



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANA CAROLINA TRIBULATO POLVANI

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE  
DERMOCOSMÉTICO DE USO TÓPICO CONTENDO  
BIOATIVOS NATURAIS E SUSTENTÁVEIS COMO  
ESTRATÉGIA PARA REDUZIR OS SINAIS DA REGIÃO  
PERIORBITAL**

ANA CAROLINA TRIBULATO POLVANI

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE  
DERMOCOSMÉTICO DE USO TÓPICO CONTENDO  
BIOATIVOS NATURAIS E SUSTENTÁVEIS COMO  
ESTRATÉGIA PARA REDUZIR OS SINAIS DA REGIÃO  
PERIORBITAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Audrey Alesandra  
Stinghen Garcia Lonni  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Antônia  
Pedrine Colabone Celligoi

Londrina  
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

A532d Polvani, Ana Carolina Tribulato Polvani.

Desenvolvimento e caracterização de dermocosmético de uso tópico contendo bioativos naturais e sustentáveis como estratégia para reduzir os sinais da região periorbital / Ana Carolina Tribulato Polvani Polvani. - Londrina, 2024. 97 f. : il.

Orientador: Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni Lonni.

Coorientador: Maria Antônia Pedrine Colabone Celligoi Celligoi.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

Inclui bibliografia.

1. Dermocosméticos - Tese. 2. Antioxidante - Tese. 3. Hidratante - Tese. 4. Biotecnologia - Tese. I. Lonni, Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni. II. Celligoi, Maria Antônia Pedrine Colabone Celligoi. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

CDU 66

ANA CAROLINA TRIBULATO POLVANI

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE  
DERMOCOSMÉTICO DE USO TÓPICO CONTENDO  
BIOATIVOS NATURAIS E SUSTENTÁVEIS COMO  
ESTRATÉGIA PARA REDUZIR OS SINAIS DA REGIÃO  
PERIORBITAL**

Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Audrey Alesandra Stingen  
Garcia Lonni  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiani Baldo da Rocha  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Belincanta Borghi Pangoni  
Universidade Estadual de Maringá- UEM

Londrina, 02 de Fevereiro de 2024.

## **AGRADECIMENTOS**

Chego ao final de mais uma caminhada árdua, de muito estudo, esforço, empenho e dedicação, resumidos em 8 anos de UEL; 5 anos de graduação e 3 anos de pós-graduação. Olho para trás e vejo toda a evolução, e o quanto tenho a agradecer aqueles que acompanharam e foram fundamentais para a chegada deste momento e a realização de mais este sonho. Por isso, expresso aqui, através de palavras sinceras, um pouquinho da importância que tiveram e ainda tem, nesta conquista e a minha eterna gratidão a todos.

Agradeço primeiramente a Deus por me dar fé e força necessária para lutar e enfrentar todas as dificuldades, sem nunca desistir, por estar ao meu lado em cada instante desse percurso, sem Ele nada seria possível.

Gratidão aos meus pais José Luis Polvani e Jacqueline Tribulato por toda dedicação, amor, incentivo e apoio incondicional. Abdicaram de tempo e de muitos projetos pessoais para que eu tivesse a oportunidade de continuar meus estudos e ter uma boa formação profissional, mas também pessoal. Eu devo tudo que sou a vocês, e se sinto orgulho de mim e do lugar onde cheguei, é porque sei que vocês vieram segurando a minha mão. Agradeço também ao meu irmão Thiago Tribulato, por toda ajuda, principalmente nessa reta final, auxiliando em absolutamente tudo, todo companheirismo e apoio, que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo, sempre fez entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente.

As minhas avós, Marina Faiad e Rosa Polvani, e em especial aos meus avôs Francisco Tribulato e Ernesto Polvani que hoje não estão mais presentes entre nós, deixando o legado, exemplo de garra e caráter, aqueles que me ensinaram a enfrentar as dificuldades da vida de cabeça erguida, com honestidade e determinação. Tenho certeza, se hoje vocês estivessem aqui estariam extremamente felizes com essa conquista, pois sempre souberam o quanto eu me dediquei para este momento. Deixo aqui o meu muito obrigada por tudo que fizeram e ainda fazem por mim, fica minha profunda admiração a vocês, por serem minha base e terem feito parte desta trajetória.

Agradeço aos meus amigos que estiveram ao meu lado nas horas que chorei e nas horas que sorri, nas horas que me lamentei e nas horas que de uma forma ou de outra demonstrei total alegria, por me ensinarem a ver a vida com

outros olhos, por oferecerem o ombro amigo sem pedir nada em troca, é um privilégio quando temos ao nosso lado pessoas tão maravilhosas como vocês. Obrigada pelos inúmeros conselhos, frases de motivação e puxões de orelha, principalmente pela compreensão ao serem privados em muitos momentos, da minha companhia e atenção. Sem palavras para agradecer por todo suporte que me ofereceram nessa fase tão desafiadora.

Em especial aos meus dois grandes amigos, Tarcísio Mendonça e Adriane Conte, minha eterna gratidão por tudo que fizeram e ainda fazem por mim, suas palavras de conforto, todos os conselhos, apoio e incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Vocês são as melhores pessoas que eu tive o privilégio de conhecer. Aqueles que me apoiaram constantemente e estiveram comigo para superar todas as dificuldades. Agradeço todos os dias pela nossa amizade, parceria e companheirismo, por indicarem as saídas que sempre procurei para meus problemas. Não foi fácil superar as adversidades que surgiram no caminho, só quem esteve dia a dia me acompanhando sabe, mas se vocês não estivessem ao meu lado, dando suporte, nada seria possível. Obrigada por entenderem minha ausência em alguns momentos, torcendo por mim, meu sucesso, minha felicidade, meus sonhos, independente da distância, principalmente por terem permitido que eu não desistisse dessa jornada, vocês foram fundamentais para isso.

Agradeço também todas as pessoas que se comprometeram com o desenvolvimento e execução deste trabalho, companheiros de projeto, pessoas com quem compartilhei tantas preocupações e aflições, por serem tão solícitos, cujos esforços e auxílio tornaram possível a concretização deste projeto e o fim de mais um ciclo. Agradeço pela experiência e aprendizado, nem sempre foi fácil enfrentar os desafios, porém, com cada um que esteve comigo nesses longos 3 anos de pós-graduação, levarei um aprendizado diferente. Sempre que precisarem estarei à disposição, e mesmo de longe, desejo a maior felicidade e que nunca desista de alcançar todos os seus objetivos. Eu estarei sempre torcendo por cada um de vocês, deixo aqui minha imensa gratidão.

A minha coorientadora, Professora Dr<sup>a</sup>. Maria Antonia e a todos os membros da banca examinadora, deixo aqui uma palavra sincera de gratidão e reconhecimento pela excelência da qualidade técnica de cada um, pela confiança, pela orientação incansável, reconheço todo empenho, paciência e sabedoria, pelos incentivos, conselhos, contribuições e sugestões para que chegássemos nesta

etapa com resultados satisfatórios e o trabalho fosse apresentado da melhor forma possível. Vocês que foram fundamentais para a minha formação.

Em especial, a minha orientadora, uma das principais responsáveis para que eu chegasse até aqui, Professora Dr<sup>a</sup>. Audrey Lonni me acompanhou desde a graduação, minha eterna gratidão por tudo que tem feito para que este trabalho pudesse ser concluído, por muitas vezes deixar de lado seus momentos de descanso para me dar suporte e orientar. Obrigada por todo incentivo, apoio, dedicação e principalmente as contribuições, que apesar da intensa rotina acadêmica aceitou me orientar. Obrigada por sempre ter acreditado e depositado sua confiança em mim ao longo de todos esses anos de trabalho, que se iniciaram ainda na graduação, terceiro/quarto ano, me ajudou a construir o caminho que percorri desde a idealização até a concretização deste projeto, por sempre estar presente para indicar a direção correta que o trabalho deveria tomar. Orgulho e admiração enorme da pessoa que é, todo seu esforço, empenho, força de vontade dentro e fora de sala de aula, talvez não existam palavras suficientes e significativas que me permitam agradecer com o devido merecimento, por uma demonstração de humildade ao transmitir seus conhecimentos para que este trabalho fosse realizado.

Não posso deixar de agradecer a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela atenção e dedicação em transmitir o máximo de conhecimento durante esses anos de formação profissional e pessoal e em especial todo aprendizado. Orgulho enorme de ter sido aluna de cada um de vocês.

Aos nossos laboratórios parceiros de projeto, obrigada pela incansável partilha de conhecimento, parceria e principalmente por nos fornecerem ferramentas necessárias para que o trabalho pudesse ser concluído.

Por fim, agradeço a Universidade Estadual de Londrina (UEL), seu corpo docente, direção e administração, que demonstrou estar comprometida com a qualidade e excelência do ensino, formando profissionais capacitados e habilitados para enfrentar o disputado mercado de trabalho. Apesar dos obstáculos enfrentados por uma faculdade pública, que não são poucos, fica meu agradecimento por fornecer todo o suporte para a realização deste sonho e proporcionar momentos inesquecíveis durante esses 8 anos.

Finalmente se encerra mais um ciclo, árduo, porém, gratificante, contudo, é hora de olhar para trás e sentir orgulho por todo caminho percorrido, tantos anos de estudo e a conclusão desse sonho que parecia inalcançável. A todos aqueles que não foram citados, mas contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho e desta etapa, muito obrigada.

“O sucesso não consiste em não errar, mas em não cometer os mesmos equívocos mais de uma vez”.

George Bernard Shaw

POLVANI, ANA CAROLINA TRIBULATO. **Desenvolvimento e caracterização de dermocosmético de uso tópico contendo bioativos naturais e sustentáveis como estratégia para reduzir os sinais da região periorbital.** 2024. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

## RESUMO

A busca por uma aparência jovem e saudável vem despertando no setor cosmeceútico a crescente demanda por produtos com alto potencial inovador, com destaque para os produtos da região periorbital. Os sinais visíveis de envelhecimento extrínseco da pele são causados principalmente pela radiação ultravioleta que induz o estresse oxidativo, desta forma, a aplicação tópica de antioxidantes promove ação antienvhecimento. Atualmente, os cosméticos contendo ingredientes naturais e sustentáveis, são solicitados por consumidores que demonstram preocupações com a saúde e o impacto ambiental. Dentre os ativos, derivados de café destaca-se o extrato seco de café verde (ECV), sendo comprovado o seu efeito no processo antienvhecimento, com rica fonte de antioxidantes e protetores do fotoenvhecimento. Outro ativo associado à biotecnologia é a levana (LEV), um exopolissacarídeo que possui eficácia antirugas, promove o aumento da proliferação celular e da produção de colágeno. Desse modo, o objetivo geral do trabalho foi desenvolver e caracterizar formulações dermocosméticas em gel-creme, do tipo O/A, de uso tópico, acrescida de extrato seco de café verde (*Coffea canephora*) e levana (*Bacillus subtilis* natto), isolados e/ou em associação, como nova alternativa cosmética natural para reduzir os sinais da região periorbital. Foram desenvolvidas quatro formulações gel-creme do tipo O/A, sendo estas: FB - formulação base (sem ativos), F1 - 2,0% (p/v) LEV, F2 - 0,6% (p/v) ECV e F3 - 1,0% (p/v) LEV + 0,3% (p/v) ECV. As quatro formulações foram submetidas a ensaios de pré-estabilidade (teste de centrifugação), avaliação das características organolépticas (cor, aspecto e odor), caracterização físico-química (determinação de pH, espalhabilidade, retenção de umidade), atividade antioxidante dos ativos e das formulações pelo ensaio ABTS<sup>+</sup>, bem como reometria de cisalhamento contínuo (fluxo), nas temperaturas de 5°C, 25°C e 34°C e espectroscopia fotoacústica com espectros obtidos no ultravioleta e visível, variando de 300 a 500 nm. Posteriormente avaliada a estabilidade preliminar das formulações. Os dados foram submetidos a análise de variância e teste de Tukey. Os resultados mostraram que todas as formulações não apresentaram alterações macroscópicas, nem alterações no aspecto, cor e odor, exceto F1, alterando sua colocação de branco para rosé após submissão ao estresse térmico. O pH de todas as formulações permaneceram na faixa recomendada para aplicação na pele (4,5 – 6,0). Em relação à espalhabilidade, houve apenas diferença estatística entre as formulações, independente do tempo, onde F3 (2.609 mm<sup>2</sup>) se destacou em comparação com as demais. Já retenção de umidade não foi observada diferenças entre as formulações, no entanto as mesmas apresentaram resultados satisfatórios. Na avaliação da atividade antioxidante, LEV e ECV adicionaram alta propriedade antioxidante a F1, F2 e F3, porém, os maiores valores foram encontrados para a formulação F3, em ambos os tempos (t<sub>0</sub>: 65,3 ± 0,6% e t<sub>15</sub>: 87,4 ± 2,7%). Neste mesmo ensaio, no decorrer do ciclo gelo-degelo, F2 e F3 apresentaram aumento desta propriedade, sendo mais pronunciada em F3 (65,3 ± 0,6% para 87,4 ± 2,7%). Na análise reológica de fluxo contínuo, a formulação F3 apresentou comportamento

não-newtoniano e pseudoplástico. Já na espectroscopia fotoacústica, F3 apresentou absorção óptica abaixo de 400 nm, demonstrando sua capacidade de interação com a pele e consequente penetração, tanto na superfície epidérmica quanto dérmica. Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que, pela primeira vez, LEV e ECV foram incorporadas em associação, em uma formulação à base de copolímero de acrilatos de sódio e lecitina, onde as formulações desenvolvidas, especialmente F3 (1,0% LEV+ 0,3% ECV), apresentaram características promissoras para o combate aos sinais de envelhecimento da região periocular, sendo a candidata à formulação final, uma vez que manteve suas características físico-químicas e organolépticas, apresentando excelente espalhabilidade, alta retenção de umidade e atividade antioxidante significativa mesmo após submissão a estresse térmico, além de uma boa interação com a pele, permeando eficientemente tanto na superfície epidérmica quanto dérmica. Assim, os resultados reforçam o potencial das formulações, como nova alternativa cosmética natural, no cuidado da pele, para reduzir os sinais da região periorbital, atendendo à crescente demanda por produtos inovadores e sustentáveis na indústria cosmética.

**Palavras-chave:** Cosméticos. Antioxidante. Hidratante. Bioativos. Biotecnologia.

POLVANI, ANA CAROLINA TRIBULATO. **Development and characterization of a dermocosmetic for topical use containing natural and sustainable bioactives as a strategy to reduce signs in the periorbital region**. 2024. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - State University of Londrina, Londrina, 2024.

## ABSTRACT

A search for a youthful and healthy appearance has been sparking increasing demand in the cosmeceutical sector for products with high innovative potential, particularly focusing on periorbital region products. The visible signs of extrinsic skin aging are mainly caused by ultraviolet radiation, which induces oxidative stress. Thus, the topical application of antioxidants promotes anti-aging action. Currently, cosmetics containing natural and sustainable ingredients are sought after by consumers who demonstrate concerns about health and environmental impact. Among the active ingredients, derivatives of coffee, such as dry green coffee extract (GCE), stand out for their proven effect in the anti-aging process, being a rich source of antioxidants and protectors against photoaging. Another active ingredient associated with biotechnology is levan (LEV), an exopolysaccharide that has anti-wrinkle efficacy, promotes increased cell proliferation, and collagen production. Therefore, the general objective of the study was to develop and characterize dermocosmetic gel-cream formulations, of the O/A type, for topical use, enriched with dry green coffee extract (*Coffea canephora*) and levan (*Bacillus subtilis natto*), either isolated or in combination, as a new natural cosmetic alternative to reduce signs in the periorbital region. Four O/A gel-cream formulations were developed: FB - base formulation (without active ingredients), F1 - 2.0% (w/v) LEV, F2 - 0.6% (w/v) GCE, and F3 - 1.0% (w/v) LEV + 0.3% (w/v) GCE. The four formulations underwent pre-stability tests (centrifugation test), evaluation of organoleptic characteristics (color, appearance, and odor), physicochemical characterization (pH determination, spreadability, moisture retention), antioxidant activity of the active ingredients and formulations using the ABTS•+ assay, as well as continuous shear rheometry (flow) at temperatures of 5°C, 25°C, and 34°C, and photoacoustic spectroscopy with spectra obtained in the ultraviolet and visible ranges, ranging from 300 to 500 nm. Subsequently, preliminary stability of the formulations was evaluated. Data were subjected to analysis of variance and Tukey's test. Results showed that all formulations did not present macroscopic alterations or changes in appearance, color, and odor, except for F1, which changed its color from white to pink after exposure to thermal stress. The pH of all formulations remained within the recommended range for skin application (4.5 – 6.0). Regarding spreadability, there was only statistical difference among the formulations, regardless of time, with F3 (2,609 mm<sup>2</sup>) standing out compared to the others. Moisture retention did not show differences among the formulations; however, they all presented satisfactory results. In the evaluation of antioxidant activity, LEV and GCE added high antioxidant properties to F1, F2, and F3; however, the highest values were found for formulation F3, at both time points (t<sub>0</sub>: 65.3 ± 0.6% and t<sub>15</sub>: 87.4 ± 2.7%). In this same assay, during the freeze-thaw cycle, F2 and F3 showed an increase in this property, with F3 showing a more pronounced increase (from 65.3 ± 0.6% to 87.4 ± 2.7%). In the rheological analysis of continuous flow, formulation F3 showed non-Newtonian and

pseudoplastic behavior. In photoacoustic spectroscopy, F3 showed optical absorption below 400 nm, demonstrating its ability to interact with the skin and consequently penetrate both the epidermal and dermal surfaces. Based on the results obtained, it can be concluded that, for the first time, LEV and GCE were incorporated in combination into a formulation based on sodium acrylates copolymer and lecithin, where the developed formulations, especially F3 (1.0% LEV + 0.3% GCE), presented promising characteristics for combating signs of aging in the periorcular region, being the candidate for the final formulation, as it maintained its physicochemical and organoleptic characteristics, showing excellent spreadability, high moisture retention, and significant antioxidant activity even after exposure to thermal stress, as well as good interaction with the skin, efficiently permeating both the epidermal and dermal surfaces. Thus, the results reinforce the potential of the formulations as a new natural cosmetic alternative in skincare, to reduce signs in the periorbital region, meeting the growing demand for innovative and sustainable products in the cosmetic industry.

**Key words:** Cosmetics. Antioxidant. Moisturizer. Bioactives. Biotechnology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Anatomia da pele humana com suas camadas e anexos. ....	19
<b>Figura 2</b> - Diferenças estruturais entre uma pele jovem e uma envelhecida. ....	21
<b>Figura 3</b> - Estrutura química da levana. ....	26
<b>Figura 4</b> - Planta da espécie <i>Coffea canephora</i> : arbusto (A), flores (B) e frutos maduros (C). ....	29
<b>Figura 5</b> - Estruturas químicas de compostos presentes no café verde: cafeína (A), ácido ferúlico (B), teobromina (C), trigonelina (D) e ácido cumárico (E). ....	30
<b>Figura 6</b> - Tipos de emulsões simples. ....	35
<b>Figura 7</b> - Determinação da atividade antioxidante dos bioativos naturais LEV (A) e ECV (B) obtidos pelo método ABTS•+. ....	52
<b>Figura 8</b> - Características organolépticas observadas nas formulações FB, F1, F2 e F3, sendo tempo inicial (t0) e tempo após 15 dias (t15). ....	56
<b>Figura 9</b> - Valores médios de pH e comparação estatística das formulações FB, F1, F2 e F3 no tempo inicial (t0) e após 15 dias (t15). ....	58
Figura 10- Perfil de espalhabilidade inicial (t0) das formulações FB, F1, F2 e F3. ....	60
<b>Figura 11</b> - Perfil de espalhabilidade das formulações FB, F1, F2 e F3 após teste de estabilidade preliminar (t15). ....	61
<b>Figura 12</b> - Valores médios de espalhabilidade e comparação estatística das formulações FB, F1, F2 e F3. ....	63
<b>Figura 13</b> - Valores médios de atividade antioxidante e comparação estatística das formulações FB, F1, F2 e F3. ....	66
<b>Figura 14</b> - Curvas de fluxo dos sistemas emulsivos FB e F3 nas temperaturas de 5°C, 25°C e 34°C. ....	69
<b>Figura 15</b> - Espectros de absorção óptica das formulações (A); Espectros de absorção óptica da epiderme controle e após 30 minutos da aplicação das formulações (B); Espectros de absorção óptica da derme controle e após 30 minutos da aplicação das formulações (n=3) (C). O quadrado pontilhado destaca a área característica de absorção da formulação F3. ....	78

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Composição da formulação base de uso tópico e funções dos respectivos componentes.....	41
<b>Tabela 2</b> - Planejamento experimental para as formulações. ....	42
<b>Tabela 3</b> - Porcentagens de inibição do radical ABTS <sup>•+</sup> frente à reação com LEV nas concentrações de 7,5 mg mL <sup>-1</sup> a 800 mg mL <sup>-1</sup> e com ECV nas concentrações de 39,0 mg mL <sup>-1</sup> a 625,0 mg mL <sup>-1</sup> .....	50
<b>Tabela 4</b> - Características organolépticas das formulações FB, F1, F2 e F3, sendo tempo inicial (t0) e tempo após 15 dias (t15).....	55
<b>Tabela 5</b> - Valores médios de pH das formulações FB, F1, F2 e F3 no tempo inicial (t0) e após 15 dias (t15). ....	57
<b>Tabela 6</b> - Valores de <i>p</i> - valor para pH. ....	57
<b>Tabela 7</b> - Valores médios de espalhabilidade inicial (t0) e após teste de estabilidade preliminar (t15) nos diferentes pesos sobre as placas (23, 25, 27 e 33 g) contendo as formulações FB, F1, F2 e F3.....	60
<b>Tabela 8</b> - Valores de <i>p</i> -valor para o ensaio de espalhabilidade .....	62
<b>Tabela 9</b> - Porcentagem média de retenção de umidade das formulações FB, F1, F2 e F3.....	64
<b>Tabela 10</b> - Valores de <i>p</i> -valor para atividade antioxidante.....	66
<b>Tabela 11</b> - Valores dos parâmetros obtidos pela análise reológica por cisalhamento contínuo dos sistemas emulsivos FB e F3, nas temperaturas de 5°C, 25°C e 34°C.....	72

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
2.1 PELE .....	18
2.2 ENVELHECIMENTO CUTÂNEO .....	20
2.2.1 ENVELHECIMENTO NA REGIÃO PERIORBITAL .....	22
2.3 ATIVOS NATURAIS .....	24
2.3.1 LEVANA .....	25
2.3.2 CAFÉ VERDE .....	29
2.4 BIOTECNOLOGIA ASSOCIADA AOS DERMOCOSMÉTICOS .....	32
2.5 EMULSÕES .....	34
2.5.1 GEL-CREME .....	36
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
3.1 OBJETIVOS GERAIS .....	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
4.1 PRINCÍPIOS ATIVOS .....	39
4.1.1 LEVANA (LEV) .....	39
4.1.2 EXTRATO SECO DE CAFÉ VERDE (ECV) .....	39
4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA) DOS ATIVOS .....	40
4.3 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES .....	41
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES .....	43
4.4.1 TESTE DE PRÉ-ESTABILIDADE .....	43
4.4.2 CARACTERIZAÇÃO ORGANOLÉPTICA .....	43
4.4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES .....	43
4.4.3.1 DETERMINAÇÃO DO pH .....	44
4.4.3.2 AVALIAÇÃO DA ESPALHABILIDADE (Ei) .....	44
4.4.3.3 TESTE DE RETENÇÃO DE UMIDADE (RU) .....	44
4.4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA) DAS FORMULAÇÕES .....	45
4.4.5. REOMETRIA DE CISALHAMENTO CONTÍNUO (FLUXO) .....	46
4.4.6 ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA .....	47
4.5 ESTABILIDADE PRELIMINAR DAS FORMULAÇÕES .....	47
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	47
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>79</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>80</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento cutâneo é um processo natural e irreversível, caracterizado pela modificação da morfofisiologia e aparência da pele que, antes com aspecto firme e tom uniforme, passa a apresentar manchas, flacidez e rugas. Com o aumento da expectativa de vida, houve maior procura por parte da população de produtos para a prevenção dos sinais de envelhecimento e a melhoria da saúde e bem-estar corporal. Uma das regiões que sofrem com este processo é a pele ao redor dos olhos, assim, a crescente preocupação com a saúde da mesma têm levado a busca por produtos que retardem ou minimizem este processo (GADELHA *et al.*, 2018; DWIVEDI *et al.*, 2019).

Na tentativa da busca pela juventude e com as inovações tecnológicas, é possível a manipulação de inúmeros produtos, principalmente os de uso facial. Devido às funções da pele de absorção, nutrição, proteção e autorregulação, o grande objetivo dos cosméticos é proteger e manter sua lubrificação, evitando sua desidratação, danificação e envelhecimento precoce, pela ação de alguns fatores externos como calor, sol, poluição, o que ocasiona perda excessiva de água, o que leva cada vez mais pessoas buscarem por tratamentos cosméticos (BLOISE, 2021).

Segundo a Associação Brasileira da Indústria Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), o Brasil ocupa a quarta posição entre os maiores consumidores de produtos cosméticos no mundo. De acordo com o levantamento de dados, o mercado de cosméticos fechou o ano de 2021 com um crescimento superior a 3,9%, alcançando R\$ 116,8 bilhões e até novembro de 2022 o setor cresceu 4,2%, atingindo um faturamento de R\$ 55,7 bilhões (ABIHPEC, 2023).

Vale também lembrar que uma característica da população brasileira é a pele se apresentar como mista e/ou oleosa, sendo essa uma característica comum na população devido ao clima tropical do país, isso porque as temperaturas mais elevadas e a maior exposição a luz solar faz com que a atividade das glândulas sebáceas seja maior contribuindo para o aparecimento e desenvolvimento de sintomas mais evidentes do envelhecimento da pele e o aumento da procura por tratamentos dermocosméticos (BUCHER; ANDRADE; ZANQUETA, 2023).

A área dos olhos é região mais fina e sensível da face e a que mais está propensa ao envelhecimento cutâneo, sendo assim, os cuidados com essa área se tornam tão importantes. Dentre as alterações estéticas que afetam a região facial, estão as disfunções como olheiras, rugas, flacidez, edema e as bolsas de gordura. Tendo em vista essas alterações, existem diversas sugestões de tratamento para corrigir as disfunções da região periorbital, como *peeling*, preenchimentos e eletroterapias (GADELHA *et al.*, 2018).

Logo, se tem a necessidade de que as formulações cosméticas para tratamento do contorno dos olhos possuam propriedades antioxidantes, drenantes, despigmentantes regeneradores, descongestionantes, hidratantes, estimulantes de colágeno e elastina e ativos que impeçam a formação de depósitos adiposos (GADELHA *et al.*, 2018).

A crescente busca pela beleza faz com que, cada vez mais surjam marcas e linhas de produtos que prometem mudanças na aparência, em decorrência disso, os estudos têm buscado tornar a composição dos produtos mais naturais, como o uso de extratos vegetais e biotecnológicos, deixando evidente a preocupação do consumidor quanto à origem e qualidade do produto adquirido, aliado a uma maior preocupação ambiental (CARVALHO, 2021; FERREIRA *et al.*, 2021; WASILEWSKI *et al.*, 2022).

A demanda por formulações com ativos biotecnológicos com propriedades cosmeceúticas vem crescendo consideravelmente, o que estimula a pesquisa e desenvolvimento de produtos que os contêm, já que apresentam biocompatibilidade, inocuidade, propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana e anti-irritante, bem como bom custo-benefício e eficácia equivalente ou superior aos cosméticos usualmente comercializados (SILVA *et al.*, 2019).

