

Universidade Estadual Paulista
“Júlio De Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Determinação da seletividade no sinergismo
entre filtros solares sintéticos e óleo de café
verde**

Beatriz Alves Leone

Orientador: Prof.^a Dr.^a Vera Lucia Borges Isaac

Araraquara

2018

Determinação da seletividade no sinergismo entre filtros solares sintéticos e óleo de café verde

Beatriz Alves Leone

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Vera Lucia Borges Isaac

Araraquara – SP

2018

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

L583d Leone, Beatriz Alves
Determinação da seletividade no sinergismo entre filtros solares sintéticos e óleo de café verde /
Beatriz Alves Leone. – Araraquara, 2018.
107 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências
Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento em Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Vera Lucia Borges Isaac.

1. Fotoproteção. 2. Óleo de café verde. 3. Sinergismo. 4. FPS. I. Isaac, Vera Lucia Borges,
orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Resumo

Filtros solares são substâncias capazes de refletir, espalhar ou absorver a radiação ultravioleta emitida pelo Sol. Alguns filtros podem ter sua capacidade de proteção aumentada pela adição de outros compostos sintéticos ou naturais. Exemplos das substâncias naturais muito utilizadas nas formulações cosméticas são os óleos de origem vegetal, tal como o óleo de café verde, que, além de ser um excelente emoliente, apresenta a capacidade de proteger a pele contra os danos advindos da exposição à radiação solar devido à sua ação antioxidante e fotoprotetora. Este estudo tem como objetivo identificar o mecanismo de interação que possibilita, ao óleo de café verde, aumentar o fator de proteção solar de diferentes filtros solares químicos e físicos, para isso, foram desenvolvidas emulsões com ou sem óleo de café verde, nas quais foram incorporados diferentes filtros para avaliação do fator de proteção solar. O aumento do FPS pode ser observado para benzophenone-3, ethyl hexyl salicylate, bemotrizinol e ethyl hexyl triazone, sendo que o aumento na absorção de radiação ocorreu na mesma faixa de UV que os filtros absorviam sem a adição do óleo de café verde, o que indica possíveis interações intermoleculares entre componentes do óleo de café e os filtros solares. Por meio de cromatografia em coluna de sílica, foram obtidas 13 diferentes frações de óleo de café verde, as quais foram analisadas quanto a sua interação com os filtros usados e posteriormente, identificadas por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Ressonância Magnética Nuclear. As frações consideradas capazes de aumentar o FPS dos filtros eram compostas majoritariamente por cafeína.

Palavras-chave: Fotoproteção. Óleo de café verde. Sinergismo. FPS.

Abstract

Solar filters are substances capable of reflect, spread or absorb the ultraviolet radiation emitted by the Sun. Some filters can be potentiated by the addition of other sintetic or natural compounds. Examples of the natural substances widely used in cosmetic formulations are vegetable oils, such as green coffee oil,

which in addition to being an excellent emollient, has the ability to protect the skin against damage from exposure to solar radiation due to its antioxidant and photoprotective action. This study aims to identify the mechanism of interaction that allows green coffee oil the ability to increase the sun protection factor of different chemical and physical sunscreens. For this purpose, emulsions with or without green coffee oil have been developed, in which different filters were incorporated to evaluate the sun protection factor. The increase in SPF can be observed for benzophenone-3, ethyl hexyl salicylate, bemotrizinol e ethyl hexyl triazone, and the increase in radiation absorption occurred in the same UV range as the filters absorbed without the addition of green coffee oil, which indicates possible intermolecular interactions between coffee oil components and sunscreens. By means of silica column chromatography, 13 different fractions of green coffee oil were obtained, which were analyzed for their interaction with the filters used and later, identified by means of High Performace Liquid Chromatografy and Nuclear Magnetic Ressonance. The fractions capable of improve the SPF os the filters were composed majoritar for caffeine.

Key words: Photoprotection. Green coffee oil. Synergism. SPF.

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura química geral de um filtro solar orgânico.....	18
Figura 2. Incidência de radiação solar sobre a pele desprotegida e da pele protegida por filtros orgânicos e inorgânicos.....	19
Figura 3. Espectro de radiação solar terrestre.....	20
Figura 4. Equipamento Optometrics SPF 290S e seu respectivo software.....	23
Figura 5. Representação esquemática da pele e seus anexos.....	26
Figura 6. Espectro eletromagnético.....	29
Figura 7. Fórmula estrutural e espectro de absorção do filtro ethylhexyl metoxycinnamate.....	34
Figura 8. Fórmula estrutural e espectro de absorção do filtro diethylamino hydroxybenzoil hexyl benzoate (Uvinul® A plus).....	35
Figura 9. Fórmula estrutural e espectro de absorção do filtro bemotrizinol (Tinosorb® S).....	36
Figura 10. Fórmula estrutural e espectro de absorção do filtro ethylhexyltriazone (Uvinul® T150).....	37
Figura 11. Fórmula estrutural e espectro de absorção do filtro benzophenone-3.	38
Figura 12. Fórmula estrutural e espectro de absorção do filtro ethylhexyl salicylate.....	39

Figura 13. Fórmula estrutural dos principais diterpenos encontrados no óleo de café verde.....	42
Figura 14. Fórmula estrutural dos principais esteróis presentes no óleo de café verde.....	43
Figura 15. Fórmula estrutural dos principais tocoferóis encontrados no óleo de café verde.....	44
Figura 16. Fórmula estrutural da cafeína e trigonelina.....	45
Figura 17. Fórmula estrutural dos ácidos presentes nos grãos de café verde..	45
Figura 18. Suporte do equipamento Optometrics SPF 290S com a fita Transpore®.....	51
Figura 19. Placa de sílica gel com as frações F3 à F7 a serem analisadas.....	56
Figura 20. Comparação do FPS das emulsões 1 e 2 com as misturas de filtros A, B, C, D e E.....	62
Figura 21. Gráficos de MPF das emulsões 1 e 2, respectivamente, com os filtros da combinação A (benzophenone-3, ethyl hexyl metoxicinnamate e ethyl hexyl salicilate).....	63
Figura 22. Gráficos de MPF das emulsões 1 e 2, respectivamente, com os filtros da combinação B (isoamyl metoxicinnamate e TiO ₂).....	64
Figura 23. Gráficos de MPF das emulsões 1 e 2, respectivamente, com os filtros da combinação C (TiO ₂ , isoamyl metoxicinnamate e ethyl hexyl salicilate).....	65

Figura 24. Gráficos de MPF das emulsões 1 e 2, respectivamente, com aos filtros da combinação D (bemotrizinol, ethyl hexil triazone, ethyl hexyl metoxicinnamate e benzophenone-3).....	66
Figura 25. Gráficos de MPF das emulsões 1 e 2, respectivamente, com aos filtros da combinação E (bemotrizinol, diethylamine hidroxybenzoyl hexyl benzoate, ethyl hexyl metoxicinnamate e benzophenone-3).....	67
Figura 26. Comparação entre os FPS das emulsões 1 e 2 contendo os filtros isoladamente.....	69
Figura 27. Frações do óleo de café verde: F8 a F14.....	70
Figura 28. Análise por CCD frações de óleo de café verde [gel de sílica, eluída com clorofórmio e acetato de etila (50/50 v/v), luz UV $\lambda = 254$ nm].....	71
Figura 29. Análise por CCD das frações codificadas de F3-F7 [gel de sílica, eluída com hexano e acetato de etila (70:30 v/v)].....	72
Figura 30. Análise por CCD das frações codificadas de F8-F14 [gel de sílica, eluída com clorofórmio e acetato de etila (90:10 v/v)].....	73
Figura 31. Gráfico de Intervalo de Confiança de 95% para o filtro benzofenona-3 acionado das frações do óleo de café verde.....	75
Figura 32. Gráfico de Intervalo de Confiança de 95% para o filtro salicilato de octila acionado das frações do óleo de café verde.....	76
Figura 33. Gráfico de Intervalo de Confiança de 95% para o filtro Tinosorb® S acionado das frações do óleo de café verde.....	77

Figura 34. Gráfico de Intervalo de Confiança de 95% para o filtro Uvinul® T150 acionado das frações do óleo de café verde.....	78
Figura 35. Cromatograma da fração F4 (Coluna Phenomenex® Luna C18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 µm), λ = 254-330 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: ACN + TFA 0,05% (B) e H2O + TFA 0,05% (A). Gradiente de 5-100% B (60 min), volume 10 µL.....	79
Figura 36. Espectros de absorção na região do UV das substâncias F4a, F4b, F4c e F4d, respectivamente.....	80
Figura 37. Cromatograma da fração F9 (Coluna Phenomenex® Luna C18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 µm), λ = 254-330 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: ACN + TFA 0,05% (B) e H2O + TFA 0,05% (A). Gradiente de 5-100% B (60 min), volume 10 µL.....	81
Figura 38. Espectros de absorção na região do UV das substâncias F9a, F9b e F9c, respectivamente.....	82
Figura 39. Cromatograma da fração F13 (Coluna Phenomenex® Luna C18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 µm), λ = 254-330 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: ACN + TFA 0,05% (B) e H2O + TFA 0,05% (A). Gradiente de 5-100% B (60 min), volume 10 µL.....	83
Figura 40. Espectros de absorção na região do UV das substâncias F13.....	83
Figura 41. Espectro de RMN de 1H da substância F13 (600 MHz, CDCl3).....	84
Figura 42. Espectro de RMN de 13C da substância F13 (150 MHz, CDCl3)....	84

Figura 43. Mapa de contornos HSQC da substância F13 (600 e 150 MHz, CDCl ₃).....	85
Figura 44. Mapa de contornos HMBC da substância F13 (600 e 150 MHz, CDCl ₃).....	85
Figura 45. Substância da fração F13 - Cafeína e suas principais correlações observadas no experimento de HMBC (→).....	86

Lista de tabelas

Tabela 1. Classificação dos fototipos de pele proposta por Fitzpatrick.....	27
Tabela 2. Famílias de filtros solares orgânicos e seu espectro de absorção de radiação UV.....	31
Tabela 3. Filtros solares aprovados pelo Mercosul e suas respectivas concentrações máximas permitidas.....	32
Tabela 4. Composição em ácidos graxos (%) do óleo de café verde.....	41
Tabela 5. Composição de álcoois diterpênicos da fração insaponificável do óleo de café verde em mg/100 g de lipídeos.....	42
Tabela 6. Composição relativa (%) da fração esterólica de óleo de café verde.	44
Tabela 7. Composição das emulsões (% m/m).....	48
Tabela 8. Combinações de filtros químicos e físicos (% m/m).....	49
Tabela 9. Constituição da fase móvel (v/v) da cromatografia em coluna.....	54
Tabela 10. Valores de FPS (Fator de Proteção Solar) de acordo com o BASF – Sunscreen Simulator e Optometrics SPF 290S.....	61
Tabela 11. Aumento percentual do Fator de Proteção Solar das emulsões causado pela incorporação do óleo de café verde.....	62
Tabela 12. Valores de FPS (Fator de Proteção Solar) de acordo com o equipamento Optometrics SPF 290S para os filtros solares avaliados individualmente.....	68

Tabela 13. Frações do óleo de café verde obtidas, composição da fase móvel em que foram obtidas e suas respectivas massas (g).....	70
Tabela 14. Valores de FPS (Fator de Proteção Solar) de acordo com o equipamento Optometrics SPF 290S para os filtros solares adicionados das frações do óleo de café verde.....	74
Tabela 15. Dados de RMN 1H (600 MHz) e 13C (150 MHz) de F13 – Cafeína, incluindo resultados obtidos nos mapas de contornos HSQC e HMBC, em CDCl ₃ . Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.....	87

Lista de Abreviaturas

ACN - acetonitrila

BEMT – bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina (Tinosorb S)

BHT – hidroxitolueno butilado

BP3 – benzofenona-3 (Uvinul M40)

CCD – Cromatografia Camada Delgada

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Cooxupé – Cooperativa Regional de Cafeicultores em Guaxupé Ltda

DHHB – dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (Uvinul A Plus)

DME – Dose Mínima Eritematosa

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

EHMC – metoxinamato de etilhexila (Uvinul MC80)

EHT – etilhexil triazone (Uvinul T150)

EHS – salicilato de etilhexila

FM – Fase Móvel

FPS – Fator de Proteção Solar

HSQC – Heteronuclear Single Quantum Correlation

HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Correlation

IMC – *p*-metoxinamato de isoamila

LaCos – Laboratório de Cosmetologia

Q.S.P – Quantidade Suficiente Para

TiO₂ – dióxido de titânio

TFA – ácido trifluoracético

UV – Ultravioleta

UVA – Ultravioleta A (comprimento de onda entre 320-400nm)

UVB – Ultravioleta B (comprimento de onda 290-320nm)

Vis – Luz visível (comprimento de onda 400-700nm)

® - Marca Registrada

Dedicatória

Aos meus pais, a base de tudo.

Por sempre estarem ao meu lado, por todo o esforço que fizeram para poder oferecer a mim, e aos meus irmãos, uma educação de qualidade, por todo o apoio e, também, pelas cobranças. Sem vocês eu não estaria aonde cheguei.

Aos amigos que, mesmo distante fisicamente, estiveram sempre ao meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis. Aos novos amigos, que tornaram minha permanência em Araraquara incrivelmente mais alegre.

Agradecimentos

À Prof.^a Vera Isaac, agradeço por ter me recebido em seu laboratório, pela oportunidade de estágio, pela orientação em minha pesquisa e por todo o conhecimento que me passou ao longo de nossos anos de trabalho juntas.

À Prof.^a Lourdes Campaner dos Santos, do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP, por ter me recebido de portas abertas para a realização de parte da pesquisa e por todas as sugestões dadas; Ao seu doutorando, Marcelo Amorim, por todo auxílio que me deu durante minha estadia no laboratório de fitoquímica.

Ao Prof. Édison Pecoraro, pelas contribuições dadas na construção desse projeto.

Ao Prof. Marcos Corrêa por, apesar de não ser meu orientador, estar sempre disposto a ajudar no desenvolvimento de meus trabalhos.

À CAPES – Coordenação de Apoio à Pesquisa no Ensino Superior, pela bolsa cedida para a realização dessa pesquisa.

Sumário

Introdução.....	18
Objetivos.....	46
Objetivo principal.....	46
Objetivos específicos.....	46
Material e Métodos.....	47
Formulação das Emulsões.....	47
Manipulação das emulsões.....	50
Avaliação do Fator de Proteção Solar.....	50
Análise de Fator de Proteção Monocromático.....	53
Cromatografia em Coluna.....	54
Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDC).....	57
Avaliação da interação das frações do óleo de café verde com os filtros.....	58
Análise das frações por <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	59
Resultados.....	62
Manipulação das emulsões.....	62
Avaliação do Fator de Proteção Solar.....	62
Cromatografia em Coluna.....	71
Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDC).....	73
Avaliação da interação das frações do óleo de café verde com os filtros.....	75
Análise das frações por <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	81
Identificação por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	86

Discussão.....	90
Conclusão.....	97
Referências Bibliográficas.....	98

Introdução

O uso de fotoprotetores se faz necessário para evitar os prejuízos à pele advindos da exposição excessiva à radiação solar, tais como pequenas inflamações, queimaduras, envelhecimento precoce das células epiteliais e mutações genéticas¹.

Fotoprotetores são produtos cosméticos que possuem a função de proteger a pele dos efeitos nocivos da exposição à radiação solar desejada ou não, através de substâncias capazes de refletir, espalhar ou absorver essa radiação. Tais substâncias são denominadas filtros, podendo ser orgânicas (Figura 1) ou inorgânicas².

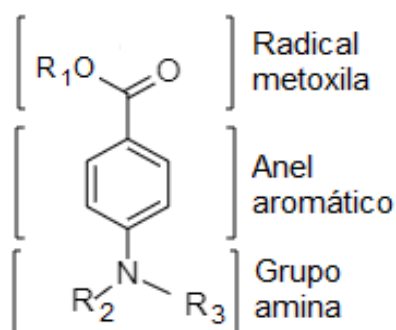


Figura 1. Estrutura química geral de um filtro solar orgânico.

Os filtros orgânicos, de modo geral, absorvem a energia da radiação UV, através da ressonância de elétrons, liberando-a em radiações de baixa energia, enquanto os filtros inorgânicos atuam refletindo e espalhando essa radiação³ (Figura 2).

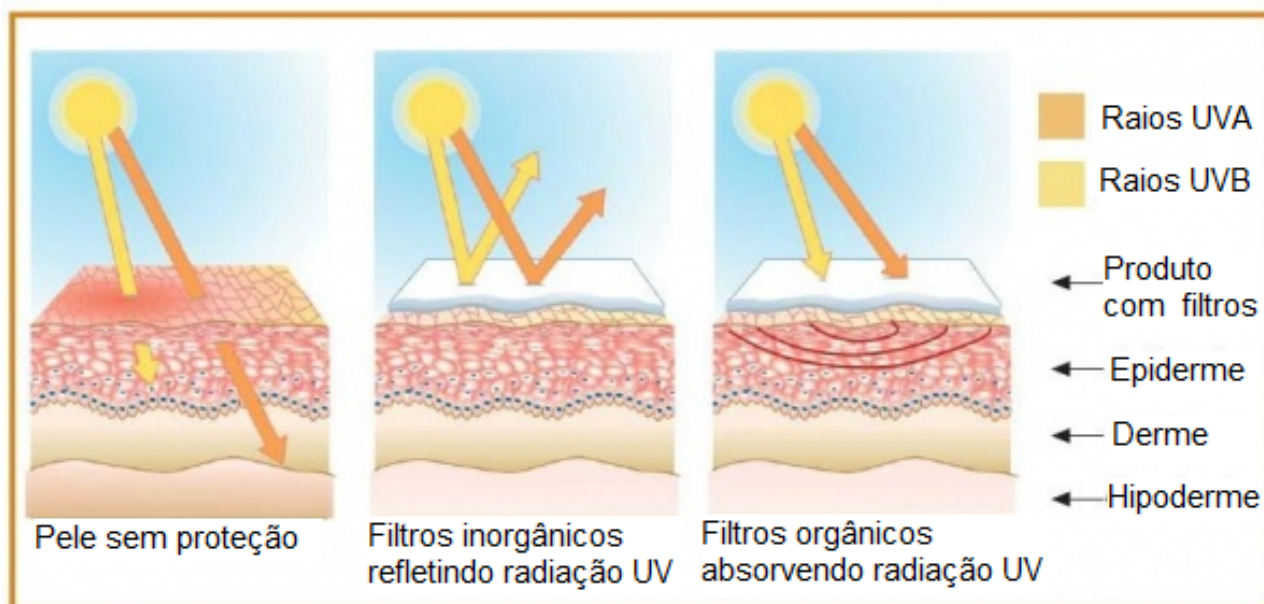


Figura 2. Incidência de radiação solar sobre a pele desprotegida e da pele protegida por filtros orgânicos e inorgânicos.

Traduzido de: BASF

Entre os filtros orgânicos existem produtos de origem natural ou sintética, dentre os quais podem ser citados o ácido *p*-aminobenzóico e derivados, derivados do ácido cinâmico, salicilatos, benzofenonas, derivados da cânfora, derivados do dibenzoilmetano e antranilatos. Já os filtros físicos constituem uma classe menor, da qual os principais representantes são o óxido de zinco e dióxido de titânio⁴.

Alguns filtros químicos podem ter seu efeito potencializado pela adição de outros compostos sintéticos ou naturais⁵, permitindo a obtenção de altos fatores de proteção solar sem se deparar com problemas quanto às porcentagens máximas de filtros permitidas pela legislação (ANVISA/RDC nº 48 de 16/03/2006)⁶, sendo, portanto, muito comum a associação de diferentes filtros químicos e físicos em uma preparação cosmética.

O Sol emite sua radiação através de ondas de energia eletromagnéticas, de amplitudes e frequências variadas. O espectro de radiação solar que atinge a Terra (Figura 3) pode ser dividido em três zonas principais, de acordo com o comprimento de onda²:

IV – infravermelho: compreende radiações superiores a 1000 nm. São essencialmente calóricas.

Vis – luz visível: compreende a faixa entre 400 – 700 nm.

UV – ultravioleta: é subdividida em UV A (315 – 400 nm), UV B (280 – 315 nm) e UV C (100 – 280 nm).

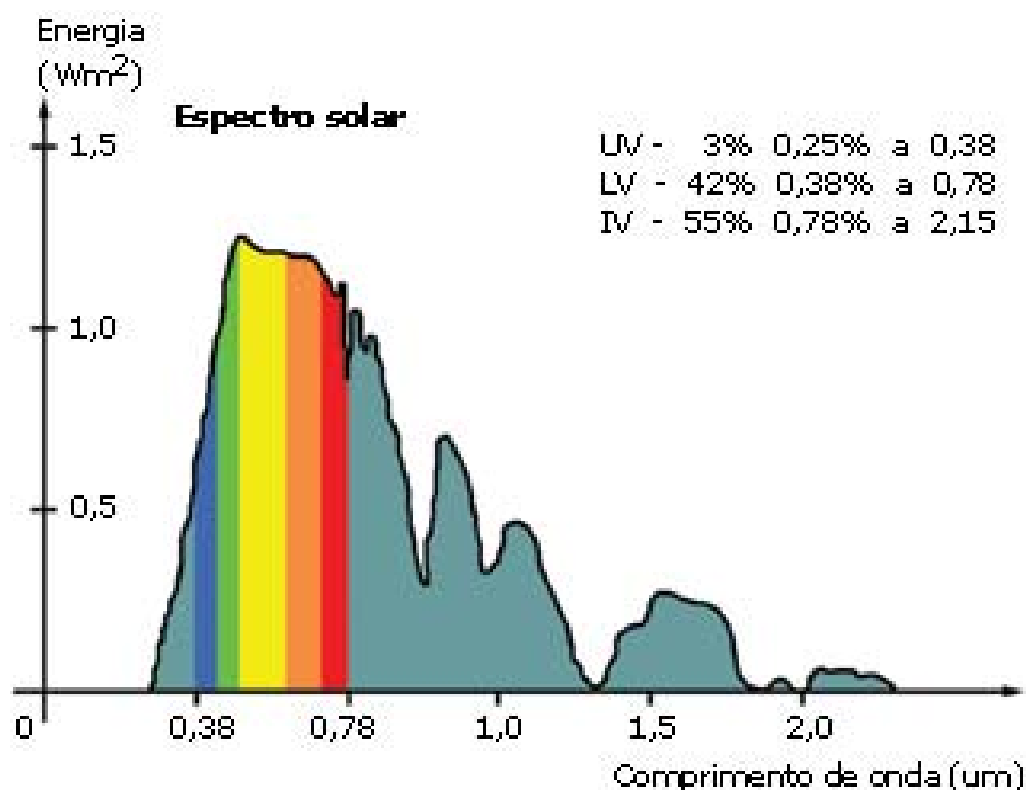


Figura 3. Espectro de radiação solar terrestre.

Fonte: UVIFUSP, 2009.

A radiação UV A é responsável pela pigmentação da pele imediatamente após a exposição ao Sol, de curta duração; a UV B é eritematosa e responsável pelo bronzeamento tardio e a UV C é quase totalmente absorvida pela atmosfera, não causando eritema ou pigmentação.

Nossa pele possui sistemas de proteção naturais contra a radiação, como a melanina, o suor (que apresenta ácido urônico em sua composição, que tem capacidade de absorver a radiação UV B) e o espessamento da camada córnea, porém esses três mecanismos, ainda que associados, não protegem a pele frente ao excesso de radiação recebido⁴.

A exposição excessiva à radiação UV, intencional ou não, é responsável por uma série de alterações atômicas e moleculares⁷ que podem resultar em diversos problemas de saúde agudos e crônicos, como eritema, queimaduras, envelhecimento precoce e câncer de pele. Tais problemas se tornam muito comuns, visto que a radiação solar exerce efeito cumulativo sobre a pele, ou seja, as alterações bioquímicas ativadas pela radiação são armazenadas, de modo que, quanto maior a frequência e tempo de exposição à radiação, maiores as chances de se desenvolver alguma alteração patológica⁸.

Considerando que a quantidade de radiação solar recebida é influenciada por inúmeros fatores ambientais, a utilização de filtros capazes de absorver radiação UV A e UV B, principalmente em regiões tropicais, onde a intensidade dessa radiação maior, é essencial para a prevenção de problemas cutâneos.

O Fator de Proteção Solar é um índice utilizado para indicar a eficácia de uma formulação fotoprotetora. Sua determinação é feita, no Brasil, pela utilização de

metodologia *in vivo*. Tal metodologia consiste na irradiação de radiação UV nas costas de voluntários sadios com pele dos fototipos I a III (quantidades e tipos de melaninas diferentes), e avaliação do tempo necessário para a formação de eritema, de acordo com a resolução da ANVISA, a RDC nº 237 de 22 de agosto de 2002⁹.

O FPS é obtido *in vivo* pela razão entre o tempo (em minutos) da dose mínima eritematosa (DME) da pele protegida pelo filtro solar, sobre a DME da pele não protegida (Equação 1)¹⁰. Em outras palavras, o Fator de Proteção Solar é uma indicação de quanto tempo uma pessoa pode permanecer exposta ao Sol sem sofrer eritema¹⁰.

$$FPS = \frac{DME \text{ pele com filtro}}{DME \text{ pele sem filtro}} \quad (1)$$

Uma vez que tal cálculo é baseado em eritema, a medida do FPS abrange somente a proteção da pele frente à radiação UV B, uma vez que a UV A é pouco eritematosa, sendo assim, dificilmente quantificada¹¹.

Por ser uma técnica invasiva, apresentar maior demanda de tempo e de custo, foram desenvolvidas metodologias *in vitro* como alternativas a esse teste, que se baseiam nas propriedades absorptivas ou no espalhamento dos filtros e que podem ser utilizadas para avaliar o Fator de Proteção Solar durante o desenvolvimento de formulações e para o controle de qualidade¹², tal como a metodologia utilizada neste estudo, a qual utiliza medições feitas por um espectrofotômetro com esfera de integração, que mede a absorção óptica do fotoprotetor e, a partir dos valores obtidos nos comprimentos de onda da faixa do UV, calcula matematicamente o FPS do produto¹³.

Na Figura 3, é possível visualizar um espectrofotômetro com esfera de integração que possibilita a leitura do FPS em UVA e UVB de formulações contendo, inclusive, partículas sólidas.



Figura 4. Equipamento Optometrics SPF 290S e seu respectivo software.

Fonte: OPTOMETRICS, 2014.

O FPS de filtros orgânicos e inorgânicos pode ser aumentado pela associação entre essas substâncias e/ou pela adição de algumas substâncias sintéticas ou naturais, como os óleos de origem vegetal, tal como o óleo de café verde.

Esse óleo é obtido através da prensagem dos grãos de *Coffea arabica L.* O método, feito a frio e sem a utilização de solventes, garante que a composição do óleo não sofra alteração e suas propriedades não sejam perdidas durante o processo de extração^{14,15}.

O óleo obtido através dos grãos verdes, além de ser uma alternativa para a utilização do chamado “café com defeito”, é um insumo rico em lipídios e material graxo insaponificável¹⁶, sendo que os componentes dessa fração possuem propriedades muito

desejadas para formulações cosméticas, tais como emoliência, retenção de umidade, aderência, penetração na pele e sensorial agradável¹⁷, entre outras.

Estudos recentes demonstram que esse óleo possui efeito emoliente e hidratante na pele, sendo indicado em formulações para peles secas, ressecadas e senis, assim como para cabelos secos e quebradiços e, também, para os lábios. Além disso, o efeito estimulante da cafeína (aceleração de metabolismo) presente no óleo de café verde é desejável para formulações que tem, como objetivo, reduzir a celulite¹⁸.

O óleo de café verde possui, além dessas características, a capacidade de proteger a pele contra os danos advindos da exposição à radiação solar devido à sua ação antioxidante e fotoprotetora¹⁹, que, embora seja baixa, pode aumentar o fator de proteção solar de outros filtros orgânicos e inorgânicos quando utilizados em associação.

O sinergismo que ocorre entre o óleo de café e alguns filtros, que comumente são utilizados em fotoprotetores encontrados no mercado, possibilita a obtenção de altos fatores de proteção solar sem a necessidade de adição de grandes porcentagens de filtros solares nesse tipo de formulação²⁰.

O aumento do FPS desses filtros pode ser devido à interações intermoleculares entre os filtros e os componentes do óleo de café verde ou à ação desse óleo como um aditivo extensor do espectro de proteção do fotoprotetor. Porém, esse mecanismo ainda não está elucidado. Assim, é fundamental conhecer o mecanismo de ação do sinergismo e, com isso, definir a melhor mistura de filtros para obtenção do FPS mais elevado.

A Pele

A pele é o órgão integrante do sistema tegumentar, juntamente ao cabelo e pelos, unhas, glândulas sudoríparas e sebáceas, que tem por principais funções proteger os tecidos subjacentes, regular a temperatura somática, reservar nutrientes e ainda conter terminações nervosas sensitivas²¹.

O maior e mais pesado órgão do corpo, é composto pela epiderme, de epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e pela derme, de tecido conjuntivo, onde estão presentes as fibras elásticas e colágenas. Subjacente, unindo-a aos órgãos, há a hipoderme, de tecido conjuntivo frouxo e adiposo^{22;23}.

A epiderme apresenta três tipos celulares: os melanócitos, as células de Langerhans, e as de Merkel, e apresenta cinco camadas: o estrato basal, o estrato espinhoso, o estrato granuloso, o estrato lúcido e o estrato córneo. Sua espessura é variável, podendo chegar até 1,5 mm. Dependendo da espessura da epiderme, a constituição exata de suas cinco camadas é modifica^{28;24}.

A Figura 5 representa a estrutura da pele, com suas camadas e anexos.

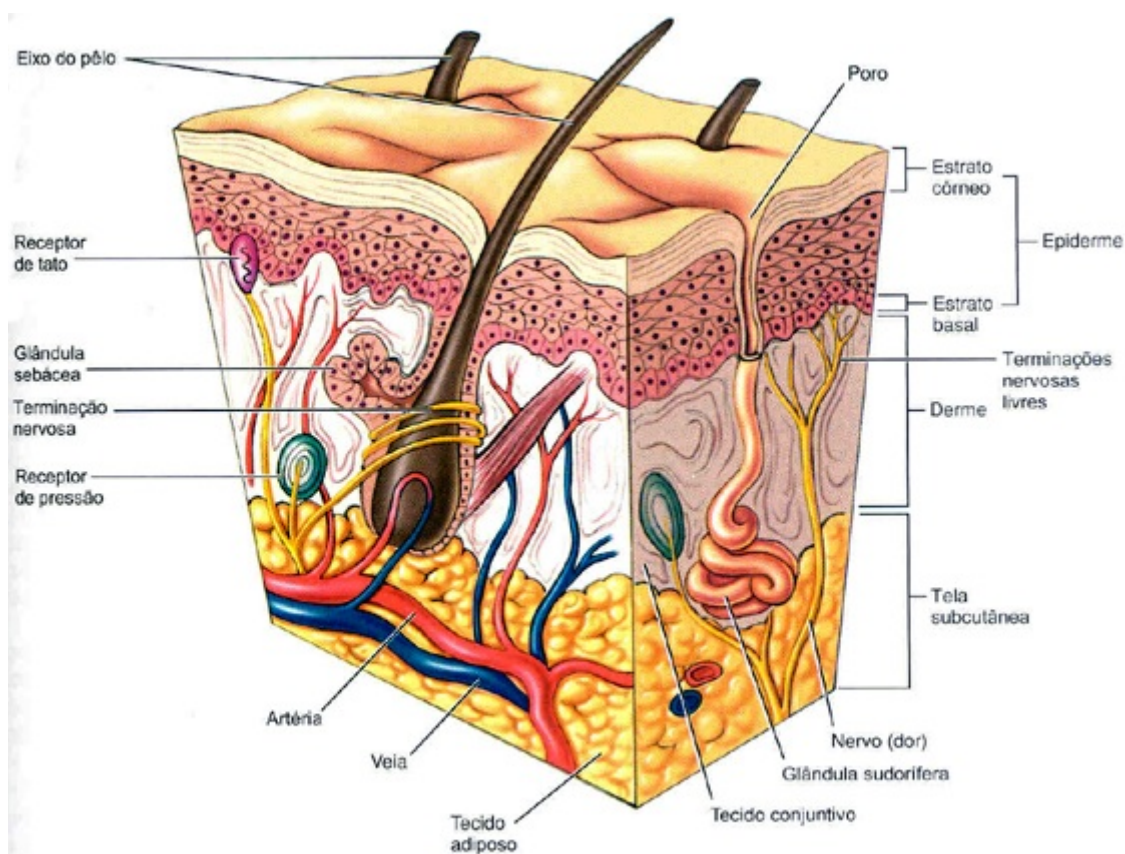


Figura 5. Representação esquemática da pele e seus anexos.

Fonte: Ciência na mosca: O tato, 2012.

Como mecanismo de proteção contra a radiação solar, a pele apresenta o suor, o espessamento da camada córnea e a melanina, produzida nos melanócitos. Os melanócitos estão localizados na camada basal da epiderme e são células responsáveis pela pigmentação da pele e dos pelos, contribuindo para a tonalidade cutânea, juntamente a pigmentos exógenos e os endógenos²⁵, conferindo proteção direta aos danos causados pela radiação UV.

A Tabela 1 apresenta a classificação dos fototipos de pele segundo Fitzpatrick²⁶ (1976).

Tabela 1. Classificação dos fototipos de pele proposta por Fitzpatrick.

	Grupo	Eritema	Pigmentação	Sensibilidade
I	Branca	Sempre se queima	Nunca se bronzeia	Muito sensível
II	Branca	Sempre se queima	Às vezes se bronzeia	Sensível
III	Morena clara	Queima (moderado)	Bronzeia (moderado)	Normal
IV	Morena moderada	Queima (pouco)	Sempre se bronzeia	Normal
V	Morena escura	Queima (raramente)	Sempre se bronzeia	Pouco sensível
VI	Negra	Nunca se queima	Totalmente pigmentada	Insensível

A pigmentação da pele apresenta grandes variações devido às diferentes concentrações e tipos de melanina (eumelaninas e feomelaninas)²⁷, determinadas por características genéticas, e por fatores ambientais e hormonais. Por esse motivo, a pele pode ser classificada por fototipo, ou seja, por suas características físicas e por sua resposta à exposição solar²⁸, como mostrado no Tabela 1.

Apesar dos mecanismos de proteção citados anteriormente, a radiação solar penetra profundamente na pele, causando alterações no desenvolvimento celular e em sua aparência²⁹.

Os danos no DNA provocados por essa radiação, juntamente a fatores genéticos, fatores ambientais e estilo de vida, são responsáveis pelo desenvolvimento de câncer de pele³⁰, o qual pode ser em duas formas: melanoma e não melanoma.

De acordo com o INCA – Instituto Nacional do Câncer, o câncer de pele não melanoma é mais frequente no Brasil e corresponde a 30% de todos os tumores malignos registrados no país. A estimativa é que tenham surgido 175.760 novos casos somente no ano de 2016, sendo a maior incidência em pessoas de pele clara, maiores de 40 anos e principalmente do sexo feminino. Já o tipo melanoma representa apenas 3% das neoplasias malignas da pele, porém é o mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase³¹.

Radiação Solar

O Sol é a estrela no centro do Sistema Solar. É uma esfera quase perfeita composta por plasma quente³². E é, de longe, a fonte de energia mais importante para a vida na Terra³³.

A luz solar na superfície da Terra é atenuada pela atmosfera da Terra, de modo que menos energia chega à superfície em condições claras quando o Sol está perto do zênite³⁴. A luz solar no topo da atmosfera da Terra é composta (por energia total) de cerca de 50% de luz infravermelha, 40% de luz visível e 10% de luz ultravioleta³⁵. A atmosfera em particular filtra mais de 70% do ultravioleta solar, especialmente nos comprimentos de onda menores (UVC)³⁶.

O espectro eletromagnético da radiação solar compreende desde raios cósmicos até ondas de rádio. A radiação não ionizante compreende a ultravioleta (UV), com comprimento de onda entre 100 e 400 nm, a luz visível, de 400 a 800 nm, e a infravermelha (IV), de 800 a 1700 nm. A radiação ultravioleta é dividida em três partes: UVC (100-280 nm), UVB (280-320 nm) e UVA (320-400 nm)³⁷.

A Figura 6 apresenta o espectro eletromagnético, bem como suas subdivisões.

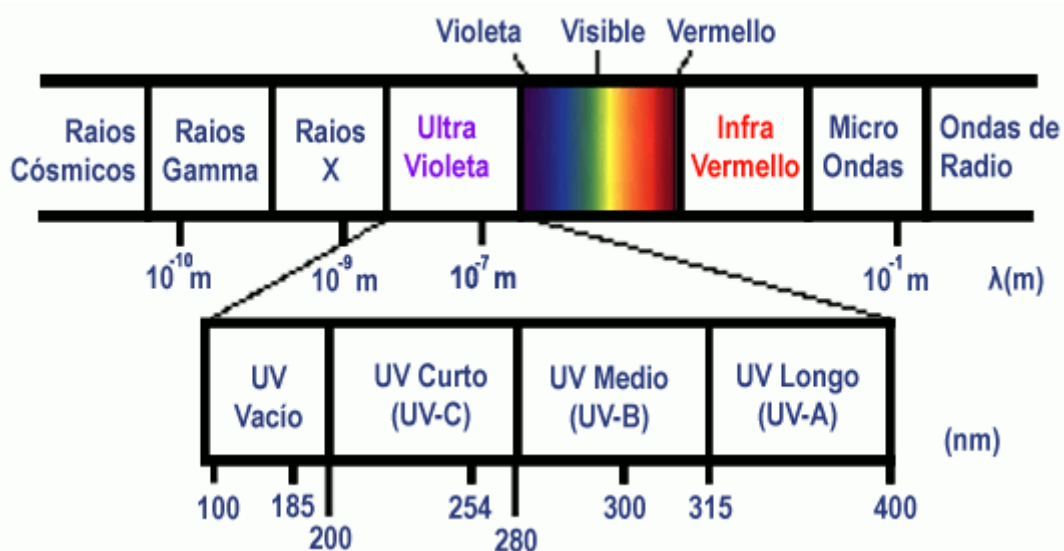


Figura 6. Espectro eletromagnético.

Fonte: Instituto de Física – UFRGS.

A radiação UVA é de 800 a 1000 vezes menos ativa na pele que a UVB. Porém, devido ao seu comprimento de onda, penetra mais profundamente, provocando danos na derme. Não produz eritema, é pigmentógena, responsável pela pigmentação imediata de curta duração^{38;39}.

A radiação UVB constitui 5% da radiação UV total que atinge a Terra. Seu comprimento de onda atinge principalmente a epiderme, sendo responsável por 80% dos danos provocados pelo sol. É eritematógena, responsável pelo bronzeamento indireto e tardio, e possui poder bactericida indiretamente proporcional ao seu comprimento de onda^{37;40}.

A radiação UVC, possui duas faixas de comprimento de onda, uma que se propaga pelo vácuo, e a outra que se propaga pela atmosfera, sendo filtrada pela camada de ozônio⁴¹.

A radiação Infravermelha representa quase metade da radiação solar que chega à Terra. No corpo humano, estes raios penetram profundamente na pele, podendo atingir a hipoderme, onde provocam a dilatação dos vasos sanguíneos³⁶.

A exposição à radiação solar, intencional ou não, provoca diversas reações fisiológicas nos humanos, podendo ser benéficas ou prejudiciais à saúde. Dentre as reações benéficas, é possível citar o eritema actínico, pigmentação imediata e tardia, espessamento da epiderme, síntese de vitamina D3. E entre as prejudiciais, estão as fotodermatoses⁴², para as quais o uso de fotoprotetores é indispensável

Fotoprotetores

Fotoprotetores são produtos cosméticos que possuem a função de proteger a pele dos efeitos nocivos da exposição à radiação solar intencional ou não, através de substâncias capazes de refletir ou absorver essa radiação, os filtros solares².

A necessidade do uso desse tipo de produto é indiscutível para a proteção da pele e o aumento expressivo do mercado nessa área é uma prova disso⁴³.

Filtros Solares

Filtros solares são substâncias orgânicas ou inorgânicas, que possuem a capacidade de absorver e/ou refletir a radiação no comprimento do ultravioleta. De modo geral, os filtros sintéticos são compostos orgânicos (presença de átomos de carbono na estrutura) e os inorgânicos são óxidos metálicos. Os filtros orgânicos protegem a pele absorvendo a radiação e transformando-a em radiações de energias menores; e os inorgânicos, por reflexão e espalhamento².

Os filtros sintéticos podem ser subdivididos pela faixa de radiação ultravioleta em que são absorvedores⁴⁴. Embora alguns filtros sejam capazes de absorver nas regiões do UVA e UVB, a maioria apresenta sua absorção mais restrita, motivo pelo qual os filtros são comumente utilizados em associação nas formulações cosméticas².

A Tabela 2 apresenta famílias de filtros classificadas pelo seu espectro de absorção de ultravioleta.

Tabela 2. Famílias de filtros solares orgânicos e seu espectro de absorção de radiação UV

Filtros solares orgânicos	
UVA	UVB
PABA	Benzofenonas
Salicilatos	Antranilatos
Ácido cinâmico	Dibenzoilmetanos
Benzimidazóis	
Cânfora	

Fonte: Sun and sunscreens. 2003.

Dentro das famílias citadas anteriormente, existem inúmeros filtros solares. Porém, nem todos são aprovados pelos órgãos regulamentadores globais. A Tabela 3 apresenta os filtros solares aprovados no Mercosul, com suas respectivas concentrações máximas permitidas nas legislações vigentes⁴⁵.

Tabela 3. Filtros solares aprovados pelo Mercosul e suas respectivas concentrações máximas permitidas.

INCI* name	Concentração máxima (% m/m)
Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine (Tinosorb® S)	10
Butyl Methoxydibenzoylmethane (Avobenzona)	5
Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate (Uvinul® A Plus)	10
Disodium Phenyl Dibenzimidazole Tetrasulfonate	10
Drometrizole TriSiloxane	15
Menthyl Anthranilate	5
Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol (Tinosorb® M)	10
Terephthalylidene Dicamphor Sulfonic Acid	10
Zinc Oxide (nano), Z-Cote	25
4-Methylbenzylidene Camphor	4
Benzophenone-3 (Uvinul® M40)	10

Benzophenone-4 (Uvinul® MS40)	5
Diethylhexyl Butamido Triazone	10
Ethylhexyl Methoxycinnamate (Uvinul® MC80)	10
Ethylhexyl Salicylate	5
Ethylhexyl Triazone (Uvinul® T150)	5
Ethylhexyl dimethyl PABA	8
Homomenthyl Salicylate	15
Isoamyl p-Methoxycinnamate	10
Octocrylene (Uvinul® N539T)	10
PEG-25 PABA	10
Phenylbenzimidazol Sulfonic Acid	8
Polysilicone-15	10
Titanium Dioxide (nano)	25
Tris Biphenyl Triazine (Tinosorb® A2B)	10

*INCI - International Nomenclature of Cosmetic Ingredients

Entre os filtros citados na tabela, alguns são mais comumente utilizados pela indústria, por apresentarem um bom custo-benefício e facilidade de incorporação, tais como o etylhexyl metoxycinnamate, octocrylene, homomenthyl salicylate, ethylhexyl salicylate e benzophenone-3. Tais filtros, porém, dificilmente oferecem um fator de

proteção elevado (FPS 50 ou mais) de forma a ficarem estáveis na formulação final, principalmente pela dificuldade de solubilização dessas substâncias⁴⁶. Por conta da atual demanda de fotoprotetores assim, indústrias químicas vem desenvolvendo novos filtros, alguns hidrossolúveis, com o intuito de oferecer alta proteção, amplo espectro de absorção, fotoestabilidade e sensorial agradável^{47,48}.

Mesmo os filtros mais novos, como o bemotrizinol, etylhexyltriazone e diethylamino hydroxybenzoil hexyl benzoate são utilizados em associação a outros filtros, possibilitando adequada proteção contra a radiação solar⁴⁹.

As Figuras 7 a 12, ilustram a estrutura química e o espectro de absorção dos filtros utilizados nesse estudo.

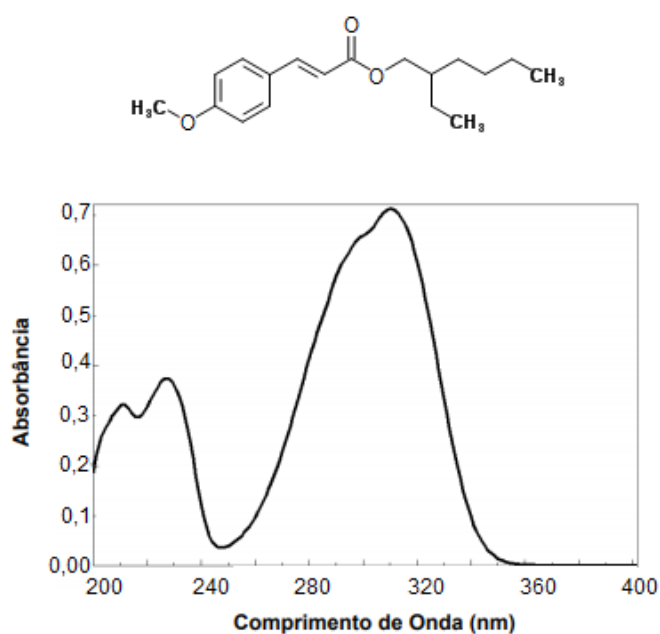


Figura 7. Fórmula estrutural e espectro de absorção do filtro etylhexyl metoxycinnamate.

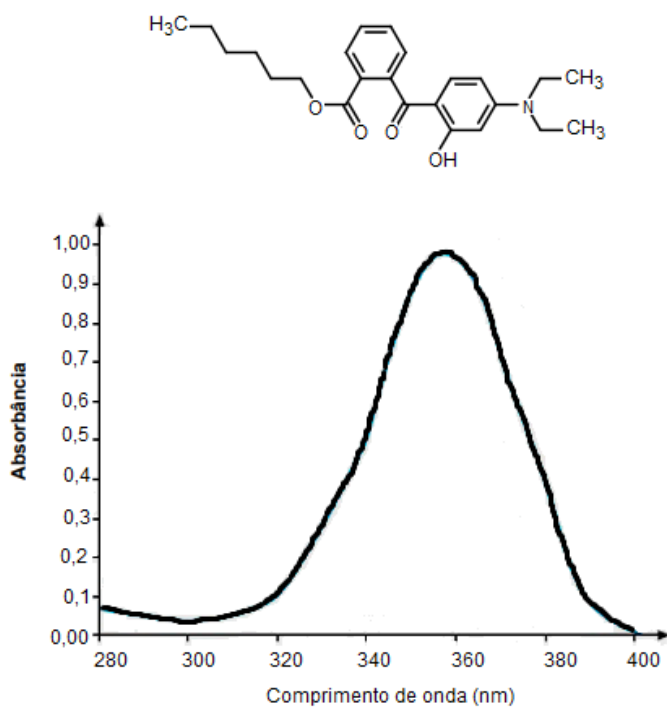


Figura 8. Fórmula estrutural e espectro de absorção do filtro diethylamino hydroxybenzoil hexyl benzoate (Uvinul® A plus).

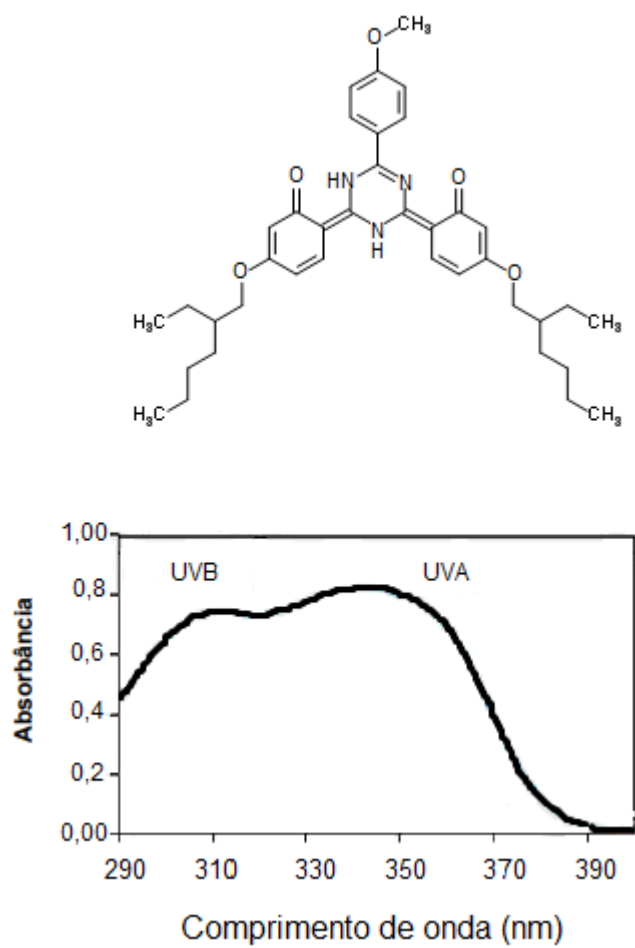


Figura 9. Fórmula estrutural e espectro de absorção do filtro bemotrizinol (Tinosorb® S).

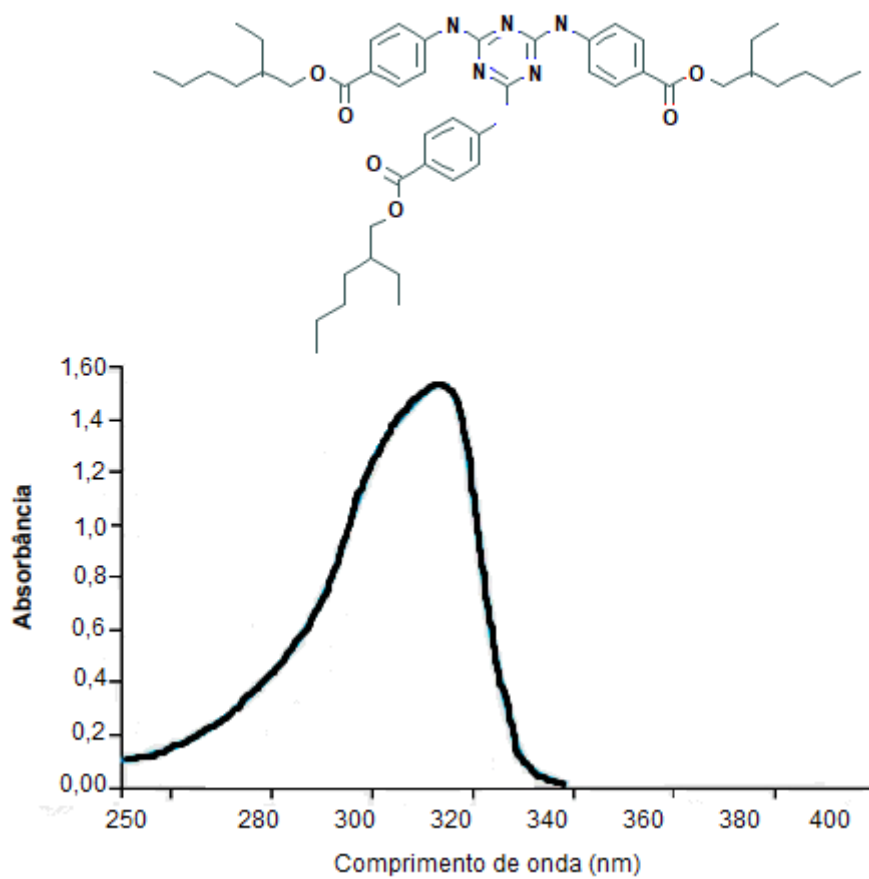


Figura 10. Fórmula estrutural e espectro de absorção do filtro ethylhexyltriazone (Uvinul® T150).

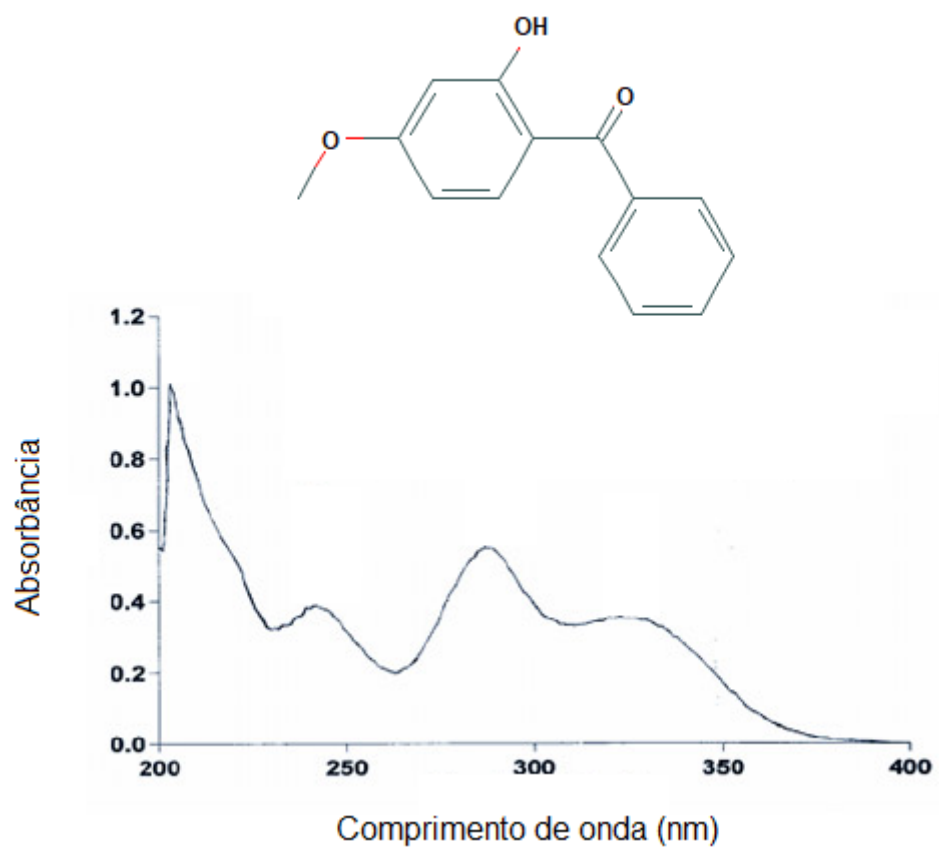


Figura 11. Fórmula estrutural e espectro de absorção do filtro benzophenone-3.

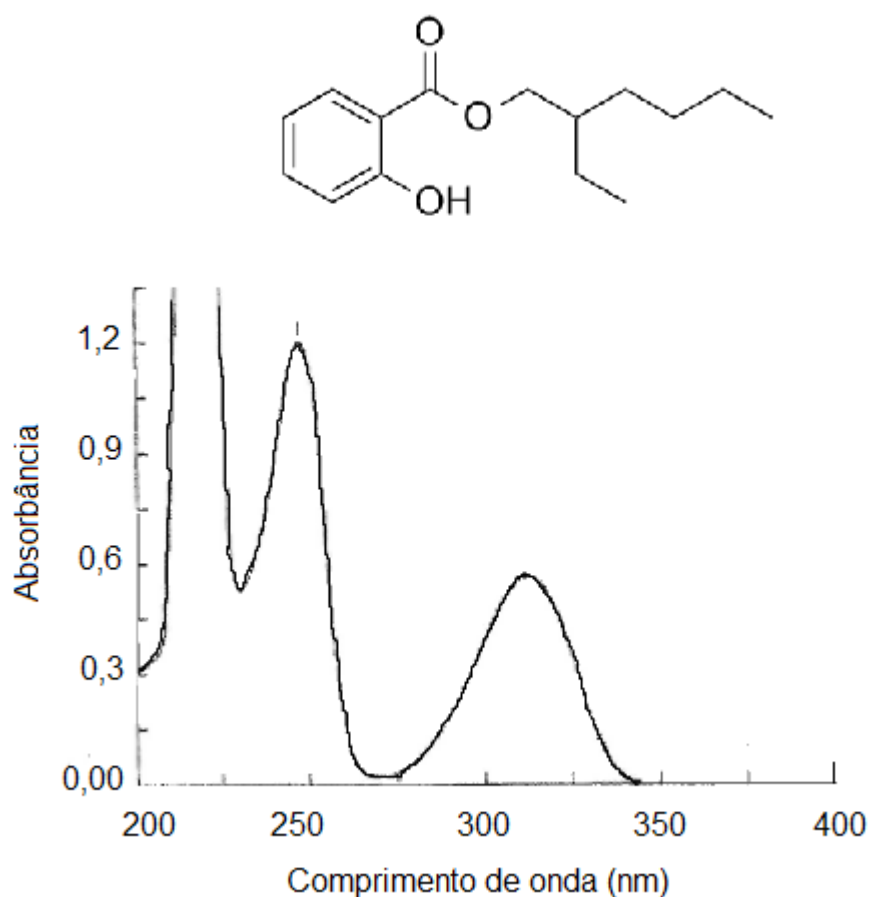


Figura 12. Fórmula estrutural e espectro de absorção do filtro ethylhexyl salicylate.

Óleos vegetais

Uma forte tendência do mercado cosmético mundial é o desenvolvimento de produtos com o maior número de componentes de origem natural, especialmente os de origem vegetal, explorando de forma racional e sustentável a biodiversidade brasileira. Tais matérias primas vegetais são ainda mais visadas caso haja estudos científicos comprovando sua segurança (biocompatibilidade e baixa toxicidade) e eficácia⁵⁰.

Dentre tais matérias primas, podemos citar, como sendo de maior importância para o desenvolvimento de produtos naturais na indústria cosmética, diferentes tipos e frações

de plantas medicinais e extratos vegetais, corantes naturais, frutas, sementes e castanhas, óleos vegetais, óleos essenciais e resinas⁵¹.

O Brasil é historicamente conhecido pela diversidade de sua flora. A grande variedade de plantas oleaginosas, torna-o um país com elevado potencial para ser um dos líderes mundiais no que se refere à exploração, produção e comercialização de produtos do setor de óleos e gorduras vegetais⁵².

Os óleos vegetais são óleos fixos, geralmente extraídos de sementes e castanhas por processos a frio. Sua constituição é rica em triglicerídeos e são utilizados em emulsões para compor a base, para melhorar a aderência à pele, solubilizar outros componentes da fórmula, assim como por seu efeito emoliente e hidratante⁵³.

Óleo de café verde

O óleo de café verde utilizado nesse estudo foi cedido pela COOXUPÉ (Cooperativa Regional de Cafeicultores em Guaxupé LTDA.). Atualmente, a Cooperativa possui mais de 14 mil cooperados e recebe café produzido em mais de 200 municípios de sua área de ação, localizada nas regiões do Sul de Minas, Cerrado Mineiro e Vale do Rio Pardo (no estado de São Paulo)⁵⁴.

O óleo de café verde é um óleo fixo, extraído através do processo de *expeller pressing*, que consiste na prensagem dos grãos verdes a alta pressão, sem a utilização de solventes. Tal processo tem o intuito de aproveitar os grãos de café colhidos verdes, que não apresentam as características de paladar e aroma desejadas e, por isso, são considerados de qualidade inferior⁵⁵. O aproveitamento desses grãos minimiza o desperdício de sacas de café que não serão torradas para a produção de pós, bebidas e

outros produtos alimentícios, sendo portanto, uma alternativa sustentável e economicamente viável.

Os lipídios estão entre os componentes mais importantes dos grãos de café, dentre os quais, ceras, triglicerídeos e matéria insaponificável⁵⁶.

A Tabela 4 lista os principais componentes da fração graxa do óleo de café verde e suas concentrações⁵⁷.

Tabela 4. Composição em ácidos graxos (%) do óleo de café verde.

Ácido Graxo	%
(C16:0) Palmítico	26,6 – 27,8
(C18:0) Esteárico	5,6 – 6,3
(C18:1) Oléico – ômega 9	6,7 – 8,2
(C18:2) Linoléico – ômega 6	52,2 – 54,3
(C18:3) Linolênico – ômega 3	2,2 – 2,6
(C20:0) Araquídico	2,6 – 2,8
(C22:0) Behênico	0,5 – 0,6
(C24:0) Lignorécico	0,2 – 0,4

Os lipídios constituem a maior parte do óleo de café⁵⁸, porém seus constituintes insaponificáveis apresentam grande importância para os efeitos desejados para os cosméticos. A fração insaponificável do óleo é composta, majoritariamente, por álcoois diterpênicos, que ocorrem na forma livre ou como monoésteres de ácidos graxos de diterpenos, sendo que os mais importantes são cafestol e kahweol (Figura 12), que

pertencem à família kaurene⁵⁹, esteróis livres ou esterificados⁶⁰, como β -sisterol 3, stigmasterol e campesterol (Figura 13), e tocoferóis⁶¹(Figura 14).

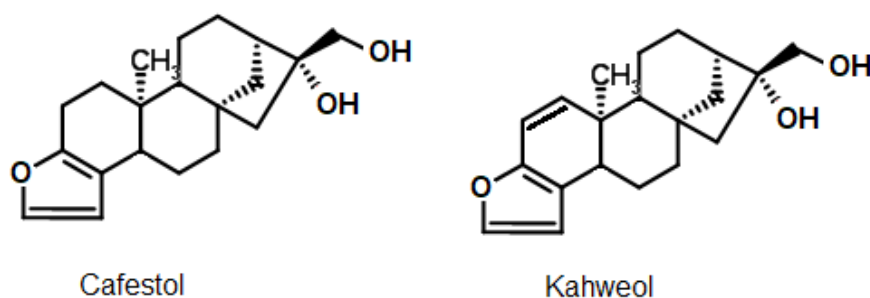


Figura 13. Fórmula estrutural dos principais diterpenos encontrados no óleo de café verde.

Na Tabela 5, estão apresentados os diterpenos presentes no óleo de café verde.

Tabela 5. Composição de álcoois diterpênicos da fração insaponificável do óleo de café verde em mg/100 g de lipídeos.

Diterpeno	mg/100g
Dehidrocafestol	traços*
Dehidrocaveol	2,6-3,4
Kahweol	431,2-663,6
Cafestol	414,2-533,7
16-O-metilcafestol	2,4-3,0
Não identificado	0,8-1,7

* valores não quantificados nas condições de análise.

Fonte: LERCKER et al.⁶²

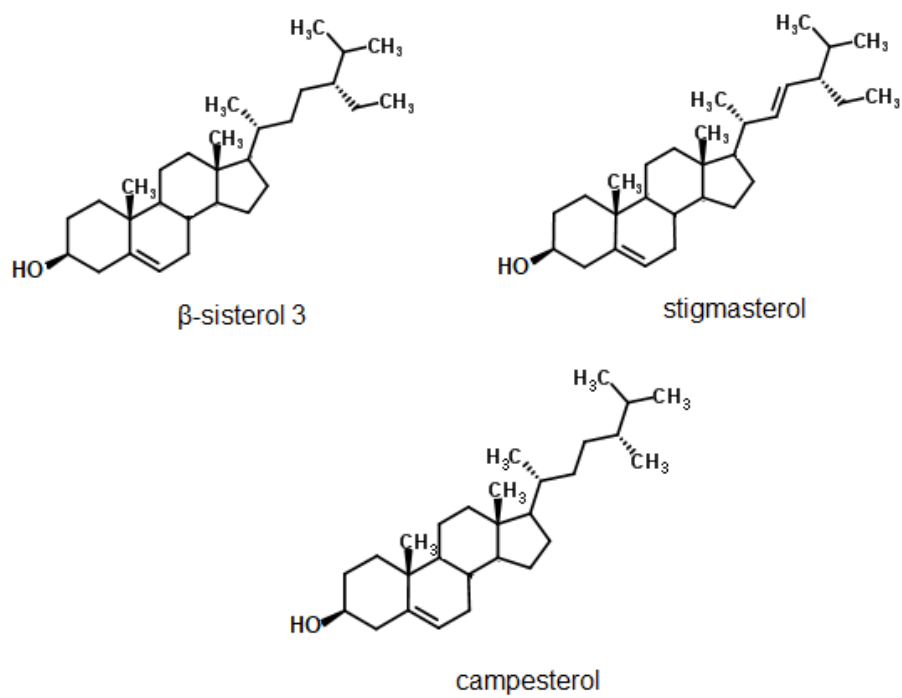


Figura 14. Fórmula estrutural dos principais esteróis presentes no óleo de café verde.

Na Tabela 6, estão apresentados os esteróis presentes no óleo de café verde.

Tabela 6. Composição relativa (%) da fração esterólica de óleo de café verde.

Esterol	(%)
colesterol	traços-0,5
campesterol	14,8-18,7
estigmasterol	19,6-24,5
sitosterol	42,7-56,5
Δ^5 -avenasterol	2,0-14,6
Δ^7 -estigmasterol	0,6-6,6
Δ^7 -avenasterol	traços-4,4

* valores não quantificados nas condições de análise.

Fonte: TISCORNIA et al.⁶³

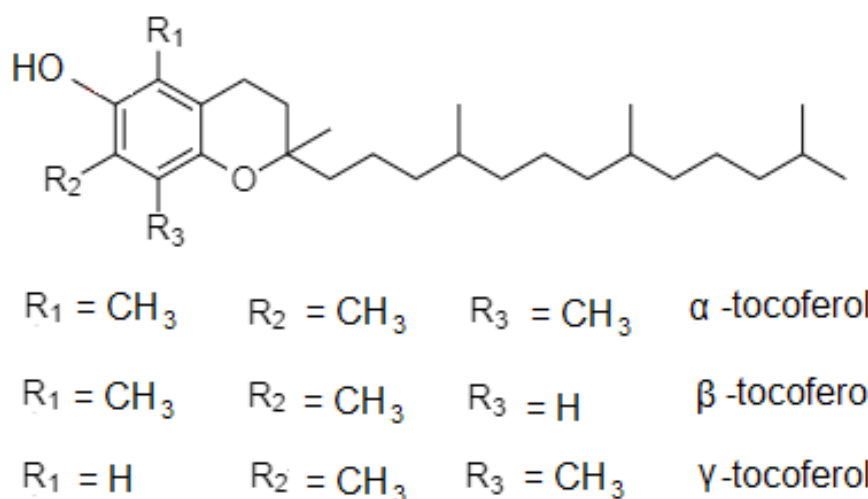


Figura 15. Fórmula estrutural dos principais tocoferóis encontrados no óleo de café verde.

Além dos componentes citados anteriormente, os grãos de café ainda apresentam metilxantinas, como a cafeína, teofilina e teobromina⁶⁴, alcaloides, como a trigonelina⁶⁵, e os ácidos fenólicos, como o cafeico⁶⁶, quínico e clorogênico (éster dos ácidos cafeico e quínico)⁶⁷. As fórmulas estruturais desses componentes estão representadas nas Figuras 16 e 17.

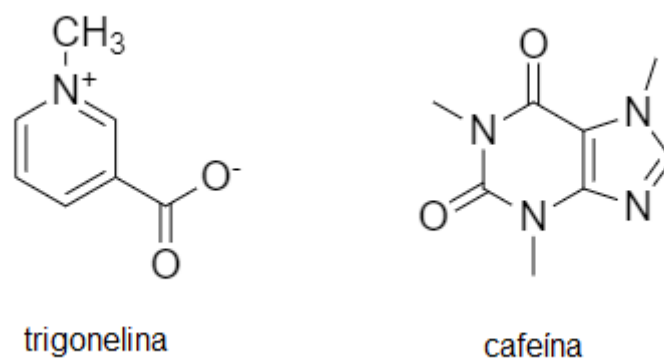


Figura 16. Fórmula estrutural da cafeína e trigonelina.

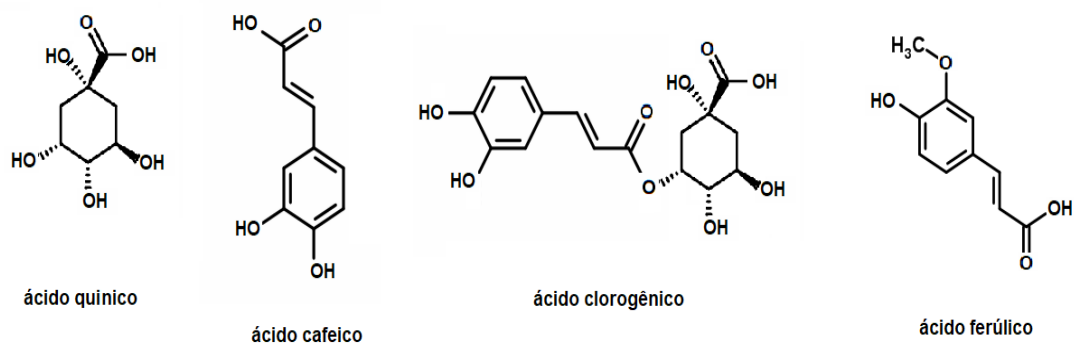


Figura 17. Fórmula estrutural dos ácidos presentes nos grãos de café verde.

O grande interesse da indústria cosmética no óleo de café verde, é devido às características sensoriais agradáveis, sua capacidade de conferir emoliência e sensação de hidratação na pele, além do efeito termogênico da cafeína, desejado para formulações

reduzidas de medida e celulite⁶⁸, potencial antioxidante e a capacidade de bloquear a radiação ultravioleta, aparentemente ligada aos diterpenos⁶⁹.

Objetivos

Objetivo principal

Este estudo tem como objetivo identificar a interação que possibilita ao óleo de café verde aumentar o fator de proteção solar de diferentes filtros sintéticos.

Objetivos específicos

Manipular fórmulas com 5 misturas de filtros, sem óleo de café verde.

Manipular fórmulas com 5 misturas de filtros, com óleo de café verde.

Avaliar o aumento do fator de proteção solar das fórmulas com óleo de café verde, comparadas às fórmulas sem o óleo.

Obter diferentes frações do óleo de café verde.

Avaliar o aumento do fator de proteção solar das fórmulas com as frações de óleo de café verde obtidas.

Determinar quais frações aumentam o FPS dos filtros testados e identificar sua composição.

Material e Métodos

Formulação das Emulsões

Material

água destilada

benzophenone-3

BHT

caprylic / capric triglyceride

cetearyl alcohol

ceteareth-20

phenoxihetanol, ethylparaben, methylparaben, propylparaben e buthylparaben

(Chemynol®)

dimethylpolysiloxane

dissodium EDTA

isoamyl p-metoxicinnamate

green coffee oil (Cooxupé)

mineral oil

ethylhexyl metoxicinnamate

ethylhexyl salicylate

propylene glycol

bemotrizinol (Tinosorb® S)

titanium dioxide

ethyl hexil triazone (Uvinul® T150)

diethylamine hidroxybenzoyl hexyl benzoate (Uvinul® A plus)

Método

Foram desenvolvidas duas formulações de emulsões óleo em água (O/A), identificadas como base 1 e 2, sendo que diferença entre essas é a adição ou não do óleo de café verde na fase oleosa. Tais emulsões foram utilizadas como base para a incorporação dos filtros solares a serem testados.

Nas emulsões nas quais o óleo de café não foi adicionado, o óleo mineral foi utilizado com o intuito de manter a porcentagem da fase oleosa em ambas as formulações, descartando assim, a possibilidade do aumento do FPS observado ser decorrente do efeito oclusivo que um componente oleoso pode exercer quando adicionado a uma formulação cosmética.

Na Tabela 7, estão apresentados os componentes das formulações estudadas.

Os filtros orgânicos e inorgânicos utilizados nas formulações foram selecionados a partir do BASF – *sunscreen simulator*, através do qual é possível saber o FPS teórico que um filtro apresentaria em uma formulação, tanto sozinho quanto em associação com outros filtros. Foram feitas quatro associações de diferentes filtros, tendo como objetivo o maior aumento possível dos filtros selecionados, sendo que o FPS empírico deveria ser de categoria média (em torno de 25) e não ultrapassar a concentração de 15% de filtros na formulação. Tais combinações foram incorporadas nas formulações apresentadas na Tabela 7, totalizando 10 amostras.

As combinações dos filtros utilizados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 7. Combinações de filtros químicos e físicos (% m/m).

Filtros	A	B	C	D	E
benzophenone-3	2			2	2
titanium dioxide		7	6		
isoamyl metoxycinnamate		5	6		
ethyl hexyl metoxycinnamate	8			4	4
ethyl hexyl salicylate	3	1			
bemotrizinol				2	2
ethyl hexil triazone				2	
diethyl amine hidroxybenzoyl hexyl benzoate					2

!!br0ken!!

Tabela 8. Composição das emulsões (% m/m).

Matéria Prima (INCI name)	1	2
cetearyl alcohol	4,5	4,5
dimethylpolysiloxane	1,5	1,5
green coffee oil	-	3
mineral oil	3	-
ceteareth-20	2	2
caprylic / capric triglyceride	2	2
BHT	0,05	0,05
propylene glycol	4	4
Chemynol®	0,5	0,5
dissodium EDTA	0,05	0,05
aqua qsp	100	100

Como o objetivo desse estudo foi identificar as interações com os filtros individualmente, após a avaliação do FPS das emulsões citadas a cima (Tabelas 7 e 8), os filtros solares foram incorporados separadamente nas emulsões base nas mesmas proporções das combinações anteriores, e posteriormente, avaliadas em relação ao seu fator de proteção solar.

Manipulação das emulsões

As matérias primas foram separadas de acordo com sua hidrofiliabilidade, pesadas em balança semi-analítica e acondicionadas em dois béqueres, constituindo duas fases, aquosa e oleosa.

Os filtros listados na Tabela 8 foram incorporados à fase oleosa das emulsões, sendo, para sua manipulação, ambas as fases, aquecidas em banho-maria, até temperaturas entre 70 e 80°C, onde ocorre a completa fusão e/ou solubilização dos componentes da fórmula. Após esse processo, a fase aquosa foi vertida sobre a oleosa e a emulsão foi mantida sob agitação constante até seu completo resfriamento, à temperatura ambiente.

Avaliação do Fator de Proteção Solar

Material

Fita Transpore® 3M

Método

Para a avaliação do FPS das amostras foi utilizado o equipamento Optometrics SPF 290S, espectrofotômetro contendo uma esfera de integração. A medição foi realizada segundo o protocolo recomendado pelo fabricante.

Na fita Transpore® (50 cm²), colocada diretamente sobre o suporte do equipamento (Figura 18), são aplicados 110 mg da amostra estudada, para formação de um filme uniforme de 2 mg/cm². Após a aplicação, as fitas foram deixadas para secar por 15 minutos sem exposição direta à luz.



Figura 18. Suporte do equipamento Optometrics SPF 290S com a fita Transpore®.

Em seguida, o suporte é introduzido diretamente no aparelho, e as leituras são realizadas pela emissão da radiação ultravioleta gerada por uma lâmpada de Xenônio, com comprimento de onda no intervalo de 290 a 400 nm, possibilitando, assim, a determinação do FPS. As medições são feitas em doze pontos da fita. As amostras foram avaliadas em triplicata.

O espectrofotômetro com esfera de integração mede a absorção óptica do fotoprotetor e, a partir dos valores obtidos nos comprimentos de onda da faixa do UV, calcula matematicamente o FPS do produto⁷⁰. O software (*winSPF*) acoplado ao equipamento detecta a absorbância transmitida e calcula os valores de FPS⁷¹.

Análise de Fator de Proteção Monocromático

O software utilizado, *WINSPF*, utiliza a seguinte equação para calcular o valor de FPS, após 12 medidas (Optometrics – *SPF Analyzer*, 2014)⁷²:

(2)

$$SPF_{SCAN} = \frac{\sum_{290}^{400} E\lambda B\lambda}{\sum_{290}^{400} \frac{E\lambda B\lambda}{MPF\lambda}}$$

Onde:

$MPF\lambda$ = valor da varredura

$E\lambda$ = radiação espectral da luz solar terrestre sob condições controladas

$B\lambda$ = eficácia contra eritema

Com base nessa equação, é possível observar que o Fator de Proteção Monocromático (MPF) influencia diretamente os resultados do FPS. O fator de proteção monocromática é obtido para comprimentos de onda entre 290nm e 400nm, sendo que cada leitura é feita pelo equipamento em intervalos de 5nm.

Os gráficos de MPF foram comparados entre as formulações com e sem óleo de café verde, pois contribuições em regiões do espectro UV fora da região de interesse comercial podem resultar em um aumento significativo no valor do FPS, sem que a proteção solar oferecida à pele seja realmente aumentada. Uma vez que o FPS é diretamente proporcional a uma somatória, o aumento do MPF em comprimentos de onda

diferentes daqueles em que os filtros da formulação absorvem, resultariam em um FPS mais alto, porém, não necessariamente, na proteção adequada contra a radiação.

Cromatografia em Coluna

Material

acetato de etila 99,5% (analítico) ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$) (Merck)

acetona (CH_3COCH_3) (Fluka analytical)

coluna cromatográfica com reservatório para solvente (2,5X45 cm)

hexano 98,7% (analítico) ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$) (Merck)

óleo de café verde (Coxupé)

metanol 99,8% (analítico) (CH_3OH) (Sigma-Aldrich)

sílica gel (SiO_2) com partículas de 40-63 μm , 230-400 mesh e poros de 60 Å

Método

A solubilidade do óleo de café verde foi testada para as fases móveis: hexano, acetato de etila, metanol e acetonitrila, sendo a maior afinidade observada para hexano e acetato de etila, os quais foram selecionados para compor a fase móvel (eluentes).

Em uma capela de exaustão, a coluna foi colocada em suporte metálico e empacotada, sendo, para isso, utilizados 85 gramas de sílica gel, como fase estacionária, umedecidos em hexano.

Após a compactação da sílica, foram aplicados 7 ml de óleo de café verde no topo da coluna e foi iniciada a eluição de solventes, do menos polar para o mais polar. Foram utilizados 150 ml de cada fase móvel (Tabela 9).

Tabela 9. Constituição da fase móvel (v/v) da cromatografia em coluna.

Solvente 1	% do solvente 1	Solvente 2	% do solvente 2
Hexano	100	-	-
Hexano	90	Acetato de Etila	10
Hexano	85	Acetato de Etila	15
Hexano	80	Acetato de Etila	20
Hexano	75	Acetato de Etila	25
Hexano	70	Acetato de Etila	30
Hexano	65	Acetato de Etila	35
Hexano	60	Acetato de Etila	40
Hexano	55	Acetato de Etila	45
Hexano	50	Acetato de Etila	50
Hexano	45	Acetato de Etila	55
Hexano	40	Acetato de Etila	60
Hexano	35	Acetato de Etila	65
Hexano	30	Acetato de Etila	70
Hexano	25	Acetato de Etila	75
Hexano	20	Acetato de Etila	80
Hexano	15	Acetato de Etila	85
Hexano	10	Acetato de Etila	90
-	-	Acetato de Etila	100
Acetona	50	Acetato de Etila	50
Acetona	75	Acetato de Etila	25
Acetona	100	-	-
Metanol	100	-	-

As frações do óleo de café verde foram coletadas em erlenmeyers de capacidade para 150 ml e deixadas na capela de exaustão até a completa evaporação do solvente presente na amostra.

Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Material

acetato de etila 98,2% (analítico)

capilares de vidro

clorofórmio 99,4% (analítico) (CHCl_3)

hexano 98,7% (analítico)

placas de sílica gel sobre placa de alumínio

Método

A análise por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foi realizada em placa de sílica gel (Silica G TLC Plates w/UV254) de 200 μm de espessura.

As frações não oleosas coletadas na cromatografia líquida de coluna aberta foram solubilizadas em acetato de etila e aplicadas a 0,5 cm da base da placa com o auxílio de um capilar de vidro, distanciando 1 cm da aplicação de cada amostra.

A cuba foi saturada utilizando 20 ml de uma mistura de clorofórmio e acetato de etila, como eluente (50:50 v/v).

A placa (Figura 19) foi acomodada na cuba até a quase completa eluição dos solventes e, após secagem, foi observada sob luz UV, a fim de que fossem comparadas as frações coletadas e constatar se, realmente, havia ocorrido a separação e se as frações eram semelhantes entre si.

Posteriormente, foram feitas duas novas placas, pois as frações possuíam polaridades muito diferentes. Desse modo, as frações menos polares foram aplicadas em uma placa de sílica e eluídas com uma mistura de hexano e acetato de etila (70:30 v/v) e, as frações mais polares, aplicadas em uma placa de sílica e eluídas com uma mistura de clorofórmio e acetato de etila (90:10 v/v) e observadas sob luz UV.



Figura 19. Placa de sílica gel com as frações F3 à F7 a serem analisadas.

Avaliação da interação das frações do óleo de café verde com os filtros

Material

acetato de etila (Merck)

fita Transpore® 3M

Método

As frações coletadas na cromatografia de coluna foram solubilizadas em acetato de etila e incorporadas nas emulsões bases contendo os filtros que apresentaram interação com o óleo de café verde.

A solubilização das frações foi realizada para obtenção de concentração de 3% da formulação base.

As medidas de FPS foram realizadas como na metodologia citada anteriormente no tópico “Avaliação do Fator de Proteção Solar”.

Análise das frações por *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*

Material

água milli-Q

acetonitrila 99,8% (analítico) (CN_3CN) (Merck)

clorofórmio 99,4% (analítico) (CHCl_3) (Fluka)

metanol 99,8% (analítico) (CH_3OH) (Fluka)

padrão de ácido cafeico

padrão de ácido clorogênico

padrão de ácido ferúlico

padrão de sitosterol

Método

As frações que interagiram com os filtros foram analisadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência e comparadas aos padrões disponíveis no laboratório. Para isso, tais frações foram inicialmente submetidas ao processo de *clean up*, com o intuito de remover qualquer impureza presente na amostra.

O *clean up* foi feito, pela diluição as amostras a serem estudadas em clorofórmio e filtrando-as através de um cartucho de sílica.

Para registro dos *fingerprints* das frações, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência modo analítico, com quatro canais de bomba modelo PU-2089 (Jasco®), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos, modelo MD-2010 (Jasco®), contendo um injetor automático modelo AS-2055 (Jasco®). Foi usada uma coluna de fase reversa C18, modelo Luna C18 (Phenomenex®) de 250 x 4,6 mm d.i, com partículas de tamanho médio de 5 µm, com coluna de guarda de fase reversa RP18 (Phenomenex®) de 4 x 3 mm. A fase móvel foi composta por acetonitrila + ácido trifluoracético 0,05% e água miliQ + ácido trifluoracético 0,05%. O gradiente foi de 5-100% de acetonitrila (60 min).

As amostras foram previamente solubilizadas em metanol e filtradas em membrana Chromafil® Xtra com poros de 0,20 µm de diâmetro. Foram injetados, automaticamente, 10µl de cada amostra.

Identificação por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Material

clorofórmio 99,4% (analítico) (CHCl_3) (Fluka)

clorofórmio deuterado 99,9% (CDCl_3) (Sigma Aldrich)

Método

Os espectros de RMN 1D e 2D foram adquiridos em espectrômetro Bruker Avance III 600, equipado com uma sonda de detecção inversa de 5 mm, operando a 600 MHz para ^1H e a 150 MHz para ^{13}C , usando como referência o sinal do resíduo do solvente não-deuterado. O solvente utilizado na dissolução da amostra para obtenção dos espectros foi CDCl_3 (CIL®).

Resultados

Manipulação das emulsões

As emulsões base desenvolvidas apresentaram a viscosidade e a espalhabilidade desejadas para esse tipo de produto, além de sensorial agradável.

Quando levadas à centrifugação por 15 minutos a 3000 rpm, as formulações não sofreram separação de fases, o que é um indicativo de possível estabilidade.

Avaliação do Fator de Proteção Solar

Os valores obtidos no ensaio realizado pelo Optometrics SPF 290 estão expressos na Tabela 10, junto aos seus respectivos FPSs teóricos, segundo o *BASF – Sunscreen Simulator*⁴⁵.

Tabela 10. Valores de FPS (Fator de Proteção Solar) de acordo com o BASF – Sunscreen Simulator e Optometrics SPF 290S.

Formulações*	FPS BASF – Sunscreen Simulator	FPS Optometrics SFP 290± DP**
emulsão 1 sem filtros	-	0,97 ± 0,02
emulsão 1 + filtros A	15	22,46 ± 1,95
emulsão 1 + filtros B	20	34,36 ± 4,92
emulsão 1 + filtros C	20	29,08 ± 2,60
emulsão 1 + filtros D	20	35,77 ± 7,06
emulsão 1 + filtros E	20	41,33 ± 4,06
emulsão 2 sem filtros	-	1,6 ± 0,03
emulsão 2 + filtros A	-	30,45 ± 3,37
emulsão 2 + filtros B	-	51,94 ± 6,68
emulsão 2 + filtros C	-	42,83 ± 3,57
emulsão 2 + filtros D	-	50,94 ± 3,36
emulsão 2 + filtros E	-	63,56 ± 6,09

*emulsão 1 – com óleo mineral. emulsão 2 – com óleo de café verde.

**Média de 36 medidas de cada amostra ± desvio padrão.

As medidas dos FPS obtidos pelo equipamento Optometrics permitiram fazer uma comparação entre as formulações originais e as adicionadas com óleo de café verde. As médias foram comparadas e a diferença estatística pode ser observada no gráfico da Figura 20.

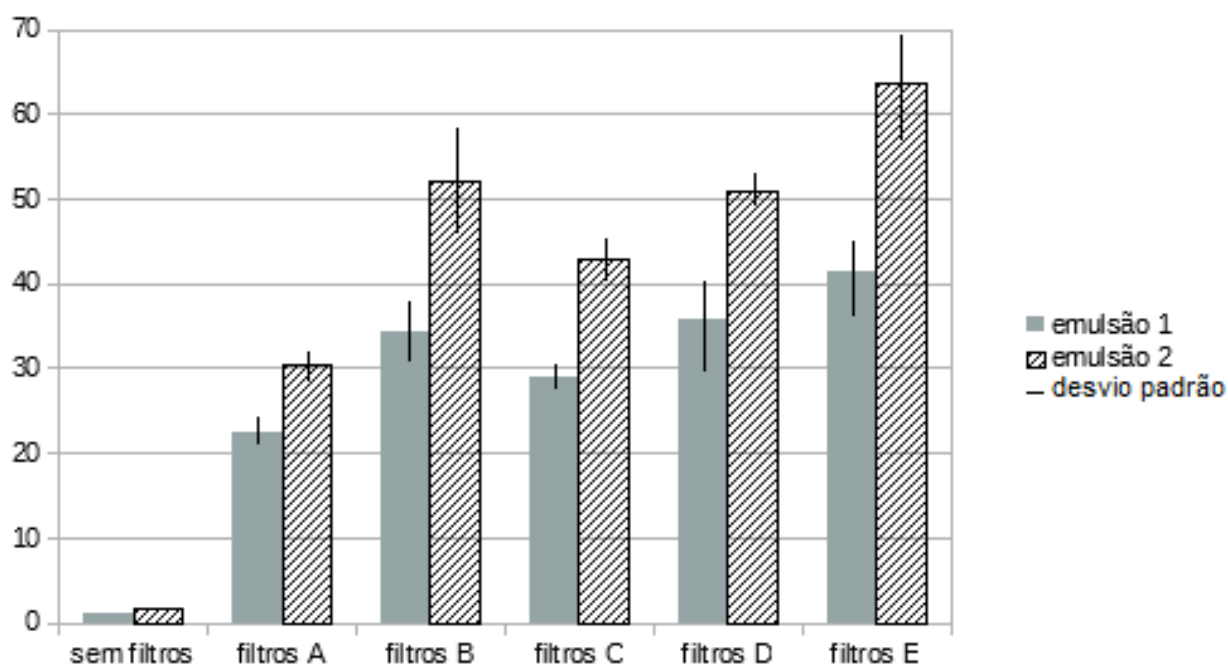


Figura 20. Comparação do FPS das emulsões 1 e 2 com as misturas de filtros A, B, C, D e E.

A Tabela 11 apresenta o aumento percentual do FPS produzido pela interação entre o óleo de café verde e os filtros contidos nas formulações.

Tabela 11. Aumento percentual do Fator de Proteção Solar das emulsões causado pela incorporação do óleo de café verde.

Filtros	FPS* da emulsão 1	FPS* da emulsão 2	Aumento (%)
A	22,46	30,45	35,57
B	34,36	51,94	51,16
C	29,08	42,83	47,28
D	35,77	50,94	42,41
E	41,33	63,56	53,78

O óleo de café verde proporcionou um aumento médio de 46,04% no fator de proteção solar das emulsões.

Avaliação dos Gráficos de MPF

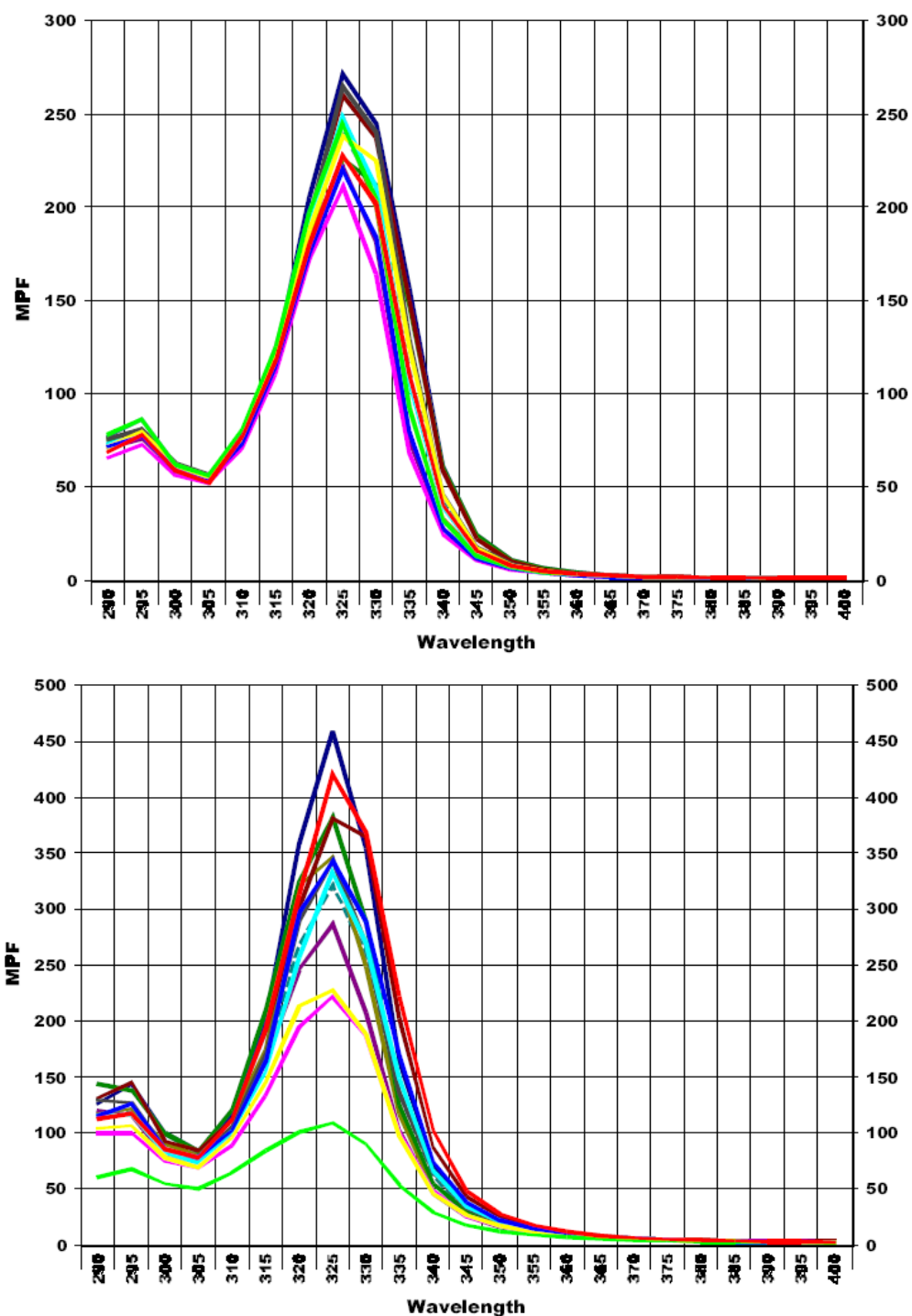


Figura 21. Gráficos de MPF das emulsões 1 e 2, respectivamente, com os filtros da combinação A (benzophenone-3, ethyl hexyl metoxicinnamate e ethyl hexyl salicilate).

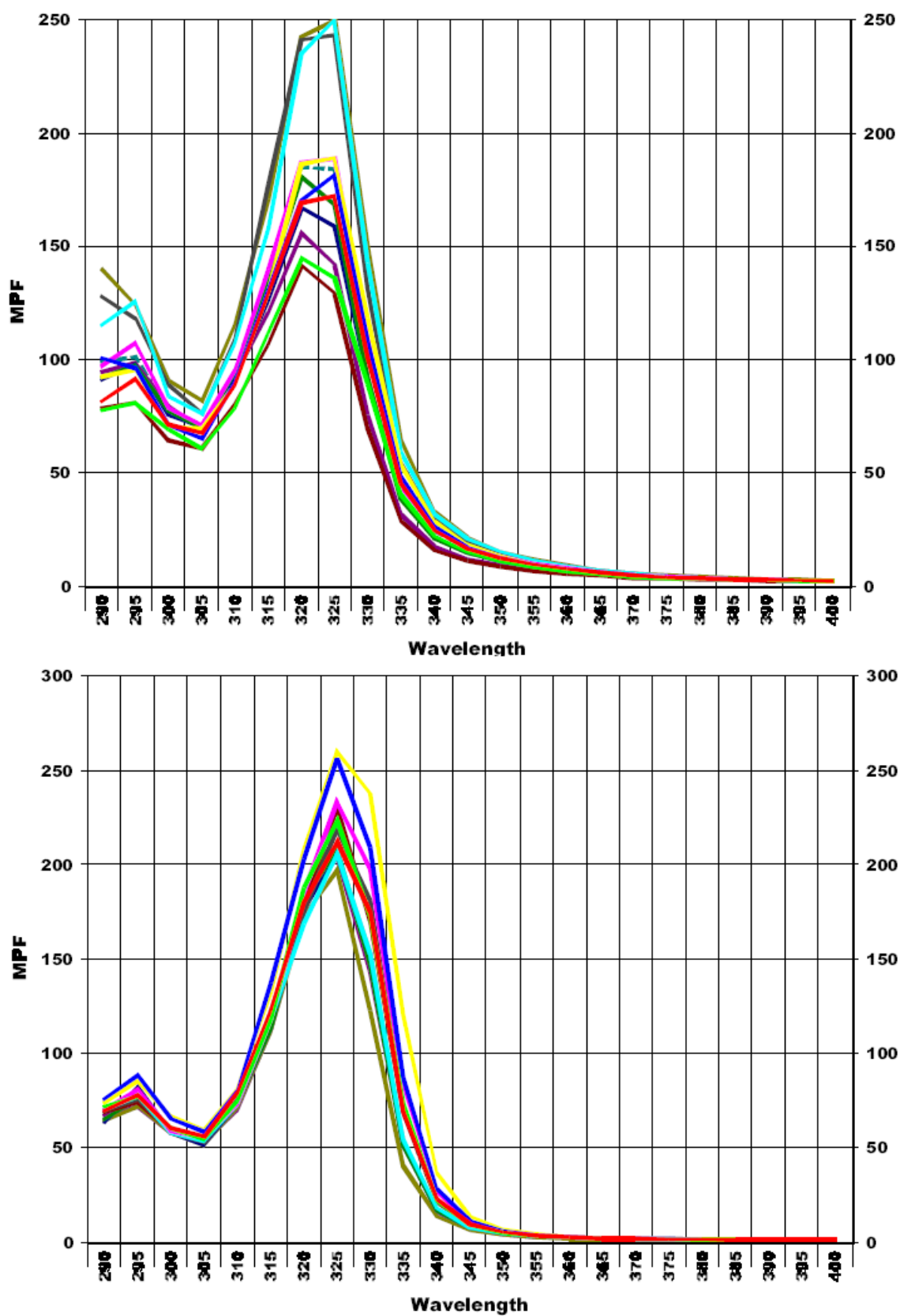


Figura 22. Gráficos de MPF das emulsões 1 e 2, respectivamente, com os filtros da combinação B (isoamyl metoxicinnamate e TiO₂).

