DPPH.....	54
Figura 18. Inibição do DPPH (%) de acordo com as formulações contendo crescente concentração de óleo de café. (F2 – formulação contendo 2,5% de óleo de café, F5 - formulação com 5% de óleo de café, F10 – formulação com 10% de óleo de café e F15 – formulação contendo 15% de óleo de café).....	55
Figura 19. Curvas de absorbância das formulações desenvolvidas com *C (a) e *U (b) - F0 (formulação contendo somente filtro hidrossolúvel UVA-B), F2 (formulação contendo filtro hidrossolúvel UVA-B e 2,5% de óleo de café), F5 (formulação contendo filtro hidrossolúvel UVA-B e 5% de óleo de café), 0 (formulação veículo – sem óleo de café ou filtro hidrossolúvel UVA-B), 2 (formulação contendo 2,5% de óleo de café), 5 formulação contendo 5% de óleo de café), 10 (formulação contendo 10% de óleo de café) e 15 (formulação contendo 15% de óleo de café).....	57
Figura 20. Índice de eritema médio para os tratamentos de estudo obtido nas regiões irradiadas. Letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5%.....	60
Figura 21. Perda de água transepidérmica para os tratamentos de estudo obtida nas regiões irradiadas. Letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5%. (F0 – formulação sem de óleo de café, F5 - formulação com 5% de óleo de café, F10 – formulação com 10% de óleo de café e F5F – formulação contendo 5% de óleo de café + 7,5% de filtro hidrossolúvel).....	61
Figura 22. Número de células de queimadura solar para os tratamentos de estudo obtida nas regiões irradiadas. Letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5%. (F0 – formulação sem de óleo de café, F5 - formulação com 5% de óleo de café, F10 – formulação com 10% de óleo de café e F5F – formulação contendo 5% de óleo de café + 7,5% de filtro hidrossolúvel).....	62
Figura 23. Foto de microscopia eletrônica mostrando características típicas da pele irradiada desprotegida (controle) como: células apoptóticas (a), derme desestruturada (b) e ausência de estrato córneo (c). (F0 – formulação sem de óleo de café, F5 - formulação com 5% de óleo de café, F10 – formulação com 10% de óleo de café e F5F – formulação contendo 5% de óleo de café + 7,5% de filtro hidrossolúvel).....	63
Figura 24. Foto de microscopia eletrônica mostrando características da pele irradiada protegida com formulação contendo filtro hidrossolúvel + 5% de óleo de café como: pequeno número de células apoptóticas (a), derme estruturada (b) e epiderme mais espessa (c).....	63

Figura 25. Foto de microscopia eletrônica mostrando características da pele irradiada protegida com formulação contendo 10% de óleo de café como: pequeno número de células apoptóticas (a), derme estruturada (b) e epiderme mais espessa (c)	64
Figura 26. Curva padrão da concentração do caveol.....	64
Figura 27. Curva dose-resposta para cada formulação em termos de letalidade avaliada pelo ensaio com <i>Artemia salina</i> . . (F2 – formulação contendo 2,5% óleo de café, F5- formulação com 5% de óleo de café, F10 – formulação com 10% de óleo de café e F15 – formulação contendo 15% de óleo de café).....	65
Figura 28. Cultura de queratinócitos antes da realização do experimento	66
Figura 29. Coloração das células pelo MTT mostrando alta viabilidade celular	66
Figura 30. Dose-resposta para cada formulação em termos de viabilidade celular avaliada pelo método de MTT. F2, formulação contendo 2.5% de óleo de café, F5, formulação contendo 5%, F10, formulação contendo 10%, F15, formulação contendo 15%	67
Figura 31. Média e desvio padrão das medidas de perda de água transepidérmica ($\text{g/m}^2\text{h}$) de cada tratamento durante 3 dias consecutivos - controle, sem qualquer formulação, F0 - formulação sem óleo de café e F15 - formulação contendo 15% de óleo de café. (0, 24 e 48 horas após a aplicação das formulações).Letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	68
Figura 32. Média e desvio padrão das medidas do conteúdo aquoso do estrato córneo (u.a.) durante 3 dias consecutivos para cada tratamento: controle, sem qualquer formulação; F0 - formulação sem óleo de café e F15 - formulação contendo 15% de óleo de café. (0, 24 e 48 horas após a aplicação das formulações)	68
Figura 33. Média e desvio padrão das medidas do índice de eritema (u.a.) durante 3 dias consecutivos para cada tratamento: controle, sem qualquer formulação; F0 - formulação sem óleo de café e F15 - formulação contendo 15% de óleo de café. (0, 24 e 48 horas após a aplicação das formulações).....	69
Figura 34. Adesivo contendo as formulações de estudo	69
Figura 35. Adesivo aplicado nas costas de voluntária.....	70
Figura 36. Local de aplicação das formulações imediatamente após retirada do adesivo	70
Figura 37. Percepção das voluntárias brasileiras durante a aplicação das formulações (% do total de voluntárias). F0 – formulação sem óleo de café e F15 – formulação contendo 15% de óleo de café.....	71

Figura 38. Percepção das voluntárias portuguesas durante a aplicação das formulações (% do total de voluntárias). F0 – formulação sem óleo de café e F15 – formulação contendo 15% de óleo de café..... 71

Figura 39. Percepção das voluntárias brasileiras dos efeitos na pele logo após a aplicação das formulações. F0 – formulação sem óleo de café e F15 – formulação contendo 15% de óleo de café (% do total de voluntárias) 72

Figura 40. Percepção das voluntárias portuguesas dos efeitos na pele logo após a aplicação das formulações (% do total de voluntárias). F0 – formulação sem óleo de café e F15 – formulação contendo 15% de óleo de café..... 72

Figura 41. Percepção das voluntárias brasileiras durante a aplicação das formulações (% do total de voluntárias). F0 - formulação sem óleo de café, F2 – formulação contendo 2,5% de óleo, F5 - formulação contendo 5% de óleo, F10 - formulação contendo 10% de óleo e F15 - formulação contendo 15% de óleo de café..... 73

Figura 42. Percepção das voluntárias brasileiras dos efeitos na pele logo após a aplicação das formulações (% do total de voluntárias). F0 - formulação sem óleo de café, F2 – formulação contendo 2,5% de óleo, F5 - formulação contendo 5% de óleo, F10 - formulação contendo 10% de óleo e F15 - formulação contendo 15% de óleo de café..... 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição da composição das formulações em creme desenvolvidas	22
Tabela 2. Descrição da composição das formulações em gel-creme desenvolvidas	23
Tabela 3. Formulações em creme contendo filtro hidrossolúvel UVA-B e seus respectivos pHs.....	23
Tabela 4. Comprimento de onda e respectivo fator de multiplicação utilizados para cálculo do FPS	28
Tabela 5. pH das formulações em gel-creme desenvolvidas	39
Tabela 6. pH das formulações em creme desenvolvidas	40
Tabela 7. Índices de consistência das formulações desenvolvidas em função do período e da temperatura de armazenamento (média de 3 repetições).....	41
Tabela 8. Índices de fluxo das formulações desenvolvidas em função do período e da temperatura de armazenamento (média de 3 repetições).....	42
Tabela 9. Viscosidade aparente das formulações a base de *C em função do período e da temperatura de armazenamento (média de 3 repetições).....	43
Tabela 10. Viscosidade aparente das formulações a base de *R em função do período e da temperatura de armazenamento (média de 3 repetições).....	45
Tabela 11. Efeitos antimicrobianos para cada tratamento, amostra 20 mg/mL (n=3).....	55
Tabela 12. Formulações desenvolvidas e suas respectivas integrais das curvas de absorbância	56
Tabela 13. Fator de proteção solar calculado pelo método de MANSUR et al. (1986) para as formulações de estudo	58
Tabela 14. FPS obtido de acordo com a concentração de óleo de café e de filtro 2- phenyl-1H- benzimidazole- 5- sulphonic acid + benzophenone-4 utilizando método de espectrofotométrico de refletância com esfera integrada	59
Tabela 15. Índice de eritema médio das regiões irradiada e não irradiadas. (F0 – formulação sem de óleo de café, F5 - formulação com 5% de óleo de café, F10 – formulação com 10% de óleo de café e F5F – formulação contendo do 5% de óleo de café + 7,5% de filtro hidrossolúvel)	60

Tabela 16. Perda transepidérmica de água média das regiões irradiada e não irradiadas. (F0 – formulação sem de óleo de café, F5 - formulação com 5% de óleo de café, F10 – formulação com 10% de óleo de café e F5F – formulação contendo 5% de óleo de café + 7,5% de filtro hidrossolúvel) 61

Tabela 17. Número médio de células de queimadura solar das regiões irradiada e não irradiadas. (F0 – formulação sem de óleo de café, F5% - formulação com 5% de óleo de café, F10 – formulação com 10% de óleo de café e F5F – formulação contendo 5% de óleo de café + 7,5% de filtro hidrossolúvel)..... 62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHT	Butilhidroxitolueno
CATA	<i>Check-all-that-apply</i>
CLAE	Cromatografia Líquida Alta Eficiência
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DME	Dose Mínima Eritematosa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EVIC	EVIC Brasil
FPS	Fator de Proteção Solar
HaCat	Células de queratinócitos
IC50%	Inibição DPPH a 50% da concentração
IE	Índice de Eritema Médio
INCI	Nomenclatura de Ingredientes Cosméticos
LC _{50%}	Letalidade a 50% da concentração
MTT	Thiazolyl blue tetrazolium bromide
NaOH	Hidróxido de sódio
PABA	Ácido paraminobenzóico
pH	Potencial de hidrogênio iônico
RNA	Ácido ribonucleico
UV	Ultravioleta
UVA	Radiação ultravioleta A
UVB	Radiação ultravioleta B
UVC	Radiação ultravioleta C

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
α	Alfa
μ	Média
e	Erro médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. EXTRATOS E ÓLEOS VEGETAIS	3
2.2. ÓLEO DE CAFÉ	4
2.2.1. COMPOSIÇÃO	4
2.3. APLICAÇÃO DO ÓLEO DE CAFÉ EM COSMÉTICOS	4
2.3.1. POTENCIAL ANTIOXIDANTE	4
2.3.2. POTENCIAL ANTIMICROBIANO	5
2.4. FORMULAÇÕES COSMÉTICAS E PROTETORES SOLARES.....	6
2.5. RADIAÇÃO SOLAR E MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FOTOPROTETOR	8
2.6. ESTABILIDADE E COMPORTAMENTO REOLÓGICO	10
2.7. CRISTAIS LÍQUIDOS.....	11
2.8. SEGURANÇA.....	12
2.8.1. ENSAIO DE LETALIDADE EM <i>ARTEMIA SALINA</i>	12
2.8.2. ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT	13
2.9. PELE E SEGURANÇA CLÍNICA DAS FORMULAÇÕES.....	14
2.10. PROPRIEDADES SENSORIAIS	16
3. OBJETIVOS	18
3.1. OBJETIVO GERAL	18
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. MATERIAL.....	19
4.2. EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	20
4.3. DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES.....	21
4.4. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE	24
4.5. DETERMINAÇÃO DO PH	24
4.6. CENTRIFUGAÇÃO	24
4.7. TESTES DE ESTABILIDADE ACELERADA.....	24
4.8. ESTUDO DA ESTABILIDADE FÍSICA POR DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO.....	25

4.9. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE CRISTAIS LÍQUIDOS NAS FORMULAÇÕES	26
4.10. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ÓLEO DE CAFÉ E FORMULAÇÕES	26
4.11. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	27
4.11.1. ESTIRPES MICROBIANAS	27
4.11.2. MÉTODO DE DIFUSÃO EM POÇO	27
4.12. DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR POR ESPECTROFOTOMETRIA UV/VISÍVEL	27
4.13. DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR POR ESPECTROFOTOMETRIA DE REFLETÂNCIA COM ESFERA INTEGRADA	28
4.14. AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO DA PELE DE CAMUNDONGOS CONTRA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA	29
4.15. QUANTIFICAÇÃO DO COMPOSTO RESPONSÁVEL PELA ABSORÇÃO DA RADIAÇÃO UV-B	30
4.16. LETALIDADE EM <i>ARTEMIA SALINA</i>	31
4.17. HACAT CULTURA DE QUERATINÓCITOS	31
4.18. ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT	31
4.19. AVALIAÇÃO CLÍNICA DE SEGURANÇA	32
4.20. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE CUTÂNEA - “PATCH TEST”	32
4.21. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES SENSORIAIS	33
4.22. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	34
5. RESULTADOS	37
5.1. DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES	37
5.2. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE	38
5.3. DETERMINAÇÃO DO PH	39
5.4. CENTRIFUGAÇÃO	40
5.5. TESTES DE ESTABILIDADE FÍSICA POR DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO	41
5.6. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE CRISTAIS LÍQUIDOS	52
5.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	53
5.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	55
5.9. DETERMINAÇÃO DO FPS “IN VITRO” POR ESPECTROFOTOMETRIA UV/VISÍVEL	56
5.10. DETERMINAÇÃO DO FPS “IN VITRO” POR ESPECTROFOTOMETRIA DE REFLETÂNCIA DIFUSA COM ESFERA INTEGRADA	58

5.11. AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO DA PELE DE CAMUNDONGOS CONTRA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA	59
5.12. QUANTIFICAÇÃO DO COMPOSTO RESPONSÁVEL PELA ABSORÇÃO DA RADIAÇÃO UVB.....	64
5.13. LETALIDADE EM <i>ARTEMIA SALINA</i>	65
5.14. CULTURA CELULAR.....	65
5.15. AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DA APLICAÇÃO TÓPICA DAS FORMULAÇÕES	67
5.16. AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE CUTÂNEA.....	69
5.17. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES SENSORIAIS.....	70
6. DISCUSSÃO	74
7. CONCLUSÕES.....	87
8. REFERÊNCIAS.....	88

1. Introdução

O uso de plantas em cosméticos tem se intensificado nos últimos anos devido ao seu forte apelo comercial. Exemplo disso são os óleos vegetais que, além de serem produtos naturais, apresentam várias propriedades num só ativo cosmético e efeitos sinérgicos que, podem contribuir para melhorar as características físico-químicas e biológicas da pele. Desse modo, aumentam a aceitação do produto pelos consumidores e representam um interessante nicho de mercado.

Um dos óleos vegetais bastante empregados como ativo ou adjuvante em cosméticos é o óleo de café. Este é uma complexa mistura de substâncias com predomínio de triglicerídeos que é extraído dos grãos com ou sem torrefação da espécie *Coffea arabica*.

Este óleo pode ser obtido por prensagem dos grãos ou por extração a quente utilizando solventes orgânicos como éter de petróleo e hexano. O óleo de café torrado é utilizado principalmente como flavorizante enquanto que o óleo de café verde possui propriedades emolientes e hidratantes sendo, portanto, bastante utilizado na indústria cosmética.

Segundo FOLSTAR (1985), o óleo de café verde é composto de triglicerídeos (75,2%), ácidos graxos livres (1%), monoésteres de álcoois diterpênicos com ácidos graxos (18,5%), álcoois diterpênicos (0,4%), ésteres de esteróis com ácidos graxos (3,2%), esteróis (2,2%), tocoferóis (0,05%), fosfatídeos (0,1 a 0,5%) e derivados de hidroxitriptamina que correspondem às ceras dos grãos (0,8%).

De acordo com WAGEMAKER et al. (2011) os principais ácidos graxos encontrados no óleo de café são o ácido linoléico (46,3 g/100g) e o ácido palmítico (30,2 g/100g). O ácido linoléico é, segundo FOSTER, HARDY e ALANY (2010), capaz de promover alívio de eczemas e possui propriedades terapêuticas inclusive de cura de dermatites.

O óleo de café possui ainda a capacidade de absorver a radiação solar ultravioleta entre os comprimentos de onda de 280 e 320 nm (GROLIER e PLESSIS, 1988) e, sendo assim, poderia aumentar o potencial de fotoproteção de formulações cosméticas com esta finalidade. Além disso, apresenta a vantagem de ser um produto natural que poderia reduzir o número e/ou quantidade de filtros artificiais na formulação.

Atualmente existe uma crescente demanda pela utilização de matérias-primas de origem natural na fabricação de produtos cosméticos inclusive em relação a produtos que visam promover a proteção da pele contra radiação solar.

Seguindo essa tendência, o óleo de café pode fornecer substâncias de grande interesse para a indústria cosmética como: a cera que recobre o grão, a qual é fonte de antioxidantes e da qual pode se separar a molécula de serotonina; ácidos graxos cujo principal é o ácido linoléico e substâncias capazes de absorver a radiação UVB.

Além disso, para se desenvolver um produto cosmético deve se ter em mente quatro premissas: *a)* estabilidade, *b)* eficácia, *c)* segurança e *d)* sensorial. Nesse sentido, este trabalho apresenta por meio de métodos de avaliação da estabilidade física e comportamento reológico das formulações, da eficácia na proteção da pele irradiada e não-irradiada, da segurança da aplicação tópica das formulações desenvolvidas e de suas propriedades sensoriais, um panorama da viabilidade técnico/científica da aplicação do óleo de café em fotoprotetores completando os quatro parâmetros necessários para a produção de produtos cosméticos.

2. Revisão de literatura

2.1. Extratos e óleos vegetais

Os extratos e óleos com origem vegetal tem sido reintroduzidos no mercado recentemente seguindo uma demanda de consumo por cosméticos naturais que apresentem maior emoliência e segurança (AHSHAWAT, SARAF e SARAF, 2008).

De acordo com PRAKASH e MAJEED (2006), extratos e óleos vegetais são matrizes complexas com grande número de princípios ativos variando em teor e tipo, baseados na origem geográfica, práticas de cultivo, colheita, processamento e estocagem.

Muitos dos extratos oleosos oriundos de plantas são empregados na indústria cosmética como emolientes capazes de auxiliar na hidratação da pele.

A hidratação do estrato córneo é um importante determinante da aparência e das propriedades físicas da pele que depende de vários fatores incluindo umidade externa, estrutura, composição lipoprotéica e função barreira da pele e, concentração de substâncias capazes de reter a água na pele.

Uma formulação cosmética natural é caracterizada pela composição lipídica semelhante à composição do manto lipídico cutâneo (ABURJAI e NATSHEH, 2003). Nesse sentido, óleos vegetais que tenham sua composição rica em ácidos graxos essenciais se assemelham bastante à pele humana e podem, desse modo, melhorar a aparência e a saúde desta.

Apesar de poder fornecer inúmeros benefícios à pele, os extratos botânicos frequentemente são difíceis de ser empregados em formulações cosméticas devido a sua baixa solubilidade ou dispersão em solventes que são comumente utilizados em cosméticos. Deste modo, a ordem de adição dos componentes da formulação, o tipo de solvente utilizado, a temperatura e o pH além de outros fatores influenciam fortemente na estabilidade da formulação.

Sendo assim, PRAKASH e MAJEED (2006) citam que o maior desafio em se trabalhar com cosméticos naturais é a compatibilidade dos ingredientes, pois, muitos extratos botânicos quando adicionados a formulações cosméticas podem conferir à estas características indesejáveis como: coloração escura, instabilidade, absorção reduzida de ativos e baixa espalhabilidade.

2.2. Óleo de café

2.2.1. Composição

Coffea arabica é a espécie de café mais produzido e consumido ao redor do mundo. A partir de seus grãos sem torrefação e prensados obtém-se um óleo bastante utilizado na indústria cosmética por sua rica composição em ácidos graxos essenciais como o ácido linoleico que é encontrado na barreira lipídica cutânea.

Além disso, o óleo de café contém até 2,5% de cera com comprovado efeito antioxidante em alimentos (WAGEMAKER, 2009; LEHMANN et al., 1972), da qual pode ser separada a molécula de serotonina (KELE e OHMACHT, 1996), e apresenta teor bastante superior aos demais óleos de materiais insaponificáveis, cerca de 13%, com comprovado efeito de absorção da radiação ultravioleta no comprimento de onda que mais causa danos à pele, ou seja, a radiação UVB (WAGEMAKER, 2009).

2.3. Aplicação do óleo de café em cosméticos

2.3.1. Potencial Antioxidante

De acordo com BISPO et al. (2008), um dos maiores desafios no desenvolvimento de produtos cosméticos, especialmente os chamados “antiaging” é inibir as lesões oxidativas causadas pelas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) como: H_2O_2 , $RO\bullet$, $ROO\bullet$ e O_2 .

As EROs promovem, de acordo com PALMER e KITCHIN (2010b), oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Deste modo, podem danificar estruturas celulares incluindo o DNA. Na pele, as lesões oxidativas levam a sobreprodução de melanossomas e melanócitos e ao enfraquecimento e desestruturação do colágeno e da elastina (PALMER e KITCHIN (2010a).

Nesse sentido muitas são as substâncias, principalmente extratos vegetais, relatados na literatura que podem ser utilizados para remover o excesso de EROs, os chamados antioxidantes. Dentre estes pode se destacar o chá verde com comprovados estudos de eficácia clínica na melhoria das condições da pele (DAL'BELO et al., 2006; GIANETI; MERCURIO; MAIA CAMPOS et al. (2013).

Algumas dessas substâncias são ainda citadas na literatura por seus efeitos antioxidantes também promoverem uma proteção da pele contra radiação ultravioleta como os extratos de *Glycyrriza glabra* e *Ginkgo biloba* (DI MAMBRO e FONSECA, 2005).

CASTELO-BRANCO e TORRES (2011) apontaram o ensaio com DPPH como a técnica mais utilizada para determinar a capacidade antioxidante de óleos vegetais. A qual, segundo os mesmos autores, está diretamente relacionada com a quantidade de compostos polifenólicos presentes nos óleos.

Ao café são atribuídos vários estudos que comprovam sua capacidade antioxidante (KELE e OHMATCH, 1996). No entanto, tais propriedades se encontram na fração hidrofílica do grão que contém alta concentração de ácidos clorogênicos.

A propriedade antioxidante do extrato de café verde denominado “Coffeeberry[®]” foi estudada, juntamente com a propriedade antioxidante da idebenona e do chá verde por FARRIS (2007). De acordo com a autora, o Coffeeberry[®] é composto de potentes polifenóis incluindo os ácidos clorogênicos, protoantrocianidinas, ácido quinico e ferúlico. O produto contendo Coffeeberry[®] mostrou significativa melhora nas linhas finas, rugas e pigmentação.

2.3.2. Potencial antimicrobiano

Diversos microorganismos patogênicos ou não estão presentes na pele. Dentre eles bactérias Gram negativas e positivas e fungos. GRICE et al. (2012) identificaram fragmentos de 16S rRNA de *Pseudomonas*, *Staphylococcus epidermidis* e *Propionibacterium acnes* na pele de cinco voluntários.

CHILLER et al. (2001) reportaram diversas bactérias associadas a patologias cutâneas. Entre estas bactérias *Staphylococcus aureus* é a causa mais comum de infecções cutâneas e sistêmicas e *S. epidermidis* faz parte da flora da pele e está relacionada com a acne. *Pseudomonas aeruginosa* não é uma bactéria normalmente residente na microflora da pele, mas também pode causar infecções cutâneas.