Uma tendência recente é a incorporação de ativos de origem microbiana à formulações cosméticas, estes são obtidos através de processos biotecnológicos, metabólitos fúngicos e bacterianos (como enzimas, peptídeos e biopolímeros funcionais). Quando incorporados a cosméticos, são capazes de modular o microbioma cutâneo, potencializar os efeitos dos demais ativos e melhorar sua permeação em camadas mais profundas da pele e, principalmente, enriquecer a formulação com compostos antioxidantes, calmantes e hidratantes (BELI; MAGESTE; TAKETANI, 2020; WASILEWSKI *et al.*, 2022).

Um exemplo destes metabólitos é a levana, um exopolissacarídeo obtido por processo biotecnológico a partir de *Bacillus subtilis* que possui encontra uma gama de aplicações nos setores biomédico, alimentício e cosmético, especialmente, em formulações tópicas faciais devido suas inúmeras propriedades antienvhecimento (SILVA *et al.*, 2019; WASILEWSKI *et al.*, 2022).

Outra classe de ativos naturais inclui os de origem vegetal, que podem ser incorporados a formulações cosméticas na forma de óleos, ceras, óleos essenciais e extratos (FERREIRA *et al.*, 2021). Um exemplo destes é o café verde. Devido sua propriedade surfactante, antimicrobiana e antitumoral, possui aplicabilidade nos setores agrícola, cosmético e farmacêutico, onde, neste último, o óleo e o extrato vêm sendo utilizados para o desenvolvimento de cosméticos tópicos como protetores solares, loções hidratantes, cremes anticelulite e esfoliantes corporais (BUZANELLO, 2019; PRATIWI, 2021).

O extrato de café verde também possui ácidos clorogênicos e outros compostos fenólicos, que lhe conferem propriedade antioxidante e fotoprotetora, por exemplo; por isso tem chamado a atenção da indústria cosmética, já que é potencialmente aplicável em formulações cosméticas (BÖGER *et al.*, 2022). Exemplos disso incluem o desenvolvimento de formulações antissinais para rosto (ENDO *et al.*, 2023) e para a região periorbital (SANTOS *et al.*, 2017), para tratamento de celulite (AYMORI *et al.*, 2022) e protetores solares (FATMAWATI *et al.*, 2022).

Vista a escassez de formulações naturais antissinais para a região periorbital e a sensibilidade desta região a procedimentos e ativos agressivos, há necessidade do desenvolvimento de uma formulação contendo ativos naturais, tanto de origem vegetal quanto biotecnológica, para tratamento de sinais de envelhecimento nesta área que seja tão ou mais eficaz que as atualmente existentes no mercado.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PELE

A pele é o maior órgão do corpo e estende-se por uma área de cerca de 2 m<sup>2</sup> (em adultos), chegando a pesar aproximadamente 20 kg (FENNER; CLARK, 2016; YADAV *et al.*, 2019). Apresenta diversas funções como: proteção dos órgãos internos, barreira tanto para perda de água quanto para a entrada de agentes exógenos (como compostos químicos, poluição, patógenos e radiação ultravioleta, por exemplo), além de ser responsável pela termorregulação, síntese de vitamina D e interação com o meio ambiente (ABDO; SOPKO; MILNER, 2020). Sua espessura varia de acordo com a região do corpo e sua anatomia conta com 3 camadas distintas: epiderme, derme e hipoderme, além de estruturas anexas como folículos pilosos e glândulas sudoríparas e sebáceas, como visto na figura 1 (YADAV *et al.*, 2019).

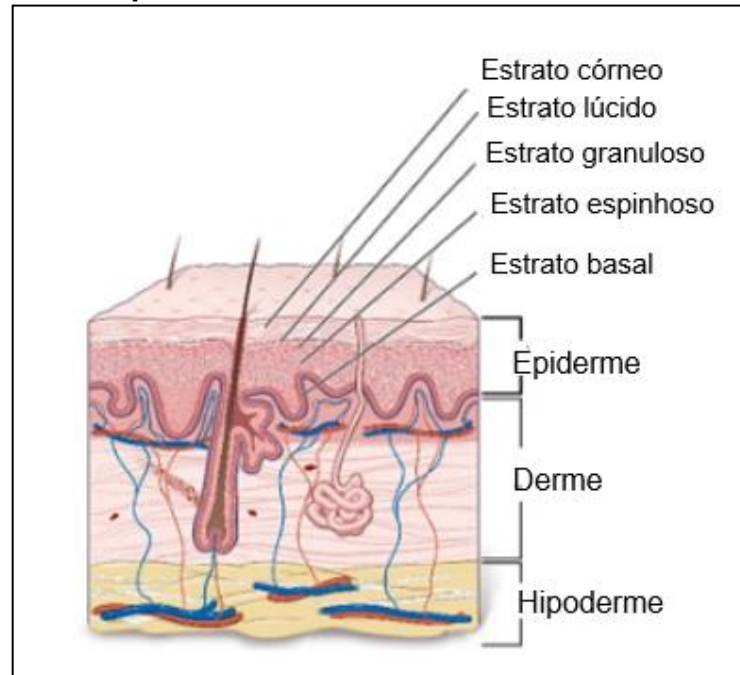
Quanto às camadas, a mais externa é a epiderme. Esta é avascular e composta por células anucleadas e queratinizadas, denominadas de queratinócitos, dispostas em 5 estratos: 1) córneo: mais externo e composto por células mortas, onde ocorre o processo de descamação, 2) lúcido: logo abaixo do estrato córneo, está presente apenas na região palmoplantar; 3) granuloso: responsável por barrar a perda de água transepidermal, 4) espinhoso: secreta ácidos graxos, auxiliando na firmeza e luminosidade da pele e 5) basal: o mais interno e produtor de células germinativas nucleadas, que se diferenciarão para repor aquelas destacadas do estrato córneo (WONG *et al.*, 2016; YOUSEF; ALHAJJ; SHARMA, 2017; DWIVEDI *et al.*, 2019).

Além dos queratinócitos, a epiderme apresenta outras células como melanócitos, células de Merkel e de Langherans (YOUSEF; ALHAJJ; SHARMA, 2017). Com exceção do estrato córneo, os demais são compostos por células viáveis (nucleadas) (NG; LAU, 2015).

É na epiderme que ocorre o processo de descamação, que se dá de forma ascendente (isto é, do estrato basal para o córneo) e consiste na renovação celular da epiderme através da produção de novos queratinócitos pelo estrato basal, que vão se diferenciando até atingir a camada córnea, de onde se desprendem as células mais velhas (BARONI *et al.*, 2012; NG; LAU, 2015; DWIVEDI *et al.*, 2019).

Este processo pode levar aproximadamente entre 28 e 50 dias para se completar dependendo da idade do indivíduo, uma vez que em idosos ocorre mais lentamente (DWIVEDI *et al.*, 2019).

**Figura 1 - Anatomia da pele humana com suas camadas e anexos.**



**Fonte:** adaptado de Cleveland Clinic (2021).

A camada intermediária da pele é a derme. Esta camada é vascularizada e responsável pela sustentação e nutrição da epiderme e, além de vasos sanguíneos, nela estão presentes anexos cutâneos (glândulas sudoríparas e sebáceas, folículos pilosos), células como mastócitos, adipócitos, macrófagos e células-tronco, além de vasos linfáticos, terminações nervosas e fibras e fibras de colágeno e de elastina (BENSON; WATKINSON, 2012; NG; LAU, 2015). Divide-se em 2 porções: papilar (mais fina e composta por fibras colágenas frouxamente dispostas) e reticular (mais espessa e contendo um arranjo denso de fibras colágenas) (DWIVEDI *et al.*, 2019). Outras funções da derme incluem termorregulação e sensações tátil, térmica, de pressão e de calor (BROWN, KRISHNAMURTHY, 2022).

Por fim, a camada mais interna da pele corresponde à hipoderme. Sua composição apresenta células adiposas, fibroblastos e macrófagos, além de vasos sanguíneos e linfáticos. Como funções, a hipoderme atua como reserva de

energia, na proteção contra choques mecânicos e como isolante térmico (BENSON; WATKINSON, 2012; WONG *et al.*, 2016).

## 2.2 ENVELHECIMENTO CUTÂNEO

O envelhecimento pode ser definido como um processo natural, gradual e irreversível em que ocorrem alterações morfofisiológicas no organismo ocasionadas por fatores internos e externos (DWIVEDI *et al.*, 2019; SCHKOWSKI; HÜLS, 2020).

Com o passar do tempo, o organismo sofre modificações decorrentes do envelhecimento e com a pele não é diferente, visto que está constantemente exposta a agressões do ambiente (BOCHEVA; SLOMINSKI; SLOMINSKI, 2019). O envelhecimento cutâneo está atrelado a alterações na morfofisiologia da pele, que culminam na mudança de seu aspecto e decaimento de sua funcionalidade em todas as camadas. Tais alterações passam a ser mais perceptíveis, aproximadamente, a partir dos 30 anos através do aparecimento de rugas, flacidez e manchas (KAMMEYER; LUITEN, 2015; BERNARDO; SANTOS; SILVA, 2019; PARRADO *et al.*, 2019).

Os fatores que contribuem para a ocorrência deste processo podem ser de origem intrínseca ou extrínseca e atuam simultaneamente no organismo (KAMMEYER; LUITEN, 2015). O envelhecimento intrínseco (ou cronológico) ocorre naturalmente e está relacionado ao metabolismo e à genética do indivíduo, ocasionando o surgimento de rugas finas, afinamento da pele e das unhas e perda de sensibilidade. Já o extrínseco está relacionado a agentes externos como poluentes, radiação ultravioleta e estilo de vida (alimentação, atividade física e tabagismo, por exemplo) e culmina na aparição de rugas mais profundas, discromias, perda de elasticidade e uma pele mais áspera (ECKHART; TSCHACHLER; GRUBER, 2019; PARRADO *et al.*, 2019).

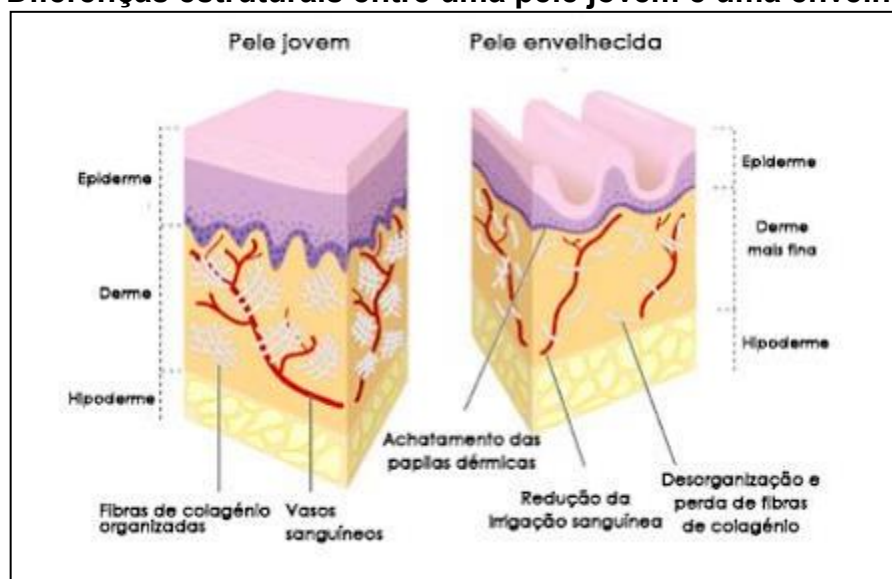
Vale ressaltar que, em ambos há produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), responsáveis por danificar componentes celulares; contudo, o extrínseco se sobrepõe ao intrínseco no que diz respeito à extensão de danos (KAMMEYER; LUITEN, 2015; PARRADO *et al.*, 2019).

Afetando todas as camadas, o envelhecimento é responsável pelo afinamento da epiderme e da derme, além do decaimento da quantidade de terminações nervosas e da produção hormonal, o que resulta em uma pele mais sensível à ação de agentes agressores externos (Figura 2) (RINNERTHALER *et al.*, 2015). Somado a isto, também há redução da produção de queratinócitos no estrato basal e das secreções sebácea e sudorípara sobre a epiderme, culminando em uma pele mais fina e ressecada (RITTIÉ; FISCHER, 2015).

Na derme, ocorre à ruptura das fibras de colágeno e elastina (responsáveis pela sustentação da pele), além da redução de ácido hialurônico e fibroblastos, o que favorece a formação de rugas e flacidez (RINNERTHALER *et al.*, 2015; RITTIÉ; FISCHER, 2015). Também há perda de sensibilidade, miniaturização dos folículos pilosos e redução na vascularização, o que compromete a termorregulação e o aporte de nutrientes e oxigênio na pele, que passa a ter uma aparência mais pálida (TOBIN, 2017).

Já na hipoderme ocorre afinamento da camada de gordura subcutânea por conta da redução na proliferação, no tamanho e na adesão dos adipócitos, contribuindo assim para a perda da firmeza da pele e aparição de rugas (WOLLINA *et al.*, 2017).

**Figura 2 - Diferenças estruturais entre uma pele jovem e uma envelhecida.**



Fonte: Santos; Chominski (2019).

A explicação mais aceita para o processo de envelhecimento tem como base nos radicais livres, gerados por conta do estresse oxidativo - tanto exógeno quanto endógeno. A mitocôndria é a principal fonte endógena de radicais livres, pois é a organela em que ocorre a metabolização do oxigênio através da respiração celular. A conversão de O<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub> ocorre em múltiplas etapas e, no decorrer deste processo, há produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que acabam por reagir com componentes celulares (como DNA mitocondrial, proteínas e lipídeos) danificando-os e, conseqüentemente, comprometendo a estrutura e funcionalidade do tecido (MARTELLI, NUNES, 2014; RINNERTHALER *et al.*, 2015; BIRCH-MACHIN; BOWMAN, 2016). A produção destes radicais também pode ser desencadeada por agentes exógenos, como radiação ultravioleta, poluição, tabagismo e dietas hipercalóricas (MARTELLI, NUNES, 2014).

Na tentativa de retardar os danos causados pelo envelhecimento, as pessoas passam a adotar hábitos de vida mais saudáveis, uma dieta balanceada contendo alimentos ricos em vitaminas A, C e E, suplementação oral de vitaminas e de colágeno, procedimentos estéticos e uso de cosméticos antiaging (ZHANG; DUAN, 2018; PACHECO; LOBO, 2021).

### **2.2.1 ENVELHECIMENTO NA REGIÃO PERIORBITAL**

O processo de envelhecimento cutâneo ocasiona modificações na aparência da face, entre as áreas, a região dos olhos é uma das mais sensíveis e delicadas do rosto e uma das áreas que apresenta os primeiros sinais de envelhecimento, como linhas finas, rugas, olheiras e bolsas (VASCONCELOS *et al.*, 2020).

A região periorbital é umas das primeiras áreas a mostrar alguns sinais do envelhecimento, como rugas, flacidez e hiperpigmentação periorbital. Um dos motivos deste envelhecimento precoce desta região é devido à região dos olhos ser muito fina e se distender facilmente (VASCONCELOS *et al.*, 2020).

O que ocorre é que a pele diminui a sua espessura durante o processo de envelhecimento, o que lhe confere translucidez e permite maior visualização da rede vascular superficial, acrescentando um tom avermelhado e azulado. A exposição solar destrói as fibras de colágeno e elastina, e, além disso,

estas alterações podem formar "bolsas", onde a causa mais frequente é a retenção excessiva de líquidos ou, em alguns casos, uma hérnia prévia à gordura da área (SILVA; MUNIZ; BERGAMO, 2021).

Vale lembrar que o esqueleto facial sofre alterações graduais de acordo com o envelhecimento, promovendo o aparecimento dos sinais do envelhecimento como as rugas, decaimento dos músculos e tecido adiposo. Ao longo do tempo, a ação dos fatores intrínsecos e extrínsecos promovem alterações visíveis na face como o surgimento de marcas de expressão e rugas, bem como a desidratação e o aspecto de cansaço na face (TALBERT *et al.*, 2014).

As alterações anatômicas promovidas pelo envelhecimento ocorrem em diferentes áreas do rosto. As rugas, na região glabellar, são causadas pelo músculo corrugador e prócero, a flacidez do compartimento de gordura retro orbital dos olhos, é ocasionado devido a alterações no músculo orbicular do olho, ligamento retentor orbicular e músculo frontal, bem como do osso subjacente. Já a área do ligamento lacrimal e do compartimento de gordura orbicular dos olhos, o que pode afetar a aparência dos montes malares (TALBERT *et al.*, 2014).

O envelhecimento também se deve a forças gravitacionais e da mímica facial que gera modificações anatômicas faciais. Em um rosto envelhecido a pele da pálpebra inferior se torna mais alongada, expondo herniações da gordura orbital e a margem orbitária inferior. Por outro lado, a pálpebra inferior escavada e alongada combina com a diminuição da vitalidade da pele e com o aprofundamento das linhas nasolabial e nasojuval resultando em fisionomia senil (VILEFORT *et al.*, 2023).

Outro clássico sinal do envelhecimento desta região são as formações das rugas, que são causadas por segmentos essenciais do tecido conjuntivo, como por exemplo, o colágeno e elastina, onde a pele sofre uma redução em sua elastina natural e com a redução das funções do tecido conjuntivo, causa então camadas de gordura na pele, além da falta de oxigenação nos tecidos que induz ao processo de desidratação da pele o que acaba resultando nas rugas. As rugas denunciam o envelhecimento facial, sendo causadas principalmente pela hiperatividade do músculo orbicular da pálpebra (TALBERT *et al.*, 2014).

A ocorrência de hiperpigmentação periorbital, popularmente conhecida como "olheira" é outro sinal evidente das modificações que ocorrem nesta

região, sendo caracterizada pelo escurecimento da área na região dos olhos provocada por inúmeros fatores, sejam eles intrínsecos e extrínsecos. Essas manchas podem ser azuladas, marrons ou vermelhas e estão relacionados a muitas condições como cansaço, envelhecimento da pele, traços étnicos, predisposição genética, processos circulatórios e à atividade dos melanócitos (MAC-MARY *et al.*, 2019).

### **2.3 ATIVOS NATURAIS**

O interesse produtos naturais deve-se principalmente às tendências de sustentabilidade e bem-estar, juntamente com a procura de um consumo consciente que estão em alta no mercado (PERES; UEMURA; ZANGHETTIN, 2021; FURMAN *et al.*, 2022).

Movidos pelo mercado de produtos naturais, orgânicos e veganos, os consumidores estão optando cada vez por cosméticos que atendam a esses requisitos. Assim, o consumo responsável começa a fazer parte da agenda do consumidor global de cosméticos, que está migrando, em diferentes graus, para uma experiência de beleza mais natural. Isso favorece marcas que combinam atributos verdes com conveniência e acessibilidade, e que sejam parceiras dos consumidores interessados em um consumo mais responsável de cosméticos (PERES; UEMURA; ZANGHETTIN, 2021; FURMAN *et al.*, 2022).

De acordo com as mudanças no comportamento do consumidor e as alterações de demanda, as ofertas de mercado tentam se moldar ao novo modelo de consumo. Procurando fornecer ao cliente algo além do produto, que agregue valor na experiência com a marca e que além dos aspectos mercadológicos, cumpra com suas obrigações ambientais e sociais (SACUTE, 2019).

Este fato está permitindo a entrada de novas empresas no mercado. Estas já se vendem de forma diferenciada, mostrando posicionamento forte e de acordo com os novos modelos de negócio, mais sustentável, mais ativo socialmente e politicamente. Abordando o consumidor, não só pelo produto estabelecido em padrões de qualidade essenciais, mas pela identificação pessoal com a marca (SACUTE, 2019).

Em relação à sustentabilidade, os avanços nas pesquisas cosméticas refletem uma tendência tecnológica mundial concentrada nos produtos

naturais e na biodiversidade relacionada às plantas e seus derivados, como extratos, óleos fixos e essenciais, como fontes de matérias-primas e princípios ativos para uso em produtos cosméticos (ZUCCO; SOUSA; ROMEIRO, 2020).

E quando falamos em matérias-primas naturais, vale ressaltar a imensa diversidade de plantas e microorganismos existentes no nosso planeta, fornecendo riquezas naturais no desenvolvimento de diversos produtos e contribuindo para o mercado científico, tecnológico e econômico mundial (FERREIRA NETO *et al.*, 2022). Estes organismos são importantes fontes de substâncias biologicamente ativas, entre as quais a bioprospecção de agentes com características antioxidantes e antimicrobianas vem ganhando destaque na indústria biotecnológica, no desenvolvimento de produtos cosméticos (BELI *et al.*, 2020).

### 2.3.1 LEVANA

A levana (Figura 3) é um exopolissacarídeo não-estrutural composto por resíduos de frutose unidos por ligações do tipo  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 6), podendo apresentar ramificações ligadas por  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) e um resíduo terminal de glicose. É encontrada em algumas espécies de plantas assim como em bactérias e fungos, atuando como reserva de energia e na formação de biofilme microbiano, respectivamente (SRIKANTH *et al.*, 2015). Sua massa molecular é de aproximadamente  $10^7$  Daltons, correspondente a aproximadamente 60.000 unidades de frutose unidas por ligações  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 6) (BERSANETI *et al.*, 2017).

A síntese da levana ocorre normalmente pela levanasacarase, uma enzima multifuncional que possui atividade de hidrólise (quebra da molécula de sacarose em: glicose e frutose na ligação  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1), transfrutossilacção (transferência do grupo frutossil para uma molécula aceptora) e polimerização (síntese das frutanas, como frutooligossacarídeos e levana). Trata-se de uma enzima que pertence ao grupo das hidrolases glicosídicas e pode ser produzida por uma ampla variedade de cepas, incluindo *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Zymomonas mobilis*, *Pseudomonas fluorescens* e *Lactobacillus reuteri* (ERNANDES, GARCIA-CRUZ, 2005; GU *et al.*, 2017).

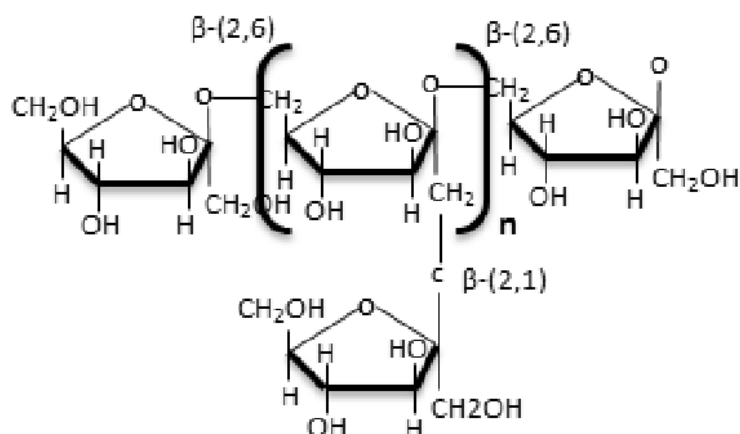
Em relação à produção de levana, a quantidade desses exopolissacarídeos produzidos pelos microrganismos está relacionada com as

condições específicas de crescimento celular e com a composição do meio de cultura. Via de regra, é produzida diretamente do microrganismo via fermentação submersa ou pela enzima isolada, na maioria dos casos utilizando a sacarose, xaropes ou melão como substrato (SANTOS; CAVALCANTI; CELLIGOI, 2011; TOMULESCU *et al.*, 2016; ONER, HERNÁNDEZ, COMBIE, 2016).

Os principais fatores que influenciam na produção de levana são: fonte de carbono e a sua concentração, temperatura, pH, tempo de cultivo, fonte de nitrogênio, presença de sais no meio de fermentação, agitação e aeração (SHIH; YU, 2005; WU *et al.*, 2013; LU *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014; BERSANETI *et al.*, 2017).

A levana também pode ser obtida por síntese enzimática, ou seja, sem a presença de células microbianas no meio de fermentação, porém as condições ideais devem ser próximas da atividade enzimática, com pH ideal de 6,0 ou próximo da neutralidade, temperatura entre 35°C/40°C, essas condições têm sido estudadas por vários outros autores (ZHANG *et al.*, 2014; LU *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2017; BERSANETI *et al.*, 2017; KIRTEL *et al.*, 2018; NI *et al.*, 2018).

**Figura 3 - Estrutura química da levana.**



**Fonte:** Da Silva *et al.* (2019).

Como propriedades, a levana é um composto renovável, termoestável, flexível, hidrófilo e lipossolúvel e *ecofriendly*. Além disso, também possui propriedades biomédicas e cosméticas, sendo um potente agente antitumoral, anti-

irritante, anti-HIV, imunomodulador, hipoglicemiante e hipocolesterolêmico, com alta capacidade antioxidante, clareadora e formadora de filme, podendo ser amplamente empregada nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (DA SILVA *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2020; DAHMER *et al.*, 2023).

Algumas propriedades biológicas da levana são importantes para sua utilização em cosmético, destacando a capacidade de retenção de água (hidratação), lubrificação, viscoelasticidade, solubilidade, antioxidante, anti-inflamatório, biocompatibilidade, biodegradável, entre outras (DA SILVA *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2020; DAHMER *et al.*, 2023).

Além das citadas acima, apresenta propriedades anti-inflamatória, antioxidante, hidratante, clareadora e calmante, além da capacidade de atuar na proliferação de queratinócitos e fibras de colágeno (KIM *et al.*, 2005). Devido a estas características, (e também por ser inócua), encontra uma gama de aplicações nos setores biomédico, alimentício e cosmético, especialmente, em formulações tópicas faciais (DA SILVA *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2020; DAHMER *et al.*, 2023).

Quanto à sua aplicação em cosméticos de uso tópico, tem-se conhecimento do desenvolvimento de formulações faciais (SILVA *et al.*, 2022; HELENAS *et al.*, 2023), labiais (DAHMER *et al.*, 2023) e corporais (VARARUNGZARIT *et al.*, 2021) em que a levana é aplicada em associação com ativos de origem vegetal (óleos essenciais) e biotecnológicos (soforolipídeos) para potencializar suas propriedades. Tais formulações mostraram-se eficazes na hidratação da pele e com alta capacidade antioxidante.

As aplicações deste polissacarídeo são diversas, com destaque nas indústrias biomédica, alimentícia e cosmética, podendo atuar como espessante, estabilizador, componente de embalagens, bem como na regeneração de tecidos lesionados e em sistemas de liberação de fármacos. Já no setor cosmético, devido às propriedades clareadora, hidratante, antioxidante e de formação de filmes, pode ser empregada na fabricação de produtos capilares (mousses, géis, sprays, shampoos) e dermocosméticos clareadores, hidratantes e antienvhecimento (KÜÇÜKAŞIK *et al.*, 2011; RADCHENKOVA *et al.*, 2015; DA SILVA *et al.*, 2020; DAHMER *et al.*, 2022; HELENAS *et al.*, 2023).

A síntese microbiana de levana pode ser feita a partir de técnicas de fermentação como, por exemplo, o cultivo submerso da cepa do microrganismo em meio líquido, sob tempo, temperatura, agitação e pH controlados, normalmente

utilizando a sacarose como fonte de carbono. Outra forma de síntese inclui a reação *in vitro* do substrato com a levanasacarase, que é a enzima que catalisa o processo através de reações de transfrutoseilação, hidrólise e polimerização (HELENAS *et al.*, 2022).

As características e o rendimento da levana obtida dependerão do microrganismo empregado, bem como das condições do meio de cultivo. Ao fim da síntese, o polissacarídeo é purificado e submetido a caracterizações físico-químicas (DA SILVA *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2020; DAHMER *et al.*, 2022; HELENAS *et al.*, 2023).