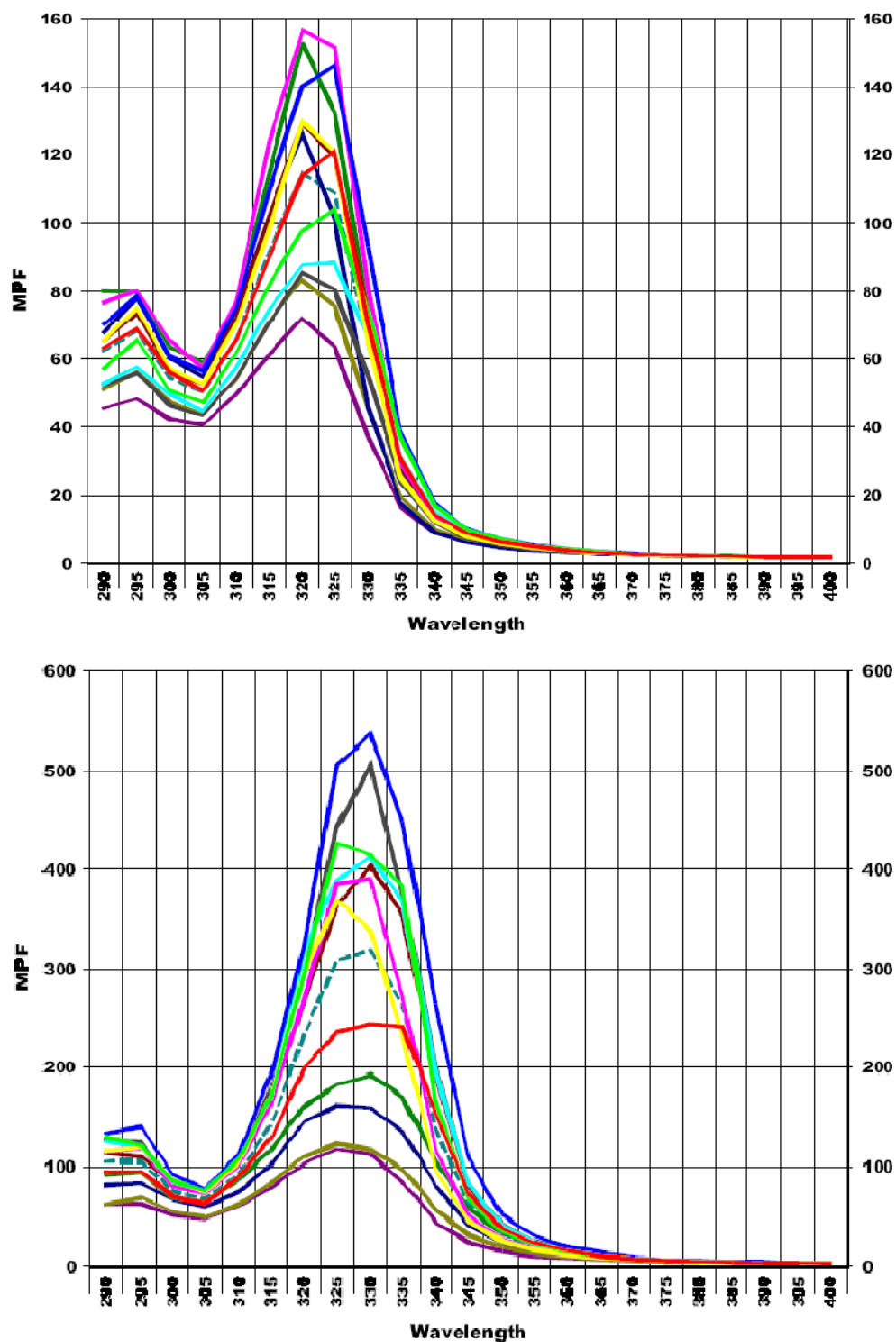


Figura 23. Gráficos de MPF das emulsões 1 e 2, respectivamente, com os filtros da combinação C (TiO₂, isoamyl metoxicinnamate e ethyl hexyl salicilate).

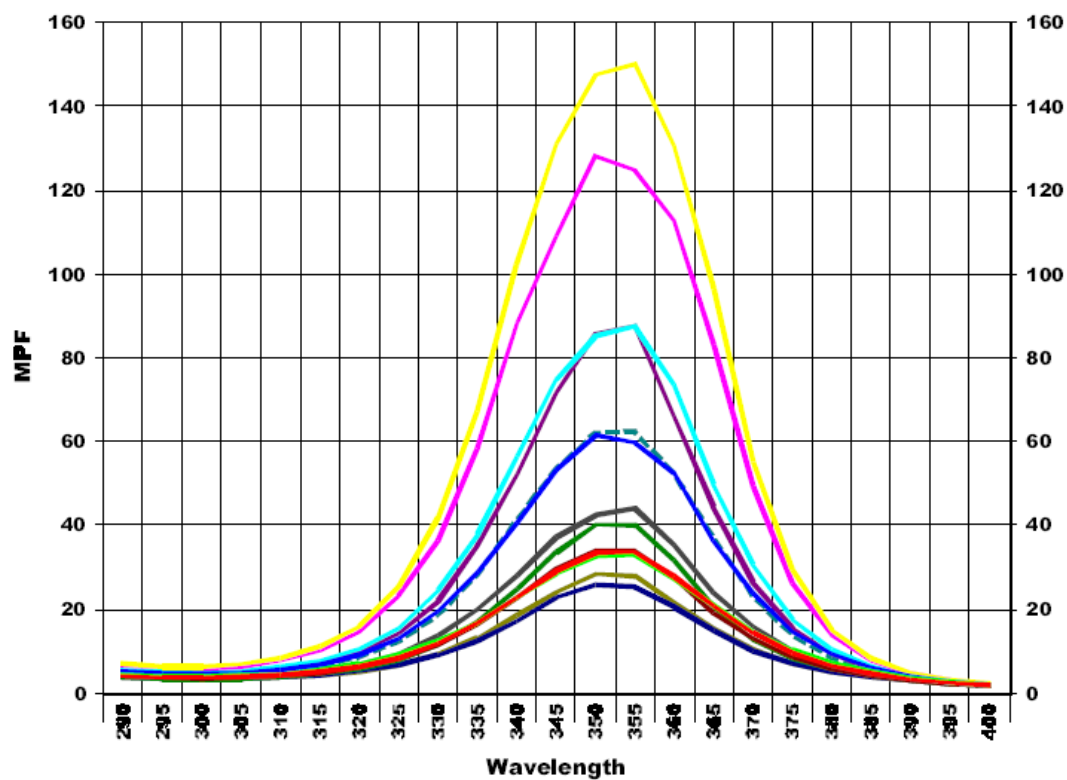
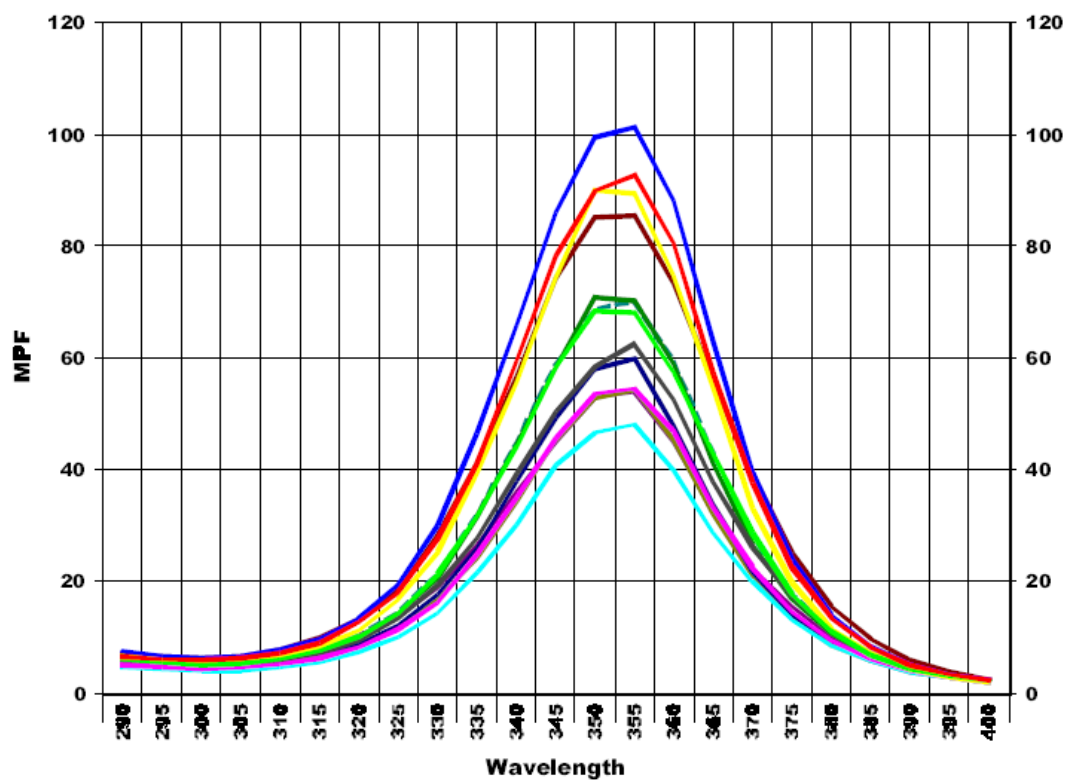


Figura 24. Gráficos de MPF das emulsões 1 e 2, respectivamente, com aos filtros da combinação E (bemotrizinol, diethylamine hydroxybenzoyl hexyl benzoate, ethyl hexyl metoxycinnamate e benzophenone-3).

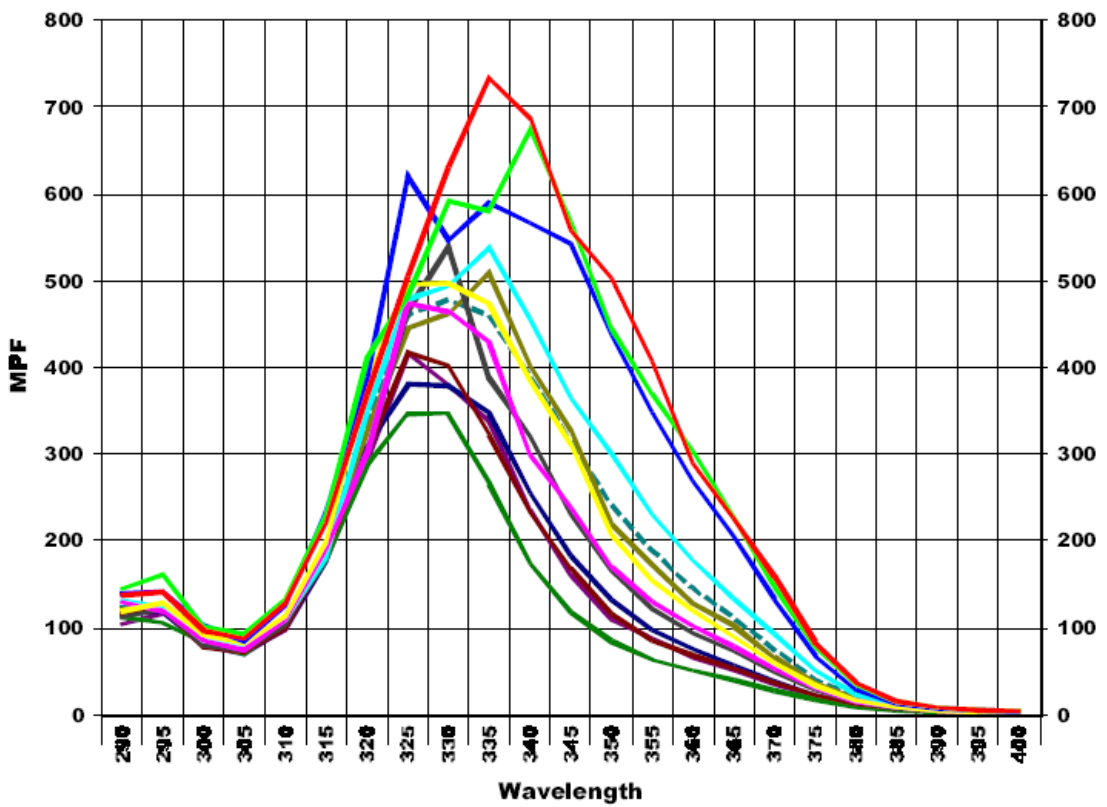
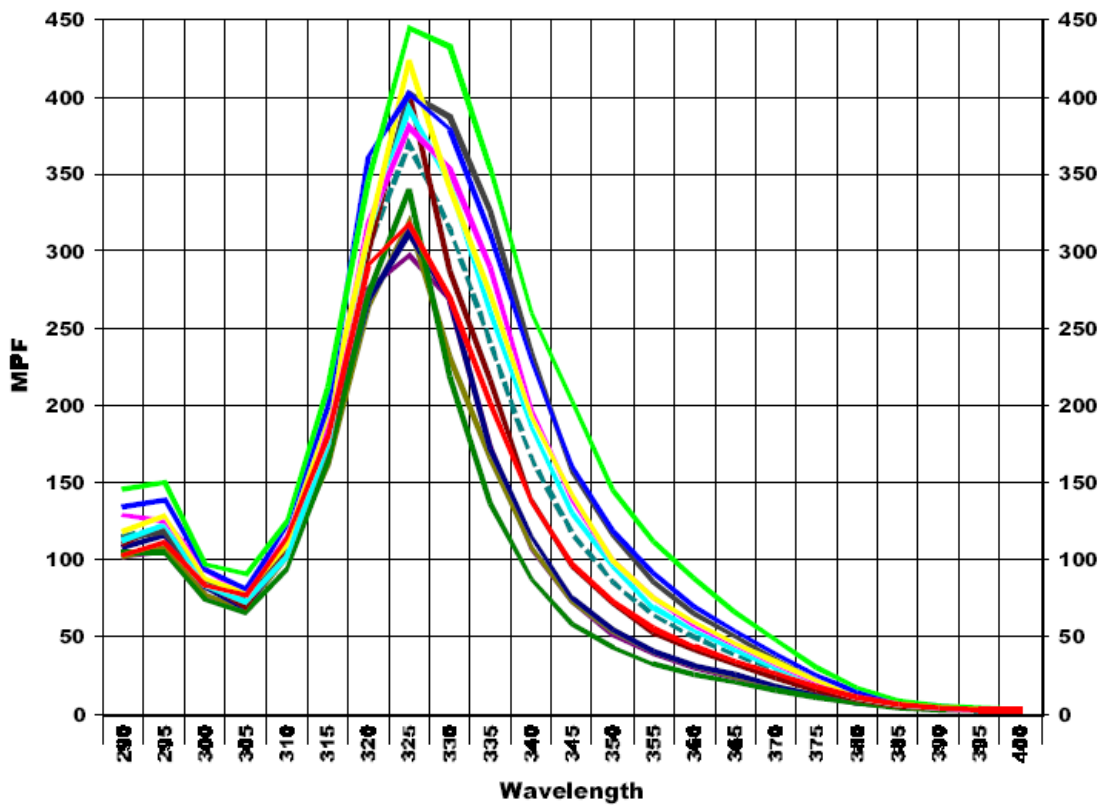


Figura 25. Gráficos de MPF das emulsões 1 e 2, respectivamente, com aos filtros da combinação D (bemotrizinol, ethyl hexil triazone, ethyl hexyl metoxicinnamate e benzophenone-3).

Os filtros avaliados individualmente apresentaram os Fatores de Proteção Solar indicados na Tabela 12.

Tabela 12. Valores de FPS (Fator de Proteção Solar) de acordo com o equipamento Optometrics SPF 290S para os filtros solares avaliados individualmente.

Filtro	FPS emulsão 1 ± DP	FPS emulsão 2 ± DP
BP-3	4,52 ± 0,61	11,86 ± 3,12
EHMC	12,70 ± 1,17	13,62 ± 0,77
IMC	10,64 ± 1,13	11,43 ± 1,10
EHS	1,64 ± 0,12	5,61 ± 0,80
BEMT	11,02 ± 4,73	18,40 ± 4,60
EHT	5,30 ± 1,17	9,13 ± 0,60
DHHB	5,40 ± 1,61	6,60 ± 1,02

*emulsão 1 – sem óleo de café verde. Emulsão 2 – com óleo de café verde.

**Média de 12 medidas para cada filtro ± desvio padrão.

As médias foram estatisticamente significativas para as formulações contendo benzophenone-3(BP-3), ethyl hexyl salicylate (EHS), bemotrizinol (BEMT), diethylamine hidroxybenzoyl hexyl benzoate (DHHB), como é possível observar no gráfico da Figura 26.

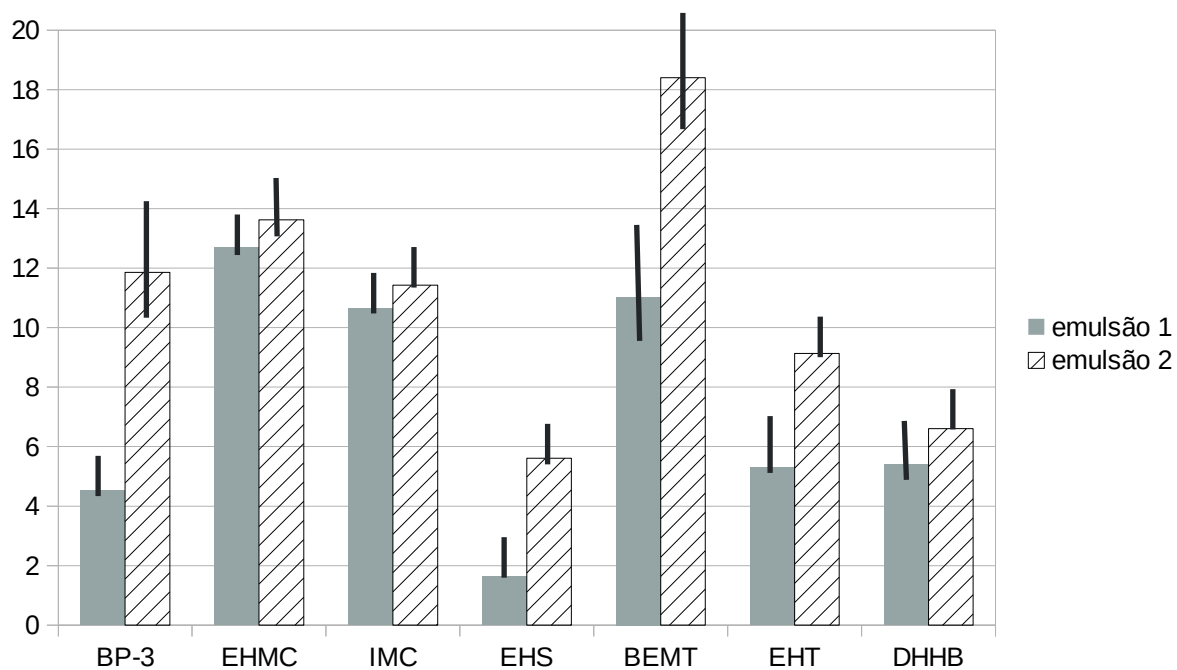


Figura 26. Comparação entre os FPS das emulsões 1 e 2 contendo os filtros isoladamente.

Cromatografia em Coluna

Foram separadas 14 frações do óleo de café verde, sendo, a primeira delas, coletada com a mistura de eluentes hexano e acetato de etila (80:20 v/v).

A velocidade média de fluxo das eluições foi de 3ml por minuto.

As frações foram nomeadas de acordo com a ordem em que foram coletadas.

As massas das frações obtidas então apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13. Frações do óleo de café verde obtidas, composição da fase móvel em que foram obtidas e suas respectivas massas (g).

Fração do óleo	Eluïntes (v:v)	Massa (g)
F1	hexano e acetato de etila (80:20)	3,836
F2	hexano e acetato de etila (75:25)	2,086
F3	hexano e acetato de etila (70:30)	0,129
F4	hexano e acetato de etila (65:35)	0,099
F5	hexano e acetato de etila (60:40)	0,061
F6	hexano e acetato de etila (55:45)	0,061
F7	hexano e acetato de etila (50:50)	0,077
F8	hexano e acetato de etila (40:60)	0,055
F9	hexano e acetato de etila (30:70)	0,020
F10	acetato de etila	0,017
F11	acetona e acetato de etila (50:50)	0,014
F12	acetona e acetato de etila (75:25)	0,031
F13	acetona e acetato de etila (50:50)	0,029
F14	metanol	0,034

A coloração das frações era visualmente diferente, oscilando entre tons de amarelo e castanho, tal como ilustrado na Figura 27.



Figura 27. Frações do óleo de café verde: F8 a F14.

Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDC)

As Figuras 28, 29 e 30 mostram as placas de sílica nas quais as frações do óleo foram aplicadas sob iluminação de uma lâmpada de UV.

Na Figura 39, é possível observar todas as frações não oleosas (F3 a F14) aplicadas na placa, eluída com a mistura de clorofórmio e acetato de etila (50/50 v/v).

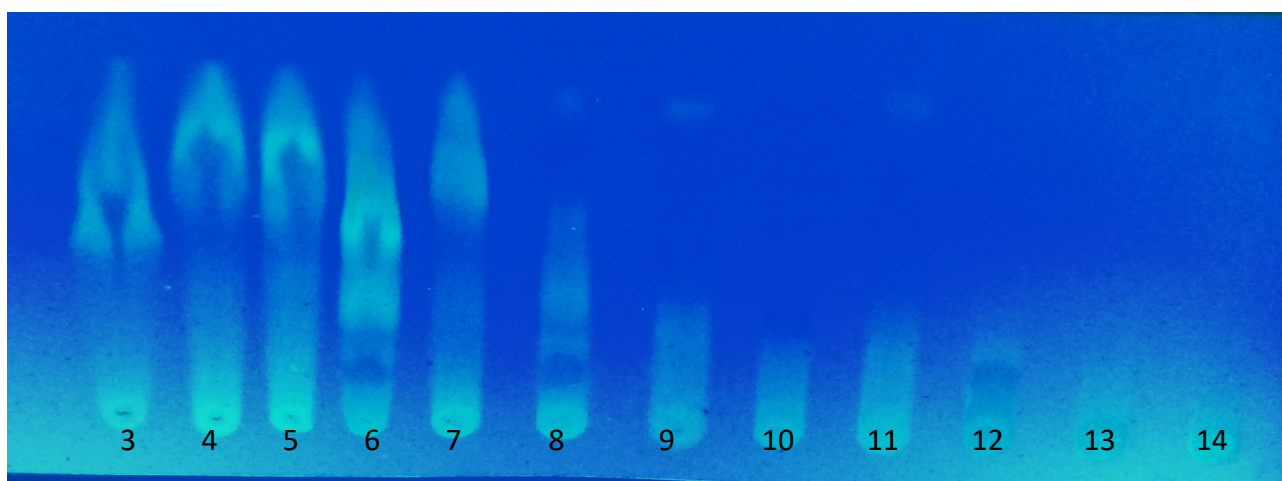


Figura 28. Análise por CCD frações de óleo de café verde [gel de sílica, eluída com clorofórmio e acetato de etila (50/50 v/v), luz UV $\lambda = 254$ nm].

Para uma melhor comparação, as frações iniciais, F3, F4, F5, F6 e F7, foram aplicadas em uma nova placa de sílica e eluídas com uma mistura de hexano e acetato de etila (70:30 v/v). A Figura 29 mostra tais frações sobre luz UV em dois comprimentos de onda diferentes.