CHOMNAWANG et al. (2005) citam *P. acnes*, *P. granulosum*, *S. epidermidis* e *Malassezia fufur* como microorganismos frequentemente envolvidos no desenvolvimento da acne. Enquanto que RAHUA et al. (2000) relatam *Candida albicans* como o microorganismo responsável pela maioria das infecções fúngicas na pele.

De acordo com RAHUA et al. (2000) os métodos de difusão, dentre os quais o método de difusão em poço utilizado no presente estudo, tem sido extensivamente utilizados para investigar a atividade antimicrobiana de substâncias e extratos de plantas.

Convém salientar ainda que a atividade antimicrobiana pode ser também considerada uma desejável propriedade de ativos e adjuvantes cosméticos, pois, pode levar a redução de conservantes nas formulações.

2.4. Formulações cosméticas e protetores solares

As emulsões são as formas mais comuns de produtos para cuidado da pele. Por definição, uma emulsão é um sistema formado por duas fases imiscíveis, aquosa e oleosa onde uma é dispersa na outra. Por causa da múltipla incompatibilidade desses materiais, um ou mais agentes emulsionantes devem ser acrescentados (EPSTEIN, 2009).

As emulsões podem ter diferentes características sensoriais em função da quantidade e natureza dos ingredientes adicionados. Desse modo, compete ao formulador avaliar a compatibilidade de diversas matérias-primas e combiná-las visando boa estabilidade, segurança, eficácia e bom sensorial.

Os géis, por sua vez, são dispersões coloidais elaboradas com polímeros hidrofílicos de diferentes origens, tais como gomas, celuloses, acrilatos e são mais utilizados para veiculação de filtros hidrossolúveis com indicação para pele mista ou oleosa.

As emulsões e os géis, bem como as emulsões estabilizadas por géis hidrofílicos, são tipos de preparação cosmética que são empregadas como veículos para incorporação de substâncias ativas dentre elas, substâncias orgânicas e/ou inorgânicas capazes de proteger a pele contra os efeitos danosos da radiação solar, os chamados filtros solares.

Existem dois tipos de filtros solares: os filtros orgânicos e os filtros inorgânicos. Os primeiros são formados por moléculas orgânicas capazes de absorver a radiação UV de alta energia e transformá-la em radiações com energias menores e inofensivas ao ser humano. Essas moléculas são, essencialmente, compostos aromáticos com grupos carboxílicos. No geral, apresentam um grupo doador de elétrons, como uma amina ou um grupo metoxila, na posição orto ou para do anel aromático (FLOR et al., 2007). Por outro lado, os filtros inorgânicos apesar de serem absorvidos pela pele, possuem maior capacidade reflexiva da luz UV protegendo a pele contra esse tipo de radiação.

O primeiro filtro solar conhecido, ácido paraaminobenzóico (PABA), teve sua origem na década de 1920. Apesar da grande aceitação deste, ultimamente seu uso está proibido em muitos países devido às reações fotoalérgicas (MACKIE e MACKIE, 1999).

Os primeiros filtros solares foram propostos para prevenir os efeitos da radiação solar na pele evitando a passagem da radiação ultravioleta por meio de mecanismos de reflexão, refração e absorção das mesmas (MARTINEZ e LECHA, 2002).

Esta radiação pode ocasionar efeitos indesejáveis na pele como o aumento da perda transepidérmica de água e o ressecamento, provocando aspecto opaco, perda de elasticidade, eritema, descamação e aparecimento de manchas em médio e curto prazo e, em longo prazo, o fotoenvelhecimento, elastose, danos oculares e câncer de pele (OLIVEIRA et al., 2004).

De acordo com ABD ELMAGGED et al. (2009), a radiação ultravioleta, em especial a UVB, induz uma gama grande de efeitos na pele como eritema, imunossupressão, fotoenvelhecimento e câncer.

Além de química, fotoquímica e termicamente inertes os protetores devem apresentar características como ser atóxico; não ser sensibilizante, irritante ou mutagênico; não ser volátil; possuir solubilidade apropriada; não ser absorvido pela pele; não alterar sua cor; não manchar a pele e vestimentas; ser incolor; ser compatível com a formulação e material de acondicionamento e, ser estável no produto final (ROSEN, 2003). Para isso devem passar por avaliações de estabilidade, segurança e eficácia.

Na maioria dos países incluindo o Brasil, os fotoprotetores são considerados como produtos cosméticos. Esses são formados por diversas substâncias capazes de absorver ou refletir a radiação solar nos comprimentos de onda ultravioleta, protegendo a pele contra os efeitos nocivos desta.

Considerando que a Pesquisa & Desenvolvimento de fotoprotetores de amplo espectro de ação e que possam oferecer proteção significativa para a pele tem sido um desafio para área cosmética, a busca de produtos naturais que ofereçam tal proteção vem exigindo tecnologia avançada para a obtenção de produtos estáveis, seguros e com eficácia comprovada.

Nesse sentido, PEDRIALI et al. (2010) destacam que há um grande interesse no desenvolvimento de protetores solares contendo concentrações reduzidas de filtros químicos UV que, além de apresentarem uma eficácia de amplo espectro, devam ser combinados com o uso de matérias-primas vegetais que melhoram a absorção UV.

Sendo assim, o óleo de café destaca-se por possuir grande potencial como ativo em formulações cosméticas fotoprotetoras, pois, por si só, é rico em ácidos graxos essenciais que se assemelham bastante à pele humana, é capaz de absorver a radiação solar ultravioleta entre os comprimentos de onda de 280 e 320 nm, aumentando o potencial de fotoproteção em formulações cosméticas com esta finalidade além de apresentar a vantagem de ser um produto

natural e, conseqüentemente, poder reduzir o número de filtros orgânicos e inorgânicos em formulações dermocosméticas com a finalidade fotoprotetora.

2.5. Radiação solar e métodos de avaliação do potencial fotoprotetor

O sol emite um amplo espectro de radiação eletromagnética, que é desviado ou atenuado pelas camadas atmosféricas da Terra. As radiações que chegam à superfície são classificadas como não-ionizantes e subdivididas em infravermelho, visível e ultravioleta (RIBEIRO et al., 2004).

Segundo RIBEIRO (2004), a radiação ultravioleta pode ser dividida em UVC, UVB e UVA de acordo com o comprimento de onda. A radiação UVC compreende os comprimentos de onda entre 200 a 290 nm, possui alta capacidade de alterar o DNA, é muito carcinogênica.

A radiação UVB compreende os comprimentos de 290 a 320 nm e é responsável pelo eritema solar, estimula a pigmentação retardada que tem importante papel na fotoproteção natural da pele, produz morte de células epidérmicas e liberação de mediadores inflamatórios próprios da queimadura solar e é capaz de produzir dano ao DNA e em sua maior parte é filtrada pela camada de ozônio.

Por sua vez, a radiação UVA compreende os comprimentos de onda entre 320 e 400 nm, possui grande capacidade de penetração na pele e está envolvida na maioria das reações fotoalérgicas, algumas reações fototóxicas, carcinogênese, fotoenvelhecimento cutâneo e reações de fotossensibilização.

A eficácia de um protetor solar é medida em função de seu fator de proteção solar (FPS), o qual indica quantas vezes o tempo de exposição ao sol, sem o risco de eritema, pode ser aumentado com o uso do protetor (MANSUR et al., 1986). Quanto maior o FPS maior será a proteção, ou seja, maior será o tempo que a pele ficará protegida frente à radiação UVB. Ressalta-se que o FPS é definido em função da radiação UVB causadora de eritemas.

Existem diversos métodos para avaliar o potencial fotoprotetor de uma substância/extrato e/ou formulações cosméticas contendo essas substâncias. Dentre estes destacam-se os métodos espectrofotométricos que, por serem rápidos e fáceis, são utilizados como avaliação preliminar do FPS de extratos vegetais e formulações cosméticas.

Todos esses métodos foram avaliados por VELASCO e colaboradores (2011). Segundo estes autores, os métodos “in vitro” apresentam vantagens como: rapidez de execução, custo acessível, reprodutibilidade, facilidade de treinamento do operador e não necessita de exposição do voluntário a riscos.

RAMOS et al. (1996) avaliaram o potencial fotoprotetor dos extratos vegetais de: *Hamamelis virginiana* L., *Matricaria recutita*, *Aesculus hippocastanum* L., *Rhamnus purshiana* DC, *Cinnamomum zeylanicum* Nees pelo método espectrofotométrico proposto por MANSUR et al. (1986).

Esses mesmos autores concluíram que tais extratos em concentração de 10% apresentaram baixos fatores de proteção solar (FPS). O maior FPS foi encontrado para *Cinnamomum zeylanicum* FPS 4. Todavia quando o extrato seco desta mesma planta foi adicionado na concentração de 10% numa solução contendo 2% de octilmetoxinamato, o FPS que deveria ser 4 foi aumentado para 7 indicando o potencial fotoprotetor desta espécie.

O chamado “método de Mansur” é um método espectrofotométrico utilizado principalmente para avaliação do potencial fotoprotetor por meio de um cálculo do FPS de acordo com as absorbâncias obtidas entre os comprimentos de onda 290 e 320 nm. O óleo de café extraído de *Coffea arabica* utilizando esse mesmo método apresentou FPS igual a 3 (WAGEMAKER, 2009).

Os métodos espectrofotométricos são, na maioria das vezes, utilizados pela comunidade científica para um “screening” de substâncias/extratos promissores para absorção da radiação UVB.

A avaliação do FPS “in vitro” também pode ser realizada pelo método de refletância difusa com esfera integrada. Nesse método, um feixe de luz de xenônio com energia suficiente para o intervalo espectral de 250 a 450nm atravessa uma superfície recoberta pelo substrato (que simula o microrrelevo da pele humana) e pelo fotoprotetor em estudo. A transmitância hemisférica total é medida pelo uso de uma esfera de integração que coleta a luz dispersada em todos os ângulos (VELASCO et al., 2011). Tal método é considerado rápido e fácil de ser executado.

Os métodos “in vivo”, apesar das dificuldades de execução e dos custos, são os mais indicados e aceitos pela comunidade científica.

Atualmente existem diversos movimentos contra a utilização de animais em experimentos. No entanto, os resultados obtidos por ensaios realizados em animais ainda são bons indicativos dos resultados esperados em humanos.

Nesse sentido, outro método bastante utilizado pela é a irradiação da pele de animais de experimentação e posterior avaliação de indicadores histoquímicos dentre eles o número de células de queimadura solar (BENEVENUTO et al., 2010). Tal método não permite determinar o FPS das formulações em estudo, mas permite diferenciar as formulações que são realmente efetivas na proteção da pele contra os danos causados pela radiação solar.

Apesar do uso de animais ter sido bastante criticado devido a extrapolação dos resultados para humanos ser questionável, vários estudos tem demonstrado que o camundongo sem pelo é um modelo útil para determinar o potencial fotoprotetor de formulações cosméticas contra os danos ocasionados pela radiação UV, pois, segundo KLIGMAN e KLIGMAN. (1996), uma DME (Dose Mínima Eritematosas) no camundongo é equivalente a uma DME em humanos fototipo II.

No entanto, estes experimentos somente podem ser realizados com produtos acabados, necessitam de aprovação do Comitê de Ética responsável e, apesar de terem sido bastante utilizados até o momento, na Europa a partir de julho de 2013 não serão mais permitidos.

Alguns estudos disponíveis recentemente na literatura visam, devido à forte tendência de proibição de testes em animais, adaptá-los para uso em cultura celular principalmente por meio de estudos de viabilidade celular como o de redução do MTT (PERDE-SCHREPLER et al., 2013).

No entanto, o método mais preciso e exato é a avaliação do FPS “in vivo” em voluntários humanos. Por este método, o FPS é calculado de acordo com a Mínima Dose Eritematosa (DEM) utilizando a seguinte equação:

$$FPS = \frac{DME \text{ com protetor solar}}{DME \text{ pele desprotegida}}$$

Onde, DME = dose mínima eritematosa, ou seja, dose mínima necessária para ocorrer o eritema.

Os ensaios clínicos são realizados no público-alvo, sob condições que simulam as condições reais de uso. No entanto, são realizados somente na fase final do desenvolvimento de formulações em função da complexidade e custo.

2.6. Estabilidade e comportamento reológico

A reologia é o estudo do fluxo de materiais quando aplicada uma força externa. Sendo que esses materiais podem apresentar dois tipos diferentes de comportamento reológico de acordo com as características de seu fluxo. O fluxo Newtoniano é caracterizado por valores constantes de viscosidade independentemente da força aplicada, enquanto que, o fluxo não-Newtoniano apresenta redução (pseudoplásticos) ou aumento da viscosidade (plásticos) de acordo com a força aplicada (MARTIN, BUSTAMENTE e CHUN, 1993).

Os estudos reológicos visam obter informações sobre as propriedades de escoamento e deformação de materiais sob a influência de forças externas (CAMARGO JUNIOR, 2006).

Para cosméticos, o comportamento reológico se refere ao comportamento de uma formulação frente a uma força que provoca um deslocamento dessa formulação tal qual, a força aplicada por um consumidor para retirar o produto da embalagem ou para espalhá-lo sobre a pele.

Segundo HEWITT e DAHMS (1996), o fluxo pseudoplástico além de ser o mais comum, é o mais indicado para produtos cosméticos, pois, estes devem apresentar uma viscosidade inicial adequada que irá permitir melhor espalhamento e cobertura da pele.

De acordo com CAMARGO JUNIOR (2006), o estudo do comportamento reológico assume cada vez mais importância, pois, a análise dos parâmetros viscosidade, índice de fluxo, índice de consistência e tixotropia, permitem compreender melhor a natureza físico-química do veículo na fase de desenvolvimento, controlar a qualidade de matérias-primas e produtos acabados, avaliar o efeito da consistência do produto na liberação e penetração dos ativos, além de contribuir na previsão do prazo de validade do produto.

2.7. Cristais líquidos

De acordo com BECHTOLD (2005) a descoberta dos cristais líquidos é atribuída ao austríaco FRIEDRICH REINITZER (1888) mas, coube a OTTO LEHMANN (1889), a designação de cristal líquido por pensar que a única diferença entre os cristais líquidos e os cristais sólidos era a fluidez.

Os cristais líquidos são caracterizados por apresentarem propriedades de líquidos e sólidos, isto é, estes exibem uma parte estrutural típica dos fluidos e a outra parte da estrutura se comporta como sólido (MÜLLER-GOYMANN, 1998 citado por MAKAI et al., 2003).

Segundo ENGELS e RYBINSKI (1998), as estruturas líquido cristalinas formadas por moléculas anfífilas são a base das emulsões e, por esse motivo, tem sido estudadas por pesquisadores de alimentos, fármacos, petróleo e indústria química. Tais estruturas também têm sido bastante estudadas em formulações cosméticas.

Os sistemas formados pelas estruturas lamelares cristalinas contêm a maior proporção de água concentrada em suas camadas entre os domínios hidrofílicos fazendo com que uma formulação contendo cristais líquidos retenha água sobre a pele por mais tempo e libere esta água de acordo a perda de água transepidérmica, ou seja, de acordo com a necessidade de hidratação da pele (MAKAI et al., 2003).

Segundo os mesmos autores, as formulações contendo cristais líquidos possuem consistência ideal e aparência atrativa, além de que sua aplicação promove uma sensação agradável na pele.

A presença de cristais líquidos em formulações cosméticas poderia, então, melhorar a aparência visual das formulações, proteger contra foto e termodegradação e promover o aumento de retenção de água na pele (SANTOS et al., 2005). Além do mais, segundo ANDRADE et al. (2007), as formulações contendo cristais líquidos seriam mais estáveis fisicamente.

2.8. Segurança

2.8.1. Ensaio de letalidade em *Artemia salina*

De acordo com KANWAR (2007), *Artemia salina* (Artemiidae) é um invertebrado pertencente à fauna aquática e ecossistemas marinhos que pode ser utilizados em bioensaios para determinação da toxicidade por meio da estimativa da média concentração de letalidade ($LC_{50\%}$).

Figura 1. Fotos de *A. Salina* (BUSTOS-OBREGON e VARGAS 2010).

O ensaio de letalidade em *A. salina* é considerado uma ferramenta útil para a avaliação preliminar da toxicidade. Este ensaio foi proposto por MICHAEL et al., (1956) (CARBALLO et al., 2012) e tem sido utilizado para investigar a segurança de muitos extratos de plantas (MOSHI et al., 2009; BASTOS et al., 2009; COE et al., 2010) devido à simplicidade e conveniência do método.

NUNES et al. (2006) citam ainda que *A. salina* requer um laboratório relativamente simples para cultivo, possui resistência à manipulação, ciclo de vida curto, grande produção de ovos, além de existir um vasto conhecimento sobre a espécie.

Outras vantagens do método são descritas por CHANDA e BARAVALIA (2011). Segundo elaso ensaio com *A. Salina* é econômico, fácil e requer pouca quantidade de material a ser testado.

No entanto, existem poucos estudos com *Artemia salina* para testar a segurança dos ingredientes cosméticos e formulações. AMORES (2010) utilizou este tipo de ensaio para avaliar o efeito da sericina, que é utilizado em formulações cosméticas, quando aplicado em várias concentrações (7,5 a 30 mg/mL). Os resultados indicaram que esta proteína não é tóxica.

2.8.2. Ensaio de redução do MTT

Culturas de células são úteis sistemas de testes alternativos para estudos toxicológicos de novas substâncias ou ingredientes cosméticos. Além disso, ensaios de citotoxicidade encontram-se entre os mais comuns na extremidade “in vitro” utilizados para prever o potencial de toxicidade de uma substância (NOGUEIRA et al., 2011).

Existem vários testes para avaliar os efeitos citotóxicos dos produtos químicos em cultura de células. O ensaio MTT baseia-se na absorção e a redução por succínico desidrogenase mitocondrial do sal de tetrazólio amarelo MTT solúvel a um insolúvel azul formazan MTT produto (CHIBA et al., 1998). A absorbância espectrofotométrica na região de luz visível do formazan dissolvido é correlacionada com o número de células vivas intactas. Compostos citotóxicos, de acordo com ULUKAYA et al. (2008), são capazes de causar danos e destruir as células fazendo com que decresça a redução de MTT à formazan.

HWANG e JEONG (2008) avaliaram os efeitos do caveol, que é um diterpeno característico do café, na produção de EROs e na proteção de células cerebrais (neuroblastoma SH-SY5Y) contra os danos neurotóxicos da 6-OHDA por ensaio de viabilidade celular utilizando o método de redução do MTT.

Diversos outros estudos disponíveis na literatura avaliaram a toxicidade de extratos de plantas por meio de ensaios de viabilidade celular (BRUGGISSER et al., 2002; SEERAM et al., 2004; SANTA-MARIA et al., 2013). Na maioria das vezes, os ensaios de redução de MTT são publicados juntamente com ensaios de toxicidade em *A. salina* e antimicrobianos.

2.9. Pele e segurança clínica das formulações

A pele é o maior órgão do corpo humano cuja principal função é separar e proteger o interior do corpo do ambiente externo além de receber estímulo sensorial, ajudar a regular a temperatura corporal e excretar substâncias indesejáveis.

A superfície externa da pele consiste em um epitélio pavimentoso, estratificado e queratinizado denominado epiderme, cuja camada mais externa é o estrato córneo.

O estrato córneo é formado por 18 a 21 camadas extremamente coesas de corpos de células epidérmicas, os corneócitos. Estes são compostos por quantidades aproximadamente equimolares de ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres, com pequenas quantidades de triglicerídeos, glicosfingolípídeos e sulfato de colesterol que fazem com que o estrato córneo possa desempenhar papel fundamental na proteção dos tecidos vivos contra a perda de água funcionando como barreira que garante a homeostase cutânea (DAL'BELO, 2008).

A epiderme é sustentada e nutrida por uma camada espessa de tecido fibroelástico denso denominado derme, que é altamente vascularizada e contém muitos receptores sensitivos. A derme, por sua vez, é fixada aos tecidos subjacentes por uma lâmina de tecido frouxo denominado hipoderme como mostrado na Figura 2.

Figura 2. Corte de pele humana mostrando as três camadas: derme, epiderme e hipoderme, e seus anexos (PORTAL EDUCAÇÃO, 2009).

De acordo com DAL'BELO et al. (2006), a aparência e a função da pele são mantidas por um delicado equilíbrio entre o conteúdo aquoso do estrato córneo e os lipídios na superfície da pele, o qual pode ser quebrado pelas agressões externas e pelo uso de agentes

tensoativos como sabonetes. Tal equilíbrio pode ser restaurado pela aplicação de formulações cosméticas contendo agentes hidratantes como a formulação contendo *Aloe vera* desenvolvida por estes mesmos autores.

Por outro lado, as formulações cosméticas podem, ao invés de auxiliar no equilíbrio do manto hidrolipídico causar um desequilíbrio, ou até mesmo uma agressão. Tal efeito na pele pode ser percebido pela presença de eritema e descamação, os quais podem ser mensurados por meio de equipamentos de biofísica da pele.

Entre os métodos mais utilizados para avaliação das condições da pele estão os que utilizam equipamentos de biofísica da pele, os quais permitem por meio de ensaios não invasivos e indolores, diagnosticar as condições imediatas da pele e monitorar os efeitos das formulações aplicadas nesta.

Dentre estes equipamentos destacam-se o Corneometer® e o Tewameter®, ambos com função de avaliar o balanço hidrolipídico da pele. O Corneometer® utiliza uma corrente de baixa frequência para por meio da medição da capacitância avaliar o conteúdo aquoso do estrato córneo sendo, portanto, um bom indicativo da hidratação da pele.

CAMARGO JUNIOR (2006) cita ainda que as medições deste equipamento são pouco afetadas pela temperatura e umidade relativa, além de apresentar alta sensibilidade, fazendo com que este equipamento se destaque entre os demais e seja bastante utilizado pela comunidade científica.

O Tewameter® é um equipamento baseado no princípio de difusão que vem sendo bastante empregado para medir a perda de água transepidérmica possibilitando verificar a manutenção da barreira cutânea.

De acordo com ROSADO et al. (2005) a perda transepidérmica de água se pode ser considerada um processo de difusão passiva que independe da umidade relativa e da temperatura ambiente que pode ser utilizada para avaliar a integridade do estrato córneo.

Possíveis lesões na barreira são facilmente detectadas pelo aumento da perda transepidérmica de água, fazendo com que este equipamento possa ser utilizado não somente para avaliar a eficácia de uma formulação cosmética na manutenção e melhora da barreira mas também para avaliar possíveis reações adversas da aplicação destas.

Apesar da pele *per se* apresentar mecanismos de defesa contra a radiação solar sendo o principal deles a produção de melanina que, é um pigmento de cor marrom escura com capacidade de absorver a radiação ultravioleta protegendo o núcleo das células e impedindo alterações cromossômicas, uma formulação fotoprotetora deve ser ainda capaz de evitar a produção de eritema sob irradiação.

