

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

DANIELA MAYRA DE OLIVEIRA FIGUEIREDO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE SISTEMA
NANODISPERSO PARA O CONTROLE DO MELASMA**

ALFENAS/MG



2023

DANIELA MAYRA DE OLIVEIRA FIGUEIREDO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE SISTEMA
NANODISPERSO PARA O CONTROLE DO MELASMA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG.
Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.
Orientador: Prof. Dr. Mateus Freire Leite.

ALFENAS/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Figueiredo, Daniela Mayra de Oliveira.

Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistema nanodisperso para o controle do melasma / Daniela Mayra de Oliveira Figueiredo. - Alfenas, MG, 2023.

112 f. : il. -

Orientador(a): Mateus Freire Leite.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Melasma. 2. Bellis perennis. 3. Melanócitos. 4. Nanodisperso. 5. Microemulsão. I. Leite, Mateus Freire, orient. II. Título.

DANIELA MAYRA DE OLIVEIRA FIGUEIREDO

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE SISTEMA NANODISPERSO PARA O CONTROLE DO MELASMA

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 02 de Junho de 2023.

Prof. Dr. Mateus Freire Leite

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Gislaine Ribeiro Pereira

Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Mateus Freire Leite, Professor do Magistério Superior**, em 02/06/2023, às 16:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1006931** e o código CRC **5263EE12**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, por todas as bênçãos em minha vida, por me conceder saúde, força de vontade, dom do estudo, por todo suporte ao longo deste trabalho, por me dar força e não me deixar desistir diante das dificuldades.

Aos meus amados pais, José Benedito e Eliana, pela confiança, apoio, carinho, incentivo e compreensão. Às minhas queridas irmãs, Sílvia (*in memoriam*) e Rafaela, pela amizade, cumplicidade, por sempre torcerem, confiarem e acreditarem na minha formação.

Ao Eduardo, meu querido marido, por todo apoio, confiança, compreensão, carinho, amizade e auxílio durante a pesquisa. Aos meus queridos filhos, Guilherme e Gabriela, por me mostrarem o que realmente é importante na vida.

Agradeço, em especial, ao meu orientador, professor Mateus, pelo incentivo, paciência, confiança, compreensão, por sempre ter acreditado no meu trabalho, por todo apoio e orientação no desenvolvimento da pesquisa.

Aos colegas de laboratório: Douglas, Pietro e Bianca, pela companhia e amizade. Em especial, agradeço à Bianca, por ter sido meu suporte no laboratório ao longo de todos os experimentos. À Cris, pela amizade e apoio. Às técnicas: Sílvia, Neila, Andréa e Patrícia Penido, pela amizade, suporte e apoio no laboratório.

Ao laboratório LATF, pela recepção e disponibilidade.

Às amigas: Olímpia, Bianca, Thalita, Isabelly, Mariana, Tássia e Elizângela, pela companhia, apoio, auxílio e amizade.

À UNIFAL-MG e todos os professores, pelo aprendizado desde minha graduação em Farmácia, Turma 2004/01.

À CAPES pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial, à Fabiana.

Ao professor Marcos Vinícios Salles Dias, pela parceria no estudo com as células.

À professora Gislaine, pela amizade, ensinamentos e apoio no estudo da permeação cutânea.

Ao André, meu professor de Inglês, pela amizade e auxílio nas traduções.

A todos os amigos que me incentivaram e acreditaram em mim.

Muito obrigada!

RESUMO

O melasma é uma dermatose crônica que pode resultar em alterações desarmônicas na tonalidade da pele e na fisionomia da face. Ocorre pelo excesso na produção dos pigmentos de melanina. Atinge principalmente mulheres em todo o mundo e tem a radiação solar como principal desencadeante. A hiperpigmentação de melasma é difícil de ser controlada, pois há envolvimento de muitos fatores que atuam em diversos mecanismos da síntese de melanina. O pigmento de melanina é produzido nos melanócitos como um meio protetor contra a radiação ultravioleta. O uso de cosméticos despigmentantes é a primeira opção para o controle das hiperpigmentações. No entanto, um dos desafios no desenvolvimento de formulações para a pele (dermatológicos ou cosméticos) é vencer o estrato córneo, principal barreira da pele para a penetração de substâncias. Por isso, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma formulação cosmética capaz de conduzir os ativos: extrato de *Bellis perennis*, nicotinamida e alfabisabolol até os melanócitos, para um efetivo controle do melasma. O veículo escolhido para compor a formulação cosmética é um sistema nanotecnológico, tal como uma microemulsão. Este tipo de sistema permite a elaboração de formulações adequadas à face, devido à baixa viscosidade e grande conteúdo aquoso. Pelo estudo de estabilidade acelerada comprