

Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of green coffee oil in cosmetic formulations

*Avaliação das actividades antioxidante e antimicrobiana do óleo de café verde
em formulações cosméticas*

**Tais A. L. Wagemaker^{1*}, Ana S. Fernandes^{2,3}, Patrícia Maia Campos¹,
Luís Monteiro Rodrigues^{2,4} & Patrícia Rijo^{2,3}**

¹ Faculty of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

² CBIOS – Universidade Lusófona's Research Center for Health Science and Technologies,
Campo Grande, 376, 1749-024, Lisboa, Portugal

³ Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences (iMed.UL), Faculdade de Farmácia,
Universidade de Lisboa

⁴ Dep.Pharmacological Sciences, Universidade de Lisboa, Faculty of Pharmacy Av. Prof. Gama Pinto, 1649-003
Lisboa, Portugal

Email: taisalw@uol.com.br

Abstract

Green coffee oil (GCO) and cosmetic formulations containing 2.5, 5, 10 and 15% of this oil were evaluated for in vitro antioxidant and antimicrobial activities. The oil and the formulations containing this oil showed low antioxidant activity evaluated by the DPPH method (42% of GCO was equivalent to 0.002% of BHT). No antimicrobial activity was found for GCO and formulations against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acnes* and *Candida albicans*, using the well diffusion method. Although GCO has been used for many years in cosmetic formulations, further studies are still needed to duly support the usefulness of GCO in skin healthcare and cosmetic products.

Keywords: Green coffee oil; *Coffea arabica*; cosmetic formulations; antimicrobial, antioxidant.

Resumo

O óleo de café verde (OCV) e formulações cosméticas que contendo 2,5, 5, 10 e 15% de óleo foram avaliados por métodos in vitro quanto às suas atividades antioxidante e antimicrobiana. O OCV e as suas formulações demonstraram baixa atividade antioxidante, avaliada pelo método DPPH (42% do OCV foi equivalente a 0,002% de BHT). Não se observou atividade antimicrobiana para o OCV e as suas formulações contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acnes* e *Candida albicans*, utilizando o método de difusão em poço. Embora o OCV seja utilizado há muitos anos em formulações cosméticas, ainda são necessários mais estudos para apoiar adequadamente a utilidade do óleo de café em produtos para cuidado da saúde da pele e em cosméticos.

Palavras-chave: óleo de café verde; *Coffea arabica*; formulações cosméticas; antioxidante; antimicrobiano.

Introduction

Green coffee oil (GCO) is extracted from *Coffea arabica* beans by mechanic pressure before roasting. It is composed of triacylglycerols (75%), unsaponifiable matter (13.54%) and wax (0.24%)⁽¹⁾. According to Wagemaker et al⁽¹⁾, the main fatty acids in GCO are linoleic and palmitic acids (46.3 and 30.2 g100 g⁻¹, respectively).

Due to its composition and balance of fatty acids⁽²⁾, there are many cosmetic products containing GCO among their ingredients. These products are usually used to improve skin conditions especially in the treatment for signs of ageing.

Velásquez Pereda et al⁽³⁾ demonstrated that GCO produced a concentration-dependent stimulation of the synthesis of collagen, elastin and glycosaminoglycans in human fibroblasts cell cultures incubated for 48 h with 3.12 to 50 mg/mL of GCO.

There are few studies *in vitro* and *in vivo* that have proved the efficacy of GCO formulations. Wagemaker et al⁽⁴⁾, using confocal microscopy reflectance, showed that formulations containing 10% of GCO could achieve the basal layer (76.5 µm). Accordingly, the forearm of volunteers submitted to a 2-hour application of this cosmetic formulation presented a reduced transepidermal water loss, when compared with the forearm of non-treated regions (control).

According to Bispo⁽⁵⁾ one of the challenges in developing anti-ageing products is to inhibit the oxidative damage caused by reactive oxygen species (ROS). ROS promote oxidation of nucleic acids, proteins and lipids and may damage cellular structures, including DNA⁽⁶⁾. In skin, oxidative damage leads to melanocytic overproduction of melanosomes and to weakened elastin and collagen⁽⁷⁾. According to Fernandes et al⁽⁸⁾, the use of exogenous compounds to remove excessive ROS may provide a promising strategy to prevent and treat a variety of diseases and intoxication conditions.

Chiller et al⁽⁹⁾ reported many bacteria and skin diseases associated to these. Among these bacteria *Staphylococcus aureus* is the most common cause of cutaneous and systemic infections and *S. epidermidis* is part of skin flora and affects acne vulgaris pores. *Pseudomonas aeruginosa* is not typically resident in skin microflora but may also cause cutaneous infections.

The new generation of cosmetics is known for the multifunctionality of its products, i.e., cosmetic products should have more than one benefit. Thus the antioxidant and the antimicrobial activities are desired properties in cosmetic ingredients. In this context, this study aimed to evaluate the antioxidant and antimicrobial activities of GCO and cosmetic formulations containing increasing amounts of this oil.

Introdução

O óleo de café verde (OCV) é extraído a partir de grãos sem torrefação de *Coffea arabica* por pressão mecânica. Este é constituído por triacilgliceróis (75%), matéria insaponificável (13,54%) e ceras (0,24%)⁽¹⁾. De acordo com Wagemaker et al⁽¹⁾, os principais ácidos gordos de OCV são o ácido linoleico e o ácido palmítico (46,3 e 30,2 g100 g⁻¹, respectivamente).

Devido à sua composição e equilíbrio em ácidos gordos⁽²⁾, existem muitos produtos cosméticos que contêm OCV entre os seus ingredientes. Na maioria das vezes, estes produtos são utilizados para melhorar as condições da pele, especialmente para tratamento dos sinais de envelhecimento.

Velásquez Pereda et al⁽³⁾ demonstraram que há uma estimulação na síntese de colagénio, elastina e glicosaminoglicanos produzida pela aplicação de concentrações crescentes de OCV em culturas de fibroblastos humanos de células incubadas durante 48 horas com 3,12-50 mg / mL deste óleo.

Existem poucos estudos *in vitro* e *in vivo* que comprovem a eficácia de formulações cosméticas que contêm OCV. Wagemaker et al⁽⁴⁾, utilizando microscopia confocal de reflectância, demonstraram que formulações contendo 10% de OCV conseguem alcançar a camada basal (76,5 µm). Deste modo, o antebraço de voluntários submetidos a uma aplicação de 2 horas desta formulação cosmética apresentaram uma reduzida perda de água transepidermica, quando comparada com a região do antebraço não tratada (controlo).

De acordo com Bispo et al⁽⁵⁾ um dos maiores desafios no desenvolvimento de produtos anti-envelhecimento é inibir as lesões oxidativas causadas por espécies reativas de oxigénio (EROs). Os EROs promovem a oxidação de ácidos nucléicos, proteínas e lípidos e podem danificar estruturas celulares, incluindo o DNA⁽⁶⁾. Na pele, as lesões oxidativas levam à sobreprodução de melanosomas pelos melanócitos e ao enfraquecimento da elastina e do colagénio⁽⁷⁾. De acordo com Fernandes et al⁽⁸⁾, a utilização de compostos exógenos para remover o excesso de EROs pode constituir uma estratégia promissora para a prevenção e tratamento de uma variedade de doenças e condições de intoxicação.

Chiller et al⁽⁹⁾ reportaram diversas bactérias associadas a patologias cutâneas. Entre estas bactérias *Staphylococcus aureus* é a causa mais comum de infecções cutâneas e sistémicas e *S. epidermidis* faz parte da flora da pele e está relacionada com o acne. A *Pseudomonas aeruginosa* não é uma bactéria normalmente residente na microflora da pele, mas também pode causar infecções cutâneas.

A nova geração de cosméticos é conhecida pela multifuncionalidade dos seus produtos, ou seja, os produtos cosméticos devem apresentar mais de um benefício. Assim, as atividades antioxidante e antimicrobiana são propriedades desejadas nos ingredientes cosméticos. Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar as atividades antioxidante e antimicrobiana de OCV e de formulações cosméticas contendo quantidades crescentes deste óleo.

Material and methods

Formulations

The formulations studied were composed of deionized water, cetearyl alcohol + cetareth-20 (Bernel), glycerin PA, methylidibromo glutaronitrile (Cosmotec), BHT and 2.5, (F2) 5.0 (F5), 10.0 (F10) or 15.0% (F15) of GCO (Melscreen coffee, Chemyunion).