O equipamento de biofísica mais utilizado para avaliar a formação e o grau do eritema é o mexameter, o qual baseia-se no princípio de remissão (YILMAZ et al., 2006). O *Mexameter*[®] apresenta uma sonda que emite luz em três comprimentos de onda pré-definidos e um receptor que mede a luz refletida, podendo-se assim, calcular a luz absorvida pela pele. O eritema é medido por dois comprimentos de onda diferentes, um deles corresponde ao pico de absorção da hemoglobina (568 nm), o outro foi escolhido para evitar influência de outras cores, como por exemplo, a bilirrubina. Os resultados são exibidos pelo aparelho como E: valores de eritema.

Todos os equipamentos de biofísica descritos acima são, na maioria das vezes, utilizados para caracterizar a pele (MERCÚRIO et al., 2013) ou para avaliar a eficácia de formulações cosméticas (DAL' BELO et al., 2006; GIANETI et al., 2013). No entanto, os mesmos podem ser utilizados também para avaliação da segurança de aplicação tópica dessas formulações como no estudo realizado por VICIOLLE e colaboradores (2012).

No entanto, para avaliar a sensibilidade cutânea das formulações pode se ainda realizar ensaios de compatibilidade cutânea, os quais visam comprovar a inocuidade de produtos quando aplicados na pele por meio da representação do primeiro contato do produto com a pele. Estes são realizados por meio de apósitos oclusivos ou semi-oclusivos ou em modelos abertos e devem seguir as premissas de ordem ética e de boas práticas clínicas (ANVISA, 2012).

2.10. Propriedades sensoriais

As percepções de qualidade de um produto para um formulador e um consumidor são diferentes: para o formulador, é baseada na confiabilidade do produto durante o tempo de armazenagem em diferentes condições ambientais, priorizando a conservação das propriedades originais como forma de apresentação e ativos; para o consumidor, a qualidade de um produto está diretamente relacionada com sua percepção fisiológica e sua sensação de bem estar produzida durante e depois da aplicação (CAMARGO JUNIOR, 2006).

As propriedades sensoriais dos produtos cosméticos são um dos parâmetros mais importantes para o desenvolvimento deste tipo de produtos. Os consumidores são primeiramente atraídos pelas campanhas de publicidade e pela embalagem, entretanto, se o produto cosmético não proporciona boas propriedades sensoriais, tais como: absorção rápida, espalhabilidade e suavidade, provavelmente os consumidores não irão comprá-lo novamente.

De acordo com GILBERT et al. (2012) a compreensão das propriedades sensoriais de formulações pode trazer informações importantes para o desenvolvimento do produto, a fim de atender a satisfação do consumidor.

Geralmente a avaliação das propriedades sensoriais é realizada por um painel treinado de voluntárias que atribuem notas e/ou conceitos para os diversos parâmetros de estudo. No entanto, estes são testes dispendiosos que demandam mão-de-obra treinada.

Uma alternativa tem sido os chamados questionários CATA (Check-all-that-apply) em que as voluntárias devem assinalar todos os parâmetros percebidos por elas. Tal tipo de questionário é mais rápido, fácil e busca simular a percepção do consumidor leigo ao escolher um novo produto cosmético (PARENTE et al., 2010).

Um questionário “CATA” consiste de uma lista de palavras ou frases na qual os entrevistados devem selecionar tudo o que eles consideram apropriado para descrever um produto. Segundo PARENTE et al. (2010), o questionário “CATA” poderia fornecer informações sobre como os consumidores percebem os produtos, que tipo de emoções, valores ou elementos que os produtos despertam entre os usuários e, com isso possibilitar a construção de padrões de preferência. PENSE-LHERITIER et al. (2012) também citaram que a informação obtida a partir de um questionário “CATA” é um resultado direto da percepção dos consumidores e pode ajudar consideravelmente os serviços de marketing na elaboração de sua estratégia de vendas.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Desenvolver formulações cosméticas contendo diferentes concentrações de óleo de café e avaliar a estabilidade e a eficácia fotoprotetora destas.

3.2. Objetivos específicos

- Desenvolver formulações cosméticas em creme e gel-creme contendo 0, 2,5, 5, 10 e 15% de óleo de café;
- Avaliar e ajustar o pH das formulações para pH compatível com a pele humana;
- Avaliar a estabilidade das formulações em testes de estabilidade acelerada;
- Avaliar o comportamento reológico das formulações desenvolvidas e determinar a mais estável;
- Avaliar a presença de cristais líquidos nas formulações;
- Determinar o fator de proteção solar “in vitro” por método espectrofotométrico;
- Determinar o fator de proteção solar “in vitro” por espectrofotometria de refletância com esfera integrada;
- Avaliar os efeitos fotoprotetores do óleo de café na pele de animais de experimentação;
- Pesquisar outros potenciais desejáveis para um ingrediente ativo: atividade antioxidante e antimicrobiana;
- Avaliar a segurança das formulações desenvolvidas para aplicação na pele utilizando ensaios “in vitro” e “in vivo”;
- Avaliar a eficácia na hidratação e manutenção da função barreira da pele;
- Avaliar o sensorial de formulações contendo altas concentrações do ativo.

4. Material e Métodos

4.1. Material

- Ácido fenilbenzimidazolsulfônico e benzofenona-4, filtro solar UVA-B hidrossolúvel, Galena
- Água destilada e deionizada
- Álcool etílico, PA, Merck
- Aminometilpropanol, AMP[®] 95, Angus
- Antibióticos, Sigma-Aldrich
- Base autoemulsionante contendo álcool batílico, ácido esteárico, ácido caprílico, ácido cáprico, triglicérides e lecitina, Nikkolipid 81S, Nikko Chemicals/Galena
- Base autoemulsionante contendo álcool behênico, pentaestearato de poliglicerila-10 e stearyl lactilato de sódio, Nikkomulse 41, Nikko Chemicals/Galena
- Base autoemulsionante contendo álcool cetearílico e metosulfato de behentrimônio, Incroquat Behenyl TMS
- Base autoemulsionante contendo álcool cetoestearílico e cetearete-20, Cosmowax J, Croda
- Base autoemulsionante contendo álcool cetoestearílico e cetearete-20, Paramul J, Galena
- Base autoemulsionante contendo álcool cetoestearílico e fosfatos de dicetila e estearila, Crodafos CES, Croda
- Base autoemulsionante contendo álcool cetoestearílico e monoestearato de sorbitano polioxietileno 20 OE, Polawax, Croda
- Base autoemulsionante contendo álcool cetoestearílico e cetearete, Uniox-A, Chemyunion
- Base autoemulsionante contendo distearato de poliglicerila-6, Plurol Stearique, Gattefosse, Brasquim
- Base autoemulsificante contendo manteiga de karité, sesquioleato de sorbitano, polissorbato 20, carbômero e celulose; Nanocolloidy[®] 2022, Lipotec/Galena
- Butilhidroxitolueno, BHT
- Carbômero, Carbopol Ultrex, Goodrich

- Copolímero de ácido sulfônico acriloidilmetiltaurato e vinilpirrolidona, Aristoflex AVC, Clariant
- Dimetilsulfóxido (DMSO) 99,9%, Merck
- DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil, Sigma-Aldrich
- Glicerina PA
- Goma sclerotium, Amigel, Alban Miller/Farmaspecial
- Hidroxietilcelulose, Natrosol, Aqualon/Galena
- Metildibromo glutaronitrila, Cosmoguard[®], Cosmotec
- Monoestearato de glicerila, Cithrol GMS-AE, Cognis
- MTT, thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich
- NaOH (solução 10%)
- Óleo de café, Melscreen coffee, Chemyunion
- Polímero de acrilatos, Plurigel[®], Galena
- Propilenoglicol PA

4.2. Equipamentos e acessórios

- Adesivo Finn chambers, Scampor Epitest Ltda Oy
- Agitador mecânico *Heidolph*[®], RZR 2021
- Balança analítica Ohaus, modelo AS 200
- Balança eletrônica Marte, modelo AS 2000
- Câmara climática TE-4001-E7, Tecnal
- Câmara de fluxo laminar
- Centrífuga *Centribio*, 80-2B
- Chapa de aquecimento
- Corneometer CM825PC (CK Eletronics, Alemanha)
- Embalagens plásticas de PVC opacas, com capacidade para 15 gramas
- Espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração, Labsphere[®] UV1000S Ultraviolet Transmittance Analyser
- Espectrofotômetro Hitachi U-2001
- Espectrofotômetro Evolution 300, Thermo Scientific
- Estufas termostatzadas com controle de umidade e fotoperíodo Eletrolab, modelo 111FC de 37° C e 45° C

- Fita cirúrgica Transpore[®], 3M
- HPLC 1260 Infinity, Agilent
- Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
- *Mexameter*[®] MX16
- Microscópio de luz polarizada – TYPE 102M – Motic
- Microscópio óptico Leica DMLB, acoplado a uma câmera DC 300
- Ovos de *Artemia salina*, JBL
- Peagômetro *Digimed*[®] DM 20
- Pipeta automática Microman M-10, Gilson
- Placas de 24 poços
- Placas de 96 poços
- Reômetro modelo DV-III (tipo clone e placa), Brookfield acoplado a software Rheocalc versão v1.01, Brookfield com vetor CP52
- Sal para cultivo de *Artemia salina*, JBL
- Seringa para insulina
- Simulador solar constituído de uma lâmpada de arco de xenônio Oriell150W (Oriel Corporation, Stratford, CT) ligada a uma fonte acoplada a um espelho dicróico 81045 Oriel e um filtro 59450 Oriel.
- Soro bovino fetal, Sigma- Aldrich
- Termômetro
- Tewameter TM300, (CK Eletronics, Alemanha)
- Vidrarias em geral

4.3. Desenvolvimento das formulações

As formulações foram elaboradas levando em consideração o pH, as características sensoriais e a interação com as matérias-primas empregadas como veículo nas formulações cosméticas.

Foram desenvolvidas formulações creme a base de ceras autoemulsionantes contendo umectantes, conservantes e antioxidante, bem como, formulações géis-creme contendo polímeros hidrofílicos além dos componentes anteriormente citados.

Tabela 1. Descrição da composição das formulações em creme desenvolvidas (nomenclatura INCI e fabricante).

Formulações em creme/ matérias-primas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ceras														
Glyceryl stearate, Croda							5							
Cetearyl alcohol + cetareth-20, Croda (*C)		12	5											
Cetearyl alcohol + dicethyl phosphate, Croda	5													
Cetearyl alcohol + methyl undecylenate, Croda												3		
Shea butter + Sorbitan sesquioleate + polysorbate 20 + Carbomer + cellulose, Lipo Chemicals					1,5									
Batyl alcohol em associações, NikkoChemicals										3				
Behenyl alcohol em associações, NikkoChemicals											3			
Cetearyl alcohol + sorbitan monostearate, Croda						5								
Cetearyl alcohol + cetareth-20, Bernel (*R)				5										
Polyglyceryl-6-distearate (*U)								4	7					
Cetearyl alcohol + cetareth-20, Chemyunion (*X)													3	6
Umectantes														
Glycerin PA	2	2	3	2,5	3	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2	2	2	2
Propylene glycol				2,5		2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2	2	2	2
Conservantes														
Methyldibromo glutaronitrile, Cosmotec	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Antioxidantes														
BHT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02

As formulações foram elaboradas sob agitação constante de 600 rpm por 20 minutos em agitador mecânico *Heidolph*® modelo RZR 2021. Tais formulações continham diferentes concentrações de óleo de café (0; 2,5; 5; 10 e 15%) que fez parte da fase oleosa destas.

Tabela 2. Descrição da composição das formulações em gel-creme desenvolvidas (nomenclatura INCI e fabricante).

Formulações em gel-creme/ matérias-primas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Ceras															
Cetearyl alcohol + cetearith-20, Croda (*C)	3	3													
Cetearyl alcohol + cetearith-20, Bernel (*R)			3	3											
Polyglyceryl-6-distearate (*U)					3	3	3								
Batyl alcohol em associações, NikkoChemicals								3							
Behenyl alcohol em associações, NikkoChemicals									3	3	3	3	3		
Cetearyl alcohol + cetearith-20, Chemunion (*X)														3	3
Polímeros															
Sclerotium gum, Alban Miller	1		1		1									1	
Ammonium acryloyldimethylsulfate/VP copolymer, Clariant												1			
Carbomer, Lubrizol											1				
Zea mays starch, Corn Products		5		5		5							5		5
Hydroxyethylcellulose, Aqualon							0,5	0,5		0,5					
Acrylate polymer, Vevy									0,5						
Umectantes															
Glycerin PA	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Propylene glycol	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Conservantes															
Methyldibromo glutaronitrile, Cosmotec	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Antioxidantes															
BHT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02

Tabela 3. Formulações em creme contendo filtro hidrossolúvel UVA-B e seus respectivos pHs.

Formulações em creme	Concentração de óleo de café (%)		
	0	2,5	5
Cera autoemulsionante	1	2	3
Cetearyl alcohol + cetearith-20, Croda	5	7,23	7,20
Cetearyl alcohol + cetearith-20, Bernel		7,27	7,23
Polyglyceryl-6-distearate		7,21	7,25
Glycerin PA	2	2	2
Methyldibromo glutaronitrile, Cosmotec	0,2	0,2	0,2
BHT	0,02	0,02	0,02
2- phenyl- 1H- benzimidazole- 5- sulphonic acid + Benzophenone-4, Merck	7,5	7,5	7,5

4.4. Avaliação preliminar de estabilidade

Após vinte e quatro horas do preparo das emulsões, estas foram avaliadas quanto às suas características organolépticas e à sua homogeneidade.

Para avaliar a estabilidade das formulações após esta primeira etapa, foram realizados testes de centrifugação, determinação do pH, avaliação visual e das características organolépticas após testes de estresse térmico.

4.5. Determinação do pH

A leitura do pH foi realizada com peagômetro *Digimed*[®] DM 20 utilizando-se amostras das formulações diluídas em água destilada na concentração de 10% (MAIA CAMPOS e BADRA, 1992).

O pH das formulações contendo somente óleo de café foi ajustado para a faixa de pH 4,5 - 6,5, compatível com a pele humana. No entanto, para as formulações contendo o filtro hidrossolúvel UVA-B, o pH foi ajustado para a faixa 7,2 – 7,5, para garantir a estabilidade das formulações contendo esse filtro.

4.6. Centrifugação

Neste teste preliminar de estabilidade, 3 gramas de cada formulação elaborada foram centrifugadas a 1,8 g (3000 rpm) em 3 ciclos de 30 minutos em Centrífuga CENTRIBIO, modelo 80-2B, frequência 60Hz (NÓBREGA, 2010).

Após cada ciclo, as amostras foram observadas quanto à manutenção da homogeneidade e sinais de separação de fases.

4.7. Testes de estabilidade acelerada

As formulações consideradas estáveis no item 4.4.1.2., foram submetidas ao teste de estabilidade acelerada por estresse térmico. Para tal, quinze gramas de cada formulação foram acondicionadas em frascos plásticos de polietileno e mantidas em diferentes condições de

temperatura durante 30 dias: temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 3$) e estufa termostatzada e com controle de umidade e fotoperíodo (37° e $45^{\circ}\text{C} \pm 2$).

As amostras foram analisadas no 1º, 7º, 15º e 30º dias de permanência em cada condição de temperatura quanto a sua homogeneidade e as suas características organolépticas. No 30º dia, foi novamente avaliado o pH das amostras em cada uma das temperaturas de estudo.

4.8. Estudo da estabilidade física por determinação do comportamento reológico

As formulações desenvolvidas que conseguiram manter a estabilidade durante os testes de estabilidade acelerada contendo todas as concentrações de estudo de óleo de café, foram novamente preparadas 24 horas antes da primeira análise.

Estas foram acondicionadas em potes plásticos opacos com capacidade para 30 g, sendo armazenadas em câmara climática 25° e estufas termoestatzadas a 37° e 45°C por um período de 90 dias.

Nos dias anteriores aos intervalos de tempo correspondentes aos dias 0, 7, 14, 21, 28, 45 e 90 foram retiradas das estufas e permaneceram a temperatura ambiente por 24 horas para determinação da viscosidade e do comportamento reológico.

Para tanto foram realizadas 3 repetições com alíquotas de 0,5g de cada formulação e temperatura de armazenagem nos dias de estudo. As amostras foram analisadas utilizando-se reômetro DV-III digital tipo Cone e Placa (Brookfield) acoplado a um software *Rheocalc* versão v1.01, Brookfield, utilizando-se vetor CP52.

Todas as medidas foram realizadas a 25°C utilizando-se velocidade de rotação de 1 a 14 rpm para se obter uma curva ascendente. O procedimento foi repetido no sentido inverso com velocidades progressivamente menores para se obter a curva descendente. O tempo de cisalhamento utilizado foi de 10 s sendo um tempo total de aproximadamente 5 minutos para cada formulação.

A integração numérica das curvas obtidas foi realizada pelo software *Origin 7.0* e a área entre as curvas ascendente e descendente foi obtida pelo mesmo software. Deste modo, pode-se obter a área de histerese das formulações.

4.9. Avaliação da presença de cristais líquidos nas formulações

Para avaliar a presença de cristais líquidos foi utilizado método proposto por CHORILLI et al. (2011). Uma alíquota da amostra das formulações foi colocada sobre lâminas microscópicas de vidro previamente submetidas por técnica de assepsia, sendo posteriormente cobertas por lamínulas. Estas, por sua vez, foram pressionadas até o completo espalhamento da amostra, sendo verificada a translucidez das amostras sobre as lâminas. Em seguida as mesmas foram analisadas no microscópio de luz polarizada (Microscópio de luz polarizada – TYPE 102M – Motic).

Este método visa detectar a homogeneidade da formulação emulsionada, bem como, com o auxílio da polarização investigar a presença de áreas de anisotropia, caracterizadas pela identificação de estruturas mesógenas, que são indicativos da presença de Cristais Líquidos. As análises em microscopia de luz polarizada ocorreram em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) nos tempo descritos como T0 (período subsequente ao preparo da formulação)- e no tempo noventa (T90) dias, isto é, após noventa dias do preparo da formulação.

4.10. Avaliação do potencial antioxidante do óleo de café e formulações

A atividade antioxidante “in vitro” do óleo de café e formulações foi avaliada pelo método de DPPH (FALÉ et al., 2009). Para determinação da atividade de radicais livres do óleo do café (2 – 8 mg/mL) e respectivas formulações cosméticas (2 - 8 mg /mL), as amostras foram adicionadas à solução metanólica de DPPH 0,002%. A mistura reacional foi incubada durante 30 min à temperatura ambiente. O BHT foi utilizado como controle positivo (1,24 – 73,21 µg/mL).

A absorvância foi medida a 517 nm contra um branco correspondente. A atividade antioxidante foi calculada: % AA = $[(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$, em que AA é a atividade antioxidante, A_{DPPH} é a absorção da solução de DPPH contra o branco e A_{sample} é a absorção do OCV ou formulações contra o branco. Os testes foram realizados em triplicata e as concentrações que fornecem 50% da atividade antioxidante ($IC_{50\%}$) foram obtidas através da representação gráfica da actividade antioxidante contra a concentração do OCV ou formulações.

4.11. Avaliação da atividade antimicrobiana

4.11.1. Estirpes microbianas

Bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Propionibacterium acnes* ATCC 6919, *Bacillus subtilis* ATCC 6633), bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), e a levedura *Candida albicans* (ATCC 10231) foram utilizadas como estirpes de referência para os testes de atividade antimicrobiana.

4.11.2. Método de difusão em poço

O óleo de café e as respectivas formulações foram testadas contra seis estirpes de bactérias e uma levedura pelo método de difusão em poço (CLSI, 2011). O meio de cultura Mueller-Hinton (3 mm de camada) foi colocado em placas de Petri (8 cm de diâmetro) armazenadas a 8 °C. Sete cilindros equidistantes foram dispostos na superfície do meio de Mueller-Hinton. Um volume de 50 µL de solução (20 mg/ml) foram adicionados aos cilindros usando uma micropipeta. Os poços (5 mm de diâmetro) com vancomicina (1 mg/mL), norfloxacin (1 mg/mL), e anfotericina B (1 mg/mL) foram utilizados como controles positivos. DMSO 100% foi usado como controle negativo. As placas microbianas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. Após a incubação, os halos de inibição de crescimento foram medidos com uma precisão de 1 mm. Todos os testes de difusão em poço foram feitos em três experiências independentes e a atividade antimicrobiana foi expressa como a mediana dos halos de inibição de crescimento (mm).

4.12. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria UV/visível

A determinação do fator de proteção solar (FPS) avalia a capacidade dos filtros solares para a porção UVB do espectro eletromagnético. Assim, para determinar o FPS das formulações obtidas, alíquotas dessas formulações foram obtidas utilizando-se pipeta automática. A alíquota foi dissolvida em álcool etílico na concentração de 0,2 µl/ml. Os

valores de FPS foram determinados por espectrofotometria utilizando-se espectrofotômetro Hitachi U-2001 seguindo metodologia desenvolvida por MANSUR (MANSUR et al., 1986).

Foram obtidos os valores de absorbância das formulações nos comprimentos de onda de 290 a 320 nm. Cada valor foi multiplicado por um peso descrito na Tabela 4. E o somatório dessas multiplicações foi multiplicada por 10 para se obter o FPS das formulações de estudo.

Tabela 4. Comprimento de onda e respectivo fator de multiplicação utilizados para cálculo do FPS.

Comprimento de onda (nm)	Fator de multiplicação
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3280
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180

Para comparar o potencial fotoprotetor das formulações de estudo foram calculadas as integrais das curvas espectrofotométricas obtidas entre os comprimentos de onda de 280 a 320nm com o software *Origin 7.0*. Tais integrais foram comparadas entre si visando avaliar qual a porcentagem de aumento da integral da curva em relação à concentração de óleo de café na formulação.

4.13. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria de refletância com esfera integrada

Para determinação do FPS “in vitro” foi utilizado espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração, Labsphere® UV1000S Ultraviolet Transmittance Analyser e como substrato fita cirúrgica Transpore®, 3M a qual foi recortada e colada sobre uma placa de quartzo de 50 x 50 mm. Sobre este substrato foi aplicada uma camada homogênea de 50mg de cada formulação. Após 20 minutos foi feita a leitura dos valores espectrofotométricos de transmitância entre o intervalo de comprimento de onda de 250 a 450 nm de 1 em 1nm. Com

base na análise de nove pontos pode ser determinado do fator de proteção solar das formulações (VELASCO et al., 2008).

4.14. Avaliação da proteção da pele de camundongos contra radiação ultravioleta

Após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do campus da USP de Ribeirão Preto (09.1.1212.53.2), foram realizados testes em 25 camundongos sem pêlo, machos, adultos, pesando em média 30 gramas, linhagem HRS/J, Laboratórios Jackson, Bar Harbor, ME, doados pelo Laboratório JOHNSON & JOHNSON, Brasil.

Amostras de 0,3 ml da formulação selecionada foram aplicadas longitudinalmente no dorso dos camundongos diariamente durante 5 dias. Os 25 animais foram divididos em 5 grupos: a) controle, onde não foi aplicada formulação, b) F0, onde foi aplicada formulação de cera autoemulsionante *R sem óleo de café, c) F5, onde foi aplicada mesma formulação contendo 5% de óleo de café, d) F10, onde foi aplicada mesma formulação contendo 10% de óleo de café e e) F5F, onde foi aplicada mesma formulação contendo 5% de óleo de café e 7,5% 2- phenyl- 1H- benzimidazole- 5- sulphonic acid + benzophenone-4.

Os camundongos foram imobilizados e, após 15 minutos da aplicação, foram posicionados a 20 cm da fonte e expostos a radiação UVA/UVB na faixa de comprimento de onda de 280 a 400nm. Foi utilizado um simulador solar constituído de uma lâmpada de arco de xenônio Oriell150W (Oriel Corporation, Stratford, CT) ligada a uma fonte acoplada a um espelho dicróico 81045 Oriel e um filtro 59450 Oriel. A dose de radiação emitida foi obtida por meio de um sensor, Radiômetro 70260 Oriel com detector de silicone 70282 colocado no mesmo local (BENEVENUTO et al., 2010). Foi utilizado nível de irradiância de 20 mW/cm² sobre a pele dorsal posterior dos ratos que foram irradiados por 28 minutos.

Em todos os grupos as áreas dorsais anteriores dos ratos foram protegidas da radiação (áreas de controle negativo) para comparar e eliminar uma possível interferência das formulações aplicadas na formação do eritema e na função de barreira da pele (GASPAR e MAIA CAMPOS, 2003). Depois de 20 horas da exposição à radiação, foi medido o índice de eritema, a perda de água transepidérmica nas áreas irradiadas e não irradiadas.

O índice de eritema foi medido, utilizando o equipamento *Mexameter*[®] MX16. Foram efetuadas 3 medidas em cada região avaliada, e a média destes valores foi utilizada para as análises posteriores. O índice de eritema está relacionado com o conteúdo de hemoglobina na pele, baseado no princípio da absorção.

Para a realização do estudo de perda de água transepidérmica foi utilizado o equipamento *Tewameter® TM 210*, acoplado a um software, cuja função é medir a perda transepidérmica de água, baseado no princípio de difusão descrito por Adolf Fick. Os valores foram dados em $\text{g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$. A sonda do aparelho permaneceu por 2 minutos sobre a pele e o valor médio das 5 medidas obtidas neste intervalo de tempo foi empregado nos cálculos estatísticos (GIOIA e CELLENO, 2002).

Após 24 horas da exposição à radiação ultravioleta, os camundongos sem pelo foram eutanasiados por inalação de CO_2 e foram colhidos com *punch* dermatológico fragmentos da pele de 5 mm de diâmetro de cada área tratada, os quais foram imersos imediatamente em solução fixadora de álcool 80%, formaldeído e ácido acético e foram deixados para fixar durante 16 horas. Após a fixação, as peças foram desidratadas, diafanizadas e mergulhadas em parafina. Posteriormente foram realizados cortes semi-seriados de 6 μm de espessura de modo que cada um destes 6 cortes correspondia a um intervalo de 10 secções. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina avaliados com microscópio óptico com objetiva de imersão de 100x (SILVA e MAIA CAMPOS, 2000).

A medida da espessura da epiderme viável e da camada córnea e a contagem do número de camadas celulares serão realizadas utilizando um microscópio óptico Leica DMLB, acoplado a uma câmera DC 300, com objetiva com aumento de 100x, com o auxílio do analisador de imagens, Image J 1.36. Foram selecionadas aleatoriamente 4 imagens por animal e a partir destas, foram realizadas 4 medidas por imagem sendo obtido o valor médio para cada animal.

Para cada imagem foi determinado o número de células de queimadura solar (queratinócitos presentes na camada basal que apresentam núcleo picnótico e citoplasma eosinofílico) por campo analisado das quais foi obtida a média do número total de células de queimadura solar por corte histológico (GASPAR e MAIA CAMPOS, 2003).

4.15. Quantificação do composto responsável pela absorção da radiação UV-B

A quantificação do composto responsável pela absorção da radiação UV-B, o caveol, foi realizada utilizando-se método adaptado de DIAS et al. (2010). Utilizando-se o padrão caveol solubilizado em acetonitrila: água (45:55, v/v) em concentrações de 0,0150 a 1,36 mM que correspondem a concentrações de 4,7 a 428 $\mu\text{g/mL}$. Foi estabelecida uma curva de calibração obtida pelo aparelho de Cromatografia Líquida (HPLC Agilent 1260 Infinity). As condições

cromatográficas foram as seguintes: coluna CC 250/4.6 Nucleosil 100.5 C18, fase móvel composta de acetonitrila: água (45:55, v/v), eluição isocrática, leitura de absorbâncias $\lambda = 290\text{nm}$.

4.16. Letalidade em *Artemia salina*

Ovos de *Artemia salina* foram cultivados em água salgada (3,8 g/L de sal) durante 48 h a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). Após incubação, 10 náuplios foram recolhidos utilizando uma micropipeta e colocados em placas de 24 poços com água salgada sob as mesmas condições. As amostras foram dissolvidas em DMSO em concentrações finais de 200 - 2000 $\mu\text{g/mL}$. DMSO a 1% foi usado como controle negativo. Após 24 horas, o número de náuplios vivos (ainda em movimento) foi contado e a letalidade (%) foi calculada subtraindo-se a letalidade do controle negativo pela a letalidade observada nas amostras (BUSSMANN et al., 2011).

4.17. HaCat cultura de queratinócitos

Queratinócitos humanos HaCat foram rotineiramente cultivados em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, e 0,1 mg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas a 37°C , sob uma atmosfera contendo 5% de CO_2 em ar.

4.18. Ensaio de redução do MTT

A citotoxicidade do óleo de café verde e formulações foi avaliada pelo ensaio de MTT, utilizando um protocolo adaptado a partir de FERNANDES et al. (2012). Neste método, o MTT é reduzido por enzimas mitocondriais de células viáveis em formazan e pode ser medido a 595 nm. A absorbância é, por conseguinte, proporcional ao número de células viáveis.

No nosso protocolo experimental, aproximadamente 5000 células foram cultivadas em 200 μL de meio de cultura por poço em placas de 96 poços e incubadas a 37°C sob uma atmosfera de 5% de CO_2 . As células cresceram durante 24 horas e, em seguida, foram expostas a diferentes concentrações de óleo de café ou formulações (10 a 100 $\mu\text{L/mL}$)

dissolvidos em DMSO, durante um período de 24 h. A concentração final de DMSO no meio de cultura foi de 0,5%. As células foram então lavadas com meio de cultura e adicionou-se MTT a cada poço a uma concentração de 0,5 mg/ml (dissolvido em meio de cultura).

As células foram cultivadas durante um período adicional de 2,5 horas e, depois, cuidadosamente lavada com PBS. DMSO (200 µl) foi adicionado a cada poço para solubilizar os cristais de formazan.

Absorbância foi lida em um Thermo Scientific Multiskan FC leitor de microplacas a 595 nm. Dois experimentos independentes foram realizados, cada um compreendendo quatro réplicas. DMSO a 5% foi utilizado como controle positivo.

4.19. Avaliação clínica de segurança

Os estudos de segurança e sensibilidade cutânea foram adaptados de VICIOLLE et al., 2012. Tais estudos foram realizados em 19 voluntários do sexo feminino, com idade média de 27 anos, que foram informados do estudo e de todos os procedimentos envolvidos. Os procedimentos seguidos estavam de acordo com os padrões éticos do Comitê Universidade Lusófona (A1/2004 Março, 12).

Três regiões no antebraço de cada voluntário foram marcadas. Nestas foram aleatoriamente aplicadas a formulação/veículo, a formulação contendo 15% de óleo de café e uma região foi usado como controle onde não foi aplicado nenhum tratamento. As formulações foram aplicadas uma vez por dia no antebraço de cada voluntário durante 3 dias consecutivos (2 mg/cm²).

As medições foram realizadas com CM825PC Corneometer® (CK Electronics, GmbH, Köln, Alemanha), Tewameter® TM300 (CK Electronics) e MX16 Mexameter® (CK Electronics). Todas as medições foram efetuadas em triplicata. Os valores basais foram determinados no primeiro dia do estudo, e as outras medições foram feitas às 24 e 48 h.

4.20. Avaliação da sensibilidade cutânea - “Patch test”

O teste de sensibilidade foi realizada com adesivos Finn Chambers (Scampor Epitest Ltda Oy) os quais foram aplicados na região posterior das costas das voluntárias e de acordo com os critérios internacionais do grupo de pesquisa de dermatite de contato, com a série de base Português. O teste foi realizado em 13 voluntárias com idades entre 19-43 anos de idade

com o veículo e a formulação contendo 15% de óleo de café. Em uma das câmaras do adesivo não foi aplicada formulação de modo que este foi utilizado como controle. A reação positiva deveria ter sido observada como vermelhidão na aplicação local.

4.21. Avaliação das propriedades sensoriais

Um painel sensorial realizado em Lisboa foi formado por 19 voluntárias com idades entre 19 e 43. O outro painel foi realizado em Ribeirão Preto com voluntárias de 22 a 36 anos. As propriedades sensoriais foram avaliadas pela aplicação de 50mg das formulações veículo e formulação contendo 15% de óleo de café em regiões delimitadas de 25cm² na região interna do antebraço.

As voluntárias foram instruídas a não usar hidratantes e loções corporais 12 horas antes do estudo e permaneceram sob aclimatação com umidade (40-60%) e temperatura ($25 \pm 1^\circ \text{C}$) controladas 15 minutos antes da avaliação.

Foram avaliadas as seguintes propriedades durante a aplicação: oleosidade, pegajosidade, suavidade, facilidade de espalhamento e facilidade de absorção. Também foram avaliadas algumas propriedades sensoriais 5 minutos após a aplicação: presença de resíduo oleoso, pele macia, pele hidratada e presença de resíduo esbranquiçado. Se as formulações apresentassem qualquer uma das características citadas anteriormente, a voluntária deveria assinalar com um “X”. Pela Figura 3, podemos observar o modelo de questionário utilizado no experimento.

NOME: _____	
AVALIAÇÃO SENSORIAL	
Características sensoriais após aplicação	Características sensoriais após 5 min. Efeitos na pele.
☐ Oleosa/gordurosa	☐ Resíduo oleoso
☐ Pegajosa	☐ Pele macia
☐ Suave	☐ Pele hidratada
☐ Fácil de espalhar	☐ Resíduo esbranquiçado
☐ Facilmente absorvida	

Figura 3. Questionário de avaliação das propriedades sensoriais.

4.22. Delineamento experimental

O delineamento estatístico foi adaptado para cada ensaio utilizando o software Origin 8.0 para verificação da normalidade dos dados e GraphPad Prism 5.0 para análises de variância e teste de comparação de médias.

Para os resultados do ensaio da atividade antioxidante, foram utilizados testes de Kruskal-Wallis, com 4 tratamentos (formulações) x 3 repetições.

Para ensaio da atividade antimicrobiana, utilizou-se a mediana do diâmetro de inibição obtida nas zonas de três experimentos independentes.

Para os ensaios de estabilidade pela avaliação do comportamento reológico das formulações foi realizada a análise de variância de duas vias com posterior teste de Bonferroni para comparação das médias do parâmetro viscosidade aparente. Foram realizadas 3 repetições para cada amostra ($\alpha \leq 0,05$). Os dados obtidos para cada uma das ceras autoemulsionantes empregadas no desenvolvimento das formulações foram analisados separadamente seguindo o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_{(i)j} + e_{ijk}$$

Onde Y_{ijk} = efeito do $j^{\text{ésimo}}$ nível do fator concentração de óleo (β) dentro $i^{\text{ésimo}}$ nível do fator tempo de armazenamento (α) na $k^{\text{ésima}}$ repetição

μ = média geral do experimento

α_i = efeito do $i^{\text{ésimo}}$ nível do fator tempo de armazenamento (α)

β_j = efeito do $j^{\text{ésimo}}$ nível do fator concentração de óleo (β)

e_{ijk} = efeito do erro na unidade experimental envolvendo $j^{\text{ésimo}}$ nível do fator concentração de óleo (β) dentro do $i^{\text{ésimo}}$ nível do fator tempo de armazenamento (α)

Para os ensaios de avaliação da segurança do óleo de café e das formulações - letalidade em *Artemia salina* e ensaios de cultura celular - foi utilizada análise de variância de 2 vias e pós-teste de Bonferroni para comparar os tratamentos (óleo e formulações). Para *A. salina* a média foi composta por 4 repetições do tratamento em 4 ensaios independentes. Para cultura celular, a média foi composta por 4 repetições do tratamento em 3 ensaios independentes ($\alpha \leq 0,05$). Ambos seguiram o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_{(i)j} + e_{ijk}$$

Onde Y_{ijk} = efeito do $j^{\text{ésimo}}$ nível do fator concentração de amostra no meio de cultura (β) dentro $i^{\text{ésimo}}$ nível do fator concentração do óleo na formulação (α) na $k^{\text{ésima}}$ repetição

μ = média geral do experimento

α_i = efeito do $i^{\text{ésimo}}$ nível do fator concentração do óleo na formulação (α)

β_j = efeito do $j^{\text{ésimo}}$ nível do fator concentração de amostra no meio de cultura (β)

e_{ijk} = efeito do erro na unidade experimental envolvendo $j^{\text{ésimo}}$ nível do fator concentração de amostra no meio de cultura (β) dentro do $i^{\text{ésimo}}$ nível do fator concentração do óleo na formulação (α)

Para os ensaios de avaliação clínica de segurança, foi utilizada análise de variância de 2 vias e pós-teste de Bonferroni para comparar os tratamentos (controle, formulação sem óleo de café, formulação contendo 15% de óleo de café). Os resultados de cada equipamento foram analisados separadamente. A média de 3 leituras obtidas em cada região do antebraço das 19 voluntárias foi considerada uma repetição. A análise de variância ($\alpha \leq 0,05$) seguiu o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_{(i)j} + e_{ijk}$$

Onde Y_{ijk} = efeito do $j^{\text{ésimo}}$ nível do fator tratamento (β) dentro $i^{\text{ésimo}}$ nível do fator tempo de aplicação (α) na $k^{\text{ésima}}$ repetição

μ = média geral do experimento

α_i = efeito do $i^{\text{ésimo}}$ nível do fator tempo de aplicação (α)

β_j = efeito do $j^{\text{ésimo}}$ nível do fator tratamento (β)

e_{ijk} = efeito do erro na unidade experimental envolvendo $j^{\text{ésimo}}$ nível do fator tratamento (β) dentro do $i^{\text{ésimo}}$ nível do fator tempo de aplicação (α)

Para analisar se houve diferença estatística nos ensaios de determinação do FPS “in vitro” pelo método de Mansur (MANSUR et al., 1986) foi utilizada análise de variância de uma via com delineamento inteiramente casualizado composto de 8 tratamentos x 3 repetições ($\alpha \leq 0,05$) seguindo o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + e_{ijk}$$

Onde Y_{ijk} = efeito do $i^{\text{ésimo}}$ nível do fator tratamento (α) na $k^{\text{ésima}}$ repetição

μ = média geral do experimento

α_i = efeito do $i^{\text{ésimo}}$ nível do tratamento (α)

e_{ijk} = efeito do erro na unidade experimental envolvendo $i^{\text{ésimo}}$ nível do fator tratamento (α)

Para analisar se houve diferença estatística nos ensaios de determinação do FPS “in vitro” pelo método de espectroscopia de refletância com esfera integrada foi utilizada análise de variância de duas vias com posterior teste de Bonferroni para comparação de médias ($\alpha \leq 0,05$) seguindo o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_{(i)j} + e_{ijk}$$

Onde Y_{ijk} = efeito do $j^{\text{ésimo}}$ nível do fator concentração de óleo de café (β) dentro $i^{\text{ésimo}}$ nível do fator concentração do filtro (α) na $k^{\text{ésima}}$ repetição

μ = média geral do experimento

α_i = efeito do $i^{\text{ésimo}}$ nível do fator concentração do filtro (α)

β_j = efeito do $j^{\text{ésimo}}$ nível do fator concentração de óleo de café (β)

e_{ijk} = efeito do erro na unidade experimental envolvendo $j^{\text{ésimo}}$ nível do fator concentração de óleo de café (β) dentro do $i^{\text{ésimo}}$ nível do fator concentração do filtro (α)

Para analisar estatisticamente se houve diferença significativa entre os tratamentos (controle, veículo, formulação contendo 5% de óleo de café, formulação com 10% de óleo e formulação contendo 5% de óleo + 7,5% de filtro hidrossolúvel) quando estes foram aplicados no dorso dos animais de experimentação, foi utilizada análise de variância de uma via. Foram utilizados 4 animais por grupo. Os resultados obtidos para cada equipamento e/ou contagem de células de queimadura solar foram analisados separadamente seguindo o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + e_{ijk}$$

Onde Y_{ijk} = efeito do $i^{\text{ésimo}}$ nível do fator tratamento (α) na $k^{\text{ésima}}$ repetição

μ = média geral do experimento

α_i = efeito do $i^{\text{ésimo}}$ nível do tratamento (α)

e_{ijk} = efeito do erro na unidade experimental envolvendo $i^{\text{ésimo}}$ nível do fator tratamento (α)

5. Resultados

5.1. Desenvolvimento das formulações

Primeiramente foi realizada uma pesquisa bibliográfica bastante detalhada sobre as ceras autoemulsionantes compostas de produtos obtidos a partir de matérias-primas de origem vegetal mais indicadas para uso em filtros solares. Estas ceras foram testadas como base para formulações sem óleo de café e contendo 2,5, 5, 10 e 15% de óleo de café na fase oleosa.

As formulações foram elaboradas sob agitação constante de 600 rpm por 20 minutos em agitador mecânico. É importante ressaltar que, além desta forma de preparação das emulsões, também foi testada adição do óleo de café como ativo após a preparação de veículos em gel e em creme. Em ambos os veículos, não se conseguiu a incorporação do ativo.

Também foram avaliadas formulações em creme tendo em sua composição outras ceras autoemulsionantes não tão indicadas para protetores solares mas, que também, apresentavam como sua descrição produtos de origem vegetal: Nanocolloydil 2022, Polawax, Cithrol GMS-AE, Nikkolipid 81S, Nikkomulse 41, Incroquat Behenyl TMS e Uniox-A nas concentrações descritas na Tabela 5.

Na fase oleosa dessas formulações foi adicionada somente a concentração de 15% de óleo de café visando avaliar qual das ceras e se uma característica específica destas faria com que a formulação contendo grande quantidade de óleo de café fosse estável.

Também foi testada uma cera a base de diestearato de poliglicerila-6 denominada Plurol stearique da Gatefosse. Essa cera, assim como a cera Uniox-A (Chemunion) a base de álcool cetosteárilico e cetearate-20 demonstraram ser compatíveis com o óleo de café.

Após a elaboração de várias formulações em creme foram testadas também várias formulações em gel-creme. Para estas formulações, foram testadas associações das ceras autoemulsionantes que já haviam se mostrado compatíveis com o óleo de café com alguns polímeros: Amigel, Plurigel, Carbopol Ultrex, Natrosol, Farmal e Aristoflex AVC (Tabela 2).

Todas as formulações foram elaboradas com conservante Cosmoguard® composto de metildibromo glutaronitrila e fenoxietanol, o qual é livre de parabenos, pois, na Europa já existe uma tendência de formulação de cosméticos *parabeno-free*.

Foi testada também uma cera que não foi compatível com óleo de café para as formulações creme (Nikkomulse 41) com todos os géis descritos anteriormente para avaliar se algum dos polímeros utilizados nas formulações poderia tornar uma formulação que a princípio não foi estável em uma formulação estável. Todavia, o acréscimo de um polímero à formulação não impediu que houvesse a separação de fases na centrífuga.

Uma vez que, as formulações em gel-creme apresentam vantagens quanto aos cremes, pois, são mais fáceis de espalhar e apresentam toque mais seco sendo considerados com melhor sensorial que as formulações em creme foram também elaboradas formulações em gel-creme para as ceras autoemulsionantes anteriormente testadas e compatíveis com o óleo de café.

Desse modo, foram elaboradas formulações contendo também os polímeros Amigel (goma sclerotium) ou Farmal (amido de milho), pois estes são de origem natural e são descritos pelos respectivos fabricantes como de sensorial agradável.

Também foram desenvolvidas formulações contendo um filtro solar hidrossolúvel com FPS conhecido visando avaliar se o óleo de café é capaz de aumentar o FPS das mesmas.

Essas formulações continham algumas das ceras autoemulsionantes que se apresentaram compatíveis com o óleo de café nas formulações descritas anteriormente: Cosmowax J, Paramul J e Plurol stearique e foram acrescidas de 7,5% de filtro hidrossolúvel UVA-B (Galena). Todavia, somente as formulações contendo 2,5 e 5% de óleo de café mantiveram-se estáveis após centrifugação (Tabela 3).

Ressalta-se ainda que tais formulações são bastante simples do ponto vista farmacotécnico, o que contribui para sua boa aceitação pelas fabricantes de cosméticos.

5.2. Avaliação preliminar de estabilidade

As ceras Paramul J, Cosmowax J e Crodafof CES apresentaram-se estáveis após o teste de estabilidade acelerada, entretanto, as formulações obtidas apresentaram-se muito consistentes, o que influenciou na redução da espalhabilidade destas.

Para a cera Cosmowax J, foram testadas também outras concentrações (5 e 6%) obtendo-se formulações também estáveis, entretanto, com consistências mais fluídas, ou seja, mais adequadas para um filtro solar e que apresentaram melhor espalhabilidade.

Todavia, as formulações cuja cera autoemulsionante utilizada foi Crodafof CES apresentaram alteração da coloração após 30 dias na estufa a 45° C indicando instabilidade mesmo com acréscimo de antioxidante (BHT).

Após os vários testes com as ceras autoemulsionantes descritas anteriormente, foram elaboradas 4 formulações (2,5, 5, 10 e 15% de óleo de café) contendo a cera Paramul J (6%), 4 formulações contendo a cera Uniox-A (6%), 4 formulações contendo a cera Cosmowax J e 4 formulações contendo a cera Plurol Stearique as quais foram submetidas ao teste de estabilidade acelerada e não apresentaram separação de fases e nem alteração organoléptica após 30 dias.

As ceras autoemulsionantes Cosmowax J (Croda), Paramul J (Galena) e Uniox –A (Chemunion), mesmo sendo de empresas diferentes apresentam segundo os fabricantes a mesma composição a base de álcool cetoestearílico e cetearate-20 entretanto, acredita-se que em diferentes proporções dos ingredientes que as compõem.

Sendo assim, nas condições do estudo pode se afirmar que a composição das ceras autoemulsionantes utilizadas e em especial o tensoativo presente nestas (cetearate-20) foi fator determinante na estabilidade dessas formulações.

5.3. Determinação do pH

As formulações elaboradas com o polímero Farmal apresentaram sensorial mais agradável do que as formulações com Amigel, porém, as formulações com Farmal apresentaram grande redução do pH após 30 dias em estufa. Tal redução foi mais acentuada quanto maior a temperatura a qual estava submetida (Tabela 5).

Tabela 5. pH das formulações em gel-creme desenvolvidas.

Formulações	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
em gel-creme															
pH inicial															
2,5	6,51	5,43	6,10	5,39	5,99	5,96	6,10	5,27	5,75	5,45	5,31	5,03	6,08	5,27	5,75
5			5,94	5,90	6,00	6,05			5,17	5,42	5,56	5,17	5,61	5,35	
10									5,09	5,39	5,51	5,09	6,28		
15									5,15	5,49	5,29	5,15	5,52		
Centrifuga	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	-	-	-	-	-	ok	ok
pH 30 dias ambiente															
2,5	6,51	5,03	6,03	5,29	5,90	5,97								5,24	5,70
5			5,85	5,89	6,03	6,01								5,33	
10															
15							*	*							
pH 30 dias 37°C															
2,5	6,20	4,98	5,79	4,87	5,84	5,38								4,79	5,61
5			5,64	4,78	5,91	5,44								4,71	
10															
15							*	*							
pH 30 dias 45°C															
2,5	6,04	4,23	5,60	4,50	5,54	4,60								4,40	5,43
5			5,37	4,78	5,54	4,53								4,34	
10															
15							*	*							

* Perda de consistência.

As demais formulações testadas apresentaram alteração do pH porém não tão acentuada. Estas também não apresentaram alteração de suas características organolépticas indicando estabilidade (Tabela 6).

Tabela 6. pH das formulações em creme desenvolvidas.

Formulações	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
em creme														
pH inicial														
2,5	5,13	5,63	5,93	5,18	6,71									
5	5,17	5,67	6,12	5,01	6,73									
10	5,45	5,59	5,86	5,32	6,66									
15	5,53	5,70	6,06	5,42	6,82	6,29	5,52	5,57	6,06	5,59	5,72	5,27	6,17	5,68
Centrífuga	-	ok	ok	ok	-	-	-	-	ok	-	-	-	-	ok
pH 30 dias 37°C														
2,5		5,04		4,92										
5		5,23		4,82										
10		5,22		4,77										
15		5,30		4,92					5,33					4,90
pH 30 dias 45°C														
2,5		4,96		4,76										
5		4,97		4,55										
10		5,05		4,62										
15		4,91		4,21					5,08					4,42

As características organolépticas das formulações obtidas foram cuidadosamente avaliadas. Estas não se alteraram nem mesmo sob estresse térmico indicando a eficácia do antioxidante utilizado.

5.4. Centrifugação

As ceras Polawax, Cithrol GMS-AE, Nikkolipid 81S e Nanocolloydil 2022 não foram compatíveis com o óleo de café devido as suas composições e apresentaram separação de fases na centrífuga.

Todas as formulações em gel-creme cujas ceras autoemulsionantes haviam sido testadas foram estáveis, pois, não apresentaram separação de fases no teste da centrífuga. No entanto, tais formulações foram estáveis somente quando acrescidas de 2,5 e 5% de óleo de café na fase oleosa.

Para as demais concentrações, a carga oleosa foi além do sustentável indicando que deveria ser aumentada a concentração do emulsificante. Por outro lado, uma concentração maior de cera autoemulsificante poderia resultar em formulações com reduzida espalhabilidade e sensorial desagradável.

5.5. Testes de estabilidade física por determinação do comportamento reológico

De acordo com os resultados obtidos, foi possível verificar que as ceras autemulsionantes selecionadas para elaboração das formulações apresentaram pouca variação no parâmetro índice de consistência. Porém, pôde se observar que as formulações a base de *C foram as mais estáveis para este parâmetro (Tabela 7).

Tabela 7. Índices de consistência das formulações desenvolvidas em função do período e da temperatura de armazenamento (média de 3 repetições).

Formulação	Temperatura de armazenamento	Concentração de óleo de café	0	7	14	21	28	45	90
*C	25° C	0	6296	8439	8720	9519	8308	9158	9979
		2,5	16542	16327	16577	16452	16945	19148	19175
		5	27984	25817	26896	25674	24697	24915	24370
		10	27126	24966	27086	23350	23639	23229	25364
		15	30158	29644	29960	28187	26985	24550	28150
	37° C	0	6296	9428	9437	9343	9846	10150	9747
		2,5	16542	18292	18433	17415	17862	18133	20538
		5	27984	27549	27791	25229	25257	23848	24126
		10	27126	27487	27313	24423	23635	22367	24466
		15	30158	30309	28192	28561	26691	27140	25341
	45° C	0	6296	9718	12925	10803	11431	11446	17071
		2,5	16542	18135	19430	17483	16149	19343	17808
		5	27984	26572	27646	25264	19886	23109	19519
		10	27126	27250	26768	20962	23644	25264	41657
		15	30158	27500	28486	27889	27406	30378	21317
*R	25° C	0	13107	15327	16415	13909	14780	15634	17151
		2,5	15077	15133	14479	13961	13769	15053	13660
		5	19894	18875	18697	18574	18541	17921	18620
		10	22346	21731	22895	22284	20678	20210	20752
		15	22350	21045	21518	21525	18961	19537	15379
	37° C	0	13107	17827	17906	21646	19379	24316	30220
		2,5	15077	15954	16349	15736	15300	16094	-
		5	19894	19547	21403	19500	18637	18594	19922
		10	22346	23410	26053	23779	22402	22193	22584
		15	22350	24035	21893	19551	21727	19676	22747
	45° C	0	13107	18852	19030	20574	19780	31010	-
		2,5	15077	16875	15833	15461	14530	14162	11897
		5	19894	20181	20890	18880	18453	18496	21631
		10	22346	23267	22139	22144	20913	24243	14018
		15	22350	18844	18175	16602	15320	18643	11158
*U	25° C	0	10091	9304	9439	9945	8950	-	-
		2,5	21288	20582	21759	20075	-	-	-
		5	14323	15976	22973	17476	21807	-	-
		10	25772	22142	33953	33083	-	-	-
		15	23839	23080	30533	26179	28719	-	-
	37° C	0	10091	8419	8779	8814	8324	-	-
		2,5	21288	12693	14082	14894	-	-	-
		5	14323	12119	15612	13191	14023	-	-
		10	25772	19257	25079	24328	23333	-	-
		15	23839	18115	24688	22097	23227	-	-
	45° C	0	10091	9170	10666	12491	14008	-	-
		2,5	21288	14213	15406	16488	14016	-	-
		5	14323	10892	13307	11935	10308	-	-
		10	25772	16115	17123	16576	13111	-	-
		15	23839	15798	17457	16356	15918	-	-

De acordo com as análises reológicas, todas as formulações apresentaram comportamento pseudoplástico com valores de índice de fluxo entre 0,16 e 0,49, sendo que as formulações a base de *C apresentaram valores entre 0,16 e 0,45, as formulações a base de *R apresentaram valores um pouco mais elevados de 0,22 a 0,49 e as formulações a base de *U valores entre 0,20 e 0,48 (Tabela 8).

Tabela 8. Índices de fluxo das formulações desenvolvidas em função do período e da temperatura de armazenamento (média de 3 repetições).

Formulação	Temperatura de armazenamento	Concentração de óleo de café	0	7	14	21	28	45	90
*C	25° C	0	0,42	0,42	0,41	0,40	0,44	0,42	0,39
		2,5	0,31	0,33	0,33	0,34	0,33	0,31	0,32
		5	0,18	0,20	0,20	0,20	0,20	0,18	0,25
		10	0,24	0,25	0,24	0,27	0,26	0,24	0,27
		15	0,27	0,29	0,30	0,27	0,30	0,27	0,34
	37° C	0	0,42	0,39	0,39	0,40	0,39	0,45	0,43
		2,5	0,31	0,32	0,33	0,34	0,32	0,33	0,35
		5	0,18	0,19	0,20	0,20	0,22	0,23	0,21
		10	0,24	0,22	0,23	0,24	0,23	0,25	0,23
		15	0,27	0,27	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28
	45° C	0	0,42	0,40	0,36	0,40	0,37	0,43	0,45
		2,5	0,31	0,32	0,31	0,31	0,31	0,31	0,32
		5	0,18	0,17	0,18	0,19	0,16	0,19	0,19
		10	0,24	0,24	0,26	0,26	0,26	0,23	0,29
		15	0,27	0,28	0,28	0,28	0,29	0,24	0,32
*R	25° C	0	0,23	0,24	0,24	0,29	0,27	0,27	0,26
		2,5	0,26	0,27	0,29	0,29	0,30	0,29	0,32
		5	0,22	0,24	0,26	0,26	0,25	0,24	0,24
		10	0,25	0,26	0,27	0,29	0,25	0,26	0,28
		15	0,42	0,44	0,42	0,43	0,44	0,45	0,48
	37° C	0	0,23	0,24	0,24	0,24	0,25	0,24	0,28
		2,5	0,26	0,27	0,27	0,27	0,30	0,28	-
		5	0,22	0,23	0,23	0,24	0,25	0,24	0,24
		10	0,25	0,26	0,25	0,24	0,25	0,30	0,26
		15	0,42	0,41	0,43	0,42	0,43	0,43	0,43
	45° C	0	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,29	-
		2,5	0,26	0,27	0,26	0,26	0,28	0,29	0,30
		5	0,22	0,23	0,23	0,24	0,25	0,25	0,25
		10	0,25	0,26	0,27	0,29	0,27	0,27	0,38
		15	0,42	0,45	0,45	0,47	0,46	0,47	0,49
*U	25° C	0	0,42	0,45	0,45	0,29	0,42	-	-
		2,5	0,40	0,44	0,45	0,45	-	-	-
		5	0,43	0,47	0,44	0,48	0,40	-	-
		10	0,34	0,43	0,37	0,41	-	-	-
		15	0,24	0,24	0,23	0,30	0,37	-	-
	37° C	0	0,42	0,40	0,41	0,36	0,41	-	-
		2,5	0,40	0,37	0,34	0,36	-	-	-
		5	0,43	0,41	0,35	0,39	0,41	-	-
		10	0,34	0,39	0,34	0,35	0,38	-	-
		15	0,24	0,25	0,20	0,24	0,29	-	-
	45° C	0	0,42	0,34	0,29	0,41	0,33	-	-
		2,5	0,40	0,33	0,29	0,27	0,30	-	-
		5	0,43	0,37	0,34	0,34	0,36	-	-
		10	0,34	0,40	0,40	0,38	0,39	-	-
		15	0,24	0,29	0,25	0,26	0,37	-	-

Também foi avaliado o parâmetro viscosidade aparente das formulações como pode se observar na Tabela 9.

Tabela 9. Viscosidade aparente das formulações a base de *C em função do período e da temperatura de armazenamento (média de 3 repetições).

Temperatura de armazenamento	Concentração de óleo de café	0	7	14	21	28	45	90
25° C	0	887Ac	1163Bb	1217Bb	1257Ba	1226Bb	1250Ba	1334Ca
	2,5	1631Ab	1676Ab	1736Ab	1762Aa	1703Ab	1884Aa	1916Ba
	5	1755Aa	1753Aa	1798Aa	1717Aa	1685Ba	1821Aa	1990Ba
	10	2158Aa	2029Aab	2167Aa	2008Aab	1952Ab	1859Bb	2373Aa
	15	2600Aa	2682Aa	2873Aa	2405Ba	2507Ba	2450Ba	2549Aa
37° C	0	887Ab	1220Ba	1236Ba	1257Ba	1268Ba	1276Ba	1428Ca
	2,5	1631Ab	1826Ab	1898Aa	1847Aab	1801Ab	1842aAb	2340Aa
	5	1755Ab	1830Aab	1908Aa	1724Ab	1794Aab	1592Bc	1730Ba
	10	2158Aa	2015Aab	2067Aab	1921Ab	1805Bb	1746Bbc	1906Ba
	15	2600Aa	2631Aa	2549Aa	2577Aa	2359Bb	2504Ba	2313Ab
45° C	0	887Ad	1280Ac	1493Ab	1433Ab	1408Ab	1458Ab	2735Ba
	2,5	1631Aa	1832Aa	1837Aa	1731Aa	1674Aa	1837Aa	1822Ca
	5	1755Aa	1655Ab	1795Ab	1717Ab	1208Cc	1598Bbc	1306Cc
	10	2158Ab	2111Abc	2418Aab	1734Bc	1991Abc	2053Abc	3971Aa
	15	2600Ab	2404Bbc	2542Ab	2489ABb	2546Ab	3083Aa	1681Cd

*Letras minúsculas diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade entre as concentrações de óleo de café na mesma temperatura de estudo (entre colunas) e letras maiúsculas diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade entre os períodos de armazenamento (entre linhas) (amostras em triplicata).

A viscosidade aparente é um parâmetro que pode ser utilizado para avaliar a estabilidade da formulação ao longo do tempo de armazenamento, pois, formulações mais estáveis apresentam pouca variação para esse parâmetro.

Pelas Figuras 4 e 5 pode-se observar que as formulações a base de *C que continham menores concentrações de óleo de café se mostraram mais estáveis quando foram armazenadas a 25° C.

Figura 4. Viscosidade aparente das formulações a base de *C contendo 0; 2,5; 5; 10 e 15% de óleo de café em função do período a 25° C (média de 3 repetições).

As mesmas formulações também foram as mais estáveis quando armazenadas a 45° C, destacando-se as formulações contendo 2,5 e 5% de óleo (Figura 5).

Figura 5. Viscosidade aparente das formulações a base de *C contendo 0; 2,5; 5; 10 e 15% de óleo de café em função do período a 45° C (média de 3 repetições).

Pela Tabela 10 pode se observar que as formulações a base de *R no geral não apresentaram uma tendência no comportamento reológico. No entanto, pela Figura 3,

observa-se que as formulações armazenadas a 25° C mantiveram valores bastante semelhantes de viscosidade aparente durante os 90 dias de estudo com exceção da formulação contendo 15% de óleo de café.

Tabela 10. Viscosidade aparente das formulações a base de *R em função do período e da temperatura de armazenamento (média de 3 repetições).

Temperatura de armazenamento	Concentração de óleo de café	0	7	14	21	28	45	90
25° C	0	1053Ac	1208Bb	1313Ba	1278Cbc	1275Bbc	1360BCa	1478Ca
	2,5	1238Ac	1325Bb	1327Ab	1285Ac	1320Bb	1425ABa	1394Ca
	5	1491Aa	1503Aa	1566Aa	1541Aa	1517Aa	1418Aa	1510Ca
	10	1826Aab	1840Aab	1992Aa	2023Aa	1675Bb	1736Cab	1882Bab
	15	3012Aa	3239Aa	3193Aa	3191Aa	2498Bb	3129Ba	2738Ac
37° C	0	1053Ad	1385Ac	1421Bc	1706Ab	1570Ac	1924Bb	2756Ba
	2,5	1238Ab	1376Ba	1435Aa	1373Aa	1450Aa	1472Aa	1446Ca
	5	1491Aab	1512Aab	1624Aa	1514Aab	1507Aab	1470Ab	1573Ca
	10	1826Ab	1959Aab	2139Aa	1868Ab	1816Ab	1821Bb	1973Ca
	15	3012Aab	3314Aa	3300Aab	2749Ac	3216Aab	3008Bab	3549Aa
45° C	0	1053Ac	1425Ab	1479Ab	1566Bb	1499Ab	2909Aa	-
	2,5	1238Ac	1441Ab	1343Ab	1320Abc	1296Cbc	1329Bbc	1186Cd
	5	1491Aa	1552Aa	1610Aa	1482Aa	1503Aa	1529Aa	1790Ba
	10	1826Abc	1980Ab	1903Abc	2036Aa	1858Abc	2100Aa	1818Bbc
	15	3012Aa	3057Aa	2890Bab	2802Aa	2438Bb	3353Aa	2110Ac

*Letras minúsculas diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade entre as concentrações de óleo de café na mesma temperatura de estudo (entre colunas) e letras maiúsculas diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade entre os períodos de armazenamento (entre linhas) (amostras em triplicata).

Figura 6. Viscosidade aparente das formulações a base de *R contendo 0; 2,5; 5; 10 e 15% de óleo de café em função do período a 25° C (média de 3 repetições).

Quando se observa a viscosidade aparente ao longo de 90 dias de estudo das formulações armazenadas a 45° C evidencia-se, mais uma vez, a maior estabilidade das formulações obtidas com esta cera autoemulsionante, principalmente, nas formulações que continham de 2,5 a 10% de óleo de café (Figura 7).

Figura 7. Viscosidade aparente das formulações a base de *R contendo 0; 2,5; 5; 10 e 15% de óleo de café em função do período a 45° C (média de 3 repetições).

As formulações a base de *U apresentam pouca diferença entre as viscosidades aparentes tanto no decorrer do tempo de armazenamento quanto em temperaturas de armazenamento diferentes.

No entanto pode se observar um aumento da viscosidade a partir de 7 dias para as formulações mantidas a 25° C, enquanto que, pode se observar uma forte queda de viscosidade para as formulações mantidas a 45° C (Figura 8 e 9).

Figura 8. Viscosidade aparente das formulações a base de *U contendo 0 (U0), 2,5 (U2), 5 (U5), 10 (U10) e 15% (U15) de óleo de café em função do período a 25° C (média de 3 repetições).

Figura 9. Viscosidade aparente das formulações a base de *U contendo 0 (U0), 2,5 (U2), 5 (U5), 10 (U10) e 15% (U15) de óleo de café em função do período a 45° C (média de 3 repetições).

Pelas Figuras 10 e 11, pode se perceber que as formulações a base de *R apresentam áreas de histerese bastante semelhantes no tempo inicial e após 90 dias de armazenamento a 25° C. No entanto, aos 90 dias de armazenamento a 45° C observa-se um aumento da área de histerese da formulação sem óleo de café.

10a)

10b)

11a)

11b)

Figuras 10 e 11. Tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para as formulações a base de *R contendo 0 ; 2,5; 5; 10 e 15% armazenadas a 25° (10a e 10b) e 45° C (11a e 11b) no tempo inicial de armazenamento (a) e após 90 dias de armazenamento (b).

As formulações a base de *C também mostraram um aumento da área de histerese após 90 dias de armazenamento a 45° C, como pode se observar pela Figura 12b.

12a)

12b)

13a)

13b)

Figuras 12 e 13. Tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para as formulações a base de *C contendo 0; 2,5; 5,0; 10,0 e 15% armazenadas a 25° (12a e 12b) e 45° C (13a e 13b) no tempo inicial de armazenamento (a) e após 90 dias de armazenamento (b).

As formulações a base de *U mostraram desde as primeiras medidas de comportamento reológico uma área de histerese maior que se manteve durante o período em que essas formulações foram estáveis, ou seja, 28 dias (Figura 14).

Figuras 14. Tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para as formulações a base de *U contendo 0; 2,5; 5,0; 10,0 e 15% armazenadas a 25° após 28 dias de armazenamento.

5.6. Avaliação da presença de cristais líquidos

Todas as formulações de estudo, mesmo aquelas que não continham óleo de café, apresentaram cristais líquidos nos tempos inicial e 90 dias após armazenamento a temperatura ambiente como pode se observar pela Figura 15.

Figura 15. Fotos obtidas por microscopia de luz polarizada mostrando a presença de cristais líquidos nas formulações sem óleo de café a base das 3 ceras autoemulsionantes: *C (A e B), *R (C e D) e *U (E e F) nos períodos inicial de estudo e após 90 dias de armazenamento a temperatura ambiente.

5.7. Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante do óleo de café e das formulações contendo concentrações crescentes deste óleo foi avaliada usando o método do DPPH. Os resultados obtidos para o óleo de café podem ser observados pela Figura 17. A atividade antioxidante deste óleo ($IC_{50} = 7,14 \text{ mg/mL}$) foi bastante inferior à do antioxidante sintético BHT ($IC_{50} = 4,40 \text{ } \mu\text{g/mL}$), obtida nas mesmas condições experimentais.

Figura 16. Curva dose-resposta do óleo de café para atividade antioxidante pelo método do DPPH.

Figura 17. Curva dose-resposta do BHT para atividade antioxidante pelo método do DPPH.

As formulações contendo óleo de café também demonstraram atividades antioxidantes baixas (Figura 17), apesar de serem mais eficazes que o óleo de café puro. Os resultados obtidos mostram que o aumento da concentração de óleo de café nas formulações aumenta a atividade antioxidante.

Figura 18. Inibição do DPPH (%) de acordo com as formulações contendo crescente concentração de óleo de café. (F2 – formulação contendo 2,5% de óleo de café, F5 - formulação com 5% de óleo de café, F10 – formulação com 10% de óleo de café e F15 – formulação contendo do 15% de óleo de café).

5.8. Avaliação da atividade antimicrobiana

O diâmetro da zona de inibição das formulações, do óleo de café e dos antibióticos padrão (controle positivo) é apresentada na Tabela 11. Para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *P. acnes* vancomicina (1 mg / mL) foi utilizada como controle positivo. Por *E. coli* e *P. aeruginosa*, a norfloxacin (1 mg / mL) foi utilizado. Anfotericina B (10 µL / mL) foi utilizado para a *C. albicans*.

Tabela 11. Efeitos antimicrobianos para cada tratamento, amostra 20 mg/mL (n=3).

Óleo e Formulações			
		+ Controle	- Controle
<i>S. aureus</i>	5	21	5
<i>S. epidermidis</i>	5	22	5
<i>P. acnes</i>	5	47	5
<i>B. subtilis</i>	5	27	5
<i>E. coli</i>	5	49	5
<i>P. aeruginosa</i>	5	40	5
<i>C. albicans</i>	5	27	5

5.9. Determinação do FPS “in vitro” por espectrofotometria UV/visível

As formulações desenvolvidas foram avaliadas quanto ao seu potencial fotoprotetor em comparação com uma formulação contendo filtro hidrossolúvel UVA-B em concentração suficiente para obter um fator de proteção solar 15.

Deste modo, pôde se observar que houve um aumento significativo na área sob a curva quando às formulações desenvolvidas continham concentrações crescentes de óleo de café indicando um aumento no potencial de fotoproteção das mesmas (Tabela 12).

Tabela 12. Formulações desenvolvidas e suas respectivas integrais das curvas de absorbância.

Concentração de óleo de café na formulação (%)	Concentração de filtro UVA-B na formulação (%)	Média da integral das curvas – *C	Média da integral das curvas – *U
0	0	0,1862Ae	0,2243Ag
	7,5	4,5124Bb	5,8692Ac
2,5	0	0,2968A	0,4650Ag
	7,5	4,7883Bb	7,0171Ab
5	0	1,2521Ad	1,2441Af
	7,5	6,4048Ba	7,5511Aa
10	0	1,5020Ad	1,6362Ae
15	0	2,3477Ac	2,8425Ad

* Letras minúsculas diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade entre as formulações desenvolvidas com a mesma cera autoemulsionante (entre linhas) e letras maiúsculas diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade entre as formulações desenvolvidas com a mesma concentração de ativos utilizando diferentes ceras autoemulsionantes (entre colunas) (amostras em triplicata).