O desenvolvimento de formulações contendo este biopolímero é exemplificado através de trabalhos como de Helenas e colaboradores (2023), que elaboraram uma formulação facial contendo levana associada ao extrato de *Aloe vera* e óleo de abacate e, também o de Silva e colaboradores (2022), com formulação facial contendo levana e óleos de canela e amêndoas.

Já Vararungzarit e colaboradores (2021) desenvolveram um hidratante corporal e Dahmer e colaboradores, uma formulação labial associando levana, soforolipídeos de *Starmarella bombicola* (levedura) e óleo essencial de toranja. Todas as formulações foram excelentes hidratantes e mostraram alta atividade antioxidante, sobretudo, aquelas em que houve associação com ativos vegetais, uma vez que estes potencializaram as propriedades da levana. Logo, fica evidente a potencial incorporação deste polissacarídeo em cosméticos, já que apresenta propriedades cosmeceúticas desejáveis.

Em 2020 a Biotec Ativos, startup instalada na Incubadora Tecnológica da Agência de Inovação (Aintec) da UEL lançou oficialmente o primeiro produto de uma linha de dermocosméticos destinados ao público feminino, que reúne tecnologia e sustentabilidade. O produto, chamado de Biolevan Sérum, foi devidamente patenteado e desenvolvido com ativos biotecnológicos (levana microbiana) e que traz como principal característica sua propriedade antioxidante, podendo ser utilizado em qualquer tipo de pele, promovendo o efeito preenchedor, ao mesmo tempo em que hidrata e controla a oleosidade (O PEROBAL, 2020).

### 2.3.2 CAFÉ VERDE

O café é um fruto com enorme importância comercial no mundo, pois quando o grão é torrado, torna-se uma das bebidas mais consumidas mundialmente, portanto, possui grande importância econômica e social para o Brasil (principal produtor e exportador do café). O café verde, segundo a International Coffee Organization, é definido como o grão de café descascado antes de passar pelo processo de torrefação (ICO, 2007; VOYTENA, 2017).

O café (*Coffea* sp.) é originário da Etiópia e que na atualidade é amplamente cultivada ao redor mundo. As plantas costumam apresentar porte arbustivo, com cerca de até 4 metros de altura, folhas longilíneas, brilhantes e onduladas na borda e grãos ovóides, cuja coloração (quando maduros) varia entre vermelho e amarelo (Figura 4) (BATISTA, 2010).

**Figura 4 - Planta da espécie *Coffea canephora*: arbusto (A), flores (B) e frutos maduros (C).**



Fonte: Kochko *et al.* (2010).

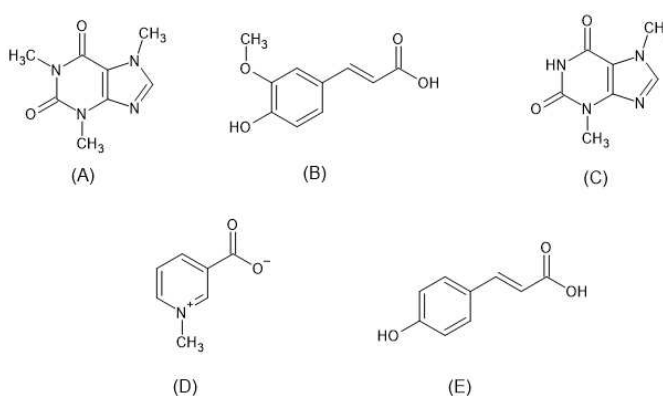
O café pertence à família Rubiaceae, que possui cerca de 500 gêneros e mais de 6.000 espécies. As duas espécies mais importantes, economicamente, são o *Coffea arabica* L, que responde por cerca de 60% a 70% da produção mundial e o *C. canephora* Pierre ex. A. Froehner (café robusta, também conhecido como Conilon no Brasil, e que responde por 30% a 40% de produção

mundial, sendo proveniente de uma árvore de porte menor, que pode crescer em altitudes mais baixas que o arábica, com rendimentos mais altos e com maior resistência para doenças (CARVALHO *et al.*, 2017; VOYTENA, 2017; PEREIRA *et al.*, 2020).

Além da relevância econômica do café, estudos recentes indicam potenciais benefícios à saúde associados à bebida, incluindo a redução da incidência de várias doenças crônicas e degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, entre outras. Há, portanto, um interesse crescente na caracterização de compostos bioativos específicos do café que possam servir como agentes fisiologicamente ativos (LUDWIG *et al.*, 2014).

Os componentes bioativos do café incluem carotenoides, terpenos, metilxantinas (como cafeína e teobromina), vitaminas, polifenóis (como os ácidos clorogênicos, cafeico, ferúlico e cumárico), flavonoides, antocianinas e trigonelina, além de lipídeos, carboidratos e proteínas e ainda melanoidinas e fenilalaninas, formadas como produtos da reação de Maillard após sua torra (Figura 5). Também apresenta íons como potássio, cálcio e magnésio. Todos estes compostos são responsáveis pelo sabor e aroma do café, bem como por suas propriedades (VIEIRA, 2015; JESZKA-SKOWRON *et al.*, 2016).

**Figura 5 - Estruturas químicas de compostos presentes no café verde: cafeína (A), ácido ferúlico (B), teobromina (C), trigonelina (D) e ácido cumárico (E).**



Fonte: Vieira (2015).

A família Rubiaceae é conhecida pelo alto teor de compostos fenólicos e alcalóides em seus grãos. Muitas das pesquisas têm sido conduzidas sobre as propriedades bioativas do café, como sua atividade antioxidante, antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, antitumoral, redução de oxidação e danos às macromoléculas, auxílio em cicatrização cutânea, estimulatória sobre o sistema nervoso central, entre outros (VOYTENA, 2017).

O café verde se destaca por possuir maior concentração de bioativos, tais como: cafeína, ácidos clorogênicos, compostos fenólicos e alcaloides que possuem atividade antioxidante, sendo assim, espera-se uma maior concentração destes compostos, propiciando maior atividade antiglicante, e consequentemente de antienvhecimento na formulação (VATS, 2022; ENDO *et al.*, 2023).

Os subprodutos do café verde como o óleo e extrato podem ser totalmente aproveitados industrialmente, com aplicações nos setores alimentício, farmacêutico e cosmético. O grão destina-se ao consumo humano, enquanto que os demais componentes do fruto podem ser utilizados, por exemplo, como fertilizante e na produção de biodiesel (JANISSEN; HUYNH, 2018).

O óleo de café verde, além das atividades citadas anteriormente, apresenta propriedades anti-UV, hidratante e anti-irritante, ajudando no tratamento de doenças de pele (acne, psoríase e alergias) e na cicatrização de feridas; por isso é aplicável a cosméticos anti-idade e hidratantes para peles extrassecas (BUZANELLO, 2019).

De modo semelhante, o extrato seco de café verde (ECV) é a principal matéria-prima da indústria de café solúvel. Entre suas propriedades está a capacidade antioxidante decorrente da presença de bioativos naturais do produto, como cafeína e ácidos clorogênicos. Devido à estabilidade térmica dos compostos, produzindo-se um extrato a partir de café verde, seria possível obter maior concentração de bioativos como cafeína e ácidos clorogênicos e maior atividade antioxidante, com valor competitivo e potencial para uso em produtos. O ECV também contribui para o aumento de colágeno na pele, o que torna interessante sua incorporação a produtos cosméticos, como, por exemplo, protetores solares e hidratantes (VIGNOLI *et al.*, 2014; CORSO *et al.*, 2016).

A incorporação do ECV a cosméticos inclui loção corporal (CHAIYASUT *et al.*, 2018), creme para as mãos (CHAIYASUT *et al.*, 2018), creme esfoliante corporal (HILDA; ARINI; NANCY, 2021), sabonete glicerinado (KAISANGSRI *et al.*, 2020), protetor solar (FATMAWATI *et al.*, 2022), creme anticelulite (AYMORI *et al.*, 2022), creme para a área dos olhos (SANTOS *et al.*, 2017) e produtos antienvhecimento (ENDO *et al.*, 2023).

Santos *et al.* 2017 avaliou diferentes formulações do tipo emulsão contendo entre outros compostos, o extrato de café verde, onde verificou formulações que se destacaram pela alta atividade antioxidante sendo potencialmente utilizável na região dos olhos como ação preventiva do envelhecimento cutâneo, entretanto, mais estudos são necessários para verificar a sua eficácia e segurança.

Um estudo *in vitro* realizado por Cho *et al.* (2017) avaliaram as capacidades de absorção de frações extraídas de extratos de café verde na faixa de comprimento de onda UV-B (290-320 nm). Os resultados revelaram um fator de proteção solar dose-dependente do teor de ácido clorogênico nos extratos de café verde onde a capacidade de absorção foi associada à presença de ligações duplas conjugadas na estrutura do ácido clorogênico, que foram previamente relatadas como absorvedores eficientes das faixas de comprimento de onda UV-A e UV-B.

O estudo de Perugini *et al.* (2020), realizado sobre a aplicabilidade de extratos de café para a redução de linhas finas, rugas e aspereza da pele, avaliou o efeito antienvhecimento em mulheres saudáveis através do uso de máscaras de biocelulose ativa contendo, entre outros fitoquímicos, extrato de torta de semente de *Coffea arabica*. As voluntárias aplicaram as máscaras três vezes por semana durante 1 e 2 meses, ao final do processo foi percebida diminuição significativas na rugosidade da pele e na área das rugas foram observadas em ambos os períodos.

## **2.4 BIOTECNOLOGIA ASSOCIADA AOS DERMOCOSMÉTICOS**

A biotecnologia usa organismos vivos ou suas matérias-primas para modificar ou criar produtos ou serviços inovadores, buscando desenvolver e/ou melhorar os métodos e procedimentos produtivos. A biotecnologia extrai dos organismos vivos todos os materiais necessários para criar, transformar e modificar

através de processos tecnológicos o meio em que se vive, sejam para fins agrícolas, fármacos, medicamentos, alimentos e cosméticos (BARBA; SANTOS, 2020).

Na área de cosméticos, a utilização dos recursos biotecnológicos tem avançado com o intuito de originar novos ou aperfeiçoar os processos já existentes. Assim, faz-se a utilização de matérias-primas como biopolímeros funcionais, produtos obtidos por processos fermentativos, tecnologias de DNA recombinante e enzimas. As empresas de biotecnologia buscam desenvolver novas classes de produtos biológicos compreendendo proteínas recombinantes, bem como novas aplicações de tecnologias moleculares para a descoberta de drogas convencionais de pequenas moléculas, além de proteínas e enzimas utilizadas pelas indústrias (MCNAMEE *et al.*, 2021).

Vale ressaltar o atrelamento da biotecnologia ao desenvolvimento sustentável, onde se visa a produção de matérias-primas renováveis de maior qualidade, segurança alimentar e aplicações ambientais diversas para descontaminação de rios e solos, produzindo pouco ou nenhum resíduo e, sempre buscando utilizar de processos biológico (LOKKO *et al.*, 2018).

A pesquisa e o desenvolvimento de novas formulações cosméticas vêm sendo fomentada pela utilização de ativos naturais advindos da biodiversidade sendo o Brasil um país que possui uma capacidade elevada no que diz respeito ao desenvolvimento de produtos biotecnológicos, como novos fármacos e enzimas, onde o mesmo apresenta uma das maiores reservas de recursos naturais, variados biomas, bem como a mais abundante biodiversidade tropical do planeta, ganhando força no cenário mundial (HENRIQUE; LOPES, 2017).

Além disso, há também a evidente biodiversidade microbiana disponível, apresentando grande potencial para bioprospecção, por este motivo, a tendência é de que cada vez mais as empresas se integrem, onde o aproveitamento da biodiversidade juntamente à sua característica sustentável possa gerar maior rentabilidade de mercado, associado à exploração da mesma (HENRIQUE; LOPES, 2017).

Atualmente, existem diversos ativos utilizados em cosméticos oriundo de biotecnologia e as empresas têm investido alto no desenvolvimento de matérias-primas mais efetivas e que apresentam resultados eficazes. Além disso, se tem a preocupação com o desenvolvimento sustentável e a produção de cosméticos naturais (BIANCHET *et al.*, 2020).

## 2.5 EMULSÕES

Uma parte considerável da aceitação de um produto cosmético ou farmacêutico constitui-se na forma farmacêutica empregada, que deve se adequar com exatidão às suas finalidades. As emulsões são hoje em dia um dos veículos mais usados na fabricação de produtos cosméticos, porque exibem uma série de benefícios como a compatibilidade pelo manto epicutâneo que recobre o exterior da epiderme, possibilitando a incorporação simultânea num mesmo produto de substâncias hidrofílicas e lipofílicas além de várias texturas, consistência e eficácia de penetração (KRAMBECK, 2009).

A palavra emulsão provém do latim e tem significado de mungir, sendo empregada nas formulações com aspecto leitoso e tem as particularidades de um complexo disperso de duas fases líquidas. Engloba triglicerídeos de fonte vegetal, animal, sintético ou mineral em sua elaboração, e destinado a proteger a epiderme, não possibilitando que a pele fique com aspecto gorduroso e com boa espalhabilidade, favorecendo emoliência e hidratação (SIQUEIRA, 2016).

Emulsões são sistemas nos quais uma fase líquida ou sólida está espalhada em uma fase líquida externa. Sua principal função é se tornar um veículo para dispensação de fármacos diluído no estado oleoso ou aquoso. As emulsões farmacêuticas apresentam-se no estado coloidal, ou seja, o tamanho de suas partículas diferencia-se a começar de nanômetros até distribuições visíveis ou grosseiras de diversos micrometros (FLORENCE, 2011).

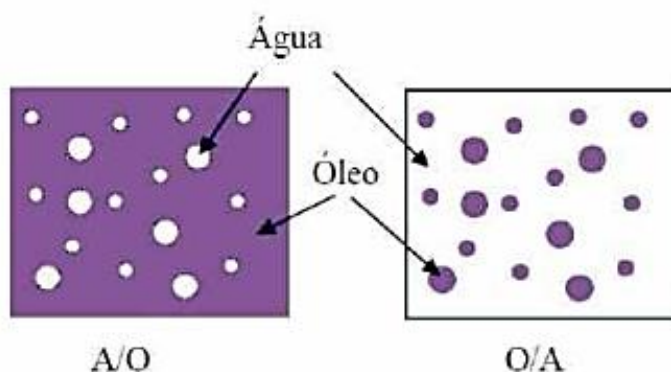
Os líquidos imiscíveis são retratados como “óleo” e “água”, já que, um dos líquidos é apolar e o outro polar. As emulsões óleo em água (O/A) exibem gotículas de óleo dispersas em água e as emulsões água em óleo (A/O), gotículas d’água dispersas no óleo. Por outro lado, emulsões múltiplas com tal característica podem ser elaboradas a partir do óleo e da água pelo processo de reemulsificação de uma emulsão, para construir duas fases dispersas. A título de exemplo, emulsões múltiplas podem denominar-se como óleo em água em óleo (O/A/O) (TAYLOR, 2016).

As emulsões empregadas nas formulações cosméticas precisam de estabilidade, consistência adequada e conservação dos seus constituintes mantendo uma superfície interfásica, mesmo após expostas a tensões consecutivas de fatores de temperatura, agitação e aceleração da gravidade. Um estudo de estabilidade

fornece informações sobre estes comportamentos onde consegue ser classificado de acordo com a sua duração feita por análises de curto e longo prazo. Dentre os tipos de estabilidade, encontra-se a física e química e conforme sua origem podem também ser classificada como intrínsecas (fatores inerentes à formulação) ou extrínsecas (fatores externos)(BARZOTTO *et al.*, 2009).

Como já mencionado, os componentes básicos de uma emulsão estão representados pela água e pelo óleo e, de acordo com a natureza da respectiva fase dispersa, tais sistemas podem ser classificados em dois principais tipos, a emulsão O/A e a emulsão A/O (Figura 6).

**Figura 6 - Tipos de emulsões simples.**



**Fonte:** Adaptado de Santos (2011).

As emulsões O/A apresentam um aspecto sensorial mais leve, conferindo um toque mais seco (menos oleoso) e proporcionando menos oclusão à pele, isso se deve ao fato de o meio dispersante ser aquoso. É o tipo de emulsão mais empregada devido à vantagem de formar um filme na superfície da pele quando a água da formulação evapora (COUTINHO,SANTOS, 2014).

Emulsões A/O possuem efeito oclusivo, podendo levar ao aparecimento de comedões sebáceos. Essas emulsões podem ser utilizadas para a limpeza da pele por meio da remoção de sujidades oleosas, já que as mesmas são solúveis em óleo e podem então ser removidas. Porém, sob o ponto de vista cosmético, esse tipo de emulsão é pouco aceito (COUTINHO, SANTOS, 2014).

A literatura cita alguns testes que permitem identificar os tipos de emulsões simples (O/A ou A/O), dentre eles estão o teste de miscibilidade, o teste de coloração e o teste de condutividade. Para o teste de miscibilidade, a emulsão avaliada será solúvel em solventes que apresentem afinidade com o meio

dispersante. No teste de coloração, o corante lipofílico tem afinidade apenas com a fase oleosa, que pode ser a micela ou o meio dispersante, sendo que a intensidade da cor dependerá se o corante migrou para a fase interna, coloração menos intensa, ou se está presente na fase externa, coloração mais intensa. Já o teste mais preciso, o da condutividade, pode ser realizado na presença de um condutivímetro, pelo qual a condução da energia elétrica só será possível se a fase dispersante for água (COUTINHO, SANTOS, 2014).

Além destas, existem as emulsões múltiplas, que são raramente utilizadas devido à sua complexidade em questões de natureza e instabilidade. Nesse sistema, emulsão água em óleo em água (A/O/A) ou emulsão óleo em água em óleo (O/A/O) podem ser produzidos (MENAA, 2014).

Além disso, podem-se distinguir três tipos de emulsões de acordo com o tamanho das gotículas formadas: as macroemulsões (conhecidas como emulsões/coloides convencionais, formadas por gotículas de 1 a 100 µm de diâmetro); as microemulsões (formadas por gotículas de 1-100 nm de diâmetro) e as nanoemulsões, formadas por gotículas de 20 nm a 200 nm de diâmetro (MENAA, 2014).

### **2.5.1 GEL-CREME**

Os géis ou gel-creme do ponto de vista farmacotécnico, são preparações semissólidas que contêm um ou mais agentes medicinais dissolvidos ou dispersos em emulsões óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) (AMARAL *et al.*, 2023).

Para Melo e Domingues (2018) trata-se de uma forma farmacêutica cremosa não iônica, formada normalmente a partir de um gel com alto percentual de água e baixo (ou nenhum) percentual de óleo sendo indicado para todos os tipos de pele e que não altera a viscosidade em presença de álcool etílico e glicóis.

Segundo a Farmacopéia brasileira o gel é a forma farmacêutica semissólida de um ou mais princípios ativos que contém um agente gelificante para fornecer firmeza a solução ou dispersão coloidal e pode conter partículas suspensas (AMARAL *et al.*, 2023).

Neste tipo de formulação o fármaco está contido em um veículo e as propriedades são variadas de acordo com as características físico-químicas do princípio ativo, de modo a garantir velocidade de liberação, propriedades de adesão ao local de aplicação e características sensoriais desejadas da formulação. (AMARAL *et al.*, 2023).

São sistemas que consistem em dispersões de pequenas ou grandes moléculas em um veículo líquido aquoso que adquire consistência semelhante às geleias pela adição de um agente gelificante. A forma farmacêutica gel pode ter sua permeabilidade cutânea melhorada com a adição de álcool (isopropílico e/ou propilenoglicol) e sendo comum a associação de gelificantes, umectantes, conservantes e quelantes (AMARAL *et al.*, 2023).

O gel-creme (O/A) tem a função de devolver ou manter água na pele, isto pode ser feito com ativos formulados em creme, gel-creme ou somente gel. A hidratação pode vir ainda com a vantagem de combater a flacidez e suas rugas e linhas de expressão (AMARAL *et al.*, 2023).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral do trabalho foi desenvolver e caracterizar formulações dermocosméticas gel-creme, do tipo O/A, de uso tópico, acrescida de extrato seco de café verde (*Coffea canephora*) e levana (*Bacillus subtilis* natto), isolados e/ou em associação, como nova alternativa cosmética natural para reduzir os sinais da região periorbital.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produção de levana (LEV) proveniente de *Bacillus subtilis* natto através de processos biotecnológicos de fermentação;
- Desenvolver formulações dermocosméticas de uso tópico do tipo gel-creme (O/A) para a região periorbital empregando planejamento estatístico;
- Caracterizar as formulações quanto aos aspectos farmacotécnicos: ensaio de pré-estabilidade: centrifugação; ensaios organolépticos: aspecto, cor e odor e ensaios físico-químicos: pH, espalhabilidade, retenção de umidade;
- Avaliar a eficácia das formulações através do ensaio da atividade antioxidante pelo método ABTS (inibição do cátion radical ácido 2,2"-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico);
- Avaliar as propriedades reológicas das formulações dermocosméticas por meio do teste de reometria de cisalhamento contínuo;
- Avaliar a interação das formulações dermocosméticas com a luz UV/visível, determinando sua profundidade de permeação na pele, através da espectroscopia fotoacústica;
- Realizar estudo de estabilidade preliminar das formulações desenvolvidas;
- Realizar a análise estatística e com base nos resultados selecionar a(s) formulação (ões) de melhor resposta;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 PRINCÍPIOS ATIVOS

#### 4.1.1 LEVANA (LEV)

A LEV foi produzida e cedida pelo Departamento de Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL), através do *Bacillus subtilis* natto em meio de fermentação contendo sacarose ( $400 \text{ g L}^{-1}$ ), extrato de levedura, ( $2 \text{ g L}^{-1}$ );  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , ( $1 \text{ g L}^{-1}$ );  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $3 \text{ g L}^{-1}$ );  $\text{MgSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$  ( $0,6 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{MnSO}_4$ , ( $0,2 \text{ g L}^{-1}$ ) e citrato de amônio, ( $0,25 \text{ g L}^{-1}$ ) (BERSANETI *et al.*, 2017).

As fermentações foram conduzidas em frascos erlenmeyer de 2L contendo 500 mL de meio a pH 7,0, a 150 rpm e  $37^\circ\text{C}$ , durante 24 horas (BERSANETI *et al.*, 2016). Após esse período, a fermentação foi interrompida por centrifugação a 9000 rpm por 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Para obter o produto, o sobrenadante foi precipitado com etanol absoluto (na proporção de 1:1,5 v/v) por 12 horas a  $4^\circ\text{C}$  e centrifugado a 9000 rpm por 20 minutos, resultando em LEV de alta massa (VIIKARI; GISLER, 1986). A LEV foi então dialisada em água destilada por 48 horas e liofilizada.

#### 4.1.2 EXTRATO SECO DE CAFÉ VERDE (ECV)

O ECV foi elaborado pela Companhia Iguazu de Café Solúvel (Cornélio Procópio, Paraná, Brasil) utilizando *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner. O processamento foi feito em planta piloto seguindo processo convencional de extração de café solúvel por percolação em colunas, utilizando a água como solvente de extração (SANTOS *et al.*, 2017).

Neste processo, água a  $180^\circ\text{C}$  foi introduzida no primeiro estágio de percolação, contendo a coluna com o café mais antigo, seguido pela percolação nos estágios subsequentes até chegar ao café mais recente. No último estágio, o extrato entra em contato com o café recém-carregado, extraíndo parte dos sólidos solúveis. Durante o processo, os sólidos solúveis aumentam, enquanto a temperatura diminui, garantindo que a última coluna, contendo café fresco, extraia o extrato a uma

temperatura próxima a 100°C, minimizando danos térmicos. O extrato resultante foi então submetido ao processo de liofilização e armazenado em recipientes plásticos vedados, mantidos refrigerados até a caracterização e uso na formulação (SANTOS *et al.*, 2017).

#### 4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA) DOS ATIVOS

A AA dos ativos de LEV e ECV foram realizados em triplicata e suas médias calculadas, onde neste ensaio foi utilizado o método ABTS<sup>•+</sup>, a qual a recepção de íons hidrogênio (H<sup>+</sup>) pelo radical ABTS<sup>•+</sup> (2, 2' – azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi avaliada através de espectrofotometria. Uma solução aquosa do radical foi preparada a partir da mistura de uma solução estoque de ABTS 7 mM com outra de persulfato de potássio 2,45 mM, a qual foi armazenada por 12 horas em frasco escuro (VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2011; CAMPANINI *et al.*, 2014).

Em seguida, a solução de ABTS<sup>•+</sup> foi diluída com uma solução tampão fosfato (pH= 7,4) para a LEV e etanol para o ECV e submetida a leitura em espectrofotômetro a  $\lambda=730$  nm, até obter uma leitura de absorbância de 0,750. Ambos os ativos foram diluídos em água, onde: LEV 7,5 mg mL<sup>-1</sup> - 800 mg mL<sup>-1</sup> e ECV 39,00 mg/mL- 625,00 mg/mL. Sendo assim, para o branco, 1 mL de tampão foi adicionado, para o controle positivo, 1 mL de ABTS diluído juntamente com 50  $\mu$ L de etanol e por fim, 50  $\mu$ L dos ativos (diluídos anteriormente) foram adicionados a 1 mL da solução do radical, deixando reagir por 6 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura de absorbância também a 730 nm. O cálculo da atividade antioxidante foi realizado a partir da equação 1 (VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2011; CAMPANINI *et al.*, 2014).

$$\% \text{ atividade} = \frac{(1 - \text{Abs}_{\text{amostra}})}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \times 100 \quad (1)$$

### 4.3 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES

Foram desenvolvidas quatro formulações tópicas gel-creme, do tipo O/A, sendo uma formulação base (FB) como controle negativo (sem ativos), com concentrações não explícitas por conta de futuro depósito de patente (Tabela 1).

**Tabela 1 - Composição da formulação base de uso tópico e funções dos respectivos componentes.**

Nome químico	INCI Name	Função
Água destilada	Water/Aqua	Veículo
Glicerina	Glycerin	Hidratante/Umectante
Copolímero de acrilato de sódio e lecitina (Legicel™)	Sodium Acrylates Copolymer (and) Lecithin	Copolímero/Emulsionante
Olivem 300®	Olive Oil PEG 7-Esters	Emoliente/hidratante
Manteiga de Karité	Butyrospermum Parkii (Shea Butter)	Emoliente/hidratante
Fenoxietanol e Metilsotiazolinona (Neolone® PE)	Methylisothiazolinone (and) Phenoxyethanol	Conservante

Fonte: próprio autor.

Além da FB citada acima, as demais três formulações para o tratamento da região periorbital foram desenvolvidas com acréscimo de ECV e LEV, isolados e/ou em associação, sendo: F1 somente LEV, F2 somente ECV e F3 associação LEV + ECV segundo o planejamento experimental, conforme a Tabela 2. As concentrações dos ativos foram escolhidas com base em testes de atividade antioxidante realizados previamente e tendo como respaldo os trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, como o realizado por DAHMER *et al.* (2023).

**Tabela 2 - Planejamento experimental para as formulações.**

Formulações	Variável ECV	Variável LEV	Composição (% p/v)
FB <sup>1</sup>	0	0	Sem ativos
F1 <sup>2</sup>	0	1	2,0 % LEV
F2 <sup>3</sup>	1	0	0,6% ECV
F3 <sup>4</sup>	1/2	1/2	0,3% ECV + 1,0% LEV

<sup>1</sup>FB - Ausência de ativos.

<sup>2</sup>F1 - Somente levana (LEV).

<sup>3</sup>F2 - Somente extrato seco de café verde (ECV).