Chemicals

Dimethyl sulphoxide (DMSO) 99.9% and methanol p.a. were purchased from Merck. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was obtained from Sigma-Aldrich.

Antioxidant activity assay

DPPH is a stable free radical that potentially reacts with the compounds able to donate H^+ . For the measurement of the radical scavenging activity, GCO (10-50% (v/v)) and respective cosmetic formulations (at final concentrations of 2, 4, 6 and 8 mg/mL) were added to DPPH 0.002% methanolic solutions. The reaction mixture was incubated for 30 min at room temperature. The absorbance was measured at 517 nm against a corresponding blank. The antioxidant activity was calculated as previously described by Falé et al.⁽¹⁰⁾: $AA\% = [(A_{DPPH} - A_{sample}) / A_{DPPH}] \times 100$, where AA is the antioxidant activity, A_{DPPH} is the absorption of the DPPH solution against the blank and A_{sample} is the absorption of the GCO/formulations against the blank. The tests were carried out in triplicate and the GCO concentration providing 50% of antioxidant activity (IC_{50}) was obtained by plotting the antioxidant activity against the GCO concentration⁽¹⁰⁾.

Antimicrobial activity assay

Microbial strains

Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Propionibacterium acnes* ATCC 6919, *Bacillus subtilis* ATCC 6633); Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853); and the yeast *Candida albicans* (ATCC 10231) were used as reference strains for the antimicrobial assays.

Material e métodos

Formulações

As formulações estudadas foram preparadas com água desionizada, álcool cetosteárico + cetareth-20 (Bernel), PA, metildibromo glutaronitrile (Cosmotec), BHT e 2,5 (F2), 5,0 (F5), 10,0 (F10) ou 15,0% (F15) de óleo de café verde (Melscreen Coffee, Chemyunion).

Produtos químicos

Dimetilsulfóxido (DMSO) 99,9% e metanol p.a. foram adquiridos à Merck. O 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) foi comprado à Sigma-Aldrich.

Ensaio de atividade antioxidante

O DPPH é um radical livre estável que, potencialmente, reage com os compostos capazes de doar H^+ . Para a avaliação da actividade sequestrante de radicais livres, o OCV (10-50% (v/v)) e respectivas formulações cosméticas (em concentrações finais de 2, 4, 6 e 8 mg /mL) foram adicionados a uma solução metanólica de DPPH a 0,002%. A mistura reaccional foi incubada durante 30 min. à temperatura ambiente. A absorvância foi medida a 517 nm contra o branco correspondente. A actividade antioxidante foi calculada como previamente descrito por Falé et al.⁽¹⁰⁾: $\% AA = [(A_{DPPH} - A_{sample}) / A_{DPPH}] \times 100$, em que AA é a actividade antioxidante, A_{DPPH} é a absorção da solução de DPPH contra o branco e A_{sample} é a absorção das formulações / óleo contra o branco. Os testes foram realizados em triplicado e a concentração de OCV responsável por 50% da actividade antioxidante (IC_{50}) foi obtida através da representação gráfica da actividade antioxidante contra a concentração de óleo.

Ensaio de atividade antimicrobiana

Estirpes microbianas

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

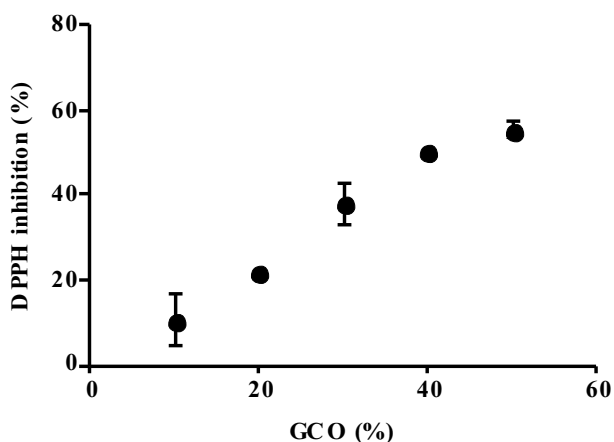
Well diffusion method

GCO and formulations were tested against six bacteria and one yeast strains by the well diffusion ⁽¹¹⁾. The Mueller-Hinton media (3 mm layer) was placed in petri dishes (8 cm diameter) and stocked (8° C). Seven equidistant cylinders were arranged on the Mueller-Hinton media surface. A 50 µL-volume of sample solution (20 mg/mL) was added to the cylinders using a micropipettor. Vancomycin, norfloxacin and amphotericin B (1 mg/mL) were used as positive controls against gram positive and gram negative bacteria and yeast, respectively; DMSO 100% was used as a negative control. The microbial plates were incubated at 37°C for 24 h. After incubation, the diameter inhibition zones were measured to an accuracy of 1 mm. All well diffusion tests were performed in three separate experiments and the antimicrobial activity was expressed as the mean of diameter inhibition zones (mm).

Results

Antioxidant activity assay

Antioxidant activity of GCO and formulations containing increasing concentrations of this oil was evaluated using the DPPH method. The results obtained for GCO are depicted in Fig. 1. The antioxidant activity of this oil ($IC_{50} = 42\%$ (v/v)) was much lower than that of the known synthetic standard BHT ($IC_{50} = 0.002\%$ (v/v) = 3 µg/mL), obtained under the same experimental conditions.



Método de difusão em poço

O OCV e as respectivas formulações foram testadas contra seis estirpes de bactérias e uma levedura pelo método de difusão em poço ⁽¹¹⁾. O meio de cultura Mueller-Hinton (3 mm de camada) foi colocado em placas de Petri (8 cm de diâmetro) armazenadas a 8 °C. Sete cilindros equidistantes foram dispostos na superfície do meio de Mueller-Hinton. Um volume de 50 µL de solução (20 mg/ml) foram adicionados aos cilindros usando uma micropipeta. Os poços (5 mm de diâmetro) com vancomicina (1 mg/mL), norfloxacin (1 mg/mL), e anfotericina B (1 mg/mL) foram utilizados como controlos positivos. DMSO 100% foi usado como controlo negativo. As placas microbianas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. Após a incubação, os halos de inibição de crescimento foram medidos com uma precisão de 1 mm. Todos os testes de difusão em poço foram feitos em três experiências independentes e a atividade antimicrobiana foi expressa como a média dos halos de inibição de crescimento (mm).

Resultados

Ensaio de atividade antioxidante

A atividade antioxidante do OCV e das formulações contendo concentrações crescentes deste óleo foi avaliada usando o método DPPH. Os resultados obtidos para o OCV são mostrados na Fig. 1. A atividade antioxidante deste óleo ($IC_{50} = 42\%$ (v/v)) foi bastante inferior à do antioxidante sintético BHT ($IC_{50} = 0,002\%$ = 3 mg/mL), obtida nas mesmas condições experimentais.

Figure 1- Concentration-response profile of GCO in terms of antioxidant activity, as evaluated by the DPPH assay.

Figura 1 - Curva concentração-resposta do óleo de café verde em termos de atividade antioxidante, avaliada pelo ensaio de DPPH.

The formulations containing GCO also showed low antioxidant activities (Fig. 2), although they were more effective than pure GCO. The results show that increasing concentrations of GCO in the formulations improved the antioxidant activity.

As formulações contendo OCV também demonstraram actividades antioxidantes baixas (Fig. 2), apesar de serem mais eficazes que o OCV puro. Os resultados obtidos mostram que o aumento da concentração de OCV nas formulações aumenta a actividade antioxidante.

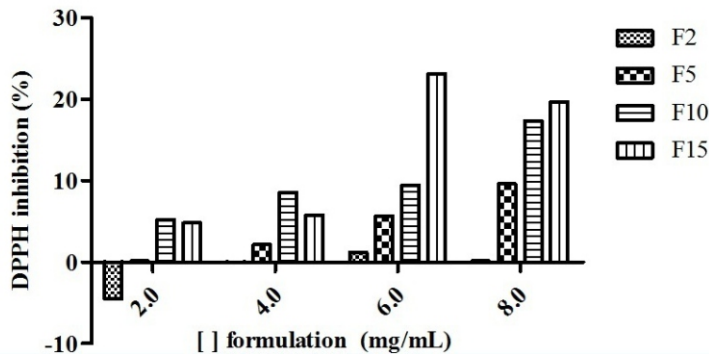


Figure 2 - Concentration-response profile of each formulation in terms of antioxidant activity, as evaluated by the DPPH assay.

Figura 2 - Curva de concentração-resposta de cada formulação, em termos de actividade antioxidante, tal como avaliado pelo ensaio de DPPH.

Antimicrobial activity assay

The inhibition diameter zone of the formulations, GCO and standard antibiotics (positive controls) are presented in Table 1 and in Fig. 3. Vancomycin (1 mg/mL) was used as a positive control against *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* and *P. acnes*; norfloxacin (1 mg/mL) for *E. coli* and *P. aeruginosa*, and amphotericin B (1 µL/mL) for *C. albicans*. None of the formulations nor the GCO presented antimicrobial activity compared to the negative control (DMSO).

Ensaio de actividade antimicrobiana

O halo de inibição de crescimento das formulações, do OCV e dos antibióticos padrão (controlo positivo) está apresentada na Tabela 1 e na Fig. 3. Para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* e *P. acnes* foi utilizada a vancomicina (1 mg/mL) como controlo positivo, para *E. coli* e *P. aeruginosa*, a norfloxacina (1 mg/mL) e a anfotericina B (10 µL/mL) foi utilizada para a *C. albicans*. Nem as formulações nem o OCV puro apresentaram actividade antimicrobiana em comparação com o controlo negativo (DMSO).

Table 1 - Antimicrobial activity of GCO and formulations at 20 mg/mL (n=3).

Tabela 1 - Actividade antimicrobiana do OCV e formulações a 20 mg/mL (n = 3).

	Bacteria						Yeast / Levedura
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. acnes</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
GCO / Óleo	-	-	-	-	-	-	-
*F	-	-	-	-	-	-	-
+ Control / Controlo	++	++	++	++	++	++	++

- : No antimicrobial activity, inhibition diameter zone = DMSO (negative control) = 5 mm.

Ausência de actividade antimicrobiana, halo de inibição de crescimento = DMSO (controlo negativo) = 5 mm.

+ + : Clear antimicrobial activity, inhibition diameter zone > 5 – 10 mm.

Actividade antimicrobiana, halo de inibição de crescimento > DMSO (controlo negativo) 5 - 10 mm

* F = formulations F2, F5, F10, and F15
formulações F2, F5, F10 e F15

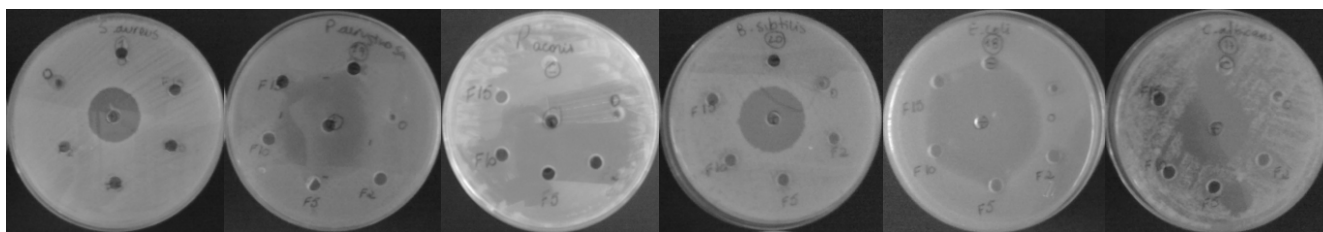


Figura 3 - Inhibition zone diameter of GCO and formulations for each microorganism tested.

Figura 3 - Halos de inibição de crescimento do OCV e formulações para cada microorganismo testado.

Discussion

In the present study, the antioxidant and antimicrobial activities of GCO and respective cosmetic formulations were studied.

Many different methodologies are available to assess antioxidant activity. Some of these techniques have been reported to evaluate the antioxidant potential of cold pressed seed oils like GCO⁽¹²⁾. Tuberoso et al⁽¹³⁾ evaluated the antioxidant potential of some edible oils (e.g. olive and soybean oils) using the DPPH radical scavenging assay. In addition, in a review about methodologies for evaluating the total antioxidant capacity of oils, Castelo-Branco and Torres⁽¹⁴⁾ highlighted the DPPH assay as the most used technique to determine the antioxidant capacity of edible oils. These authors also suggested that the majority of antioxidant capacity of some vegetable oils, like olive oil, is due to the large amount of phenolic compounds present in these oils. According to Dimitrios⁽¹⁵⁾, the nature of the antioxidants is not yet known but, due to their mode of preparation, these oils retain phenols present in the seed. Therefore, these oils may have potential uses in the promotion of health and prevention against oxidative damage mediated by ROS.

Tocopherols are present in edible plant oils, which have potent antioxidant properties⁽¹⁶⁾. These compounds can be found in GCO in mean amounts of 3.5 mg/100 g for α -tocopherol and 8.4 mg/100 g for β -tocopherol⁽¹⁷⁾.

In this study, GCO and respective formulations showed low antioxidant activity compared with BHT. These data can be justified since the majority of compounds present in GCO are fatty acids and triglycerides. Only 13% of GCO is composed of unsaponifiable matter, which contains small amounts of substances with known antioxidant activity such as tocopherol⁽¹⁸⁾.

Chlorogenic acids are other compounds present in coffee beans that were described as having high antioxidant activity⁽¹⁹⁾. However, these compounds are soluble in polar solvents and thus they are not present in coffee oil.

Discussão

No presente estudo, as atividades antioxidantes e antimicrobianas do OCV e respectivas formulações cosméticas foram estudadas. Muitos métodos estão disponíveis para avaliar a atividade antioxidante. Algumas destas técnicas têm sido indicadas para avaliar o potencial antioxidante dos óleos extraídos de sementes por prensagem a frio, como OCV⁽¹²⁾. Tuberoso et al⁽¹³⁾ avaliaram o potencial antioxidante de alguns óleos comestíveis (por exemplo, azeite e óleo de soja), utilizando o ensaio DPPH. Além disso, numa revisão sobre as metodologias para avaliar a capacidade antioxidante total de óleos, Castelo-Branco e Torres⁽¹⁴⁾ apontaram o ensaio DPPH como a técnica mais usada para determinar a capacidade antioxidante de óleos comestíveis. Estes autores também sugerem que a maior parte da capacidade antioxidante de alguns óleos vegetais, como o azeite, é devida à grande quantidade de compostos fenólicos presentes nestes óleos. De acordo com Dimitrios⁽¹⁵⁾, a natureza dos antioxidantes ainda não é bem conhecida mas, devido ao seu modo de preparação, estes óleos podem preservar os fenóis presentes na semente. Portanto, estes óleos podem ter potenciais aplicações na promoção da saúde e prevenção contra lesões oxidativas mediadas pelas EROs.

Os tocoferóis estão presentes em óleos vegetais comestíveis e apresentam propriedades antioxidantes⁽¹⁶⁾. Estes compostos podem ser encontrados no óleo de café em quantidades médias de 3,5 mg/100 g de α -tocopherol e de 8,4 mg/100 g de β -tocopherol⁽¹⁷⁾.

Neste estudo, o OCV e respectivas formulações mostraram atividade antioxidante baixa comparada com a atividade do BHT. Estes dados podem justificar-se pelo fato da maioria dos compostos presentes no óleo de café verde serem ácidos gordos e triglicéridos. Apenas 13% deste óleo é constituído por matéria insaponificável, a qual contém pequenas quantidades de substâncias com atividade antioxidante conhecida como o tocoferol⁽¹⁸⁾.

Os ácidos clorogénicos são outros compostos presentes

The formulations under study contain 0.05% of BHT, which was used as a preservative. This fact can explain why cosmetic formulations showed better antioxidant activity than pure GCO. However, it is necessary to highlight that increasing amounts of GCO caused increasing antioxidant activity (Fig. 2).

Besides antioxidant properties, the antimicrobial activity of cosmetic ingredients could be a desired property to enhance the preservation of a given formulation. Therefore, we studied the antimicrobial activity of GCO and cosmetic formulations containing this oil using the well diffusion method. A plethora of representative microorganisms was studied, including a yeast, gram-positive and gram-negative bacteria. It is important to mention that the present study included *S. aureus* and *S. epidermidis*, due to the relevance of these bacteria in skin conditions⁽²⁰⁾.

There are only few microbiology studies with coffee or its isolated compounds. Rahua et al⁽²¹⁾ studied the antifungal and antibacterial effects of caffeic acid, a common phenolic compound that can be found in coffee beans. They found neither antibacterial nor antifungal effects for this compound. In this study, GCO and respective formulations did not show activity against the bacteria and the yeast tested. It is necessary to highlight that the composition of green coffee oil is not favorable to microbial inhibition, since the main compounds in GCO are triacylglycerols⁽¹⁸⁾.

However, a significant part of GCO is composed of unsaponifiable matter. This contains, as its main compounds, diterpenes that have anti-angiogenic and anti-inflammatory properties⁽²²⁾ and can induce apoptosis in cancer cells⁽²³⁾. Further studies are still necessary to identify other biological activities of these compounds.

Conclusion

In the present study, pure GCO and cosmetic formulations of this oil presented low antioxidant activity, as evaluated by the DPPH scavenging assay. However, increasing concentrations of GCO in the formulations improved the total antioxidant activity. No antimicrobial properties were observed for GCO and respective formulations. Further studies should be carried out in order to unravel the potential properties

nos grãos de café que são descritos como tendo elevada actividade antioxidante⁽¹⁹⁾. No entanto, estes compostos são solúveis em solventes polares e, portanto, não estão presentes no óleo do café.

As formulações em estudo contêm 0,05% de BHT, o qual foi usado como conservante. Este fato pode explicar a melhor atividade antioxidante das formulações cosméticas em relação ao óleo de café puro. No entanto, é necessário salientar que quantidades crescentes de OCV causaram um aumento da actividade antioxidante (Fig. 2).

Além de propriedades antioxidantes, a actividade antimicrobiana dos ingredientes cosméticos pode ser uma propriedade desejada para melhorar a conservação de uma dada formulação. Portanto, foi estudada a actividade antimicrobiana do OCV e de formulações cosméticas contendo este óleo utilizando o método de difusão em poço.

Foi estudado um painel de microrganismos representativos, incluindo uma levedura, bactérias Gram positivas e Gram negativas. É importante mencionar que o estudo incluiu o *S. aureus* e *S. epidermidis*, devido à relevância dessas bactérias em doenças de pele⁽²⁰⁾.

Há poucos estudos de microbiologia com café ou seus compostos isolados. Rahua et al⁽²¹⁾ estudaram os efeitos antifúngico e antibacteriano do ácido cafeico, um composto fenólico comum que pode ser encontrado nos grãos de café. Eles não encontraram efeitos antibacterianos nem antifúngicos para este composto.

No presente estudo, o OCV e respectivas formulações não mostraram actividade contra as bactérias e a levedura testadas. É necessário salientar que a composição do OCV não é favorável para a inibição microbiana, uma vez que os compostos majoritários deste óleo são triacilgliceróis⁽¹⁸⁾.

No entanto, uma parte significativa do OCV é constituída por matéria insaponificável que contém compostos diterpénicos como principais compostos, os quais apresentam propriedades anti-angiogénicas e anti-inflamatórias⁽²²⁾, e podem induzir a apoptose em células tumorais⁽²³⁾. Assim, mais estudos são necessários para identificar outras actividades biológicas destes compostos.

Conclusão

No presente estudo, o OCV puro e formulações cosméticas contendo este óleo apresentaram baixa actividade antioxidante, como avaliado pelo ensaio DPPH. No entanto, concentrações crescentes deste óleo nas formulações melhoraram a actividade antioxidante total. Não foram observadas propriedades antimicrobianas para formulações e nem para o óleo de café puro. Estudos adicionais devem ser realizados, a

of GCO, therefore supporting the use of this ingredient in cosmetic products.

Acknowledgment

The authors thank FAPESP for granting financial support for this study.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no financial or personal relationship that can be understood as representing a potential conflict of interest.