Pelas Figuras 18a e 18b pode se observar o aumento da área sob a curva obtida utilizando-se o método “in vitro” descrito neste estudo. Por meio destas figuras, fica evidente que a aplicação do óleo de café pode aumentar significativamente o potencial fotoprotetor de formulações cosméticas.

Figura 29. Curvas de absorvância das formulações desenvolvidas com *C (a) e *U (b) - F0 (formulação contendo somente filtro hidrossolúvel UVA-B), F2 (formulação contendo filtro hidrossolúvel UVA-B e 2,5% de óleo de café), F5 (formulação contendo filtro hidrossolúvel UVA-B e 5% de óleo de café), 0 (formulação veículo – sem óleo de café ou filtro hidrossolúvel UVA-B), 2 (formulação contendo 2,5% de óleo de café), 5 (formulação contendo 5% de óleo de café), 10 (formulação contendo 10% de óleo de café) e 15 (formulação contendo 15% de óleo de café).

Na Tabela 13 pode se observar o fator de proteção calculado pelo método “in vitro” utilizado neste estudo para as formulações contendo óleo de café e para as formulações contendo além de óleo de café filtro hidrossolúvel UVA-B.

Ressalta-se de filtro hidrossolúvel utilizada nas formulações é a recomendada pelo fabricante para se obter um FPS 15. Acredita-se então, que o método proposto além de favorecer erros experimentais na preparação das soluções não seja suficientemente exato.

Tabela 13. Fator de proteção solar calculado pelo método de MANSUR et al. (1986) para as formulações de estudo.

Cera autoemulsionante	Concentração de óleo de café	FPS calculado
*C	0	0,040
	2,5	0,042
	5	0,224
	10	0,303
	15	0,628
	F0	1,318
	F2	1,378
	F5	1,704
*U	0	0,037
	2,5	0,104
	5	0,219
	10	0,361
	15	0,627
	F0	1,626
	F2	1,914
	F5	2,040

* A letra F na frente da concentração de óleo de café designa as formulações contendo o filtro hidrossolúvel UVA-B na concentração de 7,5%.

5.10. Determinação do FPS “in vitro” por espectrofotometria de refletância difusa com esfera integrada

Pela Tabela 14 pode-se observar o FPS encontrado para as formulações de estudo pelo método de espectrofotometria de refletância com esfera integrada.

Tabela 14. FPS obtido de acordo com a concentração de óleo de café e de filtro 2-phenyl- 1H- benzimidazole- 5- sulphonic acid + benzophenone-4 utilizando método de espectrofotométrico de refletância com esfera integrada.

Concentração de óleo de café na formulação (%)	Concentração de filtro na formulação (%)	Formulação em creme a base de *C	Formulação em creme a base de *R	Formulação em creme a base de *U
0	0	1,08 Ag	1,04 Ae	1,13 b
	7,5	4,64 Bc	10,36 Aa	-
2,5	0	1,26 Af	1,28 Ad	1,48 b
	7,5	6,47 Bb	12,31 Aa	-
5	0	1,44 Ae	1,65 Acd	1,64a
	7,5	7,21Ba	12,03 Aa	-
10	0	1,64 Ab	1,75 Ac	1,86a
15	0	2,07 Ad	2,14 Ab	2,11a

*Letras minúsculas diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade entre as formulações desenvolvidas com a mesma cera autoemulsionante (entre linhas) e letras maiúsculas diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade entre as formulações desenvolvidas com a mesma concentração de ativos utilizando diferentes ceras autoemulsionantes (entre colunas) (amostras em triplicata).

5.11. Avaliação da proteção da pele de camundongos contra radiação ultravioleta

Os valores do índice de eritema médio (IE) para cada tratamento entre as áreas irradiadas e não irradiadas diferem significativamente sendo que, como era esperado, o IE é maior para as áreas irradiadas (Tabela 15). No entanto, quando são comparados os valores de IE somente entre as áreas irradiadas, observa-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos (Figura 20).

Figura 20. Índice de eritema médio para os tratamentos de estudo obtido nas regiões irradiadas. Letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5%. (F0 – formulação sem de óleo de café, F5 - formulação com 5% de óleo de café, F10 – formulação com 10% de óleo de café e F5F – formulação contendo do 5% de óleo de café + 7,5% de filtro hidrossolúvel).

Tabela 15. Índice de eritema médio das regiões irradiada e não irradiadas.

Formulações	Índice de eritema	
	Irradiada	Não irradiada
Controle	599 ± 14 A	574 ± 14 B*
F0	602 ± 20 A	582 ± 14 B**
F5	592 ± 20 A	579 ± 7 B*
F5F	607 ± 17 A	598 ± 19 B**
F10	592 ± 11 A	579 ± 6 B**

Letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% (*) e 1% (**) de probabilidade entre as áreas irradiadas ou não das formulações aplicadas (entre linhas). (F0 – formulação sem de óleo de café, F5 - formulação com 5% de óleo de café, F10 – formulação com 10% de óleo de café e F5F – formulação contendo do 5% de óleo de café + 7,5% de filtro hidrossolúvel).

Quando se compara a perda transepidérmica de água entre as regiões irradiada ou não, pode se observar um aumento significativo deste parâmetro para as regiões irradiadas (Tabela 15). No entanto, pela Figura 21 pode se observar que os valores de perda transepidérmica de água somente entre as regiões irradiadas que foram tratadas com formulações contendo óleo

de café apresentaram valores significativamente menores para este parâmetro, destacando-se a formulação contendo 5% de óleo.

Figura 21. Perda de água transepidermica para os tratamentos de estudo obtida nas regiões irradiadas. Letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5%. (F0 – formulação sem de óleo de café, F5 - formulação com 5% de óleo de café, F10 – formulação com 10% de óleo de café e F5F – formulação contendo do 5% de óleo de café + 7,5% de filtro hidrossolúvel).

Tabela 16. Perda transepidermica de água média das regiões irradiada e não irradiadas.

Perda transepidermica de água (g.cm ² /h)		
Formulações	Irradiada	Não irradiada
Controle	9,7 ± 2,7 A	8,6 ± 2,3 B
F0	9,0 ± 2,5 A	3,6 ± 1,4 B**
F5	5,9 ± 1,7 A	3,5 ± 0,8 B*
F5F	8,0 ± 1,9 A	5,2 ± 1,0 B**
F10	8,0 ± 1,4 A	4,1 ± 2,3 B**

Letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% (*) e 1% (**) de probabilidade entre as áreas irradiadas ou não das formulações aplicadas (entre linhas). (F0 – formulação sem de óleo de café, F5 - formulação com 5% de óleo de café, F10 – formulação com 10% de óleo de café e F5F – formulação contendo do 5% de óleo de café + 7,5% de filtro hidrossolúvel).

A contagem de células de queimadura solar mostrou que a melhor formulação foi a formulação contendo filtro hidrossolúvel em associação com 5% de óleo de café. No entanto, esta não diferiu significativamente da formulação contendo 10% de óleo de café (Figura 22).

Figura 22. Número de células de queimadura solar para os tratamentos de estudo obtida nas regiões irradiadas. Letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5%. (F0 – formulação sem de óleo de café, F5% - formulação com 5% de óleo de café, F10 – formulação com 10% de óleo de café e F5F – formulação contendo do 5% de óleo de café + 7,5% de filtro hidrossolúvel).

Tabela 17. Número médio de células de queimadura solar das regiões irradiada e não irradiadas.

Número de células de queimadura solar		
Formulações	Irradiada	Não irradiada
Controle	28,2 ± 8,3 A	1,5 ± 1,1 B**
F0	12,8 ± 5,4 A	2,2 ± 2,1 B**
F5	14,7 ± 8,8 A	2,4 ± 1,8 B**
F5F	5,9 ± 4,8 A	1,3 ± 1,7 B*
F10	9,0 ± 3,9 A	1,3 ± 1,1 B**

Letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% (*) e 1% (**) de probabilidade entre as áreas irradiadas ou não das formulações aplicadas (entre linhas). (F0 – formulação sem de óleo de café, F5% - formulação com 5% de óleo de café, F10 – formulação com 10% de óleo de café e F5F – formulação contendo 5% de óleo de café + 7,5% de filtro hidrossolúvel).

Além disso, as peles dos animais sem aplicação de formulação apresentaram desestruturação da derme, epiderme fina, queratinócitos com núcleo picnótico e, em alguns casos, ausência de estrato córneo (Figura 23).

Figura 23. Foto de microscopia eletrônica mostrando características típicas da pele irradiada desprotegida (controle) como: células apoptóticas (a), derme desestruturada (b) e ausência de estrato córneo (c).

Por outro lado, as peles dos animais tratadas com formulação contendo filtro hidrossolúvel + 5% de óleo de café ou formulação contendo 10% deste mesmo óleo apresentaram menor número de células em apoptose e epiderme mais delgada (Figura 24).

Figura 24. Foto de microscopia eletrônica mostrando características da pele irradiada protegida com formulação contendo filtro hidrossolúvel + 5% de óleo de café como: pequeno número de células apoptóticas (a), derme estruturada (b) e epiderme mais espessa (c).

Figura 25. Foto de microscopia eletrônica mostrando características da pele irradiada protegida com formulação contendo 10% de óleo de café como: pequeno número de células apoptóticas (a), derme estruturada (b) e epiderme mais espessa (c).

5.12. Quantificação do composto responsável pela absorção da radiação UVB

Utilizando método CLAE proposto por DIAS et al. (2010) foi quantificado o composto caveol (MAIA et al., 2011) na formulação contendo 15% de óleo de café pela equação da reta obtida em função da concentração da substância padrão solubilizada em metanol de acordo com a Figura 26.

Figura 26. Curva padrão da concentração do caveol.

5.13. Letalidade em *Artemia salina*

Os resultados do ensaio de *Artemia salina* são mostrados podem ser observados pela Figura 27.

Figura 27. Curva dose-resposta para cada formulação em termos de letalidade avaliada pelo ensaio com *Artemia salina*. Letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. (F2 – formulação contendo 2,5% óleo de café, F5- formulação com 5% de óleo de café, F10 – formulação com 10% de óleo de café e F15 – formulação contendo 15% de óleo de café).

A taxa de letalidade do óleo de café foi maior do que o das formulações cosméticas. A formulação contendo 2,5% de óleo apresentou a menor letalidade. No entanto, as outras formulações não foram estatisticamente diferentes em termos de letalidade.

Além disso, uma vez que foi utilizado DMSO como veículo, a letalidade deste solvente foi também avaliada. DMSO foi tóxico para concentrações acima de 1%, sendo o valor de LC50 de 4,5%. Portanto, não podemos desconsiderar a contribuição de DMSO para a toxicidade observada para as amostras com concentrações finais $\geq 100 \mu\text{g} / \text{mL}$.

5.14. Cultura celular

A citotoxicidade do óleo de café e formulações também foi avaliada em culturas de células HaCat (Figura 28 e 29), utilizando o método de MTT. Nem o óleo de café puro nem as

formulações mostraram efeitos citotóxicos até 100 µg/mL (24 h de incubação), conforme representado nas Figuras 28 e 29.

Figura 28. Cultura de queratinócitos antes da realização do experimento.

Figura 29. Coloração das células pelo MTT mostrando alta viabilidade celular.

Figura 30. Curva dose-resposta para cada formulação em termos de viabilidade celular avaliada pelo método de MTT. F2, formulação contendo 2,5% de óleo de café, F5, formulação contendo 5%, F10, formulação contendo 10%, F15, formulação contendo 15%.

5.15. Avaliação da segurança da aplicação tópica das formulações

Vários métodos de biofísica da pele foram empregadas no estudo “in vivo” para avaliar o os efeitos da aplicação de formulações contendo ou não óleo de café durante 3 dias consecutivos.

Medições com Mexameter não detectaram qualquer aumento da vermelhidão da pele, o que indica que a aplicação repetida das formulações não causaram eritema, uma vez que resultados observados no primeiro dia do estudo foram mantidos durante os 3 dias de aplicação das formulações.

A perda de água transepidérmica diminuiu significativamente quando a região do antebraço foi tratado com a formulação contendo óleo café. Isto indica que o óleo não afetou, pelo contrário, melhorou a função de barreira da pele. O conteúdo aquoso do estrato córneo mostrou uma redução significativa apenas quando não foram aplicadas as formulações de estudo (região controle).

Figura 31. Média e desvio padrão das medidas de perda de água transepidermica ($\text{g/m}^2\text{h}$) de cada tratamento durante 3 dias consecutivos - controle, sem qualquer formulação, F0 - formulação sem óleo de café e F15 - formulação contendo 15% de óleo de café. (0, 24 e 48 horas após a aplicação das formulações). Letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 32. Média e desvio padrão das medidas do conteúdo aquoso do estrato córneo (u.a.) durante 3 dias consecutivos para cada tratamento: controle, sem qualquer formulação; F0 - formulação sem óleo de café e F15 - formulação contendo 15% de óleo de café. (0, 24 e 48 horas após a aplicação das formulações).

Figura 33. Média e desvio padrão das medidas do índice de eritema (u.a.) durante 3 dias consecutivos para cada tratamento: controle, sem qualquer formulação; F0 - formulação sem óleo de café e F15 - formulação contendo 15% de óleo de café. (0, 24 e 48 horas após a aplicação das formulações).

5.16. Avaliação da compatibilidade cutânea

A avaliação da compatibilidade cutânea foi realizada utilizando um adesivo oclusivo (Figura 34 e 35). Não foi possível verificar qualquer nível vermelhidão em qualquer região e os voluntários não notaram qualquer desconforto sobre a aplicação local. Estes resultados indicam que as formulações não causaram nenhum eritema ou reação adversa (Figura 36).

Figura 34. Adesivo contendo as formulações de estudo.

Figura 35. Adesivo aplicado nas costas de voluntária.

Figura 36. Local de aplicação das formulações imediatamente após retirada do adesivo.

5.17. Avaliação das propriedades sensoriais

Para avaliação das propriedades sensoriais das formulações cosméticas desenvolvidas foi um questionário do tipo “CATA” *Check-all- that- apply*. As voluntárias deveriam marcar somente as características percebidas durante a aplicação e após 5 minutos da aplicação.

O mesmo questionário foi aplicado para voluntárias em Ribeirão Preto, SP, Brasil e em Lisboa, Portugal visando avaliar a percepção e aceitação das propriedades sensoriais em dois países com cultura e clima muito diferentes.

Figura 37. Percepção das voluntárias brasileiras durante a aplicação das formulações (% do total de voluntárias). F0 – formulação sem óleo de café e F15 – formulação contendo 15% de óleo de café.

Figura 38. Percepção das voluntárias portuguesas durante a aplicação das formulações (% do total de voluntárias). F0 – formulação sem óleo de café e F15 – formulação contendo 15% de óleo de café.

Figura 39. Percepção das voluntárias brasileiras dos efeitos na pele logo após a aplicação das formulações (% do total de voluntárias). F0 – formulação sem óleo de café e F15 – formulação contendo 15% de óleo de café.

Figura 40. Percepção das voluntárias portuguesas dos efeitos na pele logo após a aplicação das formulações (% do total de voluntárias). F0 – formulação sem óleo de café e F15 – formulação contendo 15% de óleo de café.

Figura 41. Percepção das voluntárias brasileiras durante a aplicação das formulações (% do total de voluntárias). F0 - formulação sem óleo de café, F2 – formulação contendo 2,5% de óleo, F5 - formulação contendo 5% de óleo, F10 - formulação contendo 10% de óleo e F15 - formulação contendo 15% de óleo de café.

Figura 42. Percepção das voluntárias brasileiras dos efeitos na pele logo após a aplicação das formulações (% do total de voluntárias). F0 - formulação sem óleo de café, F2 – formulação contendo 2,5% de óleo, F5 - formulação contendo 5% de óleo, F10 - formulação contendo 10% de óleo e F15 - formulação contendo 15% de óleo de café.

6. Discussão

O óleo de café apresenta propriedades cosméticas consideradas de grande importância para os consumidores como emoliência e hidratação da pele. Ademais, o óleo de café adicionado às formulações cosméticas pode aumentar o potencial fotoprotetor destas. Nesse sentido, o presente trabalho, além de estudar a estabilidade, eficácia, segurança e sensorial das formulações desenvolvidas, contempla uma avaliação das propriedades bioativas do óleo de café.

Dentre as propriedades bioativas dos óleos vegetais, destacam-se a atividade antioxidante e antimicrobiana, as quais poderiam contribuir para a redução de antioxidantes e conservantes nas formulações. O óleo de café, avaliado no presente estudo, utilizando o método de DPPH, não mostrou expressivo potencial antioxidante e antimicrobiano.

ANDRADE et al. (2012) avaliaram a composição química e a atividade antioxidante do extrato da borra e da casca do café obtido por CO₂ supercrítico. O potencial antioxidante avaliado pelo método do DPPH por estes autores mostrou IC₅₀ variando de 235,1 até 21298,1 µg/mL para o extrato da casca de café de acordo com o processo e solventes utilizados. Para a borra de café, os valores de IC₅₀ obtidos variaram 202, 23 a 2369, 5 µg/mL.

No presente trabalho, óleo de café mostrou IC₅₀ = 7,14 mg/mL enquanto que o BHT nas mesmas condições de estudo, mostrou IC₅₀ = 4,40 µg/mL, ou seja, aproximadamente 1600 vezes menor (Figuras 16 e 17), indicando que, para este radical nas condições de estudo, o óleo de café não apresenta muito baixa atividade antioxidante (WAGEMAKER et al., 2012).

No entanto, o aumento da concentração de óleo de café nas formulações foi diretamente proporcional ao aumento do potencial antioxidante destas (Figura 18) sugerindo uma possível sinergia do baixo potencial antioxidante deste óleo com os antioxidantes comumente adicionados em formulações cosméticas e, deste modo, o potencial antioxidante da formulação poderia ser aumentado com a adição do óleo de café.

É preciso salientar que existem muitas formas de se avaliar a atividade antioxidante de um ativo e que o método de DPPH foi escolhido por ser o mais utilizado na literatura (CASTELO-BRANCO e TORRES, 2011) e por ser prático, rápido e de baixo custo.

Em relação às propriedades bioativas, o óleo de café apresenta ainda como compostos majoritários de sua fração insaponificável o cafestol e o caveol. De acordo com PACETTI et

al. (2012), eles representam de 39,6 a 52,1% e 25,6 a 38,4% respectivamente. Tais substâncias são alvo de pedidos de patente por suas propriedades de aumento do colágeno, elastina e aquaporinas (PEREDA et al., 2009) e pela absorção da radiação UVB (MAIA et al., 2011).

Desse modo, o presente trabalho quantificou por método CLAE (DIAS et al., 2010) o caveol presente na formulação contendo 15% de óleo de café sendo a concentração desse ativo aproximadamente igual a 8 µg/mL (Figura 26). Tal concentração pode ser considerada atóxica, pois, estudos conduzidos por LEE e JEONG (2007) concluíram que o caveol é desprovido de considerável toxicidade mesmo em alta concentração 10 µM (3,14 mg/mL).

Uma vez que o óleo de café, segundo nosso conhecimento, não apresenta outra substância capaz de absorver a radiação UVB, pode se considerar que esta baixa concentração do ativo seja responsável pela atividade fotoprotetora do óleo com FPS ~ 3 (WAGEMAKER et al., 2011). Deste modo, a substância em questão apresenta grande potencial como ativo fotoprotetor e deve ser melhor estudada.

O óleo de café possui propriedades sinérgicas fazendo com que este, quando aplicado em formulações cosméticas possa, atender aos anseios dos consumidores de formulações cosméticas cada vez mais sofisticadas que unem características multifuncionais de proteção e cuidado da pele, emoliência e hidratação, além de proteção contra os efeitos negativos da radiação solar.

Propriedades sinérgicas da aplicação de extratos vegetais em formulações cosméticas também foram encontradas por um trabalho realizado por nosso grupo de estudos, onde a formulação contendo extrato de camomila mostrou melhores resultados nos experimentos de biofísica e imagem da pele do que a formulação contendo seu ativo antioxidante isoladamente, a apigenina (NÓBREGA, 2011).

O desenvolvimento de formulações que forneçam aos consumidores as citadas propriedades cosméticas do óleo de café, levando em consideração a segurança da aplicação e características sensoriais desejáveis foi objeto de estudo do presente trabalho.

Neste, foram desenvolvidas formulações cosméticas estáveis, seguras e eficazes utilizando tensoativos não-iônicos e conservante livre de parabenos (Tabelas 1, 2 e 3).

De acordo com LÓDEN (2005), os efeitos dos tensoativos nas propriedades da barreira lipídica cutânea ainda não foram bem descritos mas, segundo os mesmos autores, os tensoativos não-iônicos são, no geral, menos irritantes do que os iônicos. Deste modo, optou-se por ceras autoemulsionantes cujos tensoativos são não iônicos.

Ainda segundo LÓDEN (2005), o conservante ideal deve apresentar um vasto espectro de atividade, deve ser seguro, estável e não deve afetar as propriedades físicas do produto

cosmético. Devido à consideração destas características e por este não apresentar parabenos em sua composição, optou-se pelo conservante Cosmoguard[®].

Após o desenvolvimento das formulações, estas necessitam passar por estudos de estabilidade preliminar, os quais consistem na realização dos testes da fase inicial do desenvolvimento do produto como avaliação do pH (Tabelas 5 e 6), centrifugação e submissão a estresse térmico durante curtos períodos de tempo.

Nestes testes empregam-se condições extremas de temperatura com objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais, que devem ser observados e analisados conforme as características de cada tipo de produto. Pelas condições em que é conduzido, o estudo não tem finalidade de estimar a vida útil do produto, mas auxiliar a triagem das formulações (BRASIL, 2010).

Segundo ANCHISI et al. (2001), a adição de extratos vegetais não pode comprometer a estrutura das formulações a qual é assegurada pela estabilidade após a centrifugação e por testes de estabilidade acelerada durante 6 meses após sua preparação.

De acordo com FERRARI (2002), o pH é um parâmetro muito significativo, pois uma alteração significativa de seu valor pode sugerir modificações químicas dos componentes presentes na formulação. Além disso, por conter grande proporção de lipídios cujos maiores expoentes são ácido graxos de cadeia insaturada, a mudança de pH pode ser um sinal de peroxidação lipídica. Alterações de pH consideráveis somente foram observadas para as formulações contendo Farmal (Tabela 5).

Segundo CHORILI, LEONARDI e SALGADO (2007), a peroxidação lipídica constitui a principal causa de deterioração dos lipídios e substâncias graxas. Afastados do seu contexto de proteção natural, tais substâncias sofrem, no decurso de processos de transformação e armazenamento, alterações do tipo oxidativo, as quais têm como principal consequência modificação da cor original e o aparecimento de odores e gostos característicos de ranço. Além desses problemas, SILVA et al. (1999) citam a quebra da viscosidade e irritações do tecido epidérmico.