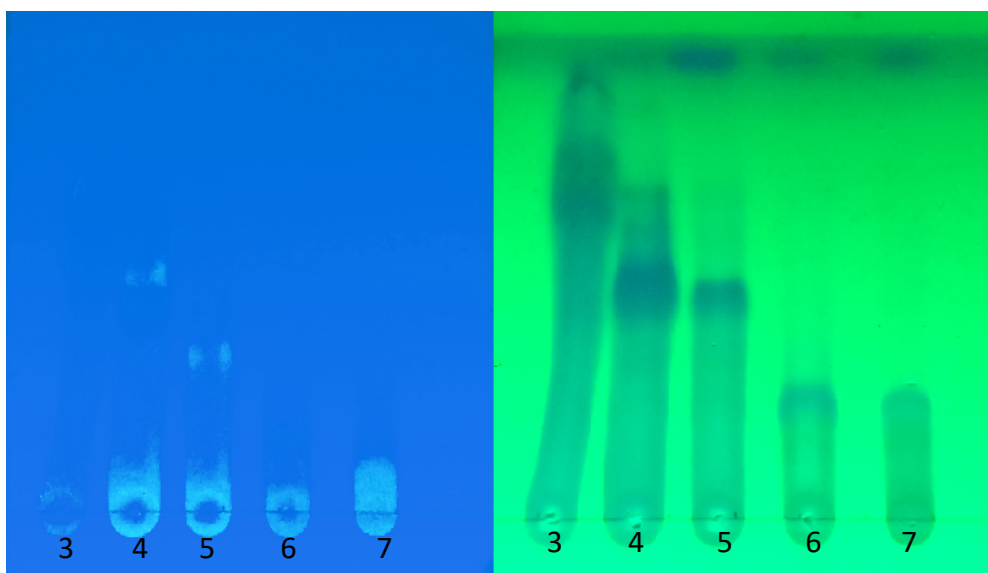


Figura 29. Análise por CCD das frações codificadas de F3-F7 [gel de sílica, eluída com hexano e acetato de etila (70:30 v/v)].

As demais frações, F8 a F14, foram aplicadas em uma placa de sílica e eluídas com uma mistura de clorofórmio e acetato de etila (90:10 v/v). A Figura 30 mostra a placa sob a observação em luz UV.

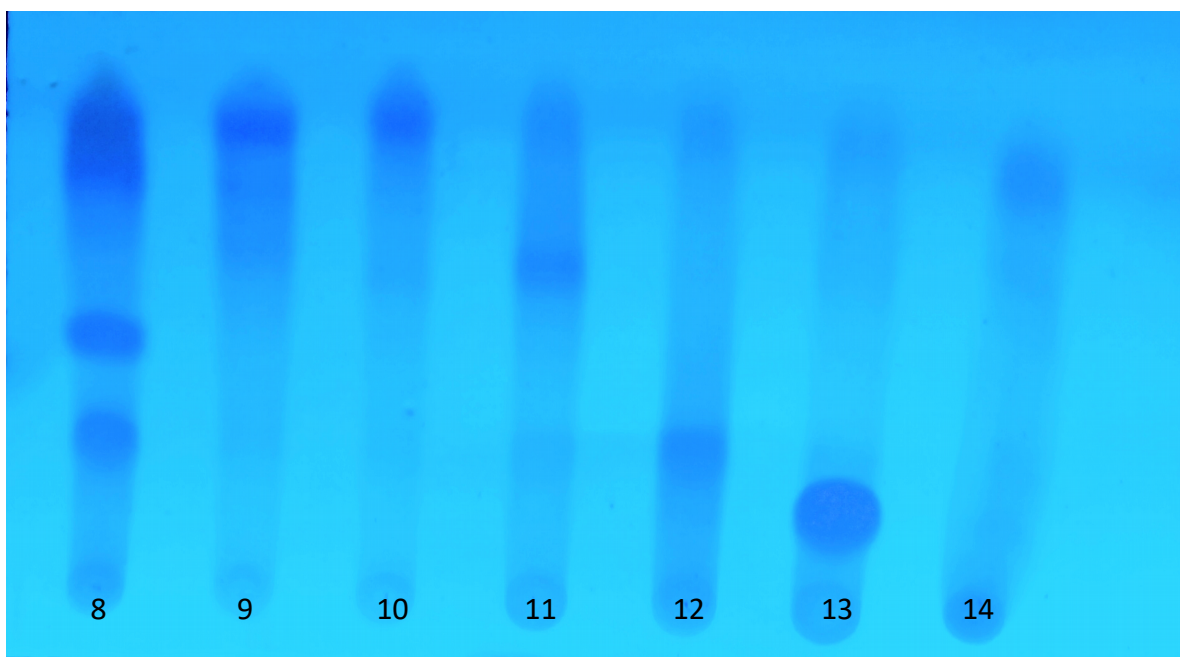


Figura 30. Análise por CCD das frações codificadas de F8-F14 [gel de sílica, eluída com clorofórmio e acetato de etila (90:10 v/v)].

Avaliação da interação das frações do óleo de café verde com os filtros

Os valores de FPS obtidos pelo equipamento Optometrics SPF 290S, bem como seus desvios padrão, estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Valores de FPS (Fator de Proteção Solar) de acordo com o equipamento Optometrics SPF 290S para os filtros solares adicionados das frações do óleo de café verde

Fração	BF-3 FPS+dp	BEMT FPS+dp	EHT FPS+dp	EHS FPS+dp
Sem óleo	4,52 ± 0,61	11,02 ± 4,73	5,30 ± 1,17	1,64 ± 0,12
Com óleo	11,86 ± 3,12	18,40 ± 4,60	9,13 ± 0,60	5,61 ± 0,80
F1	15,29 ± 4,18	17,55 ± 4,40	7,14 ± 0,44	5,63 ± 0,72
F2	15,11 ± 3,26	12,38 ± 6,55	6,42 ± 0,67	5,47 ± 0,58
F3	14,65 ± 3,05	18,10 ± 4,68	7,11 ± 0,96	5,05 ± 0,37
F4	20,89 ± 2,55	22,81 ± 2,63	6,77 ± 0,96	5,32 ± 0,43
F5	17,28 ± 3,58	28,36 ± 6,01	6,51 ± 0,66	4,81 ± 0,93
F6	19,30 ± 1,73	24,52 ± 6,23	7,55 ± 1,20	6,05 ± 0,96
F7	17,13 ± 4,4	19,49 ± 7,53	9,18 ± 0,97	6,03 ± 1,02
F8	16,03 ± 3,36	25,37 ± 5,41	8,77 ± 0,93	6,39 ± 1,20
F9	18,28 ± 4,42	17,4 ± 4,50	5,45 ± 0,32	7,23 ± 1,35
F11	19,83 ± 4,49	18,36 ± 5,18	7,01 ± 0,28	7,46 ± 0,70
F12	18,56 ± 3,28	23,87 ± 2,83	5,50 ± 0,46	7,37 ± 0,13
F13	18,38 ± 3,72	24,82 ± 4,12	5,81 ± 0,69	7,79 ± 0,96
F14	17,23 ± 2,46	19,19 ± 3,40	5,32 ± 0,46	6,85 ± 1,05
AcOEt	15,78 ± 3,22	17,32 ± 5,79	3,74 ± 1,21	6,07 ± 0,56

Os gráficos a seguir (Figuras 31, 32, 33 e 34) apresentam a comparação entre os FPSs médios obtidos para as amostras citadas acima, com intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$).

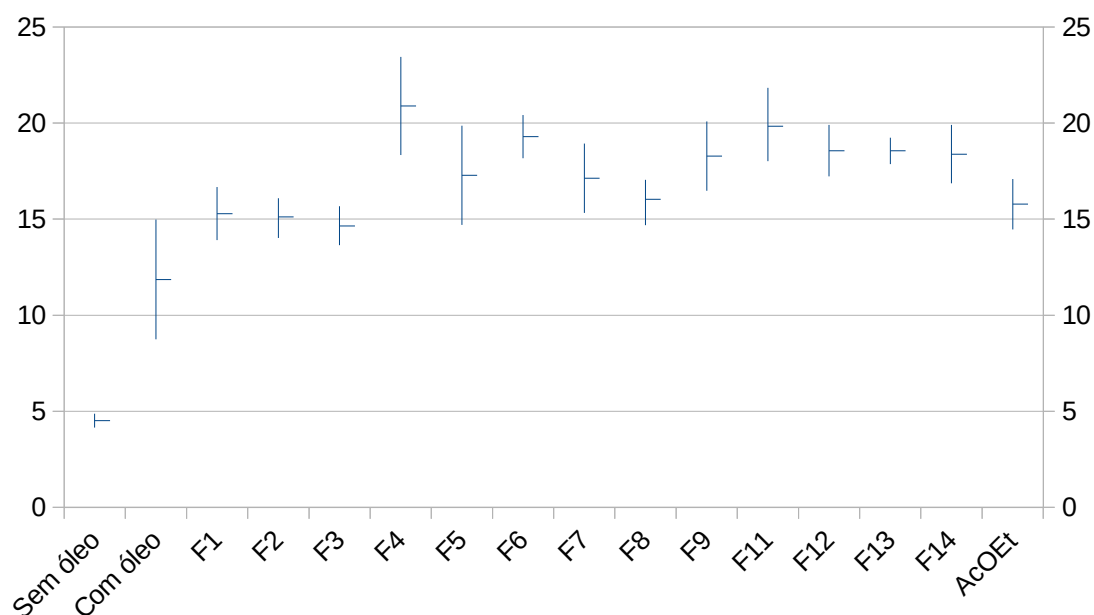


Figura 31. Gráfico de Intervalo de Confiança de 95% para o filtro BP-3 acionado das frações do óleo de café verde.

Para as emulsões contendo benzofenona-3, é possível afirmar, com base nos cálculos de intervalo de confiança, que todas amostras foram significativamente diferentes na amostra que não continha óleo de café verde. Quando comparadas à formulação com óleo de café verde, o aumento foi significativo para as frações F4, F6, F7, F9, F 11, F12, F13 e F14, e comparadas à formulação contendo acetato de etila, o aumento do FPS das formulações foi significativo para as frações F4, F6, F9, F11 e F12 e 13.

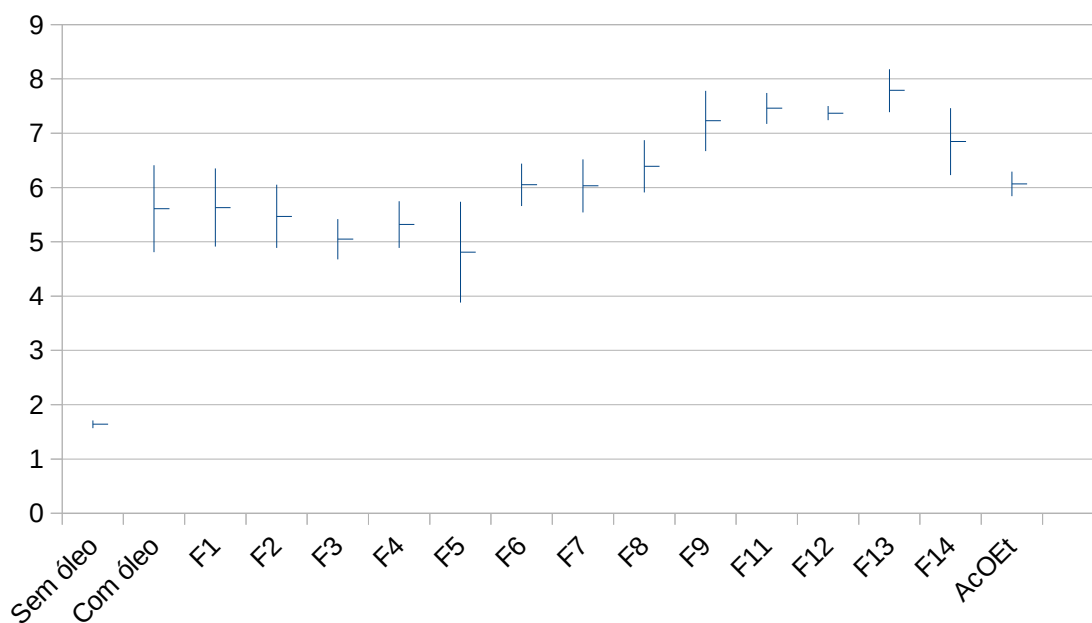


Figura 32. Gráfico de Intervalo de Confiança de 95% para o filtro EHS acionado das frações do óleo de café verde.

Para as emulsões contendo EHS, é possível constatar que todas as amostras apresentaram FPS médio maior do que a emulsão sem óleo de café verde, e quando comparadas à emulsão com óleo de café e às emulsões contendo acetato de etila, esse aumento foi observado para as frações F9, F11, F12 e F13.

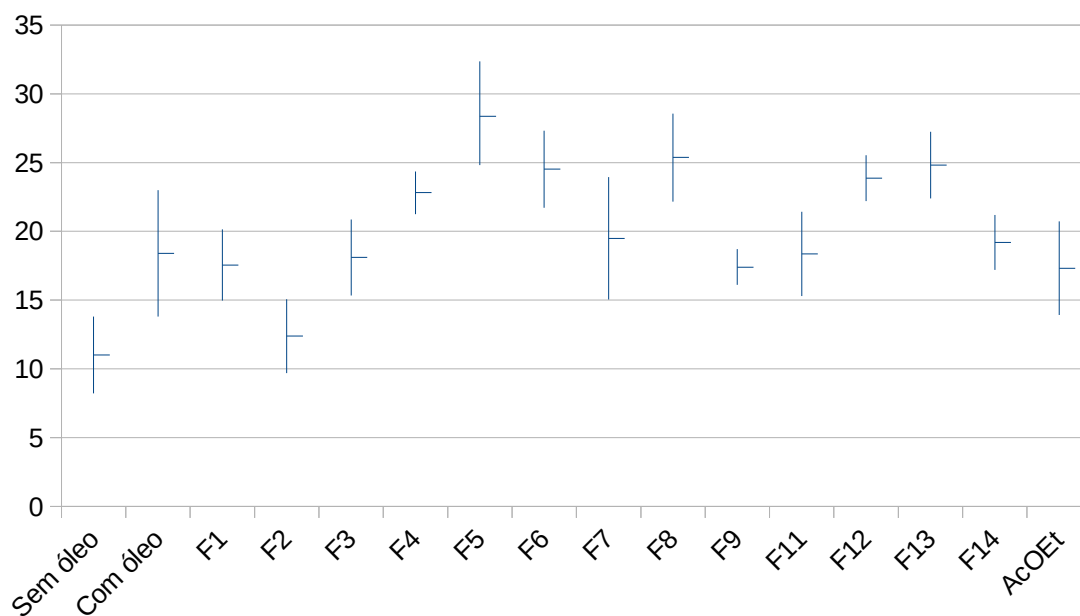


Figura 33. Gráfico de Intervalo de Confiança de 95% para o filtro BEMT acionado das frações do óleo de café verde.

Para o filtro solar BEMT, é possível observar que todas as frações apresentaram FPS médio maior do que a formulação sem óleo de café verde. Porém, comparadas à formulação com óleo de café verde ou acetato de etila, o aumento foi estatisticamente significativo apenas para as frações F4, F5, F8, F12 e F13.

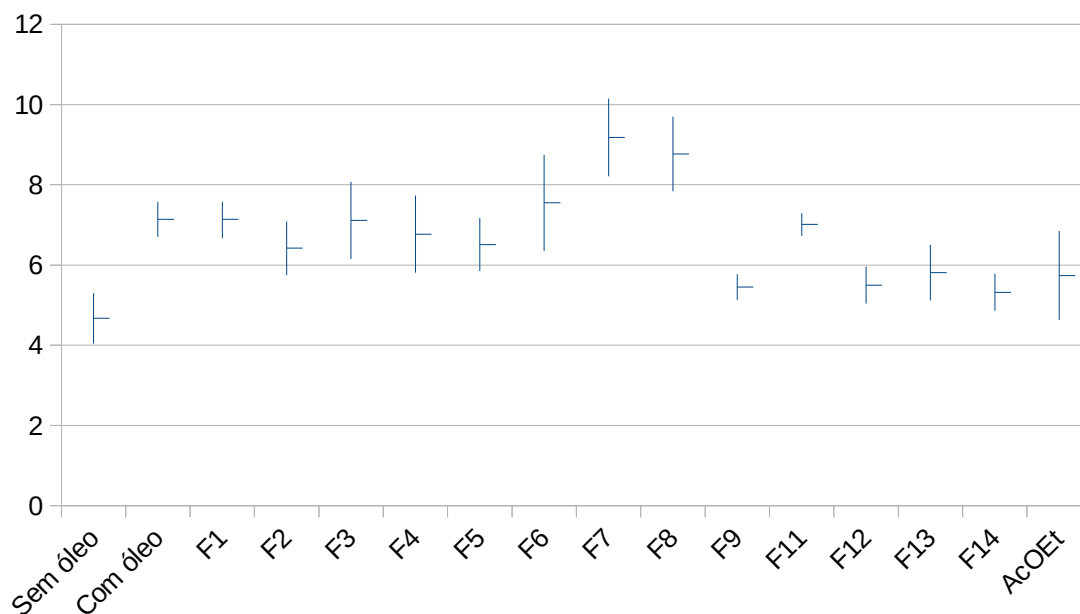


Figura 34. Gráfico de Intervalo de Confiança de 95% para o filtro EHT acionado das frações do óleo de café verde.

Para as formulações contendo o filtro EHT, é possível observar que o FPS médio de todas as formulações foi maior do que o da formulação sem óleo de café verde, e, comparadas às formulações com óleo de café ou com acetato de etila, o aumento significativo no fator de proteção solar para as frações F7 e F8.

Análise das frações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os cromatogramas das frações obtidas do óleo de café verde, consideradas capazes de aumentar o FPS dos filtros testados estão apresentados a seguir.

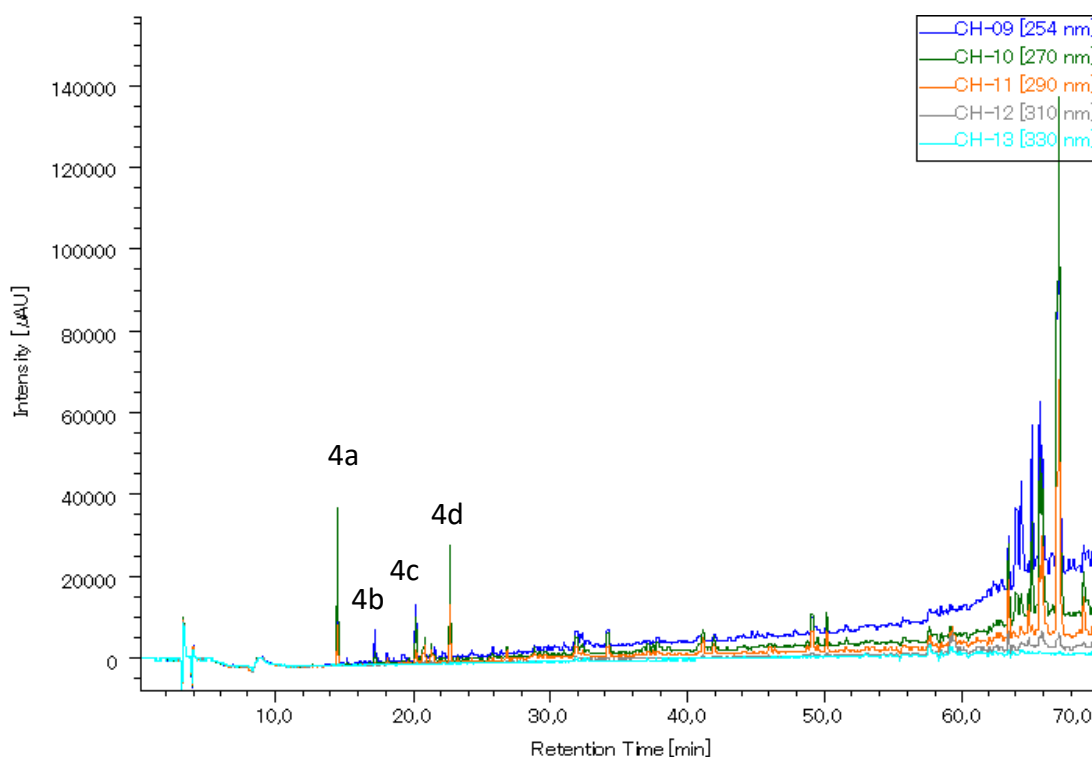


Figura 35. Cromatograma da fração F4 (Coluna Phenomenex® Luna C18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 μ m), λ = 254-330 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: ACN + TFA 0,05% (B) e H₂O + TFA 0,05% (A). Gradiente de 5-100% B (60 min), volume 10 μ L.

Na fração F4 foi possível observar a presença de 4 substâncias, denominadas F4a (tR – 14,50 min), F4b (tR – 17,16 min), F4c (tR – 20,78 min) e F4d (tR – 22,66 min).

A Figura 36 apresenta o espectro de absorção no UV das substâncias presentes na fração F4.

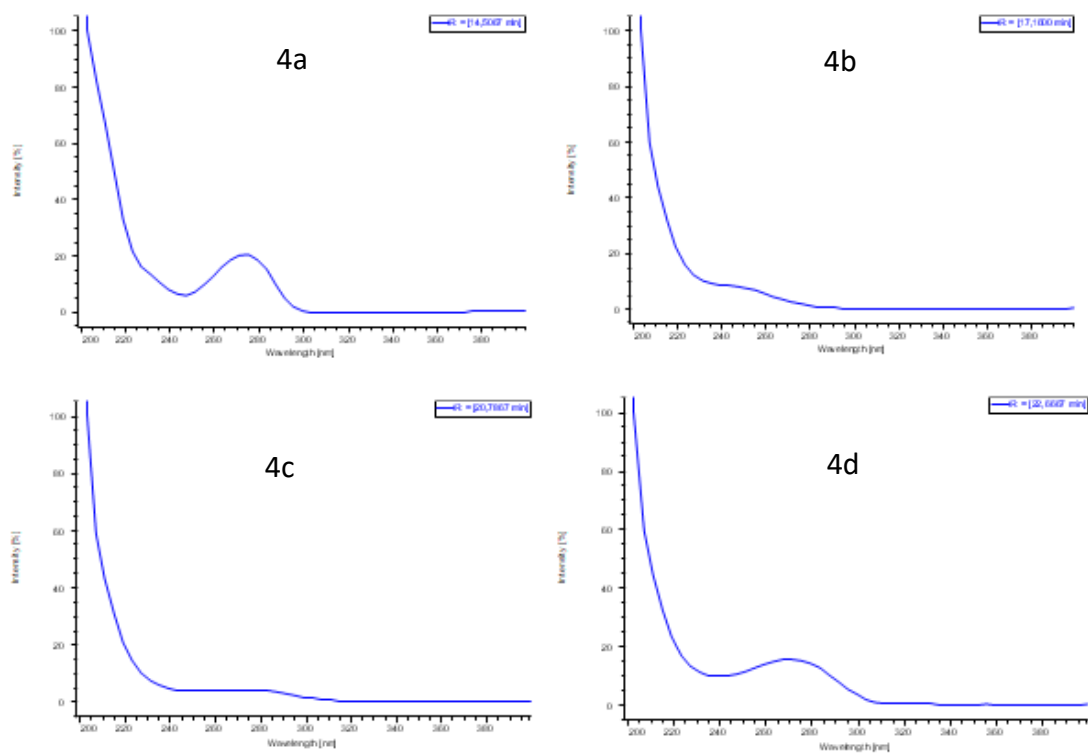


Figura 36. Espectros de absorção na região do UV das substâncias F4a, F4b, F4c e F4d, respectivamente.