<sup>4</sup>F3 - Associação de levana com extrato seco de café verde (LEV + ECV).

**Fonte:** próprio autor.

A preparação das formulações se deu da seguinte forma: em béquers separados, foi realizada a pesagem da fase 1, sendo esta aquosa, composta por Água + Glicerina, fase 2 somente o Lecigel<sup>TM</sup> e fase 3, sendo esta oleosa, composta por Olivem 300<sup>®</sup> + Manteiga de Karité, em balança analítica devidamente calibrada (precisão  $\pm 0,0001g$ ). Posteriormente, a fase 1 foi aquecida em chapa quente e a mistura homogeneizada até atingir a temperatura de  $75 \pm 2^\circ C$ . Após atingir a temperatura desejada, a solução foi colocada em um gral e levada até um agitador em hélice em rotação de  $500 \pm 5$  rpm, onde aos poucos foi sendo incorporada lentamente a fase 2.

Em seguida, as fases 1 e 3 foram aquecidas em chapa quente e a mistura homogeneizada até atingir a temperatura de  $75 \pm 2^\circ C$ . Após atingir esta temperatura em ambas as fases, foi realizada a inversão das fases (oleosa/aquosa) sendo homogeneizada até atingir temperatura de  $40 \pm 2^\circ C$ . Por fim, os ativos foram adicionados e homogeneizados, e o pH ajustado a 4,5 - 6,0 com auxílio de um pHmetro digital (pH/mV meter - HANNA, Brasil), e realizado o envase das formulações. Posteriormente, as mesmas foram acondicionadas em geladeira a temperatura aproximada de  $8 \pm 2^\circ C$ .

Após o desenvolvimento das formulações FB, F1, F2 e F3 as mesmas foram submetidas a ensaios de pré – estabilidade (cetrifugação), avaliação das características organolépticas (aspecto, cor e odor), caracterização físico-química (determinação de pH, espalhabilidade e retenção de umidade), além da atividade antioxidante, reometria de cisalhamento contínuo e espectroscopia fotoacústica (BAESSO; SHEN; SNOOK, 1994) (nestes dois últimos ensaios, avaliada

somente as formulações FB e F3) (HEMPHILL; CAMPOS; PILEHVARI, 1993; BRASIL, 2004; BORGHETTI, KNORST, 2006; BRUSCHI *et al.*, 2007; BRASIL, 2008; JONES *et al.*, 2009; VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2011; ZHANG *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2013; CAMPANINI *et al.*, 2014).

#### **4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES**

##### **4.4.1 TESTE DE PRÉ-ESTABILIDADE**

Neste ensaio, 5g da amostra, em triplicata, foram colocados em tubos de ensaio cônico e submetidos à centrifugação (Centrífuga Baby I Fanem 206-BL, São Paulo, Brasil) durante 30 minutos, a 3200 rpm e 25°C. Posteriormente, foi realizada a análise visual para detectar possíveis sinais de instabilidade como coalescência, separação de fases ou formação de sedimento (BRASIL, 2008).

##### **4.4.2 CARACTERIZAÇÃO ORGANOLÉPTICA**

As formulações foram avaliadas quanto à aspecto, cor e odor após 24 horas em repouso e cada parâmetro foi realizado em triplicata. O aspecto e a cor foram avaliados visualmente, sob luz branca, depositando 1g de cada formulação em vidro relógio colocado sobre fundo preto, comparando-a sempre com a formulação base para determinar se houve qualquer alteração em relação à mesma. Já o odor foi avaliado diretamente através do olfato e igualmente comparado ao odor da formulação base (BRASIL, 2008).

##### **4.4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES**

As características físico-químicas avaliadas foram o pH (BRASIL, 2004), espalhabilidade (BORGHETTI; KNORST, 2006) e retenção de umidade (ZHANG *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2013). Cada ensaio foi realizado em triplicata e suas médias calculadas.

#### 4.4.3.1 DETERMINAÇÃO DO pH

A determinação do pH foi realizada em temperatura ambiente ( $25 \pm 5^\circ\text{C}$ ) através do pHmetro digital (pH/mV meter - HANNA, Brasil), previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. Cada ensaio foi realizado em triplicata e suas médias calculadas onde as leituras foram obtidas pela inserção do eletrodo diretamente dentro da amostra (BRASIL, 2004).

#### 4.4.3.2 AVALIAÇÃO DA ESPALHABILIDADE ( $E_i$ )

Para  $E_i$  cada ensaio foi realizado em triplicata e suas médias calculadas. Foram utilizadas duas placas de vidro, previamente pesadas e de dimensões 10x10cm. Primeiramente, uma delas foi posicionada sob papel milimetrado e sobre ela foi colocado 0,5g de amostra; em seguida, a outra placa foi colocada sobre o conteúdo com acionamento imediato de cronômetro. Transcorrido 1 minuto, o diâmetro foi medido com ajuda da escala do papel. Este procedimento foi repetido em intervalos de 1 minuto, adicionando-se progressivamente pesos de 2g, 4g e 10g sobre as placas. Os valores de espalhabilidade foram calculados a partir da equação 2 (BORGHETTI; KNORST, 2006).

$$E_i = d^2 \times \frac{\pi}{4} \quad (2)$$

Sendo  $E_i$ : espalhabilidade,  $d$ : diâmetro ( $\text{cm}^2$ ) e  $\pi=3,14$ .

#### 4.4.3.3 TESTE DE RETENÇÃO DE UMIDADE (RU)

A RU foi determinada por método gravimétrico a partir da transferência de 1g da formulação para um cadinho previamente pesado, seguida da adição de 1 mL de água sobre o mesmo e homogeneização do conteúdo. O sistema foi acondicionado em um dessecador de umidade selado com solução saturada de carbonato de potássio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) (umidade relativa - 43%) e temperatura ambiente durante 96 horas e após este tempo, o cadinho foi retirado e pesado. A capacidade de RU foi calculada através da equação 3, em que  $P_T$  representa a massa final e  $P_0$

a massa inicial (ZHANG *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2013). Cada ensaio foi avaliado em triplicata e suas médias calculadas.

$$RU = \frac{PT}{P_0} \times 100 \quad (3)$$

#### 4.4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA) DAS FORMULAÇÕES

A AA das quatro formulações: FB, F1, F2 e F3 foram realizadas em triplicata e suas médias calculadas, onde neste ensaio foi utilizado o método ABTS<sup>•+</sup>, a qual a recepção de íons hidrogênio (H<sup>+</sup>) pelo radical ABTS<sup>•+</sup> (2, 2'- azino-bis-(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) foi avaliada através de espectrofotometria. Uma solução aquosa do radical foi preparada a partir da mistura de uma solução estoque de ABTS 7 mM com outra de persulfato de potássio 2,45 mM, que foi armazenada por 12 horas em frasco escuro (VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2011; CAMPANINI *et al.*, 2014).

Em seguida, a solução de ABTS<sup>•+</sup> foi diluída com uma solução tampão fosfato (pH= 7,4) e submetida a leitura em espectrofotômetro a  $\lambda=730$  nm, até obter uma leitura de absorvância de 0,750. Todas as formulações foram diluídos em água (1,5 g da formulação em 5 mL de água), sendo assim, para o branco, 1 mL de tampão foi adicionado, para o controle positivo, 1 mL de ABTS diluído juntamente com 50  $\mu$ L de etanol e por fim, 50  $\mu$ L da formulação (diluída anteriormente) foram adicionados a 1 mL da solução do radical, deixando reagir por 6 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura de absorvância a 730 nm. O cálculo da atividade antioxidante foi realizado a partir da equação 4 (VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2011; CAMPANINI *et al.*, 2014).

$$\% \text{ atividade} = \frac{(1 - \text{Abs}_{\text{amostra}})}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \times 100 \quad (4)$$

#### 4.4.5. REOMETRIA DE CISALHAMENTO CONTÍNUO (FLUXO)

As análises dos sistemas emulsivos foram realizadas utilizando um reômetro de gradiente e tensão de cisalhamento controlado, no modo de fluxo. Nesta avaliação, cada ensaio foi realizado em triplicata, avaliando apenas as formulações FB e F3.

O reômetro utilizado foi uma parceria juntamente com a Universidade Estadual de Maringá (UEM), através do Complexo de Centrais e Apoio à Pesquisa (COMCAP). As curvas de fluxo ascendentes e descendentes foram obtidas com um gradiente de cisalhamento de  $0 \text{ s}^{-1}$  até  $2000 \text{ s}^{-1}$ , nas temperaturas de  $5^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$  e  $34^\circ\text{C}$ . As amostras foram cuidadosamente aplicadas à placa, assegurando o mínimo de cisalhamento e permitindo um tempo de repouso de 1 minuto antes de iniciar cada análise.

Durante a análise, na obtenção das curvas, o gradiente de cisalhamento foi aumentado durante um período de 150 segundos recíprocos (s) e o sistema foi mantido no gradiente máximo de cisalhamento por 10 s, em seguida, diminuído durante 150 s.

As curvas ascendentes e descendentes foram analisadas utilizando a equação de Oswald de Waele (Equação 5) (BRUSCHI *et al.*, 2007; JONES *et al.*, 2009), em que  $\sigma$  é a tensão de cisalhamento; K é o índice de consistência;  $\dot{\gamma}$  é o gradiente de cisalhamento; e n é o índice do comportamento de fluxo.

$$\sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (5)$$

O modelo de Herschel-Bulkley foi utilizado para obtenção do valor de cedência, de acordo com a equação 6 (HEMPHILL; CAMPOS; PILEHVARI, 1993), onde,  $\sigma$  é a tensão de cisalhamento;  $\sigma_y$  é o valor de cedência; K é o índice de consistência;  $\dot{\gamma}$  é o gradiente de cisalhamento e n o índice de comportamento de fluxo.

$$\sigma = \sigma_y + (K \cdot \dot{\gamma} \cdot n) \quad (6)$$

As áreas de histerese presentes nas curvas de fluxo dos sistemas emulsivos foram obtidas utilizando o programa RheoWin 4.10.0000 (Hake®).

#### 4.4.6 ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

Esta avaliação foi realizada em parceria juntamente com a Universidade Estadual de Maringá (UEM) através do Laboratório de Fotoacústica, Fototérmica e Vidros Ópticos. Os espectros foram obtidos nas regiões espectrais do ultravioleta e do visível, com variação de comprimento de onda de 300 – 500 nm. Cada ensaio foi realizado em triplicata e suas médias calculadas, sendo avaliada apenas a FB e a F3. A potência da fonte foi de 800 W e a frequência de modulação da luz foi de 13 Hz. A espessura do tecido que contribuí para o sinal fotoacústico é obtido pelo cálculo do comprimento de difusão térmica ( $\mu_s$ ). Este parâmetro é definido matematicamente como  $\mu_s = (d/\pi f)^{1/2}$ , em que  $d$  é a difusividade térmica da amostra e  $f$  a frequência de modulação de luz. Utilizando  $d = 4,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$  (BAESSO; SHEN; SNOOK, 1994) para a difusividade térmica do tecido (epiderme e derme) o  $\mu_s = 32 \text{ }\mu\text{m}$ , o que garante que as leituras sejam realizadas próximas as superfícies nas quais a luz é incidente, sendo a espessura média das amostras de aproximadamente 900  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5 ESTABILIDADE PRELIMINAR DAS FORMULAÇÕES

As amostras, em triplicata, foram submetidas a ciclos de gelo e degelo, com as temperaturas variando de  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  à  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  (UR de  $75\% \pm 5\%$ ), em intervalos regulares de tempo, 24 horas, durante 15 dias (BRASIL, 2004). Após este período, houve nova avaliação dos parâmetros organolépticos (aspecto, cor e odor) e físico-químicos (determinação de pH e espalhabilidade), além da atividade antioxidante, onde os demais testes avaliados neste trabalho, não foi realizada a análise de estabilidade preliminar dos mesmos (retenção de umidade, reometria de cisalhamento contínuo e espectroscopia fotoacústica). Os resultados obtidos foram comparados com aqueles encontrados antes deste processo ( $t_0$  e  $t_{15}$  dias).

#### 4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, aplicando-se o teste de médias Tukey a 5% para as variáveis que apresentaram efeito de tratamento significativo. As pressuposições de normalidade dos erros e

homogeneidade das variâncias foram testadas por Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente ( $p > 0,05$ ). Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software R (R CORE TEAM, 2023).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os avanços na pesquisa científica têm permitido a descoberta de diversos ativos com potencial para serem integrados em formulações cosméticas. Esses ativos são destinados à indústria do segmento para o desenvolvimento de produtos antissinais, visando controlar ou retardar o envelhecimento da pele. Estes ativos, sejam derivados de compostos sintéticos, vegetais ou microbianos, adquirem suas propriedades, incluindo o potencial antioxidante, que é essencial para sua eficácia em formulações cosméticas. Portanto, é crucial avaliar se o ativo em questão possui a atividade antioxidante necessária para seu uso no desenvolvimento de produtos. (BICHETTI; SAMPAIO; GUSMÃO, 2018).

O envelhecimento é um processo natural que se inicia com o declínio das funções fisiológicas, provocadas por alterações moleculares e celulares. Sabe-se que ao longo da vida, o organismo produz radicais livres naturalmente, no entanto, quando sua produção é excessiva, ocorre o processo oxidativo (KANTHAPOK; SUKRONG, 2019; MANGELA; MARTINS, 2021).

Um radical livre é uma espécie química que apresenta em sua estrutura um elétron desemparelhado, o que a torna extremamente reativa para reagir rapidamente com proteínas, lipídios e DNA, por exemplo, causando danos estruturais, resultando em morte celular e aceleração do processo de envelhecimento cutâneo. Exemplos desses radicais incluem as espécies reativas de oxigênio (EROS), como os ânions hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ), hidroperoxil ( $\text{HO}_2\cdot$ ) e superóxido ( $\text{O}_2\cdot$ ) – e de nitrogênio (ERNs), como os radicais de dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2\cdot$ ) e óxido nítrico (NO) (KANTHAPOK; SUKRONG, 2019; MANGELA; MARTINS, 2021).

Para diminuir o excesso de radicais livres, se faz necessário o uso de antioxidantes, que são espécies químicas capazes de neutralizá-los para que não reajam com biomoléculas e não as danifiquem. Estes antioxidantes podem ser aplicados, por exemplo, através de produtos cosméticos (KANTHAPOK; SUKRONG, 2019; MUNTEANU; APETREI, 2021).

Para medir a atividade antioxidante de um ativo, diversos métodos podem ser utilizados, como os espectrofotométricos, dentre os quais está o de inibição do cátion radical ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), mais conhecido como  $\text{ABTS}^{+\cdot}$ . Em uma reação, a atividade antioxidante da solução de coloração inicialmente azul-esverdeada perde sua intensidade; logo, quanto maior

for a atividade antioxidante, menos intensa a coloração (SANTOS-SÁNCHEZ *et al.*, 2019).

A determinação da AA dos ativos LEV e ECV foi conduzida utilizando o método espectrofotométrico (ABTS<sup>•+</sup>). Antes do desenvolvimento das formulações, foi crucial identificar a faixa de concentração na qual os ativos exibiam essa propriedade antioxidante, sendo assim, os dados correspondentes estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3 - Porcentagens de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> frente à reação com LEV nas concentrações de 7,5 mg mL<sup>-1</sup> a 800 mg mL<sup>-1</sup> e com ECV nas concentrações de 39,0 mg mL<sup>-1</sup> a 625,0 mg mL<sup>-1</sup>.**

Concentração LEV (mg mL <sup>-1</sup> )	Inibição do radical ABTS <sup>•+</sup> (%)
7,5	15,5 ± 0,5
15,0	19,1 ± 0,2
30,0	20,3 ± 1,5
60,0	31,9 ± 3,0
120,0	40,6 ± 1,6
150,0	44,6 ± 0,9
300,0	55,7 ± 4,4
500,0	66,4 ± 1,3
800,0	82,1 ± 0,6
Concentração ECV (mg mL <sup>-1</sup> )	Inibição do radical ABTS <sup>•+</sup> (%)
39,0	8,4 ± 1,7
78,0	13,8 ± 2,1
156,0	25,1 ± 0,9
200,0	47,2 ± 2,0
313,0	54,2 ± 1,5
400,0	75,6 ± 2,0
625,0	92,1 ± 0,8

LEV - Levana.

ECV - Extrato seco de café verde.

Fonte: próprio autor.

Com base nos dados de porcentagem de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> apresentados na tabela acima (Tabela 3), observa-se que a LEV demonstrou atividade antioxidante entre 15,5 ± 0,5% e 82,1 ± 0,6% nas concentrações de 7,5 a 800 mg mL<sup>-1</sup>. Esawy *et al.* (2016) realizaram ensaio semelhante, também pelo método ABTS<sup>•+</sup>, e observaram de 14,3 a 40,9% de atividade antioxidante entre as concentrações de 0,5 a 2,5 mg mL<sup>-1</sup> para LEV de *Bacillus subtilis* M. Esta diferença entre os resultados podem ocorrer devido ao tipo e as condições do meio de cultivo

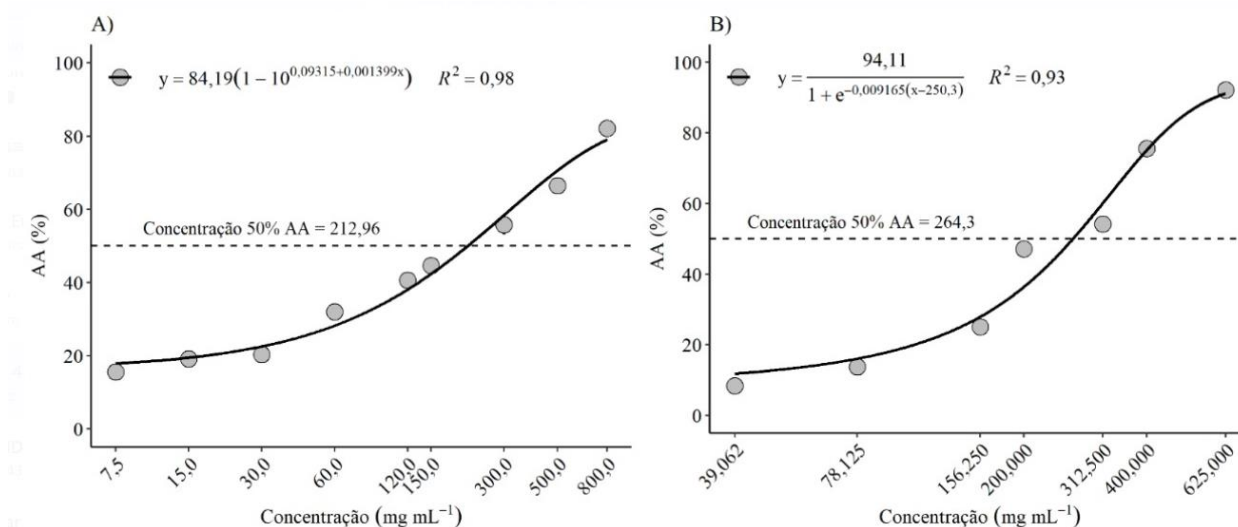
do microorganismo, como fonte de carbono, tempo, temperatura e agitação (ESAWY *et al.*, 2016).

No estudo de DAHMER *et al.* (2023), a LEV demonstrou potencial antioxidante entre 22% e 56% na faixa de concentração de 1,0 - 100 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, utilizando o método DPPH. É relevante observar que a concentração máxima de LEV utilizada nas formulações, conforme relatado no mesmo estudo, foi de 2% (p/v), similar ao realizado neste trabalho. Além disso, destaca-se que a LEV é um potente agente antioxidante, exibindo atividade em baixas concentrações (7,5 mg mL<sup>-1</sup>). De acordo com Silva *et al.* (2022), a LEV apresenta alto poder antioxidante, tornando-se um ativo atrativo para a indústria cosmética, especialmente para a incorporação em produtos antienvhecimento.

Já para o ativo ECV, a atividade antioxidante foi de 8,4 ± 1,7% a 92,1 ± 0,8% entre as concentrações de 39,0 a 625,0 mg mL<sup>-1</sup>. Masek *et al.* (2020) observaram 90% de atividade antioxidante de ECV na concentração de 4 mg mL<sup>-1</sup> pelo método ABTS<sup>•+</sup> e de 63% pelo método DPPH na mesma concentração. As diferenças entre os resultados podem ser atribuídos a metodologia utilizada, composição química do extrato, por exemplo, a qual pode variar de acordo com a região, solo entre outros fatores. O ECV possui várias classes de compostos bioativos, dentre eles, fenólicos, melanoidinas, diterpenos, xantinas e carotenoides que possibilitam esta alta capacidade antioxidante deste ativo (ENDO *et al.*, 2023).

Os modelos matemáticos utilizados a partir das concentrações mencionadas acima (Tabela 3) para determinação da atividade antioxidante tiveram um bom ajuste, conforme apresentadas nas Figuras 7A e 7B. Uma forma de observar este ajuste é pelo R<sup>2</sup> (R-quadrado), uma medida prática e intuitiva de quão bem seu modelo linear se ajusta a um conjunto de observações (dados). Quanto mais próximo de 1,0 é este valor, conseqüentemente um indício de que o modelo explica toda a variabilidade dos dados de resposta ao redor de sua média, assim os dados da atividade antioxidante representados abaixo tiveram R<sup>2</sup> entre 0,98 e 0,93 (PONTES; OLIVEIRA; SILVA, 2021).

**Figura 7 - Determinação da atividade antioxidante dos bioativos naturais LEV (A) e ECV (B) obtidos pelo método ABTS•+.**



Fonte: próprio autor.

Conforme os resultados apresentados nas Figuras 7A e 7B, podemos observar que ambos os ativos possuem atividade antioxidante que, em geral é aumentada com a elevação da concentração do mesmo uma vez que, maior quantidade do ativo, maior a atividade antioxidante.

Masek et al. (2020) notaram um aumento na atividade antioxidante da ECV à medida que a concentração do ativo variava de 1 a 4 mg mL<sup>-1</sup>. Resultados similares foram encontrados por Silva et al. (2020), que observaram um aumento na atividade antioxidante dos ativos levana e óleo de canela, conforme a concentração destes variava de 0 a 10 mg mL<sup>-1</sup>.

Através deles também foi possível determinar a concentração inibitória (IC<sub>50</sub>). A IC<sub>50</sub> é a mínima concentração necessária de antioxidante para inibir 50% de uma determinada concentração de radical, no caso, do ABTS•+, obtida a partir da razão entre o valor de IC<sub>50</sub> e da concentração inicial do radical. Dessa forma, uma menor concentração do antioxidante é necessária para inibir 50% da atividade do radical livre, logo, quanto menor o valor de IC<sub>50</sub>, maior a atividade antioxidante do ativo (SAVATOVIĆ *et al.*, 2012; BICHETTI; SAMPAIO; GUSMÃO, 2018).

Deste modo, por meio da equação gerada por cada gráfico e substituindo o y=50, encontrou-se o valor deste parâmetro para LEV e ECV, que foi

de 212,96 mg mL<sup>-1</sup> e 264,3 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, indicando que, uma menor concentração do LEV é necessária para inibir 50% da atividade do radical livre.

Os dados acima justificam a utilização dos ativos LEV e ECV para a incorporação em formulações cosméticas devido ao elevado potencial antioxidante apresentado, sendo assim, conseqüentemente, essa característica sugere que os mesmos podem oferecer benefícios significativos na prevenção do envelhecimento cutâneo. Logo, os ativos em questão foram incorporados em formulações e submetidos a avaliações quanto sua capacidade de utilização no mercado de cosméticos.

O estudo da estabilidade fornece informações que indicam o grau de conservação do produto nas variadas condições a que possa estar sujeito desde sua fabricação até sua validade. Antes do estudo de estabilidade, as amostras foram submetidas ao teste de centrifugação (BRASIL, 2007; FRANGE; GARCIA, 2009).

Os resultados do teste de pré-estabilidade evidenciaram que, mesmo após a centrifugação, as formulações FB, F1, F2 e F3 mantiveram-se estáveis, sem apresentar sinais de coalescência, sedimentação ou separação de fases. Essa estabilidade observada indica que não há necessidade de reformulação do produto e que as formulações podem ser submetidas às avaliações subsequentes.

O teste de pré-estabilidade, também conhecido como teste de centrifuga, tem como objetivo simular a ação da gravidade sobre a amostra, sujeitando-a a estresse para antecipar possíveis instabilidades. Essas instabilidades podem se manifestar na forma de coalescência, floculação, precipitações ou separações de fases, entre outras. Assim, conforme orientações de autoridades regulatórias como o Brasil (2007) e autores como Frange e Garcia (2009), a estabilidade do produto durante este teste é crucial. A ausência de qualquer sinal de instabilidade indica que o produto está apto para prosseguir com os testes subsequentes.

A estabilidade de um produto cosmético pode ser influenciada por fatores extrínsecos como o tempo, temperatura, luz, oxigênio e umidade, ou também ocorrer à influência de fatores intrínsecos, tais como a incompatibilidade física e química da formulação. A incompatibilidade física está relacionada com as mudanças na aparência da formulação como a separação de fases. Por outro lado, a incompatibilidade química está relacionada com mudanças no valor de pH,

reações de oxidação-redução, hidrólise, interações com os ingredientes da formulação, entre outros (COSTA; CAMPOS, 2021).

Os testes comumente avaliados na estabilidade são os parâmetros organolépticas (aspecto, cor e odor), parâmetros físico-químicos (pH, viscosidade, espalhabilidade, densidade) e parâmetros microbiológicos (contagem microbiana) conforme o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (MARIOTTI; FRASSON, 2011).

Os resultados organolépticos deste estudo podem ser observados na Tabela 4 e Figura 8. As formulações F2 e F3, a qual continham ECV apresentaram odor característico do mesmo, enquanto FB e F1 apresentaram-se inodoras.

Quanto ao aspecto, somente a formulação F1 apresentou-se semelhante a FB, sendo esta cremosa e as demais formulações F2 e F3, que continham ECV, apresentaram-se flúidas, justamente pela adição do ativo, favorecendo a fluidez da formulação. Resultado semelhante foi descrito por Endo *et al.* (2023) onde as formulações contendo ECV apresentaram um aspecto de gel mais fluido.

Em relação à coloração, apenas F1 sofreu alteração após 15 dias de stresse gelo-degelo, de branco para rosé, enquanto FB se manteve com coloração branca, F2 e F3 com tonalidade bege. Tal alteração ocorreu possivelmente devido a interação do ativo com os componentes da formulação, ou até mesmo o fato da LEV estar atuando como agente antioxidante da formulação, logo, ao sofrer oxidação, também tem a cor alterada.

Este entrave poderia ser facilmente resolvido pela adição de outro antioxidante à formulação, como BHT (butil-hidroxi-tolueno) terc-butil-hidroquinona (TBHQ), vitaminas (A, C e E), por exemplo, a qual seria oxidada em seu lugar, preservando-a, no entanto, a formulação foi o mais minimalista possível, não sendo acrescentado outro antioxidante, já sabendo do alto potencial antioxidante dos ativos utilizando neste estudo (HELENAS *et al.*, 2023).

Logo, para que esta informação seja concretizada, trabalhos futuros podem incluir a adição destes outros agentes oxidantes, e realizadas avaliações das formulações quanto a possíveis alterações nas propriedades organolépticas e físico-químicas. As características organolépticas em um estudo de estabilidade são imprescindíveis, devendo estar atento a qualquer mudança uma vez que, alterações

no aspecto, cor e odor de cosméticos indicam possíveis problemas de estabilidade e consequente influência na qualidade e eficácia do produto (ALBRECHT *et al.*, 2019).