Para evitar a peroxidação lipídica são utilizados antioxidantes. Segundo CHORILI, LEONARDI e SALGADO (2007) há dois tipos de antioxidantes: os lipofílicos que são aqueles que apresentam maior afinidade pela fase oleosa, como tocoferóis, ácido nordihidroguaiacorrético (NDGA), butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propila e ésteres do ácido ascórbico e os hidrofílicos. Em razão da grande quantidade de lipídios nas formulações, optou-se pelo uso de butilhidroxitolueno.

Os tocoferóis, apesar da possibilidade de sua obtenção ser também de fontes naturais, não foram adicionados às formulações, pois, os mesmos são utilizados em formulações fotoprotetoras com a finalidade de aumentar o FPS destas. Sendo assim, poderiam superestimar o FPS das formulações desenvolvidas neste estudo.

De acordo com BRASIL (2010), a centrifugação é um teste que tem por finalidade aumentar abruptamente a força de gravidade, aumentando a movimentação das partículas, e gerar condição favorável para se observar uma possível instabilidade.

Dentre todas as formulações testadas, somente as formulações a base das ceras autoemulsionantes *C, *R e *U não apresentaram alterações significativas de pH, mudanças nas características organolépticas ou separação de fases. Estas foram então consideradas estáveis e seguiram para a próxima avaliação de estabilidade por meio comportamento reológico.

Durante o período de avaliação do comportamento reológico, as formulações a base de *U, principalmente as que foram armazenadas a 25°C, apresentaram as maiores oscilações na viscosidade aparente. Esta cera é composta de ésteres de polyglyceryl – 3 assim como a cera presente nas formulações avaliadas por LENNON e RODIER (2010). Estes autores também encontraram melhora da estabilidade quando esta foi submetida a altas temperaturas. As mesmas autoras atribuem este aumento da estabilidade a natureza anfifílica dos ésteres de poliglicerila que funcionariam como co-emulsificantes nas formulações o/a (Figura 14).

As ceras autoemulsionantes *C e *R apresentam, segundo os fabricantes, exatamente a mesma composição química, ou seja, álcool cetostearylílico e cetearéth-20. No entanto, as formulações desenvolvidas com estas ceras nas mesmas concentrações apresentaram, para alguns parâmetros, comportamento reológico diferente.

As formulações a base de *C apresentaram menor oscilação para o parâmetro índice de consistência (Tabela 7). Tal fato pode explicar o motivo de algumas farmácias de manipulação, devido ao conhecimento prático, darem preferência para as formulações a base desta cera autoemulsionante, pois, as formulações-veículo a base de *C favoreceriam a manutenção da consistência adequada quando adicionada de extratos vegetais.

O índice de fluxo é um parâmetro utilizado para avaliar a pseudoplastia do sistema emulsionante, sendo que, o valor deste índice varia de 0 a 1. Quanto mais próximo de zero, mais pseudoplástica é a formulação. Para uma formulação cosmética o comportamento não-Newtoniano pseudoplástico é mais adequado visto que a fluidez e a espalhabilidade do produto são necessárias para aplicação tópica. Além de apresentarem índices de fluxo bastante

próximos a zero, o que indica o comportamento pseudoplástico, as formulações de estudo não mostraram grande oscilação para este parâmetro (Tabela 8).

Segundo MILAN et al. (2007), o aumento da viscosidade aparente com o passar do tempo faz com que a formulação apresente dificuldade para fluir de um frasco. Tal fato, no decorrer do prazo de validade do produto poderia resultar numa maior dificuldade de remoção do produto da embalagem. Dentre as formulações avaliadas somente a formulação a base de *R sem óleo de café apresentou este comportamento com aumento considerável da viscosidade aparente após 28 dias de armazenamento a 45° C, o qual impossibilitou a leitura das amostras após 45 dias de armazenamento (Figura 7).

A formulação contendo 5% de óleo de café se mostrou a formulação mais estável a base de *R, pois, não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as viscosidades no decorrer dos 90 dias de estudo mesmo a 45° C (Tabela 10). Tal formulação também se mostrou a mais estável pois não apresentou alteração significativa de viscosidade entre as temperaturas para nenhum dos períodos de armazenamento.

O comportamento reológico de uma formulação deve ser avaliado como um conjunto de resultados que vão permitir ao pesquisador determinar qual a formulação cosmética é mais estável e que apresenta comportamento compatível com a forma de armazenamento, de aplicação sobre a pele, de uso e de finalidade.

De acordo com GASPAR e MAIA CAMPOS (2003), formulações cosméticas com caráter tixotrópico se deformam durante a aplicação na pele facilitando e espalhamento e recuperando a viscosidade inicial quando terminado este processo. As mesmas autoras citam que, entretanto, um valor de tixotropia muito elevado pode fazer com que o produto escorra após a aplicação devido à recuperação muito lenta de sua estrutura. Sendo assim, as formulações a base das ceras autoemulsionantes *C e *R parecem ser as mais indicadas para aplicação na pele (Figuras 10 a 13), pois apresentaram pequena área de histerese em comparação com as formulações a base de *U (Figura 14).

Analisando-se todos os parâmetros que definem o comportamento reológico das formulações desenvolvidas pode se concluir que as formulações a base de cera autoemulsionante composta de cetearyl alcohol + cetareth-20 se mostraram mais estáveis que as formulações a base de polyglyceryl-6-distearate. Tais resultados corroboram a hipótese de que o óleo de café apresenta grande compatibilidade físico-química com o tensoativo cetareth-20 como pôde ser avaliado durante a fase de desenvolvimento de formulações.

Segundo ANDRADE et al. (2007), a presença de cristais líquidos nas formulações pode produzir uma barreira física ao redor dos glóbulos da fase oleosa evitando os processos de

floculação e coalescência. Sendo assim, as formulações contendo cristais líquidos poderiam ser mais estáveis. Desse modo, avaliou-se também a presença de cristais líquidos nas formulações consideradas estáveis.

Todas as formulações apresentaram cristais líquidos (Figura 15). De acordo com ANDRADE et al. (2007), as emulsões que contêm cristais líquidos apresentam aumento da viscosidade em relação ao tempo. Tal comportamento se deve à formação da fase líquida cristalina dentro da fase externa. Tal fenômeno ocorre, de acordo com os mesmos autores, devido à organização da microestrutura da emulsão e à presença da fase líquido cristalina, a qual impede o movimento das gotículas e reduz a ação das forças de van der Waals, que promovem a separação de fases na emulsão.

Como todas as formulações apresentaram cristais após a preparação e 90 dias após armazenamento à temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$) não foi possível correlacionar a viscosidade aparente com a presença de cristais.

Apesar da maior compatibilidade do óleo de café com o tensoativo cetareth-20, deve se ressaltar que a formulação a ser desenvolvida deve apresentar uma otimização entre a estabilidade do comportamento reológico e o potencial fotoprotetor.

Segundo GASPAR e MAIA CAMPOS (2001) as características reológicas podem interferir na proteção solar proporcionada pela formulação cosmética. Estas autoras compararam a tixotropia de três diferentes formulações cosméticas e concluíram que as formulações com maior tixotropia, isto é, maior área de histerese apresentou menor FPS.

Neste estudo também houve uma correlação entre a tixotropia e o FPS das formulações exemplificada pela formulação a base de *C contendo 10% de óleo de café que apresentou maior área de histerese e menor FPS que a formulação a base de *R contendo a mesma concentração de óleo de café.

Para determinar o fator de proteção solar de uma formulação pode se utilizar métodos “in vivo” ou “in vitro”. Os primeiros são realizados em voluntários ou em animais de experimentação, os quais, por motivos éticos, legais e financeiros, tem sido reduzidos quando se trata de experimentos de ativos e formulações cosméticas.

Os testes “in vitro” que podem ser realizados em cultura de células ou mesmo por espectrofotometria, como o método de MANSUR descrito neste estudo, são uma alternativa para a avaliação do potencial fotoprotetor de novos extratos e substâncias vegetais, bem como, de formulações cosméticas contendo estes extratos e/ou substâncias como ativos ou excipientes.

SOUSA (2008) estudou o potencial de fotoproteção de uma formulação cosmética contendo 5 e 10% de um extrato concentrado de *Anacardium occidentale* utilizando método proposto por MANSUR e colaboradores (1986) e concluiu que a aplicação de 10% do referido extrato concentrado de *A. occidentale* aumentou significativamente a capacidade de absorção da radiação ultravioleta UVB e uma emulsão fotoprotetora com FPS 15.

TABRIZI et al. (2003) avaliaram o potencial fotoprotetor de *Rosa damascena* utilizando método espectrofotométrico e concentração de 20 mg de extrato de *R. damascena*, obtido por diversas misturas de solventes, em 100 mL de solução. E concluíram que o extrato hidroalcoólico apresentou maior curva de absorção espectral e, consequentemente, maior potencial de fotoproteção.

Os mesmos autores também avaliaram a estabilidade e o potencial fotoprotetor de uma formulação cosmética acrescida dos extratos de *Rosa damascena* e, concluíram que, apesar do maior potencial de fotoproteção ter sido encontrado na formulação contendo 5% do extrato hidroalcoólico, esta formulação não foi tão estável quanto às demais indicando que é necessária a boa combinação do veículo com o ativo para se obter um produto de qualidade e alta aceitabilidade.

Pelas Figura 19a e 19b pode se observar o aumento da área sob a curva obtida utilizando-se o método “in vitro” descrito neste estudo. Por meio desta figuras, pode se observar que a aplicação do óleo de café pode aumentar significativamente o potencial fotoprotetor de formulações cosméticas.

O filtro hidrossolúvel utilizado nas formulações é recomendado pelo fabricante para se obter um FPS 15 entretanto apresentou valores bem mais baixos (Tabela 13). Acredita-se então, que o método proposto além de favorecer erros experimentais na preparação das soluções não seja suficientemente exato.

Desse modo, visando a obtenção de dados mais consistentes na avaliação do fator de proteção solar das formulações de estudo, estas foram avaliadas por espectrofotometria de refletância difusa com esfera integradora em parceria com o Laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de São Paulo.

Este método, de acordo com DIFFEY et al. (2000), é um dos mais utilizados pela Indústria Cosmética, pois possui baixo custo e é confiável para medição da proteção solar de amplo espectro.

Pela Tabela 14, pode se observar que as formulações contendo óleo de café apresentam muito baixo FPS, mas apresentaram aumento proporcional e significativo estatisticamente de acordo com a concentração de óleo na formulação. Também pode se observar que o FPS

obtido não foi influenciado pela cera autoemulsionante utilizada uma vez que o parâmetro cera não apresentou interação estatística com o parâmetro concentração de óleo de café.

No entanto, apesar de não haver interação significativa do veículo com a concentração do filtro, pode se observar que as formulações a base de *R que continham este filtro apresentaram FPS maior que as formulações a base de *C. Por esse motivo, as formulações a base de *R foram escolhidas para o teste pré-clínico, ou seja, para avaliação da proteção da pele contra radiação solar em animais de experimentação.

Os animais de experimentação foram divididos em grupos e tratados com a aplicação das formulações de estudo durante cinco dias antes de terem a pele do dorso irradiada. Após a irradiação foram avaliados, por métodos de biofísica, o índice de eritema e a perda transepidérmica de água das regiões irradiada e não irradiada.

Baseado nos resultados obtidos que constam das análises de biofísica pode se observar que, quanto ao índice de eritema, não houve diferença significativa entre os grupos de animais que foram tratados com as formulações cosméticas e o controle (Tabela 15), no qual não foi aplicada formulação. Tal fato indica que as formulações desenvolvidas não protegeram a pele dos animais em relação a este parâmetro (Figura 20).

No entanto, pode se observar pela Figura 21 que houve diferença significativa entre os valores médios de perda transepidérmica de água entre os grupos indicando que as formulações que contem óleo de café foram capazes proteger a barreira cutânea dos danos causados pela radiação UVA/B. A formulação contendo 5% de óleo de café foi a que apresentou o melhor resultado devido, provavelmente, a maior estabilidade física desta. Tal resultado mostra a importância do desenvolvimento de formulações estáveis para que estas sejam eficazes.

Pode se observar também o potencial das formulações estudadas na redução da perda transepidérmica de água da pele não irradiada (Tabela 16). Assim, o óleo de café mostrou eficácia na proteção da função barreira cutânea tanto na pele irradiada quanto na não irradiada, benefício este que muitas vezes não é obtido com formulações cosméticas convencionais, como observado no estudo de BENEVENUTO et al. (2010) que irradiaram a pele de camundongos nas mesmas condições do presente estudo e não encontraram resultados positivos na proteção da pele.

Segundo KLIGMAN e KLIGMAN (1986), a resposta cutânea aguda à radiação ultravioleta consiste, basicamente, no eritema ou queimadura solar, a qual se manifesta após 3 a 4 horas de exposição e depende da intensidade (J/m^2 ou W/m^2), da dose (J/m^2) e do comprimento de onda utilizado.

As alterações histológicas em consequência da exposição da pele à radiação UVA são basicamente restritas à derme como presença de infiltrado linfócito, aumento do tamanho das células endoteliais, extravasamento de eritrócitos e redução do número de células de Langerhans (GASPAR, 2001).

Após a exposição à radiação UVB, surgem células de queimadura solar, as quais são queratinócitos com núcleo picnótico e citoplasma eosinofílico. Estas células aparecem primeiramente nas camadas inferiores da epiderme e, após 24 horas se encontram nas partes superiores da epiderme.

Como pôde ser observado pela Tabela 17, todas as formulações apresentaram menor número de células de queimadura solar do que a pele dos animais sem formulação. A formulação sem óleo e a formulação que continha 5% de óleo de café não diferiram significativamente assim como as formulações contendo filtro hidrossolúvel + 5% de óleo de café e a formulação contendo 10% deste mesmo óleo. Tal fato indica o potencial do óleo de café como adjuvante na proteção da pele contra os danos causados pela radiação UVB.

Agentes naturais com potencial antioxidante, anti-inflamatório, antimutagênico, anticarcinogênico, com propriedades imunomodulatórias e que ainda apresentem a habilidade de exercer efeitos inibitórios em diversos processos celulares e moleculares tem ganhado considerável atenção para prevenção de danos causados à pele pela radiação ultravioleta fazendo com que mais e mais produtos contendo ingredientes botânicos para proteção da pele sejam introduzidos no mercado (AFAQ, 2011).

Nesse sentido, mesmo apresentando um baixo fator de proteção solar, as formulações contendo óleo de café mostraram diversos efeitos positivos sobre a pele quando comparadas à formulação sem óleo de café, cujos mecanismos ainda não foram elucidados.

Desse modo, ao compararmos os resultados de perda transepidérmica de água, com os resultados da contagem de células de queimadura solar, podemos observar que o óleo de café presente nas formulações foi capaz de proteger a pele dos animais de experimentação dos danos da radiação ultravioleta uma vez que protegeu a barreira cutânea e reduziu o dano celular que levaria ao processo de apoptose, ou seja, reduziu o número de células de queimadura solar.

Dentre os resultados de perda transepidérmica de água, todas as formulações contendo óleo de café apresentaram resultados significativos em relação ao controle, sendo que a formulação que continha 5% de óleo de café, mostrou efeitos mais pronunciados nesse parâmetro avaliado. De acordo com LOO et al., 2013, o aumento da perda de água transepidérmica indica uma perturbação do estrato córneo e perda de lipídios intercelulares.

PEREDA et al. (2009) avaliaram o efeito da aplicação do óleo de café em diversas concentrações em cultura de fibroblastos humanos e, concluíram que, o óleo de café melhorou o balanço fisiológico da pele além de formar novo tecido conectivo e prevenir o ressecamento da epiderme por meio do aumento dos níveis de aquaporina-3.

No entanto, embora todas as formulações estudadas tenham reduzido o número de células de queimadura solar quando comparadas com o controle, ou seja, com a área da pele que não recebeu nenhuma formulação, somente a formulação contendo a maior concentração de óleo de café e a formulação contendo óleo de café e filtro solar apresentam efeitos significativo nessa redução quando comparada com o veículo.

Assim, esses resultados sugerem que a concentração de 10% de óleo de café proporciona maior proteção da pele, o que poderia reduzir a concentração de filtros orgânicos, o que vem sendo desejável em fotoprotetores de acordo com PEDRIALI et al. (2010).

Além disso, pelas Figuras 23 a 25, pode se observar que as peles dos animais submetidas à radiação ultravioleta e não protegidas pela formulação cosmética apresentaram-se bem características, enquanto que as peles dos animais protegidas pelas formulações contendo filtro hidrossolúvel + 5% de óleo de café ou a formulação contendo 10% de óleo de café apresentaram também características de pele irradiada mas essas características não foram tão acentuadas quanto na pele desprotegida.

A rica composição em ácidos graxos essenciais como o ácido linoleico, a referida atividade antioxidante encontrada na cera e a presença de alta concentração de material insaponificável contendo substâncias com propriedades bioativas ainda em estudo como o cafestol, podem ter contribuído para que o óleo de café presente nas formulações desenvolvidas, mesmo apresentando baixo FPS, fosse capaz de proteger a pele contra os efeitos danosos da radiação solar.

Devido aos resultados controversos entre os valores de fator de proteção solar “in vitro”, os quais foram baixos, à forte evidência de proteção da pele irradiada dos animais de experimentação contra os danos causados pela simulação da radiação solar e, após a avaliação “in vitro” que possibilitou considerar as formulações seguras para aplicação na pele, foi realizado ensaio em voluntários para avaliação do FPS das formulações mais estáveis, ou seja, as desenvolvidas com *R contendo somente filtro hidrossolúvel UVA-B e filtro mais 5% de óleo de café em parceria com a empresa EVIC.

Uma vez que as formulações cosméticas contendo óleo de café desenvolvidas apresentaram resultados promissores quanto a proteção da pele, estas foram avaliadas quanto

a sua toxicidade em ensaios com *A. salina*. Sendo consideradas atóxicas até a concentração de 100 µg/mL (Figura 27).

Em recente trabalho HISEM e colaboradores (2010) compararam os resultados de toxicidade de 63 plantas com os resultados em cultura de células. Eles concluíram que o teste de toxicidade utilizando *A. salina* não deveria ser empregado como único teste para avaliar possíveis riscos a saúde humana. Por este motivo, o presente trabalho avaliou também a toxicidade das formulações e do óleo de café em cultura de células como sugerido pelos autores citados anteriormente. Mais uma vez, o óleo de café e formulações de estudo não apresentaram considerável toxicidade em cultura de queratinócitos (Figura 30). Sendo, portanto, consideradas seguras para aplicação na pele.

Além da estabilidade e eficácia demonstradas pelos ensaios citados anteriormente, foram também realizados ensaios de segurança “in vivo” para avaliar os efeitos diretos da aplicação tópica das formulações. Para isso, as formulações veículo e contendo 15% de óleo de café foram aplicadas durante três dias seguidos na pele de 19 voluntárias (2 mg/cm²).

Após 24 horas da aplicação, o local foi avaliado por técnicas de biofísica quanto à alteração da coloração que poderia indicar a presença de eritema (Figura 33), perda de água transepidermica (Figura 31) e conteúdo aquoso do estrato córneo (Figura 32).

De acordo com DAL'BELO et al. (2006), formulações hidratantes devem atuar por mecanismo oclusivo impedindo a evaporação de água da pele por meio da formação de um filme graxo que previne a perda de água. LOO et al. (2013) salientam que a perda transepidermica de água é um bom indicador de lesões na barreira cutânea.

Pôde se observar (Figuras 31) que, não somente a pele das voluntárias não mostrou alterações significativas que indicassem que houve algum tipo de dano ou desbalanço do manto hidrolipídico, como também, houve uma melhoria das condições da pele com relação à perda de água transepidermica. Este parâmetro foi significativamente reduzido após 24 e 48 horas de aplicação da formulação contendo óleo de café indicando que este óleo poderia proteger a barreira lipídica cutânea.

Além da avaliação por métodos de biofísica, outro grupo de voluntárias foi submetido a teste de compatibilidade cutânea utilizando-se adesivo oclusivo durante 48 horas (Figuras 34 a 36). Mais uma vez, os resultados negativos quanto a reações adversas puderam demonstrar a segurança da aplicação tópica das formulações contendo altas concentrações de óleo de café.

No entanto, os resultados promissores obtidos neste trabalho, não estariam completos se não fossem avaliadas as propriedades sensoriais destas formulações. Desse modo, utilizou-se um questionário do tipo “CATA” para simular a avaliação das formulações por consumidores

durante e após a aplicação que, em comparação com outros tipos de questionários, o “CATA” parece ser mais fácil para o consumidor, menos demorado e é usado com mais naturalidade (ADAMS et al., 2007).

O mesmo questionário (Figura 3) foi aplicado em Lisboa no outono com temperatura ao redor de 10° C e em Ribeirão Preto também no outono com temperatura ao redor de 25° C. Para ambos os grupos de voluntárias ficou evidente o sensorial oleoso e a presença de um filme oleoso após a aplicação da formulação. No entanto, as voluntárias brasileiras tiveram uma percepção maior de oleosidade e pegajosidade principalmente para a formulação sem óleo de café, pois 100% das voluntárias consideraram esta oleosa (Figura 37).

A mesma porcentagem de voluntárias brasileiras que percebeu um resíduo oleoso na pele após a aplicação das formulações contendo 15% de óleo de café também percebeu a presença deste resíduo nas formulações sem óleo de café, indicando que o veículo escolhido poderia não apresentar boa aceitação no mercado cosmético brasileiro. As voluntárias portuguesas, entretanto, não tiveram a mesma percepção, pois, quase todas consideraram que a formulação sem óleo de café não apresentou resíduo oleoso (Figura 38).

De acordo com a percepção das voluntárias portuguesas (Figura 40), a formulação contendo 15% de óleo de café apresentou sensorial oleoso durante e após a aplicação indicando a presença de um filme oleoso que de acordo com PARENTE et al. (2008) forma um efeito protetor sobre a pele e é desejável para produtos cosméticos de cuidado noturno, indicados para pele seca e para países de clima frio.

Tais resultados indicam que as formulações desenvolvidas devem focar atender sempre atender aos anseios do mercado cosmético onde serão lançadas levando em consideração todas as suas peculiaridades.

As voluntárias brasileiras avaliaram ainda as propriedades sensoriais das formulações contendo 2,5; 5 e 10% de óleo de café (Figuras 41 e 42). As formulações contendo óleo de café tiveram uma boa aceitação destas voluntárias, pois, cerca de mais de 50% consideraram as formulações contendo óleo de café suaves, fáceis de espalhar e facilmente absorvidas enquanto que, menos de 40% das voluntárias perceberam pegajosidade e oleosidade nessas formulações (Figura 41).

A percepção dos efeitos na pele após a aplicação das formulações pelas voluntárias brasileiras foi ainda mais positiva, pois, somente 40% das voluntárias relataram a percepção de resíduos na pele, enquanto que, mais de 50% das voluntárias sentiram a pele macia e hidratada (Figura 42).