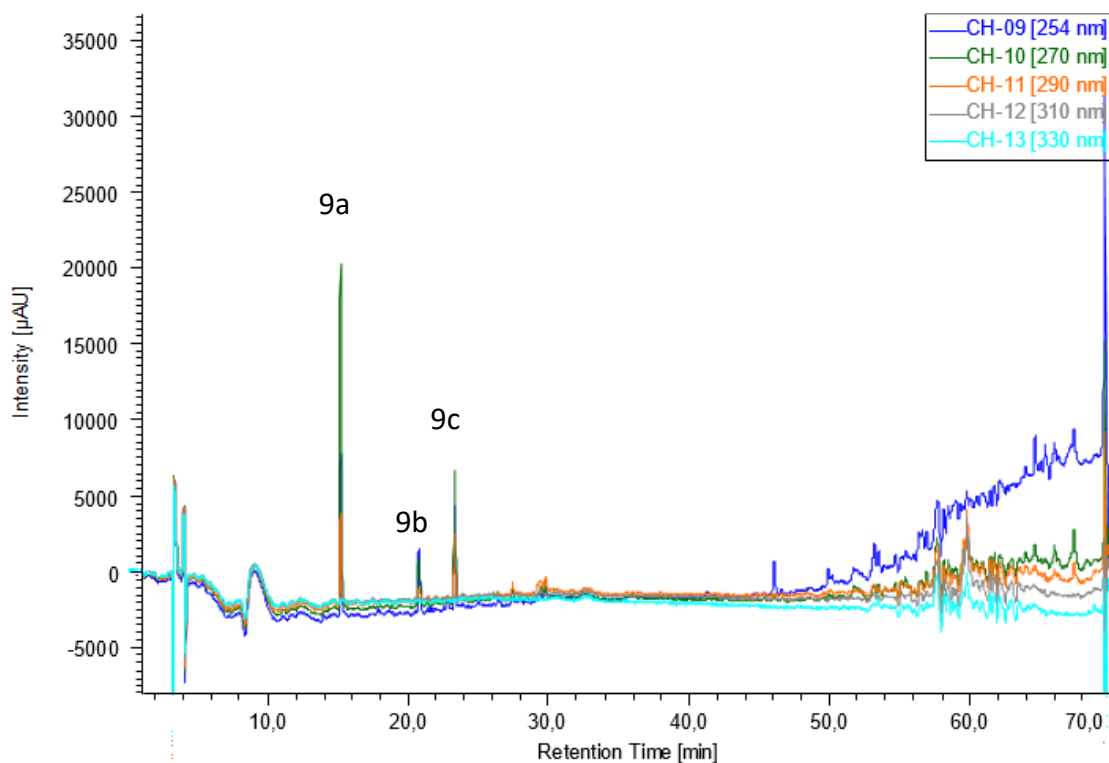


Figura 37. Cromatograma da fração F9 (Coluna Phenomenex® Luna C18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 μm), $\lambda = 254\text{-}330\text{ nm}$, vazão 1,0 mL/min. FM: ACN + TFA 0,05% (B) e H₂O + TFA 0,05% (A). Gradiente de 5-100% B (60 min), volume 10 μL .

Na fração F9 foi possível observar a presença de 3 substâncias, denominadas F9a (tR – 15,17 min), F9b (tR – 20,70 min) e F9c (tR – 23,26 min).

A Figura 38 apresenta o espectro de absorção no UV das substâncias presentes na fração F9.

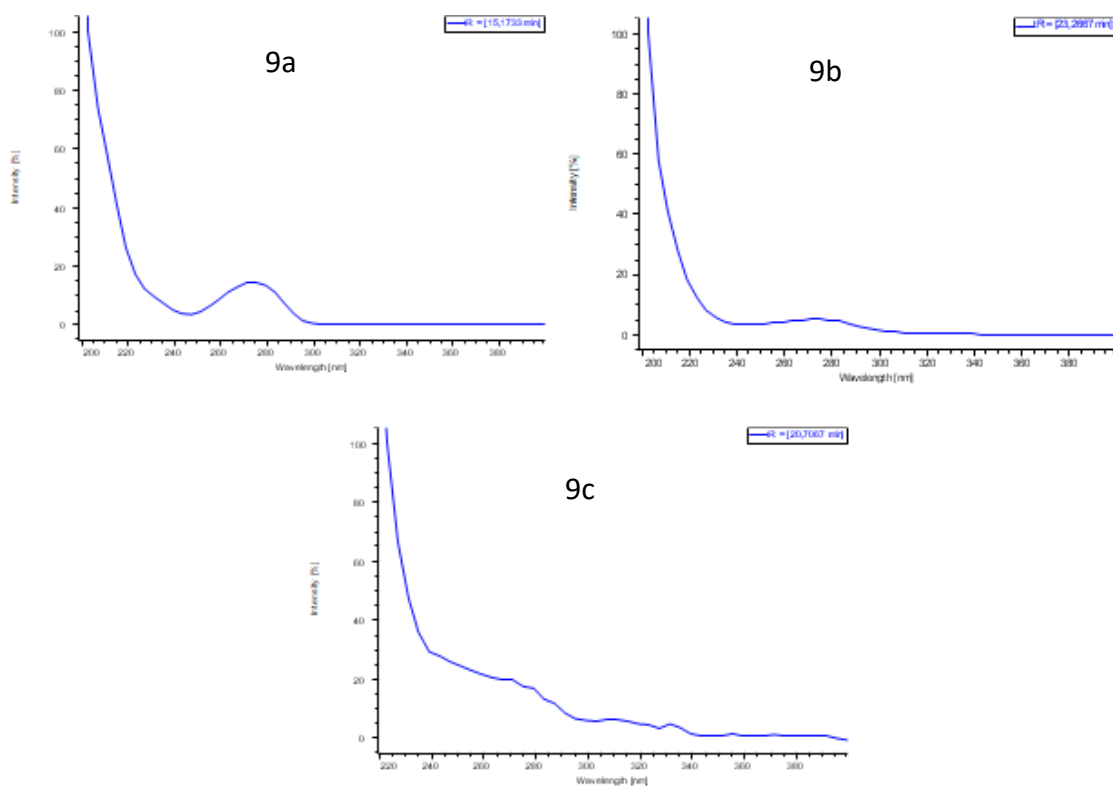


Figura 38. Espectros de absorção na região do UV das substâncias F9a, F9b e F9c, respectivamente.

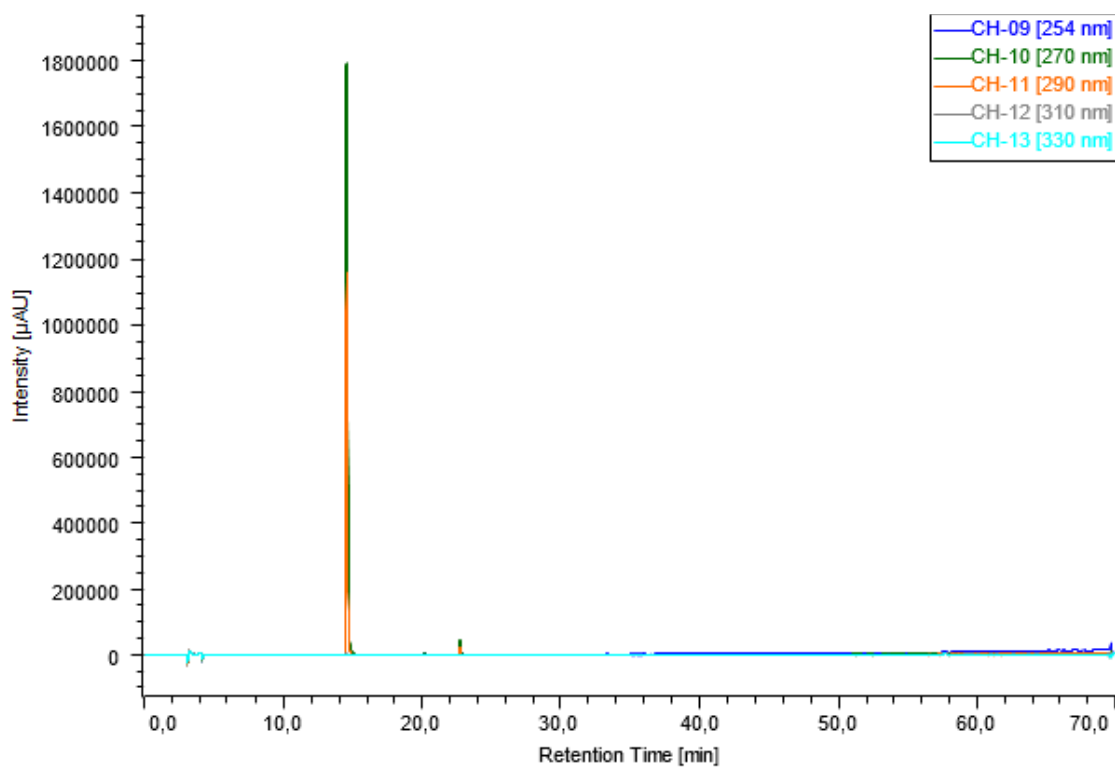


Figura 39. Cromatograma da fração F13 (Coluna Phenomenex® Luna C18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 μ m), λ = 254-330 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: ACN + TFA 0,05% (B) e H₂O + TFA 0,05% (A). Gradiente de 5-100% B (60 min), volume 10 μ L.

A fração F13 apresentou uma única substância, e seu espectro de absorção no UV está apresentado na Figura 51.

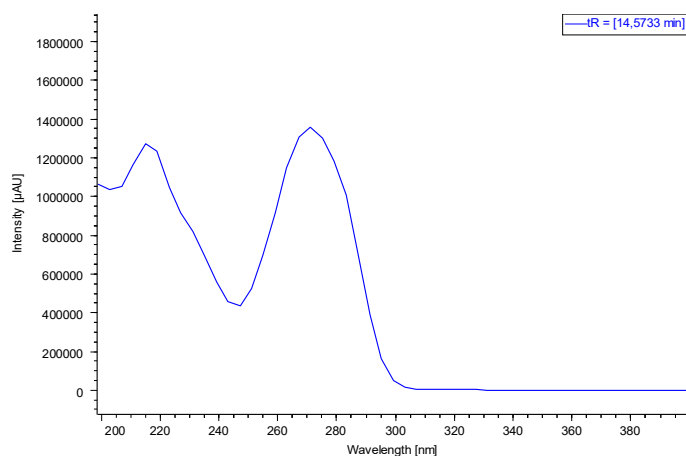


Figura 40. Espectros de absorção na região do UV das substâncias F13.

Identificação por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Por meio dos espectros de ^1H e ^{13}C , foi possível identificar a fração 13 como sendo cafeína ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$). As Figuras 41, 42, 43 e 44 apresentam os gráficos de ^1H e ^{13}C , os gráficos de contornos HSQC (Heteronuclear single quantum correlation) e HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) respectivamente.

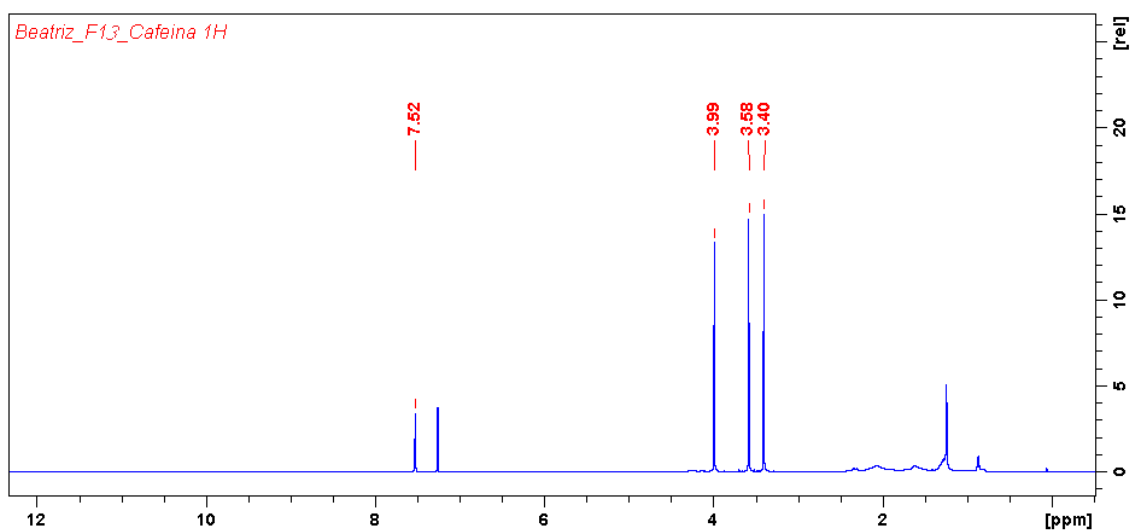


Figura 41. Espectro de RMN de ^1H da substância F13 (600 MHz, CDCl_3).

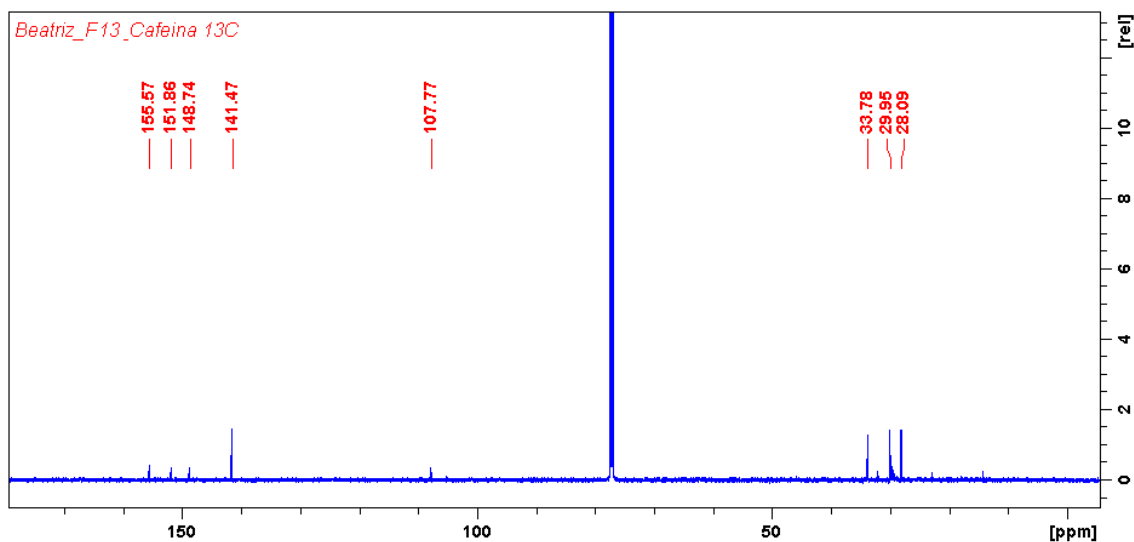


Figura 42. Espectro de RMN de ^{13}C da substância F13 (150 MHz, CDCl_3).

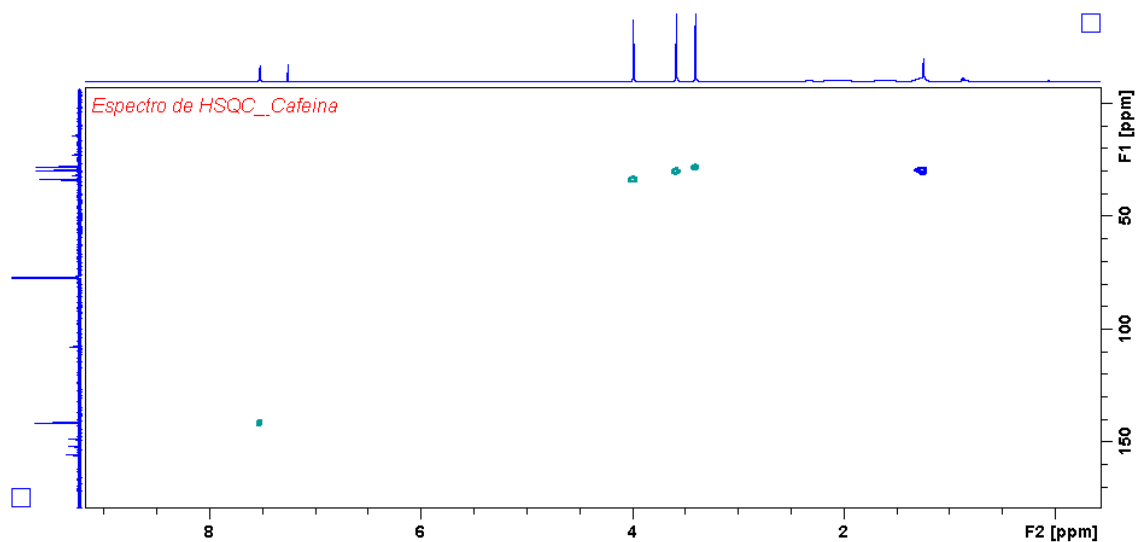


Figura 43. Mapa de contornos HSQC da substância F13 (600 e 150 MHz, CDCl₃).

O mapa de contorno HSQC permite fazer as correlações entre os hidrogênios e os carbonos aos quais estão diretamente ligados.

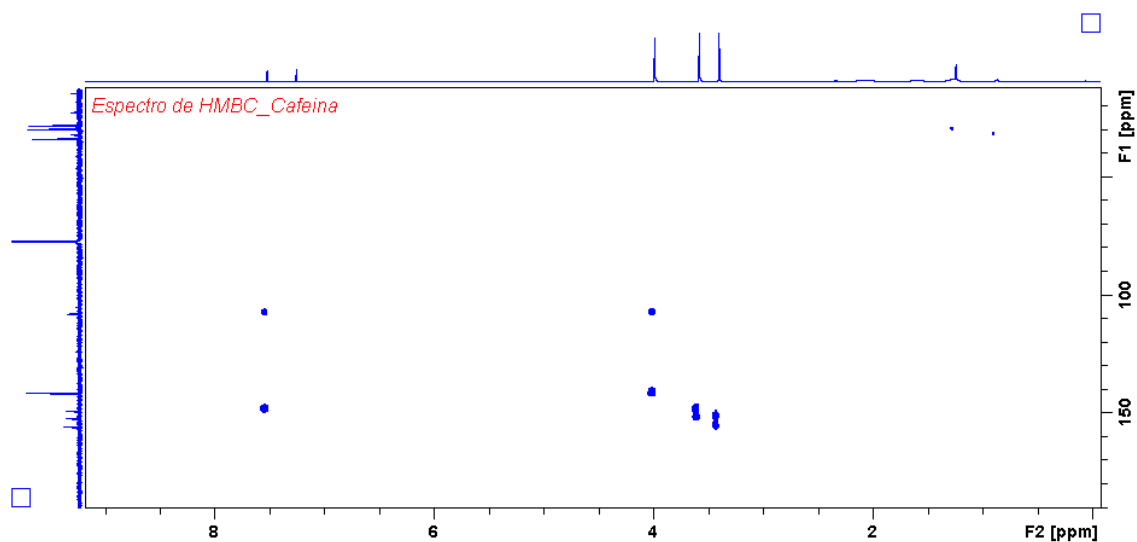


Figura 44. Mapa de contornos HMBC da substância F13 (600 e 150 MHz, CDCl₃).

O mapa de contorno HMBC permite fazer a correlação entre os hidrogênios e os carbonos aos quais estão ligados pela distância de duas ligações. Tais correlações estão apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15. Dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) de F13, incluindo resultados obtidos nos mapas de contornos HSQC e HMBC, em CDCl_3 . Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.

C/H	HSQC $^1J_{\text{CH}}$		HMBC $^nJ_{\text{CH}}$
	δ ^1H	δ ^{13}C	$^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$
1	-	-	-
2	-	155,6	-
3	-	-	-
4	-	148,7	-
5	-	107,8	-
6	-	151,9	-
7	-	-	-
8	7,52 (s)	141,5	107,8 (C-5); 148,7 (C-4)
9	-	-	-
10	3,40 (s)	28,1	151,9 (C-6); 155,6 (C-2)
11	3,58 (s)	29,9	148,7 (C-4); 155,6 (C-2)
12	3,99 (s)	33,8	107,8 (C-5); 141,5 (C-8)

A fórmula estrutural da substância identificada como cafeína, tal como as principais correlações observadas no experimento, estão apresentadas na Figura 45.

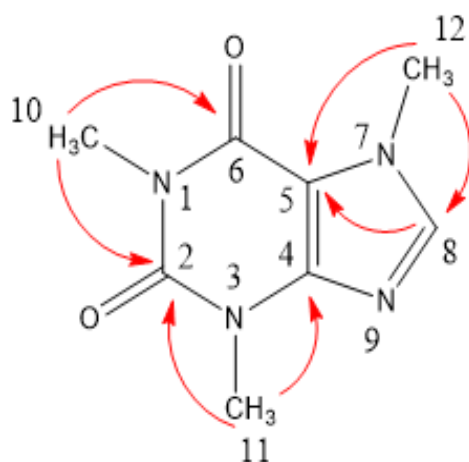


Figura 45. Substância da fração F13 - Cafeína e suas principais correlações observadas no experimento de HMBC.

Discussão

Com os resultados obtidos pelo equipamento Optometrics 290 S, foi possível comparar o FPS das emulsões sem e com óleo de café verde. É possível observar, no gráfico apresentado na Figuras 20, que existe significância estatística para o aumento do fator de proteção solar para todas as combinações de filtros testadas.

As comparações entre os gráficos de MPF apresentados nas Figuras 21 a 25 permitiram definir que o aumento da proteção, proporcionado pela adição do óleo de café de verde nas formulações, é devida a contribuições no MPF seguindo o mesmo perfil de absorção dos filtros contidos na emulsão. Esse aumento da intensidade da absorção de radiação indica que houve uma interação intermolecular entre os filtros e as substâncias absorvedoras presentes no óleo.

Quando os filtros foram analisados individualmente, foi possível observar pelas médias de FPS (Tabela 10), que nem todos os filtros obtiveram aumento de fator de proteção solar quando as emulsões foram adicionadas de óleo de café verde.

É importante salientar que o valor de FPS representa a fotoproteção que é dada pela aplicação do filtro de forma homogênea e em quantidade adequada⁷³, o que no dia a dia nem sempre ocorre, uma vez que a quantidade de produto aplicada pode ser até um quarto do ideal⁷⁴. A quantidade de produto aplicada depende fortemente da formulação e do seu comportamento sensorial⁷⁵. Isso significa que os filtros solares com valores de FPS nominais idênticos terão, no final, um desempenho de proteção UV diferente, dependendo de suas características sensoriais⁷⁶. Portanto, os valores experimentais de FPS quase nunca são os valores reais obtidos pelo consumidor.

Quanto ao processo de separação das fases do óleo de café verde, foi possível constatar que a soma das massas das frações foi de 6,5456 g. Se forem considerados que 7 ml de óleo de café verde pesam 6,5923 mg (densidade 0,94177 g/ml a 25° C)⁷⁷, o rendimento da cromatografia seria de 99,3%. Porém, uma vez que para a adição do óleo na coluna, foi utilizada uma pipeta de Pasteur, o valor desse rendimento é apenas aproximado.

Todas as frações coletadas foram evaporadas e analisadas por CCDC, independente da visualização a olho nu de qualquer componente no erlenmeyer. Portanto, foi considerado que nenhuma fração do óleo deixou de ser coletada e analisada.

As duas primeiras frações coletadas (F1 e F2) foram de maior e massa se apresentaram como substâncias oleosas, o que permite inferir que a maior parte dos ácidos graxos que constituem o óleo de café verde esteja presente nessas frações.

As frações F3 e F4 também se apresentaram visualmente como materiais graxos; porém, em rendimento consideravelmente menor.

As seguintes frações apresentaram rendimento muito baixo e secaram completamente após a evaporação dos solventes constituintes da fase móvel na capela, sendo, estas frações, provavelmente compostas por materiais insaponificáveis, como os terpenos, esteróis e tocoferóis.

A CCDC comprova que a separação por cromatografia em coluna foi efetiva na separação das frações, sendo possível observar frações de características bem diferentes. É possível notar também, que, devido à grande diferença de polaridade entre as frações, suas eluições ocorreram de forma bastante desigual, tornando difícil a

comparação entre frações similares, sendo necessária a separação dessas fases para serem analisadas novas placas, eluídas com fases móveis de polaridades bem diferentes.

Com a segunda placa (Figura 29), eluída com uma mistura de hexano e acetato de etila (70:30 v/v), é possível observar que as frações F4 e F5, que inicialmente pareciam iguais, possuem *spots* de Rf's diferentes e, sendo assim, as frações dessa placa foram consideradas diferentes entre si.

Com a placa da Figura 30, eluída com a mistura de clorofórmio e acetato de etila (90:10 v/v), é possível observar que as frações mais polares, que quase não haviam sido eluídas inicialmente, são diferentes entre si, com exceção das frações F9 e F10, que devido à sua semelhança, foram unidas, dando origem a uma única fração, denominada F9, com rendimento final de 0,0368 g.

Sendo assim, ao final da CCDC, foram obtidas 13 frações do óleo de café verde diferentes entre si.

Quando as frações foram adicionadas às emulsões, foi possível constatar que todas as frações testadas foram capazes de aumentar o fator de proteção solar dos filtros solares testados, comparando-o ao das formulações sem adição de óleo de café verde.