A associação de vários compostos resulta em uma formulação multifuncional, possibilitando a utilização de *software* para aperfeiçoamento das mesmas, e capacidade de analisar os efeitos das interações entre as diferentes variáveis estudadas (HELENAS *et al.*, 2023). Estes mesmos autores desenvolveram uma formulação a base de extrato de *Aloe vera*, vitamina E e óleo de abacate onde obtiveram boa espalhabilidade, atividade antioxidante e capacidade de retenção.

Os estudos quanto à combinação de ingredientes para a fabricação de formulações cosmeceúticas seguem avançando. Foi desenvolvido um sistema Web denominado Formula<sup>®</sup> que possibilita a criação de fórmulas de cremes e loções a partir da seleção de ingredientes. As propriedades desses ativos são armazenadas em um banco de dados integrado ao sistema, não sendo limitada a quantidade de funções e ingredientes a serem cadastrados, na sequência, a validação da fórmula criada pelo usuário é baseada em quinze regras relacionadas à formulações de emulsões (VEDANA *et al.*, 2024).

**Tabela 4 - Características organolépticas das formulações FB, F1, F2 e F3, sendo tempo inicial (t0) e tempo após 15 dias (t15).**

t0			
Formulação	Aspecto	Cor	Odor
FB <sup>1</sup>	Cre moso	Branco	Inodoro
F1 <sup>2</sup>	Cre moso	Branco	Inodoro
F2 <sup>3</sup>	Fluído	Bege Escuro	Café
F3 <sup>4</sup>	Fluído	Bege	Café
t15			
Formulação	Aspecto	Cor	Odor
FB <sup>1</sup>	Cre moso	Branco	Inodoro
F1 <sup>2</sup>	Cre moso	Rosé	Inodoro
F2 <sup>3</sup>	Fluído	Bege Escuro	Café
F3 <sup>4</sup>	Fluído	Bege	Café

<sup>1</sup> FB - Ausência de ativos.

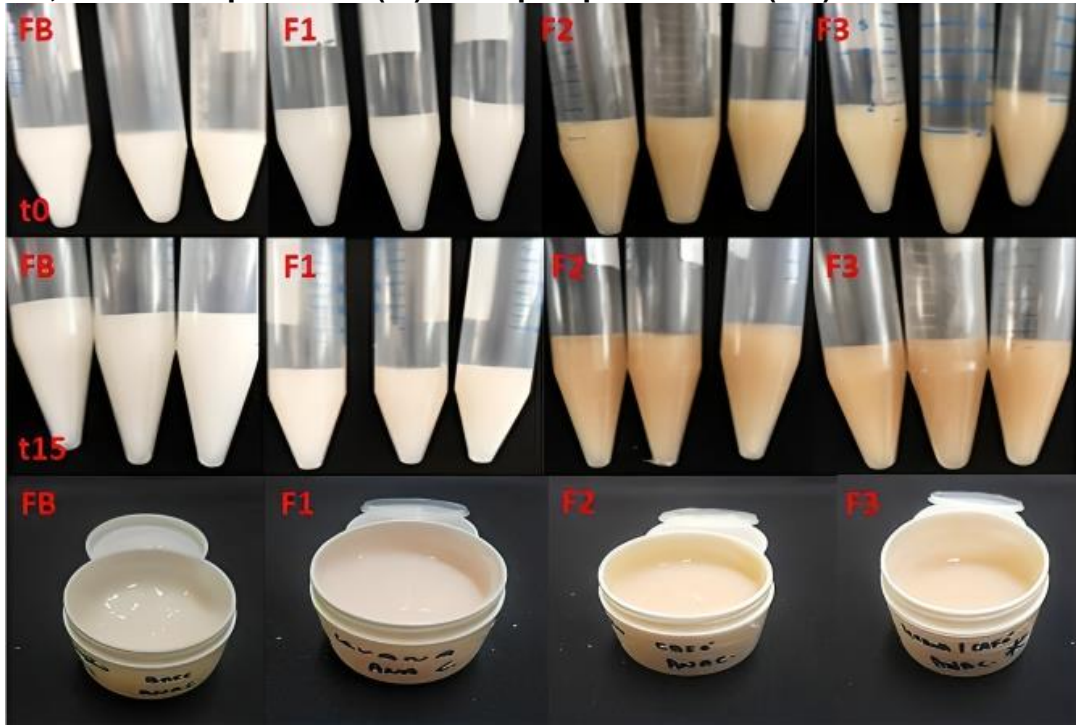
<sup>2</sup> F1 - Somente levana (2,0% (p/v) LEV).

<sup>3</sup> F2 - Somente extrato seco de café verde (0,6% (p/v) ECV).

<sup>4</sup> F3 - Associação de levana com extrato seco de café verde (1,0% (p/v) LEV + 0,3% (p/v) ECV).

**Fonte:** próprio autor.

**Figura 8- Características organolépticas observadas nas formulações FB, F1, F2 e F3, sendo tempo inicial (t0) e tempo após 15 dias (t15).**



<sup>1</sup> FB - Ausência de ativos.

<sup>2</sup> F1 - Somente levana (2,0% (p/v) LEV).

<sup>3</sup> F2 - Somente extrato seco de café verde (0,6% (p/v) ECV).

<sup>4</sup> F3 - Associação de levana com extrato seco de café verde (1,0% (p/v) LEV + 0,3% (p/v) ECV).

**Fonte:** próprio autor.

Sendo assim, de acordo com a caracterização organoléptica, todas as formulações (FB, F2 e F3), exceto F1, se mantiveram estáveis, sem alterações de suas características organolépticas, que comprometam sua eficácia, qualidade e sucesso de compra do produto. Assim, é importante enfatizar que os sentidos humanos (olfato, visão, tato e paladar quando aplicável) são essenciais para à decisão de compra de um produto cosmético e também orientam a elaboração de formulações agradáveis ao consumidor, influenciando diretamente no sucesso de uma indústria cosmética de higiene pessoal (ISAAC *et al.*, 2012).

Quanto às características físico-químicas analisadas, iniciou-se a avaliação com o pH das formulações a qual foi aferido antes (t0) e após (t15) o teste de estabilidade preliminar e os dados médios apresentados conforme tabela 5.

**Tabela 5 - Valores médios de pH das formulações FB, F1, F2 e F3 no tempo inicial (t0) e após 15 dias (t15).**

Formulação	pH	
	t0	t15
FB <sup>1</sup>	5,64 ± 0,04	5,44 ± 0,02
F1 <sup>2</sup>	5,59 ± 0,01	5,35 ± 0,03
F2 <sup>3</sup>	5,45 ± 0,02	5,27 ± 0,01
F3 <sup>4</sup>	5,45 ± 0,02	5,67 ± 0,03
CV (%)	1,8	3,2

<sup>1</sup> FB - Ausência de ativos.

<sup>2</sup> F1 - Somente levana (2,0% (p/v) LEV).

<sup>3</sup> F2 - Somente extrato seco de café verde (0,6% (p/v) ECV).

<sup>4</sup> F3 - Associação de levana com extrato seco de café verde (1,0% (p/v) LEV + 0,3% (p/v) ECV).

CV (coeficiente de variação).

**Fonte:** próprio autor.

A partir dos valores médios demonstrados acima, estatisticamente, conforme dados apresentados na Tabela 6, observa-se que houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as formulações e também entre os tempos (t0 e t15). A partir desta análise foi possível fazer uma abordagem estatística detalhada comparando as formulações e o tempo conforme Figura 9.

**Tabela 6 - Valores de  $p$  - valor para pH.**

Variável	pH
Formulações (A)	$p < 0,001^{\text{sig}}$
Tempo (B)	$p < 0,001^{\text{sig}}$
A X B	$p < 0,001^{\text{sig}}$
CV A (%)	0,36
CV B (%)	0,55

A - Formulações: FB, F1, F2 e F3.

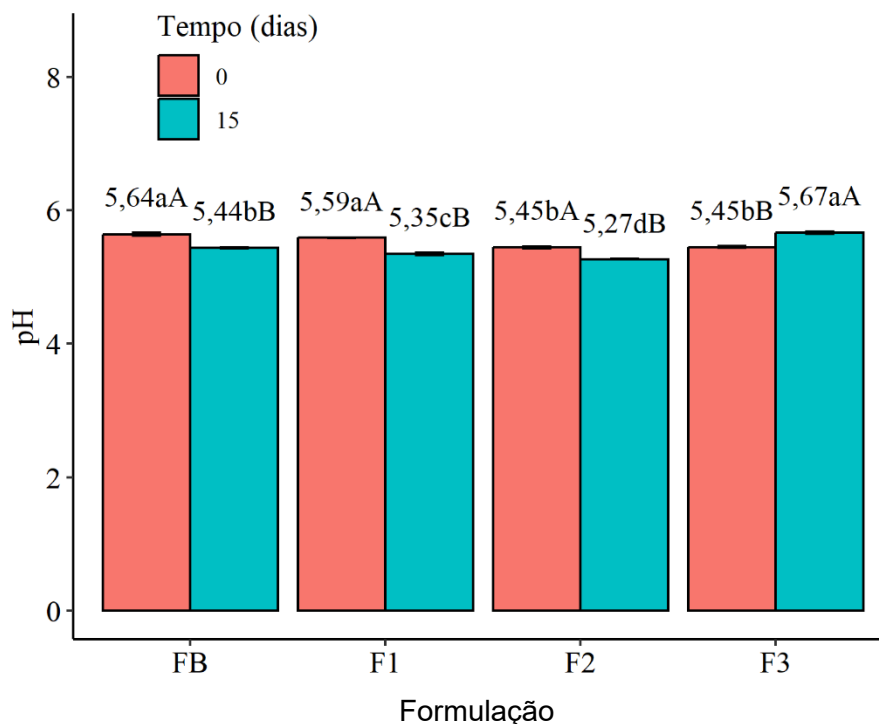
B - Tempo: Tempo inicial (t0) e após 15 dias (t15) decorridos do teste de estabilidade preliminar.

CV - Coeficiente de variação.

\* sig (significativo) de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância.

**Fonte:** próprio autor.

**Figura 9- Valores médios de pH e comparação estatística das formulações FB, F1, F2 e F3 no tempo inicial (t0) e após 15 dias (t15).**



FB - Ausência de ativos.

F1 - Somente levana (2,0% (p/v) LEV).

F2 - Somente extrato seco de café verde (0,6% (p/v) ECV).

F3 - Associação de levana com extrato seco de café verde (1,0% (p/v) LEV + 0,3% (p/v) ECV).

\* Letras maiúsculas comparam entre tempos de um mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam entre tratamentos dentro de um mesmo tempo. Foi aplicado um teste de comparações múltiplas subdivididas no tempo de acordo com Tukey a 5% de significância.

**Fonte:** próprio autor.

Conforme os dados apresentados na Figura 9, fazendo uma comparação entre as formulações dentro de um mesmo tempo, temos que: no tempo inicial (t0), os valores de pH foram maiores para FB (5,64 ± 0,04) e F1 (5,59 ± 0,01), no entanto, não diferiram estatisticamente entre si, quando comparadas com as formulações F2 (5,45 ± 0,02) e F3 (5,45 ± 0,02), as quais também não diferiram entre si. Já no t15, houve diferença estatística entre todas as formulações, sendo F3 (5,67 ± 0,03) com maior valor de pH, seguido de FB (5,44 ± 0,02), F1 (5,35 ± 0,03) e F2 (5,27 ± 0,01).

Todas as formulações apresentaram redução pequena, mas estatisticamente significativa do pH no decorrer do ciclo gelo-degelo, exceto para F3, a qual teve um acréscimo do mesmo de 5,45 ± 0,02 para 5,67 ± 0,03.

A determinação do pH trata-se de uma importante informação visto que é utilizada para verificar alterações da formulação que nem sempre são

perceptíveis a olho nu, como modificações químicas, físicas e até microbiológicas (PEREIRA SANTOS *et al.*, 2020).

Neste trabalho, o pH das formulações no tempo inicial ( $t_0$ ) variou entre  $5,45 \pm 0,02$  e  $5,64 \pm 0,03$ , enquanto após os 15 dias de ciclo gelo-degelo, o pH se manteve entre  $5,27 \pm 0,01$  e  $5,67 \pm 0,03$  (Figura 9). Em ambos os tempos foi observado que o pH das formulações permaneceu compatível com a faixa ideal de pH da pele, que varia entre 4,5 e 6,0 (POY; TEHRANI, 2017). Os valores de pH são compatíveis com os encontrados no trabalho de Santos e colaboradores (2017), que desenvolveram uma formulação para a região periorbital contendo EVC cujo pH se situou entre 4,87 e 5,67. Já no estudo de Poy e Tehrani (2017), ao elaborarem uma formulação semelhante, encontrou um valor médio de 4,89.

Além disso, este parâmetro constitui um fator primordial, pois cada produto deve apresentar valor de pH compatível à região de uso. As alterações de pH podem modificar toda a formulação desde seu aspecto até a eficácia do princípio ativo, podendo não fornecer o resultado esperado, uma vez que alguns ativos não apresentam estabilidade em determinados pH e podem vir a irritar a pele se não estiverem compatíveis com a mesma (PEREIRA SANTOS *et al.*, 2020).

Neste estudo, todas as formulações (FB, F1, F2 e F3) apresentaram pH dentro da faixa recomendada para aplicação na pele, bem como diferença estatística pequena entre as formulações e os tempos.

A espalhabilidade é compreendida como a capacidade de expansão de uma formulação ao longo do tempo sobre uma determinada superfície e ajuda a compreender como será aplicação do produto na área desejada (BORGHETTI; KNORST, 2006; SILVA *et al.*, 2019).

De maneira resumida, a espalhabilidade diz respeito à capacidade do produto se espalhar e se deformar com facilidade e uniformidade e, em uma formulação cosmética, este é um fator determinante de qualidade e que influencia nas características sensoriais do produto (BEHERA *et al.*, 2015).

Desse modo, foram aplicados pesos progressivos sobre a formulação, além do peso da placa de vidro, objetivando simular o esforço que a mão do indivíduo exerce ao aplicar o cosmético sobre a área desejada, permitindo prever se o mesmo será facilmente espalhado na pele (BARROS, 2021).

Os resultados de espalhabilidade das formulações podem ser observados na Tabela 7 e Figuras 10 e 11. Em geral, pode-se inferir que a

espalhabilidade aumentou conforme o aumento de peso sobre a placa e mesmo após o teste de estabilidade preliminar (t0 e t15), tal comportamento se manteve inalterado.

**Tabela 7 - Valores médios de espalhabilidade inicial (t0) e após teste de estabilidade preliminar (t15) nos diferentes pesos sobre as placas (23, 25, 27 e 33 g) contendo as formulações FB, F1, F2 e F3.**

Formulação	t0			
	Peso aplicado (g)			
	23	25	27	33
FB <sup>1</sup>	838 ± 60	1038 ± 88	1097 ± 138	1301 ± 134
F1 <sup>2</sup>	1136 ± 119	1306 ± 248	1458 ± 247	1726 ± 447
F2 <sup>3</sup>	1155 ± 93	1566 ± 40	1784 ± 43	2015 ± 46
F3 <sup>4</sup>	1326 ± 236	1648 ± 322	1817 ± 302	2163 ± 416
CV (%)	17,8	17,8	22,5	20,0
Formulação	t15			
	Peso aplicado (g)			
	23	25	27	33
FB <sup>1</sup>	981 ± 85	1175 ± 92	1321 ± 113	1740 ± 250
F1 <sup>2</sup>	1077 ± 116	1508 ± 326	1712 ± 154	1966 ± 210
F2 <sup>3</sup>	997 ± 335	1190 ± 348	1307 ± 501	1552 ± 567
F3 <sup>4</sup>	1452 ± 68	1940 ± 195	2446 ± 420	3054 ± 278
CV (%)	19,6	24,7	31,5	32,4

<sup>1</sup>FB - Ausência de ativos.

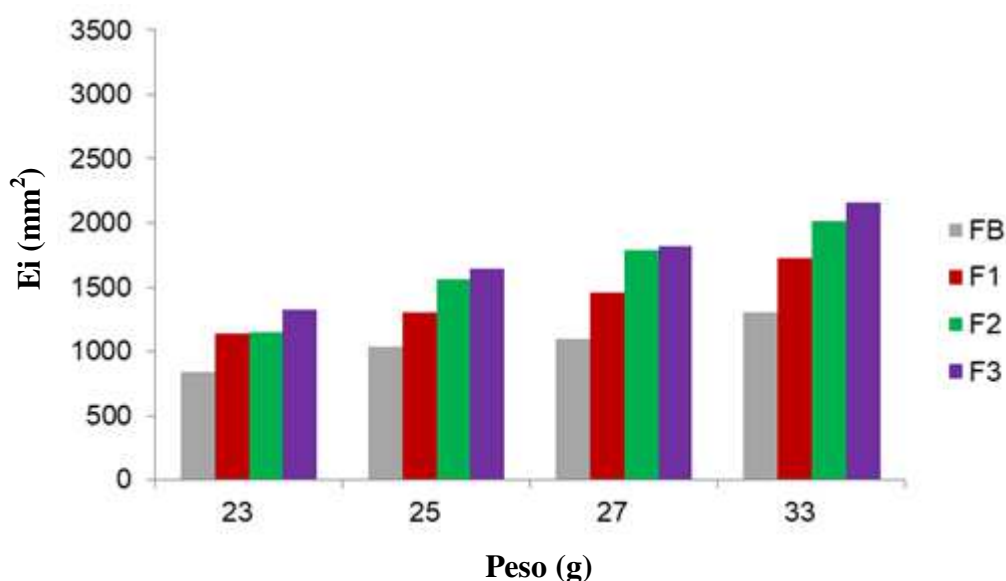
<sup>2</sup>F1 - Somente levana (2,0% LEV).

<sup>3</sup>F2 - Somente extrato seco de café verde (0,6% ECV).

<sup>4</sup>F3 - Associação de levana com extrato seco de café verde (1,0% LEV + 0,3% ECV).

CV (coeficiente de variação).

**Figura 10- Perfil de espalhabilidade inicial (t0) das formulações FB, F1, F2 e F3.**



FB - Ausência de ativos.

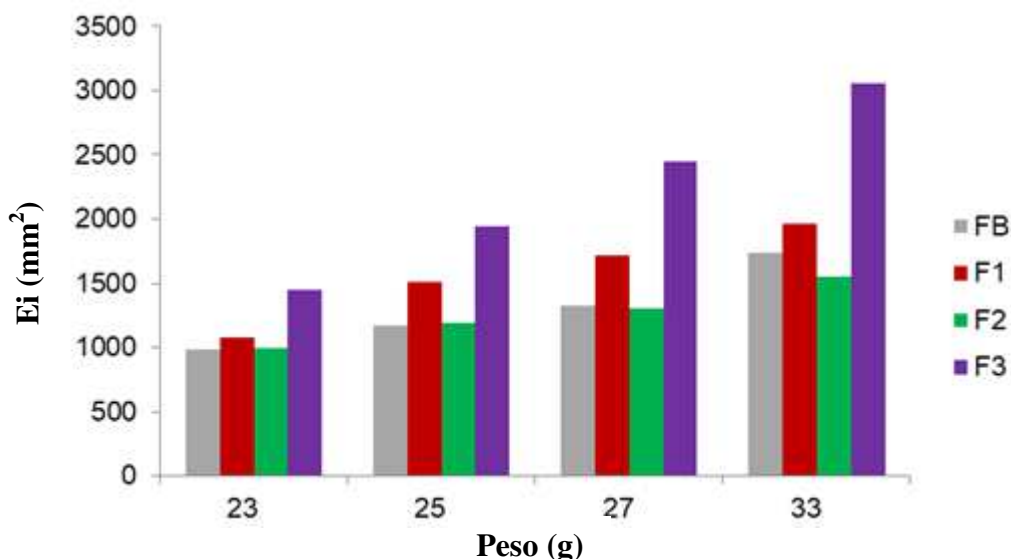
F1 - Somente levana (2,0% (p/v) LEV).

F2 - Somente extrato seco de café verde (0,6% (p/v) ECV).

F3 - Associação de levana com extrato seco de café verde (1,0% (p/v) LEV + 0,3% (p/v) ECV).

Fonte: próprio autor.

**Figura 11- Perfil de espalhabilidade das formulações FB, F1, F2 e F3 após teste de estabilidade preliminar (t15).**



FB - Ausência de ativos.

F1 - Somente levana (2,0% (p/v) LEV).

F2 - Somente extrato seco de café verde (0,6% (p/v) ECV).

F3 - Associação de levana com extrato seco de café verde (1,0% (p/v) LEV + 0,3% (p/v) ECV).

Fonte: próprio autor.

Os valores obtidos no teste de espalhabilidade estão dentro dos encontrados na literatura por Spellmeier (2005) que obteve valores de aproximadamente 1600 mm<sup>2</sup> até 5000 mm<sup>2</sup> e por Lange, Herbele e Milão (2009), que obtiveram valores de 1500 mm<sup>2</sup> até 4500 mm<sup>2</sup>.

O comportamento de aumento de espalhabilidade conforme aumento de peso era esperado e tem sido amplamente relatado na literatura. Silva *et al.* (2019) a partir de um gel-creme a base do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis* L.) observaram elevação da espalhabilidade conforme foi adicionado o peso sobre a placa. Da Silva Martins *et al.*(2023) ao desenvolverem gel e creme contendo os extratos vegetais de *Stryphnodendron adstringens* e *Centella asiática* e obtiveram os mesmos resultados, assim como Santos *et al.* (2021) no desenvolvimento de um sérum a base de óleo de *Mauritia flexuosa* para pele idosa.

Os resultados deste estudo evidenciaram uma tendência de aumento na espalhabilidade ao longo do tempo. Essa observação está em concordância com o estudo de Dahmer *et al.* (2023), no qual formulações contendo

vários ativos, incluindo a levana, também demonstraram um aumento na espalhabilidade durante o teste de estabilidade, que, neste caso, foi realizado por 15 dias. No entanto, esses resultados contrastam com os estudos de Tan et al. (2022), nos quais a espalhabilidade dos cremes contendo extrato de mangostão (*Garcinia mangostana*) diminuiu durante o teste de estabilidade acelerada, realizado por 30 dias. Os autores sugerem que as mudanças na espalhabilidade ao longo do tempo podem estar relacionadas a alterações no tamanho, forma e distribuição das fases dispersa e contínua das formulações.

Estudos têm mostrado que formulações com melhor espalhabilidade, como aquelas encontradas em F3, tendem a ter uma viscosidade mais baixa. Isso não só proporciona uma experiência sensorial mais agradável ao usuário, mas também pode aprimorar a eficácia dos ativos (Silva *et al.*, 2019).

A viscosidade desempenha um papel crucial na formulação de produtos tópicos, pois está diretamente ligada à espalhabilidade e à capacidade de distribuição uniforme sobre a pele. Formulações com viscosidades mais baixas são mais fluidas, facilitando sua aplicação e absorção pela pele. Essa característica é essencial para garantir uma distribuição homogênea dos ativos presentes na formulação, resultando em uma melhor eficácia do produto. Assim, a relação entre a espalhabilidade e a viscosidade é fundamental para o desenvolvimento de formulações cosméticas que ofereçam benefícios sensoriais e terapêuticos superiores.

Conforme os dados estatísticos apresentados na Tabela 8, não houve diferença significativa entre as formulações no decorrer do tempo (t0 e t15), no entanto, foi possível observar diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as formulações independente do tempo (Figura 12).

**Tabela 8 - Valores de p-valor para o ensaio de espalhabilidade**

Variável	Ei
Tratamento (A)	$p-0,002$ <sup>sig</sup>
Tempo (B)	$p-0,092$ <sup>n/s</sup>
A X B	$p-0,058$ <sup>n/s</sup>
CV A (%)	16,25
CV B (%)	18,24

A - Formulações: FB, F1, F2 e F3.

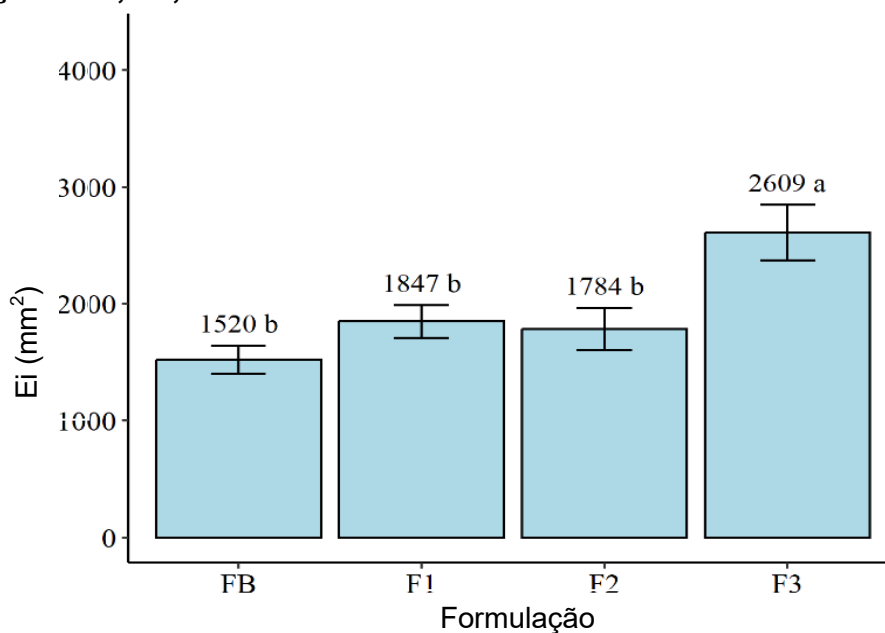
B - Tempo: Tempo inicial (t0) e após 15 dias (t15) decorridos do teste de estabilidade preliminar.

CV - Coeficiente de variação.

\* n/s (não significativo); sig (significativo) de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância.  
**Fonte:** próprio autor.

De acordo com a figura abaixo (Figura 12), os valores médios de espalhabilidade são observados ao considerar o maior peso (33g) sobre a placa, independentemente do tempo, obtidos pela média entre t0 e t15, considerando que estatisticamente não foi observada diferença significativa entre os diferentes tempos. Assim, a maior espalhabilidade foi observada em F3 (2609 mm<sup>2</sup>), sendo significativamente superior às demais formulações. Os resultados também demonstraram não haver diferença estatística para espalhabilidade entre as demais formulações.

**Figura 12- Valores médios de espalhabilidade e comparação estatística das formulações FB, F1, F2 e F3.**



FB - Ausência de ativos.

F1 - Somente levana (2,0% (p/v) LEV).

F2 - Somente extrato seco de café verde (0,6% (p/v) ECV).

F3 - Associação de levana com extrato seco de café verde (1,0% (p/v) LEV + 0,3% (p/v) ECV).

\* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

**Fonte:** próprio autor.

Milan et al. (2007) destacam uma correlação positiva entre a espalhabilidade e a aceitabilidade de um produto cosmético. Além disso, esta propriedade é de suma importância, uma vez que influencia diretamente o processo

de absorção e a taxa de liberação de ingredientes ativos na formulação (TUNGADI, PAKAYA, & ALI, 2023).

Portanto, um cosmético que apresente boa espalhabilidade não só facilita sua aplicação na pele, transmitindo uma sensação sedosa, a qual agrada o consumidor, como também sugere ser mais econômico em termos de rendimento (BARROS, 2021).

Para a avaliação da retenção de umidade, a qual ocorreu após 96 horas de acondicionamento das formulações no dessecador, podemos observar as porcentagens conforme Tabela 9.

**Tabela 9 - Porcentagem média de retenção de umidade das formulações FB, F1, F2 e F3.**

Formulação	RU (%)
FB <sup>1</sup>	79,4 ± 0,6 a*
F1 <sup>2</sup>	80,2 ± 2,3 a*
F2 <sup>3</sup>	80,3 ± 1,7 a*
F3 <sup>4</sup>	81,5 ± 2,2 a*
CV (%)	2,28

<sup>1</sup>FB - Ausência de ativos.