Cumpra ainda salientar que a formulação contendo 10% de óleo de café com relação aos efeitos na pele foi considerada a melhor formulação segundo a percepção das voluntárias brasileiras, pois, quase todas as voluntárias relataram que sentiram a pele macia e mais 60% delas perceberam a pele hidratada. Além disso, quase nenhuma das voluntárias relataram a percepção de resíduo oleoso ou branco após aplicação desta formulação.

Em síntese, de acordo com os resultados obtidos nos estudos de estabilidade das formulações desenvolvidas, a ausência de toxicidade do óleo e das formulações nas condições de estudo, a percepção de pele macia e hidratada pela maioria das voluntárias após a aplicação das formulações contendo óleo de café, os efeitos benéficos na proteção da barreira cutânea, e) efeitos fotoprotetores de redução da perda transepidermica de água e do número de células de queimadura solar e o aumento do FPS das formulações quando adicionado o óleo de café; o mesmo pode ser considerado um excelente emoliente para proteção da pele e importante ingrediente para elaboração de formulações fotoprotetoras.

Por fim, o presente estudo contribuiu para desenvolver formulações simples contendo altas concentrações de óleo de café, seguras, com propriedades sensoriais aprovadas pela maioria das voluntárias nos dois países de avaliação e eficazes tanto na proteção da pele contra os danos da radiação UV quanto na melhoria da função barreira da pele.

7. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos nas condições de estudo, foi possível concluir que:

- Dentre as formulações avaliadas no presente estudo as formulações a base de álcool cetearílico e cetearete-20 foram as que se mostraram mais estáveis mesmo após 90 dias de armazenamento;
- Dentre as concentrações de óleo de café avaliadas, 5 e 10% de óleo de café foram as que mantiveram maior estabilidade e proporcionaram maior proteção da função barreira da pele nos ensaios pré-clínico “in vivo”;
- As formulações contendo óleo de café apresentaram baixos FPS pelos métodos “in vitro”, porém os experimentos pré-clínicos “in vivo” mostraram menor número de células apoptóticas indicando que o óleo de café poderia proteger a pele dos danos causados pela radiação ultravioleta.
- As formulações selecionadas, quando submetidas a testes “in vitro” de toxicidade e “in vivo” de compatibilidade cutânea, mostraram ser seguras para aplicação tópica.
- As formulações contendo óleo de café foram melhor avaliadas na análise sensorial quando comparadas à formulação sem óleo, principalmente em relação à percepção de pele macia e hidratada após a aplicação das referidas formulações;
- O óleo de se destaca como um ingrediente único para aplicação formulações fotoprotetoras pois, mostrou nas condições do presente estudo, em função da sua rica composição, em função de sua rica composição e, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, apresenta propriedades de grande interesse para a área de Pesquisa & Desenvolvimento de cosméticos tais como: proteção, hidratação, manutenção e melhora da barreira cutânea e aumento significativo das atividades antioxidantes e fotoprotetoras das formulações.

8. Referências

ABD ELMAGGED, Z. Y. et al. Characterization of coordinated immediate responses by p16^{INK4A} and p53 pathways in UVB-irradiated human skin cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, p.175-183, 2009.

ABURJAI, T. e NATSHEH, F. M. Plants used in cosmetics. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 987-1000, 2003.

ADAMS, J.; WILLIAMS, A.; LANCASTER, B.; FOLEY, M. Advantages and uses of check-all-that-apply response compared to traditional scaling of attributes for salt snacks. In **7th Pangborn Sensory Science Symposium**. Minneapolis, USA, 2007.

AFAQ, F. Natural agents: cellular and molecular mechanisms of photoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 508, p. 144-151, 2011.

AHSHAWAT, M. S.; SARAF, S. e SARAF, S. Preparation and characterization of herbal creams for improvement of skin viscoelastic properties. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 30, p. 183-193, 2008.

AMORES, F. P. T. Aprovechamiento de las proteínas de la seda *Bombyx mori* em la preparación de cosméticos y soportes para el crecimiento de tejidos. Tesis (Doutorado). Escuela Politécnica Del Ejército, Sandolqui, 2010, disponível em <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/563>.

ANCHISI, C.; MACCIONI, A. M.; SINICO, C.; VALENTI, D. Stability studies of new cosmetic formulations of vegetable extracts as functional agents. **II Farmaco**, n. 56, p. 427-431, 2001.

ANDRADE, F. F.; SANTOS, O. D. H.; OLIVEIRA, W. P. e ROCHA-FILHO, P. A. Influence of PEG-12 dimethicone addition on stability and formation of emulsions containing liquid crystal. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 29, p. 211-218, 2007.

ANDRADE, K. S. et al. Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. **Talanta**, v. 88, p. 544-552, 2012.

BASTOS, M. L. A. et al. Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 8, n. 16, p. 1-6, 2009.

BECHTOLD, I.H. Cristais líquidos: um sistema complexo de simples aplicação. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 27, n.3, p. 333-342, 2005.

BENEVENUTO, C.G. et al. Influence of the photostabilizer in the photoprotective effects of a formulation containing UV- filters and vitamin A. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, n. 6, p. 1390-1396, 2010.

BISPO, K. C. Measuring the antioxidant potential of an açaí extract. **Cosmetics & Toiletries**, v. 123, n. 8, p. 47-50, 2008.

BRUGGISSER, R. et al. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Medica**, v. 68, n.5, p. 445-448, 2002.

BUSSMANN, R. W. et al. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine of Northern Peru. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 121-140, 2011.

BUSTOS-OBREGON, E. e VARGAS, A. Chronic toxicity bioassay with populations of the crustacean *Artemia salina* exposed to the organophosphate diazinon. **Biological Research**, v. 43, p. 357-362, 2010.

CAMARGO JUNIOR, F. B. Desenvolvimento de formulações cosméticas contendo pantenol e avaliação de seus efeitos na pele humana por bioengenharia cutânea. **Dissertação (Mestrado)**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 152p, 2006.

CARBALLO, J. L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z. L.; PÉREZ, P. e GARCÍA-GRÁVALOS, M. D. A comparison between two brine shrimp assays to detect “in vitro” cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**, v. 2, n. 17, p. 1-5, 2002.

CASTELO-BRANCO, V. N. e TORRES, A. G. Total antioxidant capacity of edible oils: chemical determinants and association with oil quality. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 1, p. 173-187, 2011.

CHANDA, S. e BARAVALIA, Y. Brine shrimp cytotoxicity of *Caesalpinia pulcherrina* aerial parts, antimicrobial activity and characterization of isolated active fractions. **Natural Product Research**, v. 25, n. 20, p. 1955-1964, 2011.

CHIBA, K.; KAWAKAMI, K; TOHYAMA, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. **Toxicology in vitro**, v. 12, p. 251-258, 1998.

CHILLER, K.; SELKIN, B. A.; MURAKAWA, G. J. Skin microflora and bacterial infections of the skin. **Journal of Invesgative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 6, n. 3, p. 170-174, 2001.

CHOMNAWANG, M. T.; SURASSMO, S.; NUKOOLKARN, V. S. e GRITSANAPAN, W. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 330-333, 2005.

CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R.; SALGADO, H. R. N. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 3, p. 113-118, 2007.

CHORILLI, M. et al. Structural characterization and “in vivo” evaluation of retinyl palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, p. 182-188, 2011.

COE, F. G.; PARIKH, D. M. e JOHNSON, C. A. Alkaloid presence and brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay of medicinal species of eastern Nicaragua. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 4, p. 439-445, 2010.

DAL'BELO, S. E. Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e *Ginkgo biloba*. **Tese (Doutorado)**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2008, 178p.

DAL'BELO, S. E.; GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Moisturizing effect of cosmetic formulation containing *Aloe vera* extract in different concentrations assessed by skin bioengineering techniques. **Skin Research and Technology**, v. 12, p. 241-246, 2006.

DIAS, R. C. E. et al. Evaluation of kahweol and cafestol in coffee tissues and roasted coffee by new high-performance liquid chromatography methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 88-93, 2010.

DIFFEY, B.L. et al. “In vitro” assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 43, n.6, p.1024-35, 2000.

DI MAMBRO, V. M. e FONSECA, M. J. V. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 287-295, 2005.

ENGELS, T. e RYBINSKI, W. Liquid crystalline surfactant phases in chemical applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 1313-1320, 1998.

EPSTEIN, H. Cosmeceutical vehicles. **Clinics in Dermatology**, v. 27, p. 453-460, 2009.

FALÉ, P. L. et al. Rosmarinic acid, scutellarein 40-methyl ether 7- O -glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* (“falso boldo”). **Food Chemistry**, v. 114, p. 798-805, 2009.

FARRIS, P. Idebenone, green tea, and Coffeeberry® extract: new and innovative antioxidants. **Dermatologic Therapy**, v. 20, p. 322-329, 2007.

FERNANDES, A. S. et al. Development of pyridine-containing macrocyclic copper (II) complexes: potential role in the redox modulation of oxaliplatin toxicity in human breast cells. **Free Radical Research**, v. 46, n. 9, p. 1157-1166, 2012.

FERRARI, M. Desenvolvimento e avaliação da eficácia fotoprotetora de emulsões múltiplas contendo metoxicinamato de etilexila e óleo de andiroba (*Carapa guyanensis*). **Tese (Doutorado)** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores solares. **Química nova**, v. 30, n. 1, p. 153-158, 2007.

FOLSTAR, P. Lipids In: CLARKE, R.J. & MACRAE, R. (Eds.) Coffee: Chemistry. Londres: **Elsevier Applied Science**, cap.6, p.203-222, 1985.

FOSTER R.H., HARDY G. e ALANY R.G. Borage oil in the treatment of atopic dermatitis. **Nutrition**, v. 26, n. 7-8, p. 719-20, 2010.

GASPAR, L. R. Desenvolvimento de formulações dermocosméticas contendo filtros solares e acetato de tocoferila: avaliação da estabilidade e de seus efeitos protetores no tecido cutâneo. **Dissertação (Mestrado)**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2001, 145p.

GASPAR, L. R. e MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Study of sunscreens by the determination of stability, SPF and skin feeling. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 62, 2001.

GASPAR, L. R. e MAIA CAMPOS P. M. B. G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, p. 35-44, 2003.

GIANETI, M. D.; MERCURIO, D. G.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. The use of green tea extract in cosmetic formulations: not only an antioxidant active ingredient. **Dermatologic Therapy**, 2013.

GILBERT, L.; PICARD, C.; SAVARY, G.; GRISEL, M. Impact of polymers on texture properties of cosmetic emulsions: a methodological approach. **Journal of Sensory Studies**, v. 27, p. 392-402, 2012.

GIOIA, F. e CELLENO, L. The dynamics of transepidermal water loss (TEWL) from hydrated skin. **Skin Research Technology**, v. 8, p.178-186, 2002.

GRICE, E. A.; KONG, H. H.; YOUNG, A. C. et al. A diversity profile of human skin microbiota. **Genome Research**, v. 18, p. 1043-1050, 2008.

GROLLIER, J.F., PLESSIS, S. Use the coffee bean oil as a sun filter. L'oreal. **Patent 4793990 US**, 1988.

HEWITT, J. e DAHMS, G. H. Rheology- its effect on physical SPFs. **Soap Perfumery and Cosmetics**, v. 69, p. 23-25, 1996.

HISEM, D. et al. Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicity to brine shrimp *Artemia salina*. **Toxicon**, v. 57, p. 76-83, 2011.

HWANG, Y. P. e JEONG, H. G. The coffee diterpene kahweol induces heme oxygenase-1 via the P13K and p38/Nrf2 pathway to protect human dopaminergic neurons from 6-hydroxydopamine-derived oxidative stress. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 582, p. 2655-2662, 2008.

KANWAR, A. S. Brine shrimp (*Artemia salina*) - a marine animal for simple and rapid biological assays. **Journal of Chinese Clinical Medicine**, v. 2, n. 4, p. 236-240, 2007.

KELE, M. e OHMACHT, R. Determination of serotonin release from coffee wax by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 730, n. 1-2, p. 59-62, 1996.

KLIGMAN, L. H. e KLIGMAN, A. M. The nature of photoaging: its prevention and repair. **Photodermatology**, v. 3, p. 215-217, 1986.

LEE, K. J. e JEONG, H. G. Protective effects of kahweol and cafestol against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage. **Toxicology Letters**, v. 173, p. 80-87, 2007.

LEHMANN, G.; NEUNHOEFFER, O.; ROSELIUS, W.; VITZTHUM, O. Verfahren zum Schutz von autoxydablen Stoffen. **Patent DE 1668236**, 1972.

LENNON, P. e RODIER, J-D. Improving skin moisturization with polyglycerol-derived plant waxes. **Cosmetic & Toiletries**, v. 125, n. 1, p. 43, 2010.

LÓDEN, M. The clinical benefit of moisturizers. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 19, p. 672-688, 2005.

LOO, C. H. et al. Effect of compositions in nanostructured lipid carriers (NLC) on skin hydration and occlusion. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 13-22, 2013.

MACKIE, B.S. e MACKIE, L.E. The PABA story. **Australian Journal of Dermatology**, v. 40, p. 51-53, 1999.

MAKAI, M. et al. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. **Intenational Journal of Pharmaceutics**, v. 256, p. 95-107, 2003.

MAIA, N. B. ; GUERREIRO FILHO, O. ; CARVALHO, C. R. L. ; WAGEMAKER, T. A. L. Uso da matéria insaponificável extraída do óleo de café e/ou do caveol para fins de proteção contra raios ultravioleta. **Pedido de Patente Instituto Nacional de Propriedade Industrial**, 2011

MANSUR, J.S. et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 61, n. 3, 1986.

MARTIN, A., BUSTAMANTE, P., CHUN A.H.C. Rheology. In : MARTIN, A., BUSTAMANTE, P., CHUN, A.H.C. **Physical Pharmacy**, 4th ed. Philadelphia : LEA e FEBIGER, v. 17, p. 453-473, 1993.

MARTINEZ, I. e LECHA, M. Actualización en fotoprotección. **Revista Internacional de Dermatologia Dermocosmetica**. v. 5, p. 217-220, 2002.

MERCURIO, D. G.; SEGURA, J. H.; DEMETS, M. B. A.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Clinical scoring and instrumental analysis to evaluate skin types. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 38, p. 302-309, 2013.

MILAN, A. L. K.; MILÃO, D.; SOUTO, A. A.; CORTE, T. W. F. Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 649-657, 2007.

MOSHI, M. J. et al. Antimicrobial and brine shrimp toxicity of some plants used in traditional medicine in Bukoba District, north-western Tanzania. **Tanzania Journal of Health Research**, v. 11, n. 1, p. 23-28, 2009.

NÓBREGA, A. T. Desenvolvimento e avaliação da eficácia de formulações cosméticas contendo extrato de camomila ou seus componentes isolados. **Dissertação (Mestrado)**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010, 191p.

NOGUEIRA, D. R.; MITJANS, M.; INFANTE, M. R.; VINARDELL, M. P. Comparative sensitivity of tumor and non-tumor cell lines as a reliable approach for “in vitro” cytotoxicity screening of lysine-based surfactants with potential pharmaceutical applications. **Interntaional Journal of Pharmaceutics**, v. 420, p.51-58, 2008.

NUNES, B. S.; CARVALHO, F. D.; GUILHERMINO, L. M.; STAPPEN, G. V. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**, v.144, p. 453-462, 2006.

OLIVEIRA, D. A. G. C. et al. Protetores solares, radiações e pele. **Cosmetic & Toiletries**, v. 16, p. 68-72, 2004.

PACETTI, D.; BOSELLI, E.; BALZANO, M.; FREGA, N. G. Authentication of italian espresso coffee through the GC peak ratio between kahweol and 16-O-methylcafestol. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1569-1574, 2012.

PALMER, D. M. e KITCHIN, J. S. A double-blind, randomized, controlled clinical trial evaluating the efficacy and tolerance of a novel phenolic antioxidant skin care system containing *Coffea arabica* and concentrated fruit and vegetable extracts. **Journal of Drugs in Dermatology**, v.9, n. 12, p. 1480-1487, 2010a.

PALMER, D. M. e KITCHIN, J. S. Oxidative damage, skin aging, antioxidants and a novel antioxidant rating system. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 9, n. 1, p. 11-15, 2010b.

PARENTE, M. E.; GÁMBARO, A.; ARES, G. Sensory characterization of emollients. **Journal of Sensory Studies**, v. 23, p. 149-161, 2008.

PARENTE, M.E.; ARES, G.; MANZONI, A.V. Application of two consumer profiling techniques to cosmetic emulsions. **Journal of Sensory Studies**, v. 25, p. 685-705, 2010.

PEDRIALI, C.A. et al. Desenvolvimento de fotoprotetores bioativos contendo extato comercial de *Punica granatum* L. **Anais do 24º Congresso Brasileiro de Cosmetologia**, São Paulo, 2010.

PENSÉ-LHÉRITIER, A.M.; KOEHL, L.; LAVARDE, M.; GAGNAIRE, S.; VIE, K. Contribution of the sensorial evaluation of velvet fabric in cosmetic emulsions to the sensorial universe. **Journal of Sensory Studies**, v. 27, p. 365-374, 2012.

PERDE-SCHREPLER, M. et al. Grape seed extract as photochemopreventive agent against UVB-induced skin cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 118, p. 16-21, 2013.

PORTAL EDUCAÇÃO.. Apostila do curso de cosmetologia. www.portaleducacao.com.br (12 de janeiro de 2009).

PRAKASH, L. e MAJEED, M. Navigating the challenges of formulating with naturals. **Cosmetics & Toiletries**, v. 121, n. 3, p. 83-90, 2006.

RAHUA, J-P.; REMES, S. HEINONEN, M. et al. Antimicrobial effects of finish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 3-12, 2000.

RAMOS, M.F.S. et al. Preliminary studies towards utilization of various plant extracts as antisolar agents. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 18, p. 87-101, 1996.

RIBEIRO, R. P. Desenvolvimento e validação da metodologia de análise do teor de filtros solares e determinação do FPS “in vitro” em formulações fotoprotetoras comerciais. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004, 92p.

RIBEIRO, R. P. et al. Avaliação do fator de proteção solar (FPS) “in vitro” de produtos comerciais em fase de desenvolvimento. **Infarma**, v. 16, n. 7-8, p. 85-88.

ROSADO, C.; PINTO, P.; RODRIGUES, L. M. Comparative assessment of the performance of two generations of Tewameter®: TM210 and TM300. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 27, p. 237-241, 2005.

ROSEN, C. F. Topical and systemic photoprotection. **Dermatologic Therapy**, v. 16, p. 8-15, 2003.

SANTA-MARIA, C. et al. Protection against free radicals (UVB irradiation) of a water-soluble enzymatic extract from rice bran. Study using human keratinocyte monolayer and reconstructed human epidermis. In. **Bioactive Dietary Factors and Plant Extracts in Dermatology Nutrition and Health**. Part IV, p. 215-225, 2013.

SANTOS, O. D. H.; MIOTTO, J. V.; MORAIS, J. M. e ROCHA-FILHO, P. A. Attainment of emulsions with liquid crystal from marigold oil using required HLB method. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, p. 243-249, 2005.

SEERAM, N. P.; ADAMS, L. S.; HARDY, M. L.; HEBER, D. Total cranberry extract versus its phytochemical constituents: antiproliferative and synergistic effects against human tumor cell lines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n.9, p. 2512-2517, 2004.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n.1, p. 94-103, 1999.

SILVA, G. M. e MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Histopathological, morphometric and stereological studies of ascorbic acid and magnesium ascorbyl phosphate in a skin care formulation. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 22, p.169-179, 2000.

SOUSA, B. C. *Anacardium occidentale*: Avaliação do efeito fotoprotetor e conservante em preparações cosméticas. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de Pernambuco, 2008, 90p.

SPEER K. e KÖLLING-SPEER I. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, n.1, p. 201-216, 2006.

TABRIZI, H.; MORTAZAVI, S. A.; KAMALINEJAD, M. An “in vitro” evaluation of various *Rosa damascena* flower extracts as a natural antisolar agent. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 25, p. 259-265, 2003.

ULUKAYA, E.; OZDIKICIOGLU, F.; ORAL, A. Y.; DEMIRCI, M. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. **Toxicology in vitro**, v. 22, p. 232-239, 2008.

VELASCO, M. V. R. et al. Associação da rutina com p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação in vitro da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n.1, p. 23-27, 2008.

VELASCO, M. V. R. et al. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (in vitro) – revisão. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 27-34, 2011.

VICIOLE, E.; CASTILHO, P.; ROSADO, C. “In vitro” and “in vivo” assessment of the effect of *Laurus novocanariensis* oil and essential oil in human skin. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 34, n. 6, p. 546-550, 2012.

WAGEMAKER, T.A.L. Variabilidade do teor de óleo, de seu fator de proteção solar e de outros componentes da fração lipídica do gênero *Coffea* visando usos alternativos aos grãos. **Dissertação (Mestrado)**, Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, SP, 95p, 2009.

WAGEMAKER, T. A. L.; CARVALHO, C. R. L.; MAIA, N. B.; GUERREIRO FILHO, O. Sun protection factor, content and composition of lipid fraction of green coffee beans. **Industrial Crops and Products**, v.33, p. 469-473, 2011.

WAGEMAKER, T. A. L. et al. Efeitos fotoprotetores do óleo de café em formulações cosméticas. **Anais do 26º Congresso Brasileiro de Cosmetologia**, São Paulo, Brasil, 2012.

YILMAZ, E. e BORCHERT, H. Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsion on skin hydration, elasticity and erythema – an “in vivo” study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, p.232-238, 2006.

ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 09.1.1212.53.2), intitulado "Aplicação do Óleo de Café em Formulações Cosméticas: avaliação da estabilidade e da eficácia fotoprotetora", de autoria de **Tais Aleriana Lucon Wagemaker** e de **Patrícia Maria B. G. Maia Campos** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do **Campus de Ribeirão Preto – USP** foi aprovado em reunião da CEUA de 18/11/2009.

This is to certify that the work (Protocol number 09.1.1212.53.2), entitled: "Aplicação do Óleo de Café em Formulações Cosméticas: avaliação da estabilidade e da eficácia fotoprotetora", by **Tais Aleriana Lucon Wagemaker** and **Patrícia Maria B. G. Maia Campos**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, November 18, 2009.

Ribeirão Preto, 23 de novembro de 2009.

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

Declaração

Declaramos, para os devidos efeitos, que os ensaios de natureza clínica incluídos no programa experimental do estágio de Doutoramento da aluna Tais Aleriana Lucon Wagemaker, no âmbito de um programa de formação avançada estabelecido pela parceria entre a ABC (Associação Brasileira de Cosmetologia) a SPCC (Soc. Portuguesa de Ciências Cosmetológicas) e a Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, estão de acordo com os princípios do parecer nºA1/2004 de 12 de Março da Comissão de Ética para a Saúde desta Universidade.

Lisboa, 15 de Dezembro de 2012

 Luis Monteiro Rodrigues
 TMSO/PhD e
 Director FCTS, Director CBios

Campo Grande, 376
 1749-024 Lisboa - Portugal