References / Referências

- [1].Wagemaker TAL, Carvalho, CRL, Maia NB, Guerreiro Filho O. Sun protection factor, content and composition of lipid fraction of green coffee beans. *Ind Crop Prducts* 2011; 33: 469-473.
- [2].Alvarez AMR, Rodriguez MLG. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. *Grasas Aceites* 2000; 51: 74-96.
- [3].Velásquez Pereda MDC, Dieamant GC, Eberlin S, Nogueira C, Colombi D, Stasi LCD, Queiroz MLS. Effect of green *Coffea arabica* L. seed oil on extracellular matrix components and water-channel expression in in vitro and ex vivo human skin models. *J Cosmetic Derm* 2009; 8:56-62.
- [4].Wagemaker TAL, Pereira KC, Maia Campos PMG. Efeitos imediatos de formulações cosméticas contendo óleo de café na hidratação e microrrelevo da pele. ABC, 2011.
- [5].Bispo KC. Measuring the antioxidant potential of na açai extract. *Cosmetics & Toiletries* 2008; 123: 47-50.
- [6].Palmer DM, Kitchin JS. Oxidative damage, skin aging, antioxidants and a novel antioxidant rating system. *J Drugs Dermatol* 2010; 9: 11-15.
- [7].Palmer DM, Kitchin JS. A Double-blind, randomized, controlled clinical trial evaluating the efficacy and tolerance of a novel phenolic antioxidant skin care system containing *Coffea arabica* and concentrated fruit and vegetable extracts. *J Drugs Dermatol* 2010; 9: 1480-1487.
- [8].Fernandes AS, Castro M, Oliveira NG. Oxidative stress and antioxidant defenses – a pedagogical review. *Biomedical and Biopharmaceutical Research* 2011; 8: 97-108.
- [9].Chiller K, Selkin BA, Murakawa GJ. Skin microflora and bacterial infections on the skin. *JID Symposium Proceedings*, 2001; 6: 170-174.
- [10].Falé PL, Borges C, Madeira PJA, Ascensão L, Araújo MEM, Florêncio MH, Serralheiro MLM. Rosmarinic acid, scutellarein 40-methyl ether 7- O - glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* ("falso boldo"). *Food Chem* 2009; 114: 708-805.
- [11].CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2011). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty First International Supplement M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- [12].Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chim Acta* 2008; 613:1-19.
- [13].Tuberoso CIG, Kowalczyk A, Sarritzu E, Cabras P. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Food Chem* 2007; 103: 1494-1501.
- [14].Castelo-Branco VN, Torres AG. Total antioxidant capacity of edible vegetable oils: chemical determinants and association with oil quality. *Rev Nutr* 2011; 24: 173-187.
- [15].Dimitrios B. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trens in Food Science and Technology* 2006; 17: 505-512.
- [16].Bramley PM, Elmadfa I, Kafatos A, Kelly JF et

al. Vitamin E. *J Sc Food Agric* 2000; 80:913-938.

[17].Alves RC, Casal S, Alves MR, Oliveira MB. Discrimination between arabica and robusta coffee species on basis of their tocopherol profiles. *Food Chem* 2009; 114: 295-299.

[18].Speer K, Kölling-Speer I. The lipid fraction of coffee bean. *Braz J Plant Physiol* 2006; 18: 201-216.

[19].Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, Sugawara M, Iseki K. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int J Pharm* 2011; 403:136-138.

[20].Chomnawang MT, Surasmo S, Nukoolkam VS, Gritsanapan W. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. *J Ethnopharmacology* 2005; 101: 330-333.

[21].Rahua J-P, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P. Antimicrobial effects of finish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology* 2000; 56:3-12.

[22].Cárdenas C, Quesada AR, Medina MA. Anti-angiogenic and anti-inflammatory properties of kahweol, a coffee diterpene. *PLoS ONE* 2011; 6:1-9.

[23].Choi MJ, Park EJ, Oh JH, Min KJ, Yang ES, Lee TJ, Kim SH, Choi YH, Park JW, Kwon TK. Cafestol, a coffee-specific diterpene, induces apoptosis in renal carcinoma Caki cells through down-regulation of anti-apoptotic proteins and Akt phosphorylation. *Chem Biol Interact* 2011, 25;102-108

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da FAPESP.

Conflito de Interesses

Os autores declaram não existir qualquer relação de natureza financeira ou pessoal que possa ser entendida ou representar um potencial conflito de interesses.