<sup>2</sup>F1 - Somente levana (2,0% (p/v) LEV).

<sup>3</sup>F2 - Somente extrato seco de café verde (0,6% (p/v) ECV).

<sup>4</sup>F3 - Associação de levana com extrato seco de café verde (1,0% (p/v) LEV + 0,3% (p/v) ECV).

\* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

\*CV (coeficiente de variação).

**Fonte:** próprio autor.

Conforme os dados de retenção de umidade apresentados na Tabela 9, estatisticamente obtivemos um p-valor de  $p=0,66$  ( $p>0,05$ ), sendo assim, não houve diferença estatística entre as formulações para este teste, sendo observada apenas uma variação numérica entre as mesmas de  $79,4 \pm 0,6\%$  a  $81,5 \pm 2,2\%$ .

Sabemos que a pele possui um fator de hidratação natural, no entanto, ainda não é suficiente, uma vez que existem diversos fatores ambientais que influenciam na diminuição do volume hídrico da pele. Portanto, é essencial contar com formulações ricas em ativos que melhorem a hidratação, garantindo assim a eficácia das atividades metabólicas e fisiológicas do corpo humano (RANGEL, 2021). Os resultados deste estudo demonstraram altos índices de retenção de umidade em todas as formulações analisadas, sendo mais pronunciada

em F3, principalmente devido à presença de dois ativos, sendo eles LEV e ECV, com alta capacidade hidratante, retendo eficientemente o conteúdo de água na pele, evitando uma perda transepidermal de água expressiva.

Sabe-se que a estrutura da LEV conforme demonstrado na Figura 3 apresenta vários grupamentos hidroxila (OH) e estes interagem com as moléculas de água através de ligações de hidrogênio retendo-as, sendo tal característica que a torna altamente higroscópica (SILVA et al., 2022; ZHANG et al., 2022). Semelhantemente, a composição química do ECV, conforme ilustrado na Figura 5, também apresenta moléculas com este mesmo grupamento, além de nitrogênio (N) na estrutura que, com seu par de elétrons livre, também retém água por ligações de hidrogênio; logo sua higroscopicidade pode ser explicada da mesma maneira

Durante a avaliação da AA, foi possível observar os valores médios obtidos em cada formulação (FB, F1, F2 e F3), tanto antes (t0) quanto após (t15) o teste de estabilidade preliminar, realizado pelo método espectrofotométrico (ABTS<sup>•+</sup>), como destacado na Tabela 10.

**Tabela 10 - Valores médios de atividade antioxidante das formulações FB, F1, F2 e F3 no tempo inicial (t0) e após 15 dias (t15).**

Formulação	AA	
	t0	t15
FB <sup>1</sup>	26,6 ± 3,4	6,3 ± 1,2
F1 <sup>3</sup>	46,0 ± 1,4	47,2 ± 0,9
F2 <sup>2</sup>	57,5 ± 2,6	81,6 ± 1,3
F3 <sup>4</sup>	65,3 ± 0,6	87,4 ± 2,7

<sup>1</sup>FB - Ausência de ativos.

<sup>2</sup>F1 - Somente levana (2,0% (p/v) LEV).

<sup>3</sup>F2 - Somente extrato seco de café verde (0,6% (p/v) ECV).

<sup>4</sup>F3 - Associação de levana com extrato seco de café verde (1,0% (p/v) LEV + 0,3% (p/v) ECV).

**Fonte:** próprio autor.

A partir dos dados médios mencionados acima, estatisticamente, foi possível observar que houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as formulações e também entre os tempos (t0 e t15) (Tabela 11). A partir desta análise foi possível fazer uma abordagem estatística detalhada entre as formulações e o tempo conforme Figura 13.

**Tabela 10 - Valores de  $p$ -valor para atividade antioxidante.**

Variável	AA
Formulação (A)	$p < 0,001^{\text{sig}}$
Tempo (B)	$p < 0,001^{\text{sig}}$
A X B	$p < 0,001^{\text{sig}}$
CV A (%)	2,34
CV B (%)	2,59

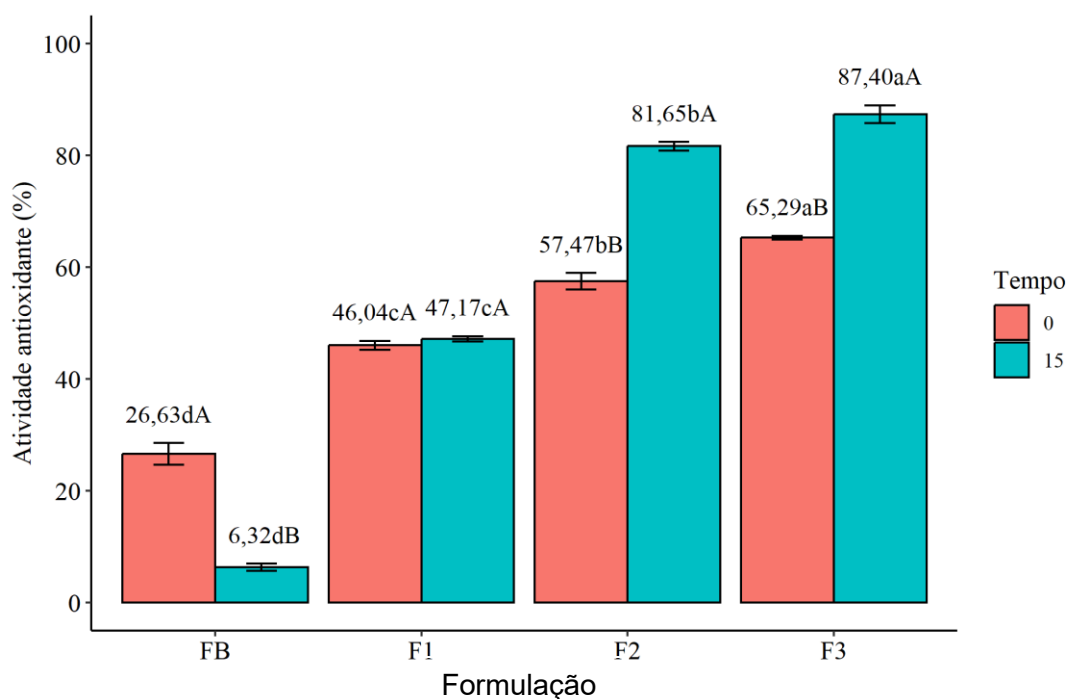
A – Formulações: FB, F1, F2 e F3.

B - Tempo: Tempo inicial (t0) e após 15 dias (t15) decorridos do teste de estabilidade preliminar

CV - Coeficiente de variação.

\* sig (significativo) de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância.

Fonte: próprio autor.

**Figura 13- Valores médios de atividade antioxidante e comparação estatística das formulações FB, F1, F2 e F3.**

FB - Ausência de ativos.

F1 - Somente levana (2,0% (p/v) LEV).

F2 - Somente extrato seco de café verde (0,6% (p/v) ECV).

F3 - Associação de levana com extrato seco de café verde (1,0% (p/v) LEV + 0,3% (p/v) ECV). \*

Letras maiúsculas comparam entre tempos de um mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam entre tratamentos dentro de um mesmo tempo. Foi aplicado um teste de comparações múltiplas de Tukey a 5% de significância.

Fonte: próprio autor.

Com base nos dados apresentados na Figura 13, ao comparar as formulações em um mesmo período de tempo, observa-se que no momento t0 houve diferença estatística significativa entre todas as formulações, onde a maior AA

foi registrada para F3 ( $65,3 \pm 0,6\%$ ), seguida por F2 ( $57,5 \pm 2,6\%$ ), F1 ( $46,0 \pm 1,2\%$ ) e FB ( $26,6 \pm 3,4\%$ ). Resultado semelhante para o momento t15, onde os maiores valores de AA foram encontrados em F3 ( $87,4 \pm 2,7\%$ ), seguido de F2 ( $81,6 \pm 1,3\%$ ), F1 ( $47,2 \pm 0,9\%$ ) e FB ( $6,3 \pm 1,2\%$ ).

Além disso, observou-se uma redução estatisticamente significativa de AA para a formulação FB ao longo do ciclo gelo-degelo, de  $26,6 \pm 3,4\%$  para  $6,3 \pm 1,2\%$ , enquanto F1 não apresentou diferença estatística durante o ensaio de estabilidade preliminar, mantendo-se entre  $46,0 \pm 1,4\%$  e  $47,2 \pm 0,9\%$ . Por outro lado, houve um aumento dessa propriedade para F2 (de  $57,5 \pm 2,6\%$  para  $81,6 \pm 1,3\%$ ) e F3 (de  $65,3 \pm 0,6\%$  para  $87,4 \pm 2,7\%$ ).

Os resultados apresentados acima só comprovam as propriedades antioxidantes descritas em diversas literaturas tanto para a LEV quanto para ECV, demonstrando como a combinação desses ativos pode potencializar os resultados (VOYTENA, 2017; DAHMER et al., 2023).

Embora não haja evidências na literatura sobre o efeito sinérgico específico entre esses dois ativos, diversos estudos indicam benefícios da combinação de ativos, como observado por Silva et al. (2019), onde a associação de LEV de *B. subtilis* com o óleo de canela resultou no desenvolvimento de uma formulação cosmeceutica com propriedades antioxidantes, hidratantes e antimicrobianas.

A elevada AA das formulações, especialmente da F3, pode ser explicada pela presença de ativos potentes em associação, como a LEV e o ECV, sendo deste modo, uma formulação de grande interesse na indústria cosmética. A abundância de antioxidantes desempenha um papel vital na proteção contra os radicais livres, fornecendo elétrons para reduzir a velocidade do processo oxidativo. Essa ação ajuda a minimizar danos às estruturas moleculares e celulares (DE GOIS et al., 2022).

Os antioxidantes são verdadeiros guardiões da saúde da pele, agindo como escudos protetores contra os radicais livres gerados pelo metabolismo celular. Essas moléculas reativas são conhecidas por causar estragos, atacando os componentes vitais das células cutâneas, como os lipídios, aminoácidos nas proteínas, ácidos graxos poli-insaturados e até mesmo as ligações duplas nas bases do DNA. Ao interceptar esses radicais livres, os antioxidantes desempenham um

papel fundamental na preservação da integridade estrutural e funcional da pele (DE GOIS et al., 2022).

A capacidade dos antioxidantes em proteger esses componentes essenciais da pele é fundamental para combater os efeitos prejudiciais do envelhecimento. Ao reduzir o estresse oxidativo e os danos causados pelos radicais livres, os antioxidantes ajudam a manter a pele com uma aparência jovem e saudável por mais tempo. Esses benefícios são particularmente vantajosos ao formular produtos cosméticos destinados a minimizar os efeitos e sinais do envelhecimento cutâneo, como rugas, linhas finas, flacidez e descoloração (DE GOIS et al., 2022).

Portanto, a inclusão de antioxidantes potentes, como os presentes na formulação F3, é uma estratégia essencial na busca por uma pele mais radiante, firme e rejuvenescida. Esses compostos desempenham um papel multifacetado na promoção da saúde e beleza da pele, destacando a importância da F3 como uma formulação promissora, de destaque na indústria cosmética.

O teste de reologia por reometria de cisalhamento contínuo é um procedimento trabalhoso e que demanda tempo significativo para ser realizado adequadamente (GILBERT et al., 2013). Devido à complexidade das medições e à necessidade de repetição para garantir a precisão dos resultados, é impraticável realizar o teste em todas as formulações desenvolvidas. Portanto, uma seleção cuidadosa é feita, geralmente escolhendo as formulações que demonstraram os melhores resultados em testes anteriores, como espalhabilidade e atividade antioxidante (BRANCO et al., 2020).

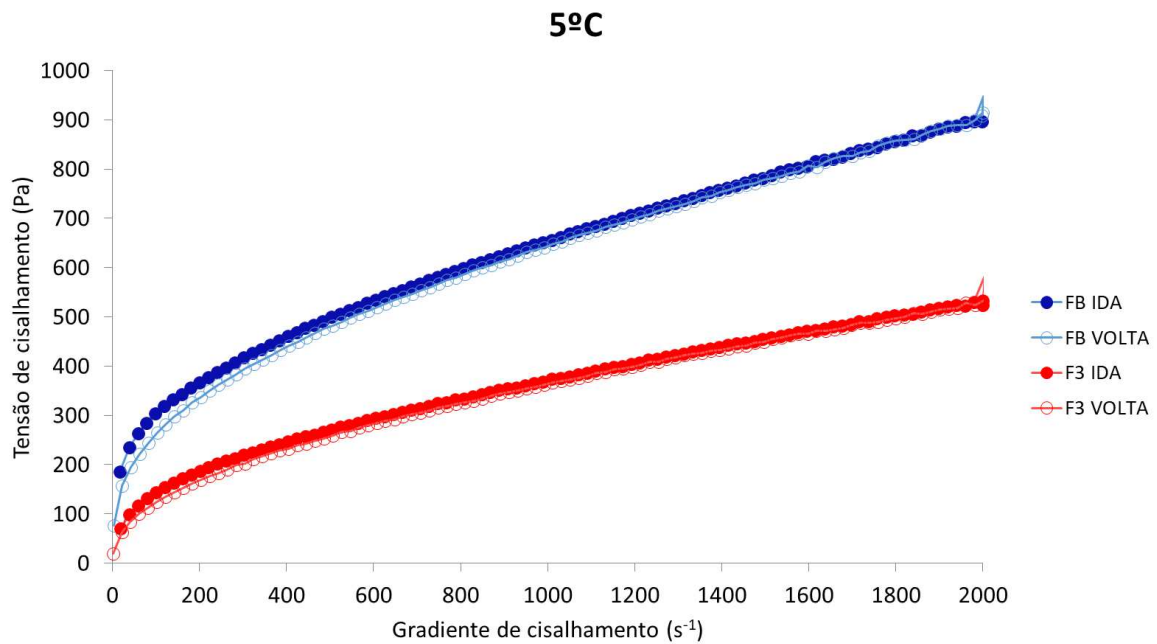
Ao selecionar apenas algumas formulações para o teste de reologia, pode-se aperfeiçoar o uso de recursos e maximizar a eficiência do estudo. Isso permite que se concentrem nas formulações mais promissoras, economizando tempo e esforço. No caso específico, a formulação F3 foi escolhida devido aos seus resultados superiores nos testes preliminares, enquanto a FB foi usada como ponto de comparação para avaliar as propriedades reológicas relativas. Essa abordagem se baseia na premissa de que as formulações com melhores características iniciais têm maior probabilidade de apresentar desempenho superior também na análise reológica.

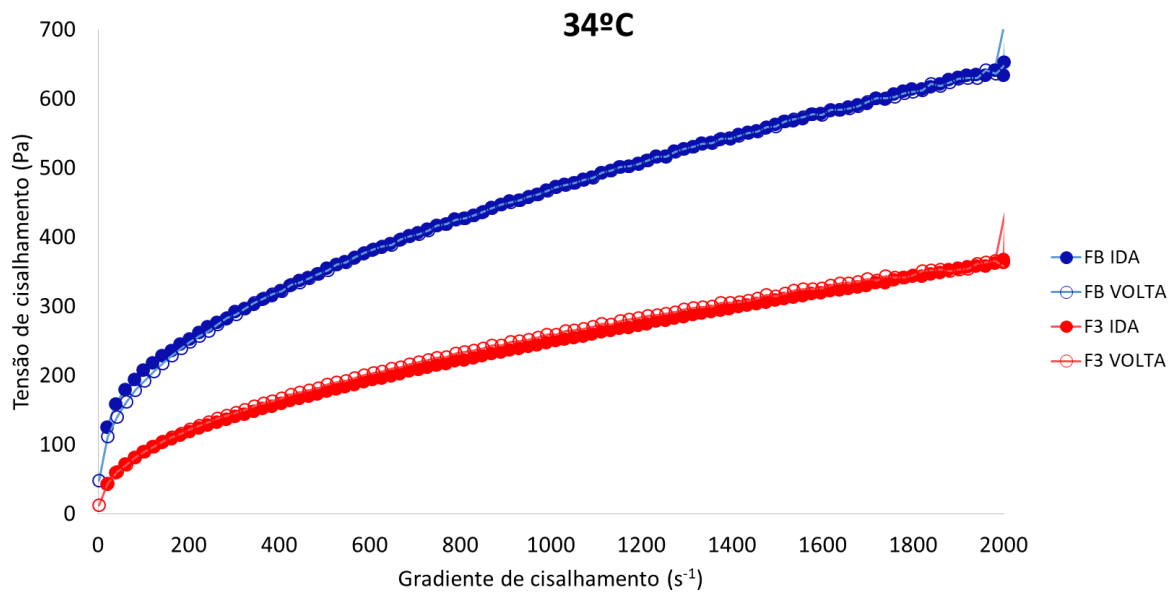
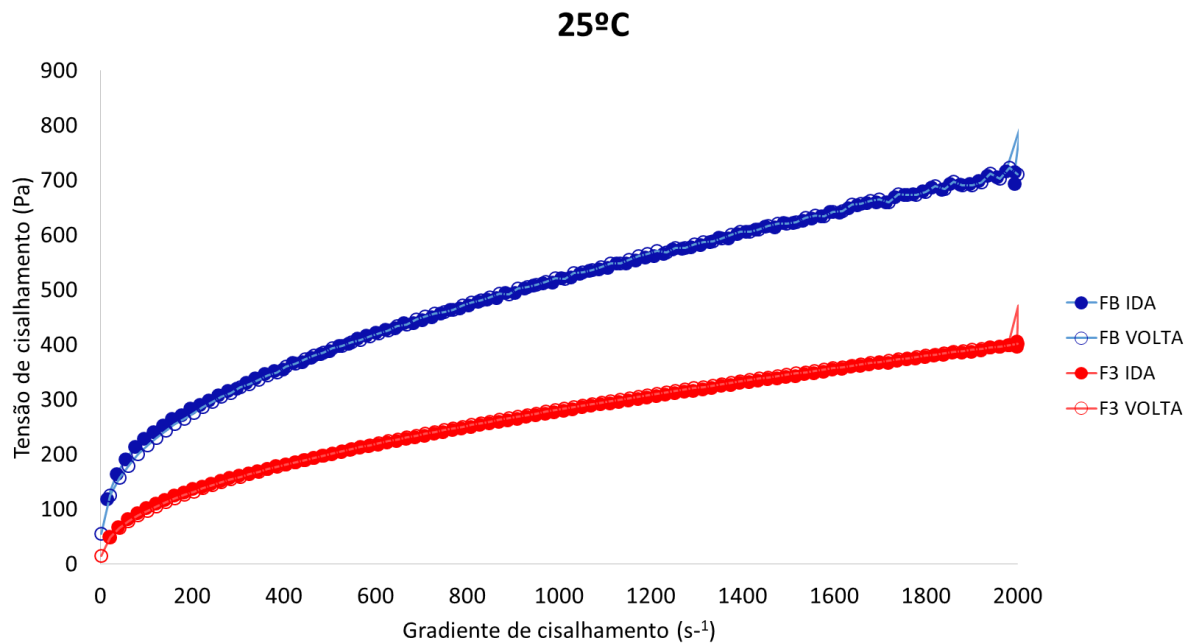
A reologia pode ser definida como o estudo do comportamento de fluxo e deformação da matéria, sendo estabelecida uma relação entre a tensão de

cisalhamento e o gradiente de cisalhamento, formando uma curva ascendente, permitindo assim determinar o comportamento de fluxo da amostra (CALIXTO; MAIA CAMPOS, 2017).

O comportamento de fluxo da amostra é visualizado através de um gráfico conhecido como curva de fluxo, em que a tensão de cisalhamento é plotada no eixo vertical (ordenadas) e o gradiente de cisalhamento no eixo horizontal (abscissas) (CALIXTO; MAIA CAMPOS, 2017). As curvas de fluxo dos sistemas emulsivos FB e F3 nas temperaturas de 5°C, 25°C e 34°C estão demonstradas na Figura 14.

**Figura 14- Curvas de fluxo dos sistemas emulsivos FB e F3 nas temperaturas de 5°C, 25°C e 34°C.**





\* O símbolo fechado representa a curva de ida e o símbolo aberto a curva de volta. Cada curva é representada pela média de três análises realizadas de forma independentemente com coeficiente de variação menor que 10%.

FB - Ausência de ativos.

F3 - Associação de levana com extrato seco de café verde (1,0% (p/v) LEV + 0,3% (p/v) ECV).

**Fonte:** próprio autor.

O comportamento reológico dos sistemas emulsivos foram analisadas estatisticamente usando o índice de consistência (K), índice de comportamento de fluxo (n) e área de histerese, conforme o modelo reológico de Ostwald de Waele (Lei da Potência), além disso, o valor de cedência ( $\sigma_0$ ) foi

avaliado usando o modelo de Herschel (FERREIRA *et al.*, 2020; INFANTE *et al.*, 2021). Os resultados mostraram coeficientes de correlação ( $r$ ) acima de 0,99 para os modelos, indicando que os mesmos explicam adequadamente os valores de  $K$ ,  $n$ ,  $\sigma_0$  e área de histerese, conforme apresentado na Tabela 12.

**Tabela 11 - Valores dos parâmetros obtidos pela análise reológica por cisalhamento contínuo dos sistemas emulsivos FB e F3, nas temperaturas de 5°C, 25°C e 34°C.**

Formulação	Temperatura (°C)	K (Pa.s) <sup>n</sup>	n (adimensional)	$\sigma_0$ (Pa)	Área de histerese (Pa.s)
FB	5°C	6,6223 ± 5,7008	0,5885 ± 0,0141	167,3333 ± 17,3926	2,64E+04 ± 1,78E+03
F3	5°C	6,1700 ± 0,1844	0,5708 ± 0,0025	55,6367 ± 1,2140	1,78E+04 ± 1,78E+03
FB	25°C	19,2433 ± 1,4383	0,4641 ± 0,0063	50,1567 ± 5,6001	2,9E+03 ± 1,11E+03
F3	25°C	7,1967 ± 0,2579	0,5213 ± 0,0048	17,1333 ± 0,9172	- 1,9E+03 ± 8,8E+03
FB	34°C	14,9327 ± 5,7536	0,4932 ± 0,0527	63,7167 ± 31,1170	1048 ± 7,2E03
F3	34°C	5,0957 ± 0,1582	0,5530 ± 0,0053	19,1233 ± 0,9000	-1,2E+04 ± 1,1E03

FB - Ausência de ativos.

F3 - Associação de levana com extrato seco de café verde (1,0% (p/v) LEV + 0,3% (p/v) ECV).

Fonte: próprio autor.

A partir da análise reológica é possível determinar se a emulsão apresenta comportamento de fluido newtoniano ou um fluido não-newtoniano. Os fluidos newtonianos obedecem a lei de Newton e apresentam deformação de fluxo diretamente proporcional a tensão de cisalhamento, sem que haja alteração da sua viscosidade, ou seja, a viscosidade permanece constante independente das mudanças no gradiente de cisalhamento (CALIXTO; MAIA CAMPOS, 2017; EUDIER *et al.*, 2019).

Por outro lado, os fluidos que não seguem este comportamento são chamados de não-newtonianos, ou seja, a viscosidade varia com a tensão aplicada. Estes tipos de fluidos são classificados em duas categorias onde, os fluidos não-newtonianos independentes de tempo são os fluidos pseudoplásticos, dilatantes e plásticos e os dependentes de tempo são os tixotrópicos e os reopéticos (CALIXTO; MAIA CAMPOS, 2017; EUDIER *et al.*, 2019).

Os fluidos do tipo plástico e pseudoplásticos têm viscosidade decrescente com o aumento do gradiente de cisalhamento, enquanto os dilatantes, a viscosidade aumenta com o aumento do gradiente de cisalhamento. Os materiais plásticos são aqueles que precisam de uma tensão inicial para começar a fluir, apresentando curva de fluxo com início em um ponto diferente da origem, enquanto que os materiais pseudoplásticos apresentam em geral curva de fluxo passando pela origem (CALIXTO; MAIA CAMPOS, 2017; EUDIER *et al.*, 2019).

O fluido pseudoplástico é o mais aplicado para produtos cosméticos, pois apresenta viscosidade compatível com a grande maioria das preparações cosméticas, como géis e emulsões além de possuírem uma boa espalhabilidade, formando uma cobertura sobre a pele. O mesmo resultado não ocorre com fluidos newtonianos devido ao rápido escoamento sobre a pele, formando uma distribuição não uniforme (EUDIER *et al.*, 2019).

Os fluidos não-newtonianos também são classificados de acordo com o tempo, onde partem do princípio onde a viscosidade é alterada em função do tempo de cisalhamento. Os fluidos tixotrópicos perdem viscosidade enquanto os reopéticos ganham viscosidade de acordo com o tempo de cisalhamento (SHIROMA, 2012).

A tixotropia é um parâmetro importante para a avaliação das propriedades reológicas dos cosméticos e consiste na capacidade do fluido reduzir a viscosidade com o aumento da tensão de cisalhamento e retornar a viscosidade

inicial após cessar a tensão de cisalhamento. Este fenômeno é dependente do tempo e da recuperação do fluido (HUANG, 2019; COSTA; MAIA CAMPOS, 2021; FRANZOL, 2021).

Produtos tixotrópicos tornam-se mais fluidos quando submetidos a uma pressão externa, espalhando-se mais facilmente na região onde são aplicados, e recuperam a viscosidade inicial no momento em que se encerra a aplicação, impedindo que o produto escorra durante o procedimento (FORMARIZ *et al.*, 2005). Quanto maior for a tixotropia, maior será o tempo necessário para a recuperação da estrutura inicial do sistema, maior será a flexibilidade e a resistência à quebra (HUANG, 2019; COSTA; MAIA CAMPOS, 2021).

Vale lembrar que a viscosidade deve ser rapidamente recuperada após o cisalhamento para que a formulação permaneça como uma película na pele. Além disso, a estabilidade reológica garante que a emulsão mantenha suas propriedades ao longo do tempo, evitando a separação dos componentes, o que é crucial para sua segurança e eficácia (HUANG, 2019; COSTA; MAIA CAMPOS, 2021).

Do ponto de vista reológico, os valores médios do índice de fluxo inferiores a um ( $n < 1$ ) indicam que as formulações exibem um comportamento pseudoplástico. Portanto, tanto o perfil da curva de fluxo quanto o valor de  $n$  corroboram a natureza não-newtoniana pseudoplástica das formulações em todas as temperaturas testadas (5°C, 25°C e 34°C). Esses resultados reométricos estão em concordância com as observações do teste de espalhabilidade. Bezerra (2020) observou que a emulsão formulada com óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) exibiu um comportamento considerado adequado para formulações tópicas, caracterizado pela natureza não-newtoniana pseudoplástica. Portanto, o comportamento pseudoplástico das formulações propostas confirma positivamente a adequação do sistema para uso cosmético.

O valor do índice de consistência (K) é obtido a partir da viscosidade média de todos os pontos da curva de fluxo. O valor de K das emulsões foi dependente da adição dos ativos LEV e EVC e da temperatura, conforme pode ser observado na Tabela 12. Os resultados demonstraram que, o valor de K, ao ser analisado na temperatura de 5°C, não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as formulações F3 e FB.

Nas temperaturas de 25°C e 34°C, a presença dos ativos levou a uma diminuição estatisticamente significativa na formulação F3 quando comparado com a FB. Essa dependência ocorre porque temperaturas mais elevadas afetam diretamente as interações moleculares dentro do fluido, alterando sua conformação e tornando o mesmo menos viscoso, levando a uma diminuição no índice de consistência (K).