É possível observar na Tabela 12, que a presença de acetato de etila nas formulações também causou um aumento no FPS calculado pelo Optometrics, provavelmente, devido à interação desse solvente com a fita na qual a amostra é aplicada, deixando-a mais opaca. Por esse motivo, foram consideradas com frações que interagiram com os filtros solares, aquelas que apresentaram FPS significativamente maior do que as formulações com óleo de café verde e as com acetato de etila.

As frações que interagiram com os filtros solares não foram as mesmas para os quatro fotoprotetores, o que pode ser um indício do tipo de interação que ocorre entre essas moléculas, relacionando suas estruturas químicas e a intensidade do aumento do fator de proteção solar observado. Dentre as frações consideradas capazes de aumentar o FPS significativamente, podem ser destacadas as frações F4, F9 e F13, por terem interagido com três dos quatro filtros testados.

No momento de preparo das amostras para o HPLC, foi possível observar que todas as frações apresentaram resíduos de material graxo, que foi majoritariamente filtrado, porém a presença desses resíduos pode ser observada nos espectros.

A análise por CLAE demonstrou que quase todas as frações eram compostas por cerca de três substâncias, o que justifica a grande quantidade de frações que interagiram com os filtros, pois estas frações poderiam apresentar composições parecidas, com substâncias em concentrações diferentes.

Os cromatogramas analisados permitiram observar que as frações apresentaram composições muito semelhantes, estando uma substância com tempo de retenção de aproximadamente 14,5 min presente em todas as frações ativas, sendo que na fração F13, apresentou a substância sozinha e a maior concentração entre as frações analisadas. Por esse motivo, tal fração foi submetida a análise por RMN, por meio do qual foi possível a identificação da cafeína.

A capacidade da cafeína em aumentar o FPS dos filtros testados, pode ser parcialmente justificada por sua capacidade de absorção de radiação UVB, apesar dessa absorção não ser tão expressiva quanto em comprimentos de onda menores (UVC)⁷⁸, como pode ser observado no gráfico apresentado na Figura 46.

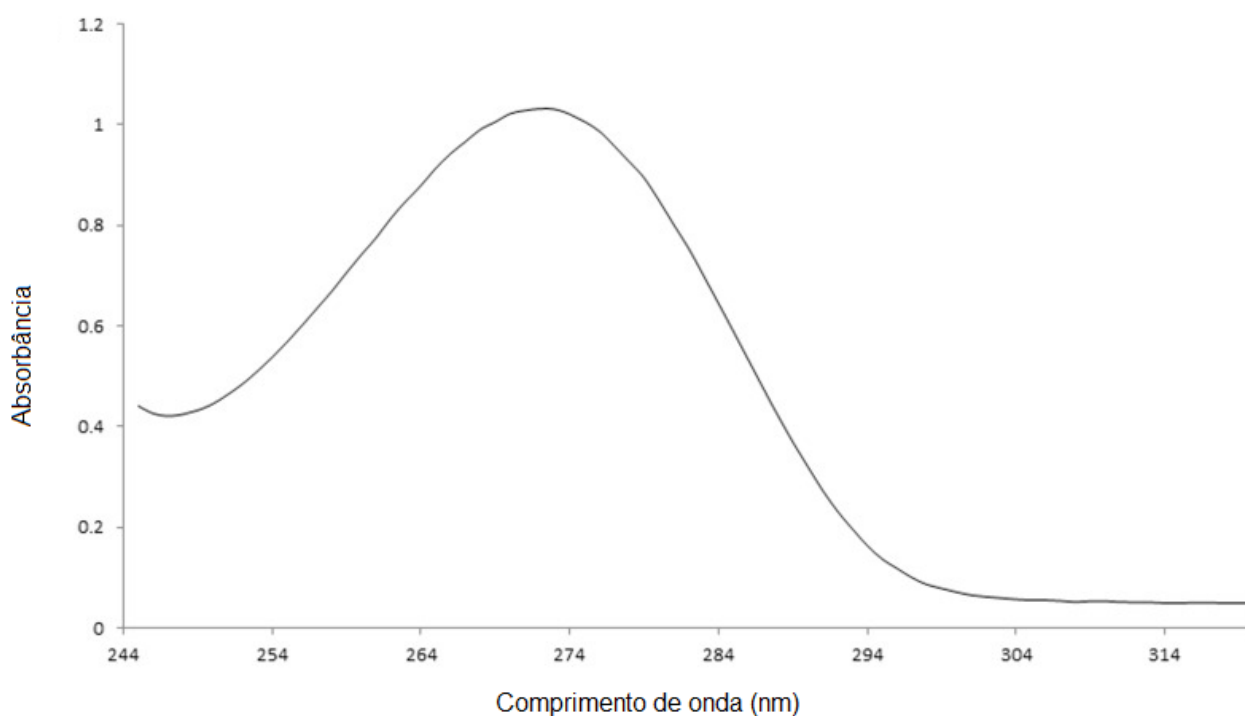


Figura 46. Perfil de absorção de padrão de cafeína no ultravioleta.

Fonte: referência 78.

A maior absorção de radiação UV acontece na faixa de 270 nm (UVC), porém em 290 nm, onde se inicia a faixa de proteção dos filtros solares, ainda há absorção.

Como os filtros e a cafeína são moléculas aromáticas, o aumento no FPS pode ser causado por interações intermoleculares do tipo empilhamento π - π , que se refere a uma atração, não covalente entre anéis aromáticos. Esse empilhamento, formado pela sobreposição de dois anéis paralelos⁷⁹, causa uma alteração da configuração da nuvem eletrônica dos filtros, o que altera o modo como a radiação ultravioleta é absorvida pelo filtro solar.

Além da interação com os filtros solares, a cafeína tem sido estudada por diversos grupos de pesquisa como forma de proteção da pele.

O consumo de cafeína por meio da ingestão de café e chá-preto está associado a uma menor incidência de melanomas, o que está associado à indução da apoptose de melanócitos danificados pela exposição à radiação ultravioleta⁸⁰.

Em relação à aplicação tópica, tal substância apresenta efeitos amplamente variáveis nos danos no DNA induzidos por radiação, dependendo da administração pré ou pós-irradiação e da sua concentração. A cafeína administrada pós-irradiação UV inibe o reparo enzimático de lesões de DNA, levando à potencialização de danos, enquanto sua presença antes ou durante a irradiação provoca proteção em uma ampla gama de sistemas de teste: bactérias, culturas de células, sementes de plantas e camundongos⁸¹.

Koo *et al* (2006), avaliaram (em camundongos) a capacidade da cafeína de proteger a pele de danos causados pela radiação ultravioleta quando aplicada topicamente logo após a exposição, promovendo a deleção de queratinócitos com DNA danificado, diminuindo parcialmente o dano causado pela radiação, bem como a fotocarcinogênese⁸².

Efeito semelhante foi observado por Choi *et al*, em estudo sobre a aplicação tópica de uma fração de café moído, rica em cafeína, foi capaz de inibir efetivamente o aumento de espécies de oxigênio reativas intracelulares induzido por UVB em células HaCaT. Assim como diminuiu a formação de rugas induzida por UVB na pele dorsal de camundongos em mais de 35% quando comparado com o controle, diminuiu a espessura epidérmica em 40%, reduziu significativamente a perda de água transdérmica (27%) e formação de eritema (48%) que resultam da irradiação UVB⁸³.

O efeito protetor da cafeína também foi estudado por Kronschläger *et al* (2013), quando a aplicação tópica de cafeína veiculada como colírio, foi capaz de diminuir significativamente a incidência de catarata induzida pela radiação UV em ratos⁸⁴.

Apesar da identificação da cafeína como substância capaz de aumentar o FPS de alguns filtros, é preciso salientar que existem outras substâncias no óleo de café verde que possuem absorção na faixa de radiação ultravioleta e podem apresentar atividade semelhante, tal como ácido cafeico⁸⁵, ferúlico⁸⁶ e clorogênico⁸⁷.

A busca por substâncias naturais capazes de proteger a pele do fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese é foco de diversas pesquisas⁸⁸, e tanto o óleo de café verde quanto a cafeína isolada estão incluídos nessa tendência.

Conclusão

Esse estudo pode corroborar que a adição do óleo de café verde em formulações fotoprotetoras causa um aumento significativo de FPS, sendo que tal aumento, ocorre dentro da faixa de absorção UV de interesse para os filtros solares comumente utilizados pela indústria cosmética.

Foi possível constatar que, a interação do óleo de café verde não ocorre com todos os filtros contidos nas formulações, havendo ainda diferença na intensidade como esse aumento ocorre e nas frações do óleo responsáveis por ele.

Com a identificação da cafeína como responsável pelo aumento no fator de proteção solar, é possível concluir que a utilização de tal substância em formulações cosméticas é interessante, uma vez que esta possui, além de sinergismo com filtros solares sintéticos, diferentes modos de proteger a pele dos efeitos nocivos da exposição à radiação ultravioleta.

- 1 Harris MINC. *Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento*. 2ª.ed. Rev e Ampli. São Paulo: Ed. Senac 2005.
- 2 Flor J, Davolos MR, Correa MA. Protetores Solares. *Quim Nova*. 2007; 30(1): 153-158.
- 3 Monteiro ÉDO, Filtros Solares e Fotoproteção. *Rev Bras Med*. 2010; 6: 67.
- 4 Corrêa MA, Isaac VLB. Emulsões. *Cosmetologia Ciência e Técnica*. 1ed. São Paulo(SP) Medfarma. 2012; 337-381.
- 5 Nascimento CS, Nunes LCC, De Lima AAN, Grangeiro Júnior S, Rolim Neto PJ. Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha. *Rev Bras Farm*. 2009; 90(4): 334-339.
- 6 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº48, de 16 de Março de 2006. Brasília: Anvisa, 2006.
- 7 Wondrak GT, Jacobson MK, Jacobson EL. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochem Photobiol Sci*. 2006; 5(2): 215-37.
- 8 Fisher GJ., Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Voorhees JJ. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol*. 2002; 138(11): 1462-70.
- 9 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 237, de 22 de Agosto de 2002. Brasília: Anvisa, 2002.
- 10 Beber TC, Schneider N. Determinação do FPS in vitro de filtros solares combinados. XIV Congresso Nacional de Cosmetologia. São Paulo, Brasil. 2000.

- 11 Ferrari M, Oliveira MSC, Nakano AK, Rocha-Filho PA. Determinação do fator de proteção solar (FPS) in vitro e in vivo de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*). Rev Bras Farmacogn. 2007; 17(4): 626-630.
- 12 Mansur JS, Breder MN, Mansur MCD'a, Azulay RD. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. Ass. Bras. Dermatol. 1986; 61(3): 121-124.
- 13 Khury E, Borges E. Protetores Solares. Cosm.Toil. 2011; 48(4): 4-18.
- 14 Coffee Oil (novel functional ingredients for cosmetic formulations). [editorial] [acesso em: 05 Jun 2016]. Disponível em: <<http://www.campo-research.com/campo/products/coffe2.html>>
- 15 Turatti JM. Extração e caracterização de óleo de café. II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. 1998; 1533-1539.
- 16 Fernandes SM, Pereira RGFA, Pinto NAVD, Nery MC, De Pádua FRM. Constituintes químicos e teor de extrato aquoso de cafés arábica (*Coffea arabica* L.) e comilon (*Coffea canephora* P.) torrados. Ciênc e Agrotec. 2003; 27(5): 1076-1081.
- 17 Cunha AP, Silva AP, Roque OR, Cunha E. Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 2004; 49-54.
- 18 Pereda MDCV, Dieamant GC, Eberlin S, Nogueira C, Colombi D, Stasi LC, Queiroz MLSDeS. Effect of green *Coffea arabica* L. seed oil on extracellular matrix components and water-channel expression in *in vitro* and *ex vivo* human skin models. J Cosmet Dermatol. 2009; 8: 56-62.
- 19 Ramos MFS, Santos EP, Bizarri CHB, Mattos HA. Preliminary studies towards utilization of various plant extracts as antisolar agents. Int J Cosmet Sci. 1996; 18:

87-101.

- 20 Leone BA. Efeito sinérgico do óleo de café verde com filtro solar químico [Trabalho de Conclusão de Curso] Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara, 2015.
- 21 Rubinstein E. Introdução ao estudo da anatomia. [acesso em: 07 Jul 2017] Disponível em: http://labs.icb.ufmg.br/anatefis/introducao_Anatomia.htm
- 22 Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica: texto e atlas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013; 12: 354-359.
- 23 Ross MH, Pawlina W. Histologia: texto e atlas, em correlação com Biologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2012; 6: 498-504.
- 24 Strauss JS, Matoltsy AG. Pele. Em: Weiss, L, Greep, RO. Histologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1981; 4: 486.
- 25 Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. Nature, 2007; 445: 843-50.
- 26 Fitzpatrick T, Jimbow K, Quevedo W, Szabo G. Some Aspects Of Melanin Biology: 1950–1975. J Investig Dermatol. 1976; 67(1): 72-89.
- 27 Viglioglia PA. Biologia cutânea da pele normal. In: Viglioglia, PA, Rubin, J. Cosmiatria II. 2ª ed. Buenos Aires: AP Americana, 1991; 22-37.
- 28 Fitzpatrick TB, Mosher DB. Pigmentação cutânea e distúrbios do metabolismo da melanina. Em: Isselbacher, Kurt J. et al. Medicina interna. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1983; 276-284.

- 29 National Institute of Health – Sun and Skin: The Dark Side of Sun Exposure. News in Health. Maryland, USA. July, 2014.
- 30 Ribeiro LR, Marques EK. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. Em: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK, organizadores. Mutagênese ambiental. Canoas: ULBRA, 2003; 21-27.
- 31 INCA – Ministério da Saúde. 1996-2018. [Acesso em 30/01/2018] Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home>.
- 32 “How Round is the Sun?” [editorial] NASA. 2008.
- 33 “First Ever STEREO Images of the Entire Sun”. [editorial] NASA. 2011.
- 34 El-Sharkawi M.A. Electric energy. CRC Press. 2005; 87–88.
- 35 Qiang FU. Radiation (Solar). University of Washington, Seattle, WA, USA. 2003.
- 36 "Reference Solar Spectral Irradiance: Air Mass 1.5".[editorial] American Society for Testing and Materials (ASTM) Terrestrial Reference Spectra for Photovoltaic Performance Evaluation. 2009.
- 37 Nicholas JL, Nadim AS, Madhu AP. Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspects. 2ª Ed. New York: Marcel Dekker, 1990; 313.
- 38 Franquilino E. Radiação e fotoenvelhecimento. Rev de Negócios da indústria da Beleza, V. Edição temática; 2014; 26: 5-7.
- 39 Corrêa MA. Cosmetologia: ciência e técnica - São Paulo: Medfarma, 2012.
- 40 Neves K. Como Formular Protetores Solares. Rev de Negócios da indústria da Beleza, 2008; 7: 24-25.

- 41 Neves K. Sol e origem da radiação eletromagnética. Rev de Negócios da indústria da Beleza, 2008; 7: 11-13.
- 42 Sol e pele. Sociedade Portuguesa de Dermatologia [editorial]. [acesso em 08 Ago 2017] Disponível em: http://www.dermo.pt/_script/?id=17&det=80,
- 43 Dossiê especial sobre o sol; Cosméticos e Perfumes [editorial] 2003; 27-29.
- 44 Mota ED, Páez MTC, Serrano SC. Sun and sunscreens. Medifam, 2003; 13(3):39-45. Disponível em: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1131-57682003000300005&lng=en. [acesso em 09 Ago 2017]
- 45 Sunscreen Simulator – BASF. [acesso em 19 Fev 2018] Disponível em: https://www.sunscreensimulator.basf.com/Sunscreen_Simulator/Input_show.action.
- 46 Herzog B, Hueglin D, Osterwalder U. New sunscreen actives. In: Shaath NA, ed. Sunscreens – regulations and commercial development, cosmetic science and technology, 3rd edn, Series 28. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005; 291–320.
- 47 Cosméticos – Novos filtros UV facilitam a produção de protetores solares.[editorial]. [acesso em: 21 Fev 2018] Disponível em: <https://www.quimica.com.br/cosmeticos-novos-filtros-uv-facilitam-a-producao-de-protetores-solares/3/>
- 48 Nohynek GJ, Schaefer H. Benefit and Risk of organic ultraviolet filters. Regul Toxicol Pharm. 2001; 33: 285-299.
- 49 Barros C. 9 opções de filtros solares para tornar o seu fotoprotetor excepcional. [acesso em: 26 Fev 2018] Disponível em: <http://www.cleberbarros.com.br/opcoes-de-filtros-solares-para-fotoprotetor-excepcional/>

- 50 Franquilino E. Em ritmo de expansão. *Cosmet Toiletries* (ed. Port.), edição temática, 2006; 18: 7-10.
- 51 Miguel LM. Tendências do uso de produtos naturais nas indústrias de cosméticos da França. *Rev Geo Amer C*, 2011; 1-15.
- 52 Andrade MHC, Vieira AS, Aguiar HF, Chaves JFN, Neves RMPS, Miranda TLS, Salum A. Óleo do fruto da palmeira macaúba – parte i: uma aplicação potencial para indústrias de alimentos, fármacos e cosméticos. [acesso em 27 Fev 2018] Disponível em: <http://entabanbrasil.com.br/downloads/oleo-macauba-ii.pdf>
- 53 Miguel LM. Uso sustentável da biodiversidade na Amazônia brasileira: experiências atuais e perspectivas das indústrias de cosméticos e fitoterápicos. [dissertação] Universidade de São Paulo. 2007.
- 54 Cooxupé Disponível em: <https://www.cooxupe.com.br/quem-somos/> [acesso em: 27 Fev 2018]
- 55 ABIC – Associação Brasileira da Indústria de Café, 2013. [acesso em: 30 Ago 2015]. Disponível em: <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=38>.
- 56 Tango JS. Utilização industrial do café e dos seus subprodutos, *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL*, 1971; 28.
- 57 Fonseca H, Gutierrez LE. Estudo do teor e composição do óleo de algumas variedades de café (*Coffea arabica* L.). *Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz"*, 1971; 28: 313-322.
- 58 Speer K, Kolling-Speer I. The lipid fraction of the coffee bean. *Braz J Plant Physiol*. 2006; 18: 201-216.

- 59 Nikolova-Damyanova B, Veilikova R, Jham GN. Lipid classes, fatty acid composition and triacylglycerol molecular species in crude coffee beans harvested in Brazil. *Food Res Int*, 1998; 31: 479–486. [acesso em: 13 Ago 2017] Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996999000162>>
- 60 Kölling-Speer I, Speer K. 16-O-methylkahweol in Robusta coffee. Em: 19th International Colloquium on the Chemistry of Coffee. Paris: ASIC. 2001.
- 61 Folstar P, Van-Der-Plas HC, Plinik W, De-Heus JG. Tocopherols in the unsaponifiable matter of coffee bean oil. *Journal of Agriculture, Food and Chemistry*, 1977; 25(2); 283–285.
- 62 Lercker G *et al.* La frazione lipidica del caffè. 2: Su alcuni parametri di qualificazione. *Industrie Alimentari*, Pinerolo, 1996b; 35(11): 1186-1193.
- 63 Tiscornia E, Centi-Grossi M, Tassi-Micco C, Evangelisti F. La frazione sterolica dell'olio di caffè (*Coffea arabica* L.). *Riv Ital Sost. Grasse*, Milão, 1979; 61(8): 283-292.
- 64 Alonso-Salces RM, Guillou C, Berrueta LA. Liquid chromatography coupled with ultraviolet absorbance detection, electrospray ionization, collision-induced dissociation and tandem mass spectrometry on a triple quadrupole for the on-line characterization of polyphenols and methylxanthines in green coffee beans. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009; 23: 363–383.
- 65 Nogueira M, Trugo LC. Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. *Ciênc Tecnol Aliment.* Campinas. 2003; 23(2): 296-299.

- 66 Phenol Explorer. [acesso em: 27 Mar 2018] Disponível em: <http://phenol-explorer.eu/contents/show/2/457/552>
- 67 Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. J Sci Food Agric. 1999.
- 68 Ballone GJ, Moura E. Cafeína, 2008. [acesso em: 28 Fev 2018] Disponível em: <http://www.psiqweb.med.br/site/?area=NO/LerNoticia&idNoticia=154>
- 69 Savian AL, Varella FT, Athayde ML, Da Silva CB. Desenvolvimento e avaliação preliminar da estabilidade de emulsão não iônica O/A contendo óleo de café verde como potencializador de fator de proteção solar. Rev Bras Farmacogn, 2011; 91: 82.
- 70 Khury E, Borges E. Protetores Solares. Cosm Toil. 2011; 48(4): 4-18.
- 71 Moyal D. et al. In vivo persistent pigment darkening method: proposal of a new standard product for UVA protection factor determination. Int J Cosmet Sci. 2007; 443-449.
- 72 Gaikwad M, Kale S. Formulation and *in vitro* evaluation for sun protection factor of *Moringaoleifera* lam (family-moringaceae) oil sunscreen cream. Int J Pharm Pharm Sci. 2011; 3(4): 371.
- 73 Diffey B. Sunscreen isn't enough. J Photochem Photobiol B. 2001; 64: 105-108.
- 74 Stenberg C, Larkö O. Sunscreen application and its importance for the Sun protection factor. Arch Dermatol. 1985; 121:1400–1402.
- 75 Pissavini M, Diffey B. Predicting the efficacy of sunscreens in vivo veritas. Int J Cosmet Sci. 2011; 34: 44–48.

- 76 Osterwalder et al. Global state of sunscreens. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2014; 30: 62–80.
- 77 Oliveira PMA. Óleo de grãos de café verde obtidos por extração supercrítica, extração com fluido pressurizado e comparação de sua composição com o óleo de café extraído pelos pequenos produtores do estado de São Paulo: análise da concentração de compostos bioativos. [dissertação] Universidade de São Paulo. 2013.
- 78 Shehata AB, Rizk MS, Rend EA. Certification of caffeine reference material purity by ultraviolet/visible spectrophotometry and high-performance liquid chromatography with diode-array detection as two independent analytical methods. *J Food Drug Anal*. 2016; 24(4): 703-715.
- 79 Schleyer PVR. Introduction: Delocalization- π and σ (Editorial), *Chem Rev*. 2005; 105: 3433-3435.
- 80 Caini S et al. Coffee, tea and caffeine intake and the risk of non-melanoma skin cancer: a review of the literature and meta-analysis. *Eur J Nutr*. 2017; 56: 1.
- 81 Kumar SS, Devasagayam TP, Jayashree B, Kesavan PC. Mechanism of protection against radiation-induced DNA damage in plasmid pBR322 by caffeine. *Int J Radiat Biol*. 2001; 77(5): 617-23.
- 82 Koo S-W, Hirakawa S, Fujii S, Kawasumi M, Nghiem P. Protection from photodamage by topical application of caffeine after ultraviolet irradiation. *Br J Dermatol*. 2007; 156: 957–964.
- 83 Choi HS, Park ED, Park Y, Han SH, Hong KB, Suh HJ. Topical application of spent coffee ground extracts protects skin from ultraviolet B-induced photoaging in hairless

- mice. *Photochem Photobiol Sci.* 2016; 15(6): 779-90.
- 84 Kronschläger M, Löfgren S, Yu Z, Talebizadeh N, Varma SD, Söderberg P. Caffeine eye drops protect against UV-B cataract. *Exp Eye Res.* 2013; 113: 26-31.
- 85 Karsili TNV, Marchetti B, Ashfold MNR, Domcke W. Ab Initio Study of Potential Ultrafast Internal Conversion Routes in Oxybenzone, Caffeic Acid, and Ferulic Acid: Implications for Sunscreens; *The Jour of Phys Chem.* 2014; 118(51): 11999-12010.
- 86 Lin F-H *et al.* Ferulic Acid Stabilizes a Solution of Vitamins C and E and Doubles its Photoprotection of Skin. *Jour of Inves Dermatol.* 2005; 125(4): 826-832.
- 87 Marti-Mestres G, Mestres JP, Bres J, Martin S, Ramos J, Vian L. The “in vitro” percutaneous penetration of three antioxidant compounds. *Inter Jour of Pharm.* 2007; 331(1): 139-144.
- 88 Bosch R *et al.* Mechanisms of Photoaging and Cutaneous Photocarcinogenesis, and Photoprotective Strategies with Phytochemicals. *Antioxidants (Basel).* 2015; 4(2): 248-68.