Podemos afirmar que a viscosidade é diretamente afetada pela temperatura, uma vez que este parâmetro é ligado à força de atração entre moléculas, ou seja, se a formulação se encontra em alta temperatura, as moléculas estão mais afastadas e conseqüentemente irá diminuir a viscosidade. Por outro lado, quando a temperatura é baixa, as moléculas tendem a ter mais atração, aumentando a viscosidade (MELO *et al.*, 2013). Além disso, o calor pode alterar a estrutura da levana, reduzindo sua capacidade de formar uma rede viscosa, devido as temperaturas mais altas levarem ao aumento das quebras das ligações deste ativo (CHEN; GAO; PLOEHN, 2014).

A área de histerese das emulsões foi analisada pela área formada entre as curvas ascendentes e descendentes. O fenômeno denominado histerese para reologia é a tendência de um fluido voltar ao seu estado físico inicial após uma crescente aplicação de taxas de cisalhamento. Em fluidos não newtonianos independentes do tempo, a ida e a volta são coincidentes, ou seja, formam o mesmo perfil, porém, em fluidos newtonianos dependentes do tempo, essa volta ocorre por outro caminho (MACHADO, 2002).

Através da Figura 14, foi possível visualizar a presença de área de histerese bem pequena nas formulações, em todas as temperaturas, sendo um pouco mais pronunciada na temperatura de 5°C. As curvas de fluxo descendentes apresentaram menor resistência ao escoamento quando comparadas às curvas ascendentes, indicando menor viscosidade do sistema quando o gradiente de cisalhamento é interrompido, o que foi observado em ambas as formulações na temperatura de 5°C e na FB nas temperaturas de 25°C e 34°C conforme apresentada na Tabela 12. A área de histerese da formulação nas condições anteriormente citadas apresentou valores positivos, sendo estas classificadas como formulações tixotrópicas.

Os sistemas com menor área de histerese possuem a recuperação estrutural imediata, como foi visto em ambas as amostras na temperatura de 25°C. Além disso, a tixotropia implica em um equilíbrio entre facilidade de aplicação e estabilidade pós-aplicação. O entendimento e gerenciamento adequados dessas propriedades são cruciais para a eficácia e qualidade do produto (HUANG, 2019; COSTA; MAIA CAMPOS, 2021).

Para a formulação F3 nas temperaturas de 25°C e 34°C, pode-se verificar a presença de área de histerese negativa e as curvas de fluxo, principalmente na temperatura mais alta, onde apresentaram um comportamento de reopexia bem discreto, em que a viscosidade da curva ascendente foi menor que a descendente, provocando um efeito de histerese oposto à tixotropia (SHIROMA, 2012).

À medida que a temperatura de uma formulação se eleva, as interações moleculares, tais como pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, tendem a se enfraquecer (BAEK *et al.*, 2018), isso resulta em uma estrutura molecular mais flexível e conseqüentemente com menor viscosidade. A incorporação de ativos na formulação pode modificar ainda mais essas características, podendo funcionar como plastificantes, alterando a rigidez da rede molecular, ou como agentes que interagem de forma específica, influenciando a organização e o comportamento dinâmico das moléculas na formulação (JUNIOR, 2006).

Dessa forma, a manipulação de uma amostra que exhibe simultaneamente comportamentos reológicos pseudoplásticos, reopéticos e tixotrópicos exige uma abordagem técnica cuidadosa, considerando as mudanças da viscosidade. A natureza pseudoplástica requer controle do cisalhamento para manter a estrutura do produto, enquanto o comportamento reopético demanda atenção ao tempo de processamento para manter a consistência desejada (FRANZOL, 2021).

Sendo assim, a caracterização da formulação quanto ao seu comportamento reológico é um fator fundamental para o estudo de uma formulação, visto que o estudo apresentou dois ativos de grande complexidade estrutural, contemplando um sistema com grandes possibilidades de aplicação na pele (FORMARIZ *et al.*, 2005).

A realização do teste de espectroscopia fotoacústica é crucial para garantir a eficácia da permeação da formulação na pele. Este teste permite uma análise detalhada da penetração dos ativos da formulação nas camadas mais

profundas da pele, fornecendo informações essenciais sobre sua absorção e distribuição (ZSIKÓ et al., 2019).

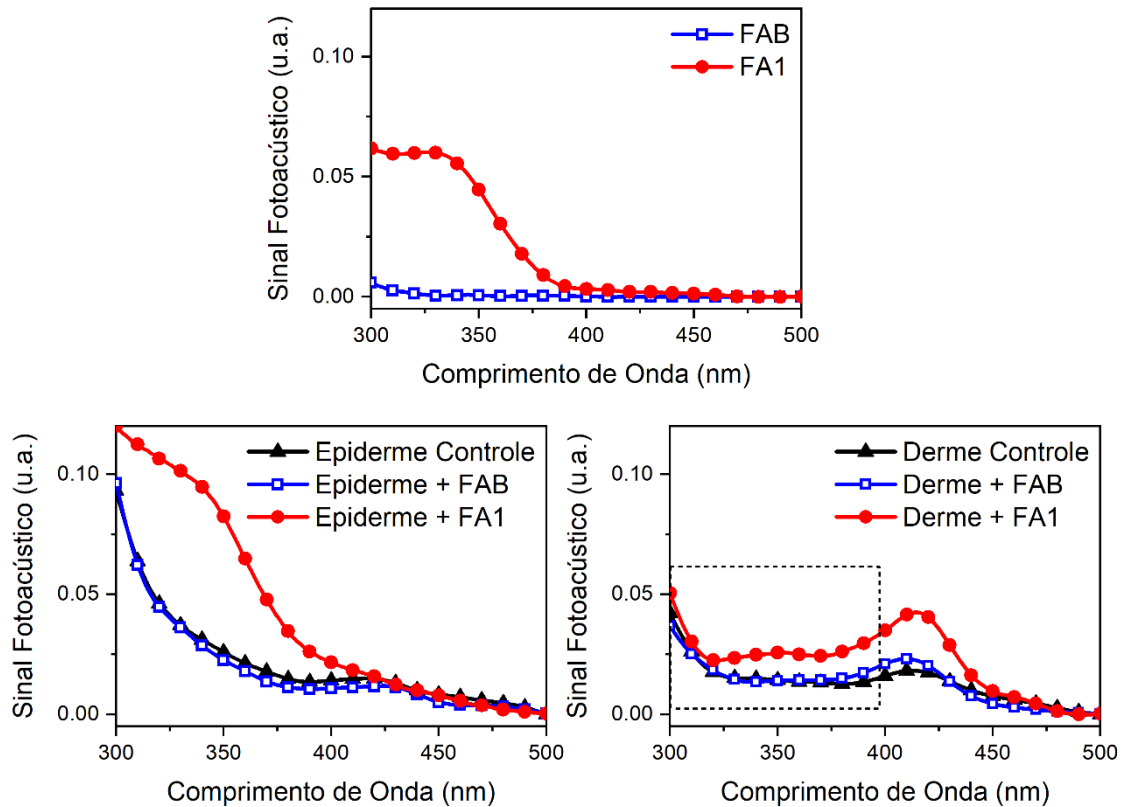
Ao avaliar a permeação da formulação na pele através da espectroscopia fotoacústica, pode-se determinar não apenas a quantidade de substância que penetra na pele, mas também a profundidade alcançada e a cinética de absorção ao longo do tempo. Fatores fundamentais para garantir que os ativos estejam atingindo as camadas da pele onde sua ação é mais necessária para obter os resultados desejados (ZSIKÓ et al., 2019; LOW et al., 2021).

Além disso, a espectroscopia fotoacústica pode ajudar a identificar potenciais problemas de segurança relacionados à absorção excessiva de certos ingredientes ativos, garantindo que a formulação seja segura para uso tópico, fator de suma importância para o consumidor final (ZSIKÓ et al., 2019).

Devido ao alto custo da análise, e a elevada demanda de tempo, priorizou-se a avaliação das formulações que apresentaram os melhores resultados de espalhabilidade e atividade antioxidante, onde F3 foi escolhida por apresentar maior potencial de sucesso, bem como o controle (FB), concentrando esforços na investigação da mesma, direcionando recursos para maximizar os benefícios e reduzir os gastos.

A Figura 14 (A) mostra os espectros de absorção óptica das formulações FB e F3. A formulação FB praticamente não apresentou absorção óptica na região espectral analisada. A formulação F3 apresentou absorção óptica abaixo de 400 nm. A Figura 15 (B) mostra os espectros de absorção óptica da superfície epidérmica após 30 minutos da aplicação das formulações. Nota-se que não é possível diferenciar o espectro da Epiderme + FB em relação a Epiderme controle, já a Epiderme + F3 apresenta um aumento de absorção óptica na região característica da formulação. A Figura 15 (C) mostra os espectros de absorção óptica da superfície dérmica após 30 minutos da aplicação das formulações. Observa a presença da formulação F3 pelo aumento de intensidade na região de 300 a 400 nm na superfície dérmica da pele com formulação em comparação a pele controle.

**Figura 15- Espectros de absorção óptica das formulações (A); Espectros de absorção óptica da epiderme controle e após 30 minutos da aplicação das formulações (B); Espectros de absorção óptica da derme controle e após 30 minutos da aplicação das formulações (n=3) (C). O quadrado pontilhado destaca a área característica de absorção da formulação F3.**



FAB = FB - Ausência de ativos.

FA1 = F3 - Associação de levana com extrato seco de café verde (1,0% (p/v) LEV + 0,3% (p/v) ECV).

**Fonte:** próprio autor.

Assim, os resultados sugerem que a formulação F3 apresenta uma capacidade notável de penetração e interação tanto com as camadas superficiais quanto com as mais profundas da pele. Essas conclusões são essenciais para uma avaliação abrangente da eficácia e segurança das formulações em aplicações cosméticas e dermatológicas, fornecendo insights valiosos para o desenvolvimento e aprimoramento de produtos destinados ao cuidado da pele.

## 6 CONCLUSÃO

Foram desenvolvidas quatro formulações tópicas, gel-creme, do tipo O/A, sendo estas: FB (sem ativos), F1 (2% levana), F2 (0,6% extrato seco de café verde) e F3 (1,0% levana + 0,3% extrato seco de café verde). A formulação F3 demonstrou ser promissora para o desenvolvimento de um dermocosmético destinado à redução dos sinais na região periorbital, se destacando por manter-se estável frente à centrifugação, preservando suas características organolépticas, como o aspecto, cor e odor, além do pH compatível para aplicação cutânea ( $t_0$ :  $5,45 \pm 0,02$  e  $t_{15}$ :  $5,67 \pm 0,03$ ).

Destacou-se também pela sua excelente espalhabilidade ( $2609 \text{ mm}^2$ ) em relação as demais formulações, resultado semelhante observado para a retenção de umidade que, apesar de não apresentar diferença estatística entre as formulações, apresentou o maior percentual ( $81,5 \pm 2,2\%$ ), proporcionando uma aplicação confortável e eficaz na hidratação da pele. Exibiu os maiores valores de atividade antioxidante ( $t_{15}$ :  $87,4 \pm 2,7\%$  e  $t_0$ :  $65,3 \pm 0,6\%$ ), sugerindo um potencial significativo na proteção contra danos causados pelos radicais livres. Seu comportamento reológico favorável não-newtoniano e pseudoplástico também contribui para sua aplicabilidade na pele, garantindo uma viscosidade adequada. Em relação a espectroscopia fotoacústica, sugere que a formulação F3 é capaz de permear efetivamente nas diferentes camadas da pele, como indicado pelo aumento na absorção óptica nas regiões epidérmica e dérmica.

Dessa forma, os resultados demonstraram que essas propriedades combinadas fazem da formulação F3 uma candidata promissora, em um mercado com crescente demanda, para um dermocosmético contendo bioativos naturais e sustentáveis como estratégia para reduzir os sinais da região periorbital.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDO, J.M.; SOPKO, N.A.; MILNER, S.M. The applied anatomy of human skin: A model for regeneration. **Wound Medicine**, v. 28, p.1-10, 2020.

ABIHPEC. Associação Brasileira de Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. **Panorama do Setor. Caderno de tendências 2021-2022**. São Paulo, 2023.

AISYAH, Y.; YUNITA, D.; IKHWANA, Y. Formulation and characteristics of skin cream with the addition of essential oil blend. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v.1297, p.012080, 2024.

ALBRECHT, L.P.; ALBRECH, A.P.; BONFANTI, G.; COSTA, D.H.; DEUSCHLE, V.C.K.N. 6º Congresso Internacional em Saúde. **Estudo de Estabilidade de uma Formulação Anticelulítica**, 2019. 11p.

AMARAL, A.A.; FERREIRA, L.M.; SILVA, S.D.K.; PENSIN, C.F. Desenvolvimento de formulação de uso tópico baseada em uma inovação incremental contendo o princípio ativo Ibuprofeno. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v.6, n.13, p.2333-2345, 2023.

AYMORI, P.A.; PANGONI, F.B.B.; KALSCHNE, D.L.; DE CONTI, A.J.; ALFIERI, D.F.; ANDRAUS, R.A.C.; LONNI, A.A.S.G. Efficacy of the association of formulation with *Coffea canephora* extract and phonophoresis against gynoid lipodystrophy in women population: development, characterization and clinical study. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 11, p.e405111133753, 2022.

BAEK, K.H.; ARGÜELLES-VIVAS, F.J.; OKUNO, R.; SHENG, K.; SHARMA, H.; WEERASOORIYA, U. P. Emulsification of Athabasca bitumen by organic alkali: Emulsion phase behavior and viscosity for bitumen/brine/triethylenetetramine. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v.168, p.359-369, 2018.

BAESSO, M.L.; SHEN, J.; SNOOK, R.D. Mode-Mismatched thermal lens determination of temperature coefficient of optical path length in soda lime glass at different wavelengths. **Journal of Applied Physics**. v.75, n.8, p.3732-3737, 1994.

BARBA, R. Y. B.; SANTOS, N. DOS. A Bioeconomia no Século XXI: Reflexões sobre Biotecnologia e Sustentabilidade no Brasil. *Revista de Direito e Sustentabilidade. Encontro Virtual*, v.6, n. 2, p. 26-42, 2020. <http://dx.doi.org/10.26668/IndexLawJournals/2525-9687/2020.v6i2.7023>

BARONI, A.; BUOMMINO, E.; DE GREGORIO, V.; RUOCCO, E.; RUOCCO, V.; WOLF, R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in dermatology**, v. 30, n. 3, p. 257-262, 2012.

BARROS, C. **Melhorando a espalhabilidade em formulações cosméticas**. 2021. Disponível em: <https://connect.in-cosmetics.com/pt/formulacoes/melhorando-a-espalhabilidade-em-emulsoes-cosmeticas-formulation-in-action/>. Acesso em: 04 dez. 2023.

BARZOTTO, I L.; OLIVEIRA, S.M.M.; TAVARES, B.; DALLABRIDA, S. Estabilidade de emulsões frente a diferentes técnicas de homogeneização e resfriamento. **Visão Acadêmica**, v. 10, n. 2, p.36-42, 2009.

BATISTA, Luiz Antônio. **Características morfofisiológicas de cafeeiros *Coffea arabica* L.**. 2010. 66f. Tese (Doutorado em agronomia/fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

BEHERA, B.; SINGH, V.K.; KULANTHAIVEL, S.; BHATTACHARYA, M.K.; PARAMANIK, K.; BANERJEE, I.; PAL, K. Physical and mechanical properties of sunflower oil and synthetic polymers based bigels for the delivery of nitroimidazole antibiotic – A therapeutic approach for controlled drug delivery. **European Polymer Journal**, v. 64, p. 253-264, 2015.

BELI, C. M.; MAGESTE, J. M.; TAKETANI, N. F. Bioprospecção de enzimas para cosmética: seu impacto na biotecnologia. **Revista Ensaios Pioneiros**, v. 3, n. 2, p.10-24, 2020.

BENSON, H.A.E.; WATKINSON, A.C. **Topical and transdermal drug delivery: principles and practice**. Cingapura: Wiley, 2012. 448 p.

BERNARDO, A.F.C.; SANTOS, K.; SILVA, D.P. Pele: alterações anatômicas e fisiológicas do nascimento à maturidade. **Revista Saúde em foco**, v. 1, n. 11, p. 1221-33, 2019.

BERSANETI, G. T.; MANTOVAN, J.; MAGRI, A.; MALI, S.; CELLIGOI, M. A. P. C. Edible films based on cassava starch and fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis natto* CCT 7712. **Carbohydrate Polymers**, v.151, p.1132-1138, 2016.

BERSANETI, G. T.; PAN, N. C.; BALDO, C.; CELLIGOI, M. A. P. C. Co-production of Fructooligosaccharides and Levan by Levansucrase from *Bacillus subtilis natto* with Potential Application in the Food Industry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.184, p.838-851, 2017.

BERSANETI, G.T.; PAN, N.C.; BALDO, C.; CELLIGOI, M.A.P.C. Co-production of BIANCHET, R. T.; CUBAS, A. L. V.; MACHADO, M. M.; MOECKE, ELISA H. S. Applicability of bacterial cellulose in cosmetics - bibliometric review. **Biotechnology Reports**, v. 27, e00502, 2020.

BEZERRA, R. G. **Valiação pré-clínica do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum Wittm.*) e emulsão a base deste para o tratamento da dermatite: formulação, caracterização e efeitos antimicrobiano e anti-inflamatório**. 2020. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.

BICHETTI, A.E.; SAMPAIO, P.G.; GUSMÃO, C.P. Estudo da atividade antioxidante de uma formulação cosmética. **Revista Uningá**, v.55, n.3, p.1-13, 2018.

BIRCH-MACHIN, M. A.; BOWMAN, A. Oxidative stress and ageing. **British Journal of Dermatology**, v. 175, n. S2, p. 26-29, 2016.

BLOISE, M. I. Óleos vegetais e especialidades da floresta Amazônica. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 15, n. 5, p. 46-49, 2021.

BOCHEVA, G.; SLOMINSKI, R.M.; SLOMINSKI, A.T. Neuroendocrine aspects of skin aging. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 11, p. 2798, 2019.

BÖGER, B.R.; BIGOTTO, B.G.; LONNI, A.A.; BENASSI, M.T. Eye cosmeceutical formulations with roasted coffee oil in free and microencapsulated forms: development and preliminary stability study. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 124, n. 4, p. 2100168, 2022.

BOGER, B.R.; LONNI, A.A.S.G.; BENASSI, M. DE T. Characterization and Sensory Evaluation of a Cosmeceutical Formulation for the Eye Area with Roasted Coffee Oil Microcapsules. **Cosmetics**, v.10, n.1, p.1-14, 2023.

BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 4, p.531-537, 2006.

BRANCO, I. G., SEN, K., & RINALDI, C. Effect of sodium alginate and different types of oil on the physical properties of ultrasound-assisted nanoemulsions. **Chemical Engineering and Processing-Process Intensification**, 153, 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. 1.ed. Brasília: ANVISA, 2004, 52p.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2007, 130p.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2ª. ed., 2008. 120p.

BROWN, T.M.; KRISHNAMURTHY, K. **Histology, dermis**. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535346/>. Acesso em: 26 out. 2023.

BRUSCHI, M.L.; JONES, D.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M.P.D.; DE FREITAS, O.; LARA, H.G. Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontaldisease: in vitro release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.96, n.8, p.2074-2089, 2007.

BUCHER, A.G.; ANDRADE, I.C.S.M.; ZANQUETA, E.B. Pesquisa populacional de fitocosméticos para o tratamento de acne. **Revista Biosalus**, v.5, p.1-7, 2023.

BUZANELLO, E.B.; **Desenvolvimento de nanoemulsões de café verde para fins farmacêutico e cosmético**. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biociências). 2019. 152 f. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

CALIXTO, L. S.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Physical Mechanical characterization of cosmetic formulations and correlation between instrumental measurements and sensorial properties. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 39, n.5, p. 527-534, 2017.

CAMPANINI, M. Z.; CUSTÓDIO, D. L.; IVAN, A. L.; MARTINS, S.M.; PARANZINI, M. J.; MARTINEZ, R.M.; GEORGETTI, S.R. Topical formulations containing pimenta pseudocaryophyllus extract: In vitro antioxidant activity and in vivo efficacy against UV-B-induced oxidative stress. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n.1, p. 86-95, 2014.

CARVALHO, A. C.; CARVALHO, D. F.; FILGUEIRAS, G. C.; ARAÚJO, A. C. S.; CARVALHO, A. V. Panorama e importância econômica do café no mercado internacional de commodities agrícolas: uma análise espectral. **Agroecossistemas**, v.9, n.2, p.223-222, 2017.

CARVALHO, J.G.S. **Estudo sobre formulações cosméticas naturais e princípios ativos de origem natural encontrados no Brasil**. 2021. 71f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2021.

CHAIYASUT, C.H.A.I.Y.A.V.A.T.; SIVAMARUTHI, B.S.; SIRILUN, S.A.S.I.T.H.O.R. N.; MAKHAMRUEANG, N.E.T.N.A.P.A.; SIRITHUNYALUG, J.; PEERAJAN, S.; KESIKA, P. Formulation and stability assessment of arabica and civet coffee extracts based cosmetic preparations. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical**, v. 11, n. 6, p. 425-429, 2018.

CHEN, X.; GAO, H.; PLOEHN, H. J. Montmorillonite–levan nanocomposites with improved thermal and mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**, v.101, p.565-573, 2014.

CHO, YONG-HUN, BAHUGUNA, A.; KIM, HAN-HYUK; KIM, DONG-IN; KIM, HYEON-JEONG; YU, JAE-MYO; JUNG, HYUN-GUG; JANG, JAE-YOON; KWAK, JAE-HOON; PARK, GEUN-HYE; KWON, O-JUN; CHO, Y.J.; AN, J.Y.; JO, C.; KANG, S.C.; AN, BONG-JEUN. Potential effect of compounds isolated from *Coffea arabica* against UV-B induced skin damage by protecting fibroblast cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 174, p. 323-332, 2017.

CORSO, M.P., VIGNOLI, J.A., BENASSI, M.T. Development of an instant coffee enriched with chlorogenic acids. **Journal of Food Science and Technology**, v.53, n. 3, p.1380-1388, 2016.

COSTA, G.M.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Efficacy of topical antioxidants in the skin

hyperpigmentation control: A clinical study by reflectance confocal microscopy. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.20, n.2, p.538-545, 2021.

COUTINHO, C. S. C.; SANTOS, E. P. Cremes e Loções: Visão Geral. **Cosmetics & Toiletries** (Brasil), v. 26, n.4, p. 36-38, 2014.

DA SILVA, R. T.; BERSANETI, G. T.; LONNI, A. A. S. G.; CELLIGOI, M. A. P. C. **Produção de levana e sua aplicação em cosméticos**. In A produção do conhecimento nas ciências biológicas, Edition 1; De Oliveira Junior, J. M. B. (org); Ponta Grossa: Editora Atena, 2019; pp. 22-35, ISBN 978-85-7247-279-1.

DA SILVA, R.T.; BERSANETI, G.T.; CHIDEROLI, R.T.; PEREREIRA, U.P.; LONNI, A.A.S.G.; BIGOTTO, B.G.; CELLIGOI, M.A.P. Biological properties of levan *Bacillus subtilis* natto and cinnamon essential oil for application in cosmeceutical formulations. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p.23009-23024, 2020.

DAHMER, D.; BERGAMINI, T. A.; BIGOTTO, B. G.; CELLIGOI, M. A. P. C.; LONNI, A. A. S. G. **Cosméticos labiais: Tendência verde e emprego da biotecnologia**. In Farmácia hospitalar e clínica e prescrição farmacêutica, Edition 1; Pessoa, D. L. R.; Ponta Grossa, Brazil, 2022; pp. 56-70, ISBN 978-65-258-0665-5.

DAHMER, D.; SCANDORIEIRO, S.; BIGOTTO, B.G.; BERGAMINI, T.A.; GERMINIANI-CARDOZO, J.; DA COSTA, I.M.; KOBAYASHI, R.K.T.; NAKAZATO, G.; BORSATO, D.; PRUDENCIO, S.H.; DALTOÉ, M.L.M.; CELLIGOI, M.A.P.C.; LONNI, A.A.S.G. Multifunctional Biotechnological Lip Moisturizer for Lip Repair and Hydration: Development, In Vivo Efficacy Assessment and Sensory Analysis. **Cosmetics**, v.10, n.6, p.1-30, 2023.

DA SILVA MARTINS, M.; SILVESTRE, R.B.; ADAMCZUK, S.E.; ISAAC, V.L.B. Desenvolvimento e estudo de estabilidade de formulações cosméticas contendo extrato de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e *Centella asiatica* (L.) Urb. com atividade antioxidante. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v.26, n.2, p.40-49, 2023.

DE GOIS, C.M.D.; DE LIMA, C.B.; MEDEIROS, D.A.; GODINHO, J. Avaliação da atividade antioxidante do extrato de *Hibiscus Sabdariffa* in vitro para a formulação de sérum antiaging. **E-Acadêmica**, v.3, n.3, e2933317-e2933317, 2022.

DWIVEDI, A.; AGARWAL, N.; RAY, L.; TRIPATHI, A. **Skin aging & cancer**. Cingapura: Springer, 2019. 154p.

ECKHART, L.; TSCHACHLER, E.; GRUBER, F. Autophagic control of skin aging. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 7, n.30, 2019.

ENDO, T. M.; FERRARI, A.B.S.; ZERAIK, M.L.; DINARDO, V.; LONNI, A.A.S. Desenvolvimento de formulação dermocosmética com *Coffea canephora* verde: potencial propriedade como antienvhecimento cutâneo. **Visão Acadêmica**, v. 24, n. 4, p.4-13, 2023.

ERNANDES, F.M.P.G.; CRUZ, C.H.G. Nutritional requirements of *Zymomonas mobilis* CCT 4494 for levan production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.54, p. 589-600, 2011.

ESAWY, M.A.; HASHEM, A.M.; AHMED, E.F.; TAIE, H.A.A.; ATY, A.A.A.E.; SALAMA, B.M.; GAMAL, A.A.; AWAD, G.E.A. Sequential optimization by statistical designs for levansucrase and levan production by *Bacillus subtilis* M and its evaluation of antioxidante activity. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 88, n. 8, p. 475-485, 2016.

EUDIER, F.; SAVARY, G.; GRISEL, M.; PICARD, C. Skin surface physico-chemistry: Characteristics, methods of measurement, influencing factors and future developments. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.264, p.11-27, 2019.

FATMAWATI, S.; NUGRAHAENI, F.; NURSAL, F.K.; FITRIANA, A. Sunscreen Factor Formulation and Test of Gel Preparations of 70% Ethanol Extract on Arabica Coffee Leaf (*Coffea arabica* L.). In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2022.

FENNER, J.; CLARK, R.A.F. Anatomy, physiology, histology, and immunohistochemistry of human skin. **Skin tissue engineering and regenerative medicine**, v. 1, p.1-17, 2016.

FERREIRA NETO, P.T.P.; SANTOS, T.R.; TELLIS, C.J.M. Desenvolvimento de novos derivados de plantas medicinais para doenças negligenciadas: uma análise bibliométrica. **Revista Fitos**, v.2, p.267-292, 2022.

FERREIRA, M.S.; MAGALHÃES, M.C.; OLIVEIRA, R.; SOUSA-LOBO, J.M.; ALMEIDA, I. F. Trends in the use of botanicals in anti-aging cosmetics. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3584, 2021.

FERREIRA, V.T.P.; INFANTE, V.H.P.; FELIPPIM, E.C.; CAMPOS, P.M.B.G.M. Application of Factorial Design and Rheology to the Development of Photoprotective Formulations. **AAPS PharmSciTech**, v.21, n.2, 42, 2020.

FLORENCE, A.T. **Princípios físico-químico em farmácia**. 2. ed. São Paulo: pharmabooks, 2011. 690p.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; JUNIOR, A. A. S.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsão e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** v.41, n.3, p.302-313, 2005.

FRANGE, R.C.C.; GARCIA, M.T.J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 263-271, 2009.

FRANZOL, A. **Correlação entre reologia e textura de emulsões para predição de desempenho sensorial pelo uso de redes neurais**. 2021. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Materiais). Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil. 2021.

FURMAN, A.C.; VEIT, M.T.; PALÁCIO, S.M.; GONÇALVES, G.C.; BARBIERI, J.C.Z. Sustainability in the production process of the cosmetic industry: a literature review. **Research, Society and Development**, v.11, n.13, e586111335852, 2022.

GADELHA, R.L.; PAIVA, D.L.M.; GAYOSO, C.W. Radiofrequência pulsada para flacidez periorbitária: estudo comparativo. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 10, n. 2, p. 140-146, 2018. <https://doi.org/10.5935/scd1984-8773.20181021190>

GILBERT, L., PICARD, C., SAVARY, G., & GRISEL, M. (Rheological and textural characterization of cosmetic emulsions containing natural and synthetic polymers: relationships between both data. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 421, 150-163, 2013.

GU, Y.; ZHENG, J.; FENG, J.; CAO, M.; GAO, W.; QUAN, Y.; DANG, Y.; WANG, Y.; WANG, S.; SONG, C. Improvement of levan production in *Bacillus amyloliquefaciens* through metabolic optimization of regulatory elements. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.101, p.4163-4174, 2017.

HELENAS, J. K.; BERSANETI, G.T.; SILVA, R.T.D.; BIGOTTO, B.G., LONNI, A.A.S.G.; BORSATO, D.; BALDO, C.; CELLIGOI, M.A.P.C. Development of Facial Cosmetic Formulations Using Microbial Levan in Association with Plant-Derived Compounds Using Simple Lattice Design. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 66, p.e23220275, 2023.

HENRIQUE, A DA. S.; LOPES, G. C. A biodiversidade e a indústria de cosméticos: uso dos flavonoides contra o envelhecimento cutâneo. **Revista Uningá Review**, v. 29, n. 2, p.58-63, 2017.

HEMPHILL, T.; CAMPOS, W.; PILEHVARI, A. Yield-power law model more accurately predicts mud rheology. **Oil and Gas Journal**, v. 91, n. 34, 1993.

HILDA, D.; ARINI, A.; NANCY, C.D. Formulation of body scrub cream from extract of arabika green coffee (*Coffea arabica* L.) as antioxidant. In: **4th International Conference on Sustainable Innovation 2020–Health Science and Nursing (ICoSIHSN 2020)**. Atlantis Press, 2021. p. 337-342.

HUANG, N. Rheological Characterization of Pharmaceutical and Cosmetic Formulations for Cutaneous Applications. **Current Pharmaceutical Design**, v.25, n.21, p. 2349-2363, 2019.

ICO. **International Coffee Agreement**. 2007. Disponível em: <<http://www.ico.org/documents/ica2007e.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2020.

INFANTE, V.H.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Application of a Reflectance Confocal Microscopy Imaging Analysis Score for the Evaluation of Non-Melanogenic Changes

in Male Photoaged Skin. **Photochemistry and Photobiology**, v.99, n.3, p.993-1002, 2022.

ISAAC, V.; CHIARI, B.G.; MAGNANI, C.; CORRÊA, M.A. Análise sensorial como ferramenta útil no desenvolvimento de cosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p.479-488, 2012.

JANISSEN, B.; HUYNH, T. Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. **Resources, Conservation and recycling**, v. 128, p. 110-117, 2018.

JESZKA-SKOWRON, M.; SENTKOWSKA, A.; PYRZYŃSKA, K.; DE PEÑA, M. P. Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: influence of green coffee bean preparation. **European Food Research and Technology**, v. 242, p. 1403-1409, 2016.

JONES, D.S.; BRUSCHI, M.L.; FREITAS, O.; GREMIÃO, M.P.D.; LARA, E.H.G.; ANDREWS, G.P. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, n. 1-2, p. 49-58, 2009.

JUNIOR, A.T.J. **Desenvolvimento de formas lipossomais contendo levana**. 2006. 87f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

KAISANGSRI, N.; SELAMASSAKUL, O.; SONKLIN, C.; LAOHAKUNJIT, N.; KERDCHOECHUEN, O.; RUNGRUANG, R. Phenolic compounds and biological activities of coffee extract for cosmetic product. **SEATUC journal of science and engineering**, v. 1, n. 1, p. 71-76, 2020.

KAMMEYER, A.; LUITEN, R. M. Oxidation events and skin aging. **Ageing research reviews**, v. 21, p. 16-29, 2015.

KHANTHAPOK, P.; SUKRONG, S. Anti-aging and health benefits from Thai food: Protective effects of bioactive compounds on the free radical theory of aging. **Journal Food Health Bioenviron Science**, v. 12, p. 54-67, 2019.

KIM, K.H.; CHUNG, C.B.; KIM, Y.H.; KIM, K.S.; HAN, C.S.; KIM, C.H. Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. **Journal of Cosmetic Science**, v.56, n.6, p.395-406, 2005.

KIRTEL, O.; MENÉNDEZ, C.; VERSLUYS, M.; VAN DEN ENDE, W.; HERNÁNDEZ, L.; TOKSOYÖNER, E. Levansucrase from *Halomonas smyrnensis* AAD6T: first halophilic GH-J clan enzyme recombinantly expressed, purified, and characterized. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.102, p.9207-9220, 2018.

KRAMBECK, K. **Desenvolvimento de Preparações Cosméticas contendo Vitamina C**. 2009.96 f. Dissertação (Mestrado) -Curso de Farmácia, Universidade do

Porto, Porto, 2009.

KÜÇÜKAŞIK, F.; KAZAK, H.; GUNAY, D.; FINORE, I.; POLI, A.; YENIGUN, O.; NICOLAUS, B. Molasses as fermentation substrate for levan production by *Halomonas* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.89, p.1729-1740, 2011.

LANGE, M.K.; HERBELE, G.; MILÃO, D. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de uma emulsão base não-iônica contendo resveratrol. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p.146-151, 2009

LIU, Q.; YU, S.; ZHANG, T.; JIANG, B.; MU, W. Efficient biosynthesis of levan from sucrose by a novel levansucrase from *Brenneria goodwinii*. **Carbohydrate Polymers**, v.157, p.1732-1740, 2017.

LOKKO, Y.; HEIJDE, M.; SCHEBESTA, K.; SCHOLTÈS, P.; VAN MONTAGU, M.; GIACCA, M. Biotechnology and the bioeconomy-Towards inclusive and sustainable industrial development. **New Biotechnology**, v. 40, p. 5-10, 2018.

Low, S. S., Lim, C. N., Yew, M., Chai, W. S., Low, L. E., Manickam, S., ... & Show, P. L. Recent ultrasound advancements for the manipulation of nanobiomaterials and nanoformulations for drug delivery. **Ultrasonics sonochemistry**, 80, 105805, 2021.

LU, L.; FU, F.; ZHAO, R.; JIN, L.; HE, C.; XU, L.; XIAO, M. A recombinant levansucrase from *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1 catalyzes versatile transfructosylation reactions. **Process Biochemistry**, v.49, n.9, p.1503-1510, 2014.

LUDWIG, I. A.; CLIFFORD, M. N.; LEAN, M. E.; ASHIHARA, H.; CROZIER, A. Coffee: biochemistry and potential impact on health. **Food & Function**, v.5, n.8, p.1695-1717, 2014.

MACHADO, J. C. V. **Reologia e escoamento de Fluidos**. Rio de Janeiro. 2002. 257p.

MAC-MARY, S.; SOLINIS, I. Z.; PREDINE, O.; SAINTHILLIER, JEAN-MARIE.; SLADEN, C.; BELL, M.; MAHONY, M.O. Identification of three key factors contributing to the aetiology of dark circles by clinical and instrumental assessments of the infraorbital region. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 12, n. 1, p. 919-929, 2019.

MCNAMEE, L.M.; CLEARY, E.G.; ZHANG, S.; SALIM U.; LEDLEY, F.D. Late-stage Product Development and Approvals by Biotechnology Companies After Initial Public Offering, 1997-2016. **Clinical Therapeutics**, v. 43, n. 1, p. 156-171, 2021.

MANGELA, T.P.A.; MARTINS, A.S.S. **Benefícios da vitamina C na pele**. **Enciclopédia Biosfera**, v.18 n.35; p. 41-55, 2021.

MARIOTTI, D.; FRASSON, A.P.Z. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de formulações cosméticas contendo extrato etanólico dos frutos de *Fragaria vesca* L.(morango). **Infarma**, v. 23, n. 3/4, p.37-43, 201.

MARTELLI, F.; NUNES, F.M.F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e cultura**, v. 66, n. 3, p. 54-57, 2014.

MASEK, A.; LATOS-BROZIO, M.; KAKUZNA-CZAPLINSKA, J.; ROSIAK, A.; CHRESLIJANSKA, E. Antioxidant properties of green coffee extract. **Forests**, v. 11, n. 5, p. 557, 2020.

MASMOUDI, H.; LE DRÉAU, Y.; PICCERELLE, P.; KISTER, J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, p. 117-131, 2005.

MELO, E.K.S.; CARVALHO, A.L.M.; BORBA, V.F.C.; SOUSA, G.D.; TABOSA, M.A.M.; LEAL, L.B. Análise e estudo viscosimétrico de diferentes géis de cetoprofeno 2,5%. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 95-99, 2013.

MELO, C.A.S.; DOMINGUES, R.J.S; LIMA A. B. **Elaboração de géis e análise de estabilidade de medicamentos**. Belém: EDUEPA, 2018. 51p.

MENAA, F. Emulsions Systems for Skin Care: From Macro to Nano-Formulations. **Journal of Pharmaceutical Care & Health Systems**, v. 1, n. 2, p. 1-2, 2014.

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

MUNTEANU, I. G.; APETREI, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity : A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n.7, p.1-30, 2021.

NG, K.W.; LAU, W.M. Skin deep: the basics of human skin structure and drug penetration. **Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement: drug manipulation strategies and vehicle effects**, p. 3-11, 2015.

NI, D.; XU, W.; BAI, Y.; ZHANG, W.; ZHANG, T.; MU, W. Biosynthesis of levan from sucrose using a thermostable levansucrase from *Lactobacillus reuteri* LTH5448. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.113, p.29-37, 2018.

O PEROBAL. **Startup lança hidratante antioxidante e rejuvenescedor com apelo sustentável**. 2020. Disponível em: <https://operobal.uel.br/pesquisas/2020/10/09/startupdauehidratantesustentavel/>. Acesso em: 20 dez. 2023.

ONER, E. T.; HERNÁNDEZ, L.; COMBIE, J. Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. **Biotechnology Advances**, v.34, p.827-844, 2016.

PACHECO, D.L.; LOBO, L.C. Antioxidantes utilizados para combater o Envelhecimento Cutâneo. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 9, p. 342-356, 2021.

PARRADO, C.; MERCADO-SAENZ, S.; PEREZ-DAVO, A.; GILABERTE, Y.; GONZALEZ, S.; JUARRANZ, A. Environmental stressors on skin aging. Mechanistic insights. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 759, 2019. 10.3389/fphar.2019.00759

PEREIRA, L. L. GUARÇONI, R.C.; PINHEIRO, P.F.; OSÓRIO, V.M.; PINHEIRO, C.A.; MOREIRA, T.R.; CATEN, C.S. New propositions about coffee wet processing: Chemical and sensory perspectives. **Food Chemistry**, v. 310, p. 125943, 2020.

PEREIRA SANTOS, F.D.R.; BELFORT SANTOS, M.G.; BRASIL LUCENA, V.; BARROS VIANA, M.; DE ARAÚJO PEREIRA DE CASTRO, A. Uso do óleo de coco babaçu (*Attalea speciosa*) como emoliente em formulação fitocósmica com ação hidratante. **Revista Cereus**, v.12, n.4, p.2-13, 2020.

PERES, F.B.; UEMURA, L.C.; ZANGHETTIN, L. Análise de processos e insumos na fabricação de cosméticos naturais. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v.7.n.12, p.425-439, 2021.

PERUGINI, P.; BLEVE, M.; REDONDI, R.; CORTINOVIS, F.; COLPANI, A. In vivo evaluation of the effectiveness of biocellulose facial masks as active delivery systems to skin. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.19, n.3, p. 725-735, 2020.

PONTES, E.A.S.; OLIVEIRA, E.G.; SILVA, B.H.M. Análise gráfica do comportamento de diversas sequências numéricas através de suas equações matemáticas de regressão: um processo de ensino e aprendizagem de matemática em um ambiente computacional. **Revista Ibero-Americana De Humanidades, Ciências e Educação**, v.7, n.12, p.951-966, 2021.

POY, D.; TEHRANI, K. **The effect of medicinal plants as cosmetics: Anti-Puff Eye cream**. 2017. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Donya-Poy/publication/351117756\\_The\\_effect\\_of\\_medicinal\\_plants\\_as\\_cosmetics\\_Anti-Puff\\_Eye\\_cream/links/60886850881fa114b431a874/The-effect-of-medicinal-plants-as-cosmetics-Anti-Puff-Eye-cream.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Donya-Poy/publication/351117756_The_effect_of_medicinal_plants_as_cosmetics_Anti-Puff_Eye_cream/links/60886850881fa114b431a874/The-effect-of-medicinal-plants-as-cosmetics-Anti-Puff-Eye-cream.pdf). Acesso em: 04 dez. 2023.

PRATIWI, L. Coffea: The Application of green Components in Cosmetics Formulation. **Majalah Obat Tradisional**, v. 26, n. 3, p. 174-187, 2021.

R CORE TEAM, R. **A language and environment for statistical computing**. Foundation for Statistical Computing. Disponível em :<http://www.r-project.org>. Acesso em: 04.dez.2023

RADCHENKOVA, N.; PANCHEV, I.; VASSILEV, S.; KUNCHEVA, M. DOBREVA, S.; KAMBOUROVA, M. Continuous cultivation of a thermophilic bacterium *Aeribacillus*

*pallidus* 418 for production of an exopolysaccharide applicable in cosmetic creams. **Journal of Applied Microbiology**, v.119, p.1301-1309, 2015.

RANGEL, R.L.G. A importância da hidratação cutânea para melhor tratamento das disfunções estéticas. **Revista de Empreendedorismo e Gestão de Micro e Pequenas Empresas**, v.6, n.1, p.165-179, 2021.

RINNERTHALER, M.; BISCHOF, J.; STREUBEL, M. K.; TROST, A.; RICHTER, K. Oxidative stress in aging human skin. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 545-589, 2015.

RITTIÉ, L.; FISHER, G.J. Natural and sun-induced aging of human skin. **Cold spring harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 1, a015370, 2015.

SACUTE, Y.N. **Análise do padrão de consumo concernente aos modelos de negócio sustentáveis produtores de cosméticos**. Disponível em:<[https://monografias.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/9012/1/AnaliseDoPadraodeConsumo\\_Sacute\\_2019.pdf](https://monografias.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/9012/1/AnaliseDoPadraodeConsumo_Sacute_2019.pdf)>. Acesso em 24 out. 2019.

SANTOS, A.C.F., KALSCHNE, D.L.; VIEGAS, M.C.; VANINI, L.S.; TOLEDO BENASSI, M.; LONNI, A.A.S.G. Desenvolvimento de uma formulação cosmeceútica para região dos olhos com extrato padronizado de café verde. **Visão Acadêmica**, v. 18, n. 3, p.18-34, 2017.

SANTOS, F.D.R.P.; SANTOS, M.G.B.; LUCENA, V.B.; CHAVES, J.A. Características físico-químicas de um sérum desenvolvido à base do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) para pele idosa. **Revista Enfermagem Atual In Derme**, v.95, n.33, 95(33), p.1-15, 2021.

SANTOS, L. F.; CAVALCANTI, O. A.; CELLIGOI, M. A. C. Produção e aplicação de polissacarídeos: um enfoque na levana e os potenciais dispositivos. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.4, p.254-270, 2011.

SANTOS-SÁNCHEZ, N.F.; SALES-CORONADO, R.; VILLANUEVA-CAÑONGO, C.; HERNÁNDEZ-CARLONS, B. Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. **Antioxidants**, v. 10, p.1-29, 2019.

SAVATOVIĆ, S. M.; CETKOVIC, G. S.; CANADANOVIC-BRUNET, J. M.; DJILAS, S. M. Kinetic behaviour of the DPPH radical-scavenging activity of tomato waste extracts. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 77, n. 10, p. 1381-1389, 2012.

SCHIKOWSKI, T.; HÜLS, A. Air pollution and skin aging. **Current environmental health reports**, v. 7, p. 58-64, 2020.

SHIH, I.L.; YU, Y.T. Simultaneous and selective production of levana and poly (gamma-glutamic acid) by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, v.27, p.103-106, 2005.

SHIROMA, P. H. **Estudo do comportamento reológico de suspensões aquosas de bentonita e cmc: influência da concentração do NaCl**. 2012. 130 f. Dissertação (Mestre em Engenharia), Universidade de São Paulo, São Paulo. 2012.

SILVA, F.V.F.; SANTOS, M.C.; NEIVA, L.D.B.; OLIVEIRA, M.A.C.; LEAL, B.S.; MOREIRA, F.S.A.; SANTOS, P.N.; CAVALVANTE, G.L.; SOUSA, J.P.S.; NETO, M.P.L. Desenvolvimento e controle de qualidade de um gel-creme antiacneico a base do óleo da *Copaífera officinalis* L (copaíba). **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v.30, p.1-10, 2019.

SILVA, R.T.; BERSANETI, G.T.; CHIDEROLI, R.T.; PEREIRA, U.P.; LONNI, A.A.S. BIGOTTO, B.G. Propriedades biológicas da levana de *Bacillus subtilis* natto e do óleo essencial de canela para aplicação em formulações cosmeceúticas. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.5, p.23009-23024, 2020.

SILVA, R.K.; MUNIZ, B.V.; BERGAMO, T.T.F. Os efeitos do plasma rico em plaquetas (prp) no rejuvenescimento cutâneo facial. **Revista Científica Eletrônica de Ciências Aplicadas da FAIT**, n.1, p.1-14, 2021.

SILVA, R.T.; BERSANETI, G.; BIGOTTO, B.G.; SILVEIRA, V.A.I.; LONNI, A. A.S.G, BORSATO, D.; CELLIGOI, M.A.P Development of a facial biocosmetic containing levan, almond and cinnamon oils with antioxidant and moisturizing properties. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 44, p. e58869-e58869, 2022.

SILVA, R.T.; BERSANETI, G.T.; LONNI, A.A.S.G.; CELLIGOI, M.A.P. Produção de levana e sua aplicação em cosméticos. *In*: DE OLIVEIRA JUNIOR, José Max Barbosa. **A produção do conhecimento nas ciências biológicas**. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. p. 22-35.

SIQUEIRA, J.C. **Avaliação da estabilidade de uma emulsão cosmética cold cream contendo diferentes tipos de ceras**. 2016. 27 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). Curso de Química Industrial, Centro Universitário Univates, Lajeado, 2016.

SPELLMEIER, F. **Estudo comparativo entre dois métodos de produção de bases emulsionadas através da estabilidade acelerada**. 2005. 98 f. Monografia (Graduação) – Curso de Farmácia, Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2005.

SRIKANTH, R.; SRIKANTH, R.; SIDDARTHA, G.; SUNDHAR REDDY ,C. H., HARISH B S.; JANAKI RAMAIAH, M.; UPPULURI, K. B. Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. **Carbohydrate Polymers**, v. 2123, n. 1, p.8-16, 2015.

TALBERT, L.; KAU, C.H.; CHRISTOU, T.; VLACHOS, C.; SOUCCAR, N. A 3D analysis of Caucasian and African American facial morphologies in a US population. **Journal Of Orthodontics**, v. 41, n. 1, p. 19-29, 2014.

TAN, P.L.; RAJAGOPAL, M.; CHINNAPPAN, S.; SELVARAJA, M.; LEONG, M.Y.; TAN, L.F.; YAP, V.L. Formulation and physicochemical evaluation of Green Cosmeceutical Herbal face cream containing standardized Mangosteen Peel Extract. **Cosmetics**, v.9, n.3, p.46, 2022.

TAYLOR, M. E. A. K. M. G. **Aulton Delineamento de formas farmacêuticas**. 4. ed.

Brasil: elsevier, 2016. 836p.

TOBIN, D.J. Introduction to skin aging. **Journal of Tissue Viability**, v.26, n.1, p.37-46, 2017.

TOMULESCU, C.; STOICA, R.; SEVCENCO, C.; CĂȘĂRICĂ, A.; MOSCOVICI, M.; VAMANU, A. LEVAN - A MINI REVIEW. Scientific Bulletin. Series F. **Biotechnologies**, v.20, p.309-317, 2016.

TUNGADI, R.; PAKAYA, M.S.; ALI, P.D.A. Formulasi dan evaluasi stabilitas fisik sediaan krim senyawa astaxanthin. **Indonesian Journal of Pharmaceutical Education**, v.3, n.1, p.117-24, 2023.

VARARUNGZARIT, A.; TEERAKULKITTIPONG, N.; ARTTAWEJKUL, P.; JANGIAM, W. Efficacy and Safety of a Body Skincare Product Containing Levan. **The Journal of Prapokkiao Hospital Clinical Medical Education Center**, v. 38, n. 4, p. 390-399, 2021.

VASCONCELOS, S.C.B.; NASCENTE, F.M.; SOUZA, C. M. D.; SOBRINHO, H.M.R. O uso do ácido hialurônico no rejuvenescimento facial. **Revista Brasileira Militar de Ciências**, v. 6, n. 14, p.1-8, 2020.

VATS, A. Pharmacological properties of green coffee: a review. **The Pharma Innovation Journal**, v. 11, n. 7, p. 2970-2976, 2022.

VEDANA, J.A.V.; DE OLIVEIRA, C.F.; DE PAULA, D. Validação de ambiente virtual de aprendizagem aplicado à formulação de cremes e loções. **Peer Review**, v.6, n.2, p. 377-396, 2024.

VIEIRA, L.C.G. **Características fitoquímicas e propriedades antioxidantes do grão de café verde**. 2015. 53f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Brasil, 2015.

VIGNOLI, J.A.; BASSOLI, D.G.; BENASSI, M.T. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 863-868, 2011.

VIGNOLI, J.A.; VIEGAS, M.C.; BASSOLI, D.G.; BENASSI, M.T. Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and conilon coffees. **Food Research International**, v. 61, p. 279- 285, 2014.

VIIKARI, L., GISLER, R. By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas strains*. **Applied Microbiol Biotechnology**, v. 23, p. 240-244, 1986.

VILEFORT, L.A.; FERREIRA, T.R.; MENANDRO, L.G.B.; REZENDE, R.P.A.; GALVÃO, K.J.C.L.; RICARDONI, F.M.; BISPO, K.S.; MACIEL, R.A.L.H.; PRADO, K.F.; LOBATO, M.S. Abordagem geral sobre a blefaroplastia. **Revista Eletrônica Acervo Científico**, v.44, p.1-7, 2023.

VOGEL, E. M. **Avaliação da qualidade de cosméticos com ativo cafeína em bases galênicas gel e creme elaborados por farmácias magistrais na cidade de Campo Mourão – PR.** 2019. 168 f. Dissertação (Mestrado em Inovações Tecnológicas) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

VOYTENA, A. P. L. **Caracterização do perfil químico e avaliação de segurança e eficácia in vitro do óleo de café (*Coffea arabica* L.) visando aplicação cosmética.** 2017. 121f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2017.

WASILEWSKI, T.; SEWERYN, A.; PANNERT, D.; KIERUL, K.; KEDZIA, M.D.; BARAN, Z.H.; LUKASZEWICZ, M.; LEWINSKA, A. Application of Levan-rich digestate extract in the production of safe-to-use and functional natural body wash cosmetics. **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 2793, 2022.

WOLLINA, U.; WETZKER, R.; NASER, M.B.A.; KRUGLIKOV, I.L. Role of adipose tissue in facial aging. **Clinical interventions in aging**, p. 2069-2076, 2017.

WONG, R.; GEYER, S.; WENINGER, W.; GUIMBERTEAU, J.C.; WONG, J.K. The dynamic anatomy and patterning of skin. **Experimental dermatology**, v. 25, n. 2, p. 92-98, 2016.

WU, F.-C.; CHOU, S.-Z.; SHIH, I.-L. Factors affecting the production and molecular weight of levan of *Bacillus subtilis* natto in batch and fed-batch culture in fermenter. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.44, p.846-853, 2013.

YADAV, N.; PARVEEN, S.; CHAKRAVARTY, S.; BANERJEE, M. Skin anatomy and morphology. **Skin Aging & Cancer: Ambient UV-R Exposure**, p. 1-10, 2019.

YOUSEF, H.; ALHAJJ, M.; SHARMA, S. **Anatomy, skin (integument), epidermis.** NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2017. 8p.

ZHANG, S.; DUAN, E. Fighting against skin aging: the way from bench to bedside. **Cell transplantation**, v. 27, n. 5, p. 729-738, 2018.

ZHANG, T.; GUO, Q.; XIN, Y.; LIU, Y. Comprehensive review in moisture retention mechanism of polysaccharides from algae, plants, bacteria and fungus. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 1 - 22, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104163>

ZHANG, T.; LI, R.; QIAN, H.; MU, W.; MIAO, M.; JIANG, B. Biosynthesis of levan by levansucrase from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002. **Carbohydrate Polymers**, v.101, p.975-981, 2014.

ZHANG, Z.; WANG, X.; HAN, Z.; ZHAO, M.; YIN, L. Purification, antioxidant and moisture-preserving activities of polysaccharides from papaya. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2332-2337, 2012.

ZHAO, L.; FAN, F.; WANG, P.; JIANG, X. Culture medium optimization of a new bacterial extracellular polysaccharide with excellent moisture retention activity. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, p. 2841-2850, 2013.

Zsikó, S., Csányi, E., Kovács, A., Budai-Szűcs, M., Gácsi, A., & Berkó, S. Methods to evaluate skin penetration in vitro. *Scientia Pharmaceutica*, 87(3), 19, 2019.

ZUCCO, A.; SOUSA, F.S.; ROMEIRO, M.C. Cosméticos naturais: uma opção de inovação sustentável nas empresas. **Brazilian Journals of Business**, v.2, n.3, p.2684-2701, 2020.

## ANEXOS



# CERTIFICATE

Seven Publicações Ltda hereby declares that the article **Eyes as a mirror of the soul**, by Ana Carolina Tribulato Polvani, Briani Gisele Bigotto, Natalia Rodrigues de Oliveira, Mariana Arrevolti, Leticia Falcai Ferrante, Fernanda Belincanta Borghi Pangoni, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi and Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni, was PUBLISHED in an individual chapter of the book, theme: Harmony of Knowledge: Exploring Interdisciplinary Synergie, under registration number ISBN: 978-65-84976- 83-2.

**Publication link:** <https://sevenpublicacoes.com.br/index.php/editora/article/view/3221>  
**DOI:** 10.56238/sevenced2023.006-071

Finally, I sign this declaration.

São José dos Pinhais, Brazil, December 19, 2023.

  
**Nathan Albano Valente**  
WRITING EDITOR

  
ISBN: 978-65-84976-83-2  
9 786584 976832

Seven Publicações Ltda. CNPJ: 43.789.355/0001-14 Tv. Ferdinando Aristides Moleta - Monsão Para, São José dos Pinhais - PR, 83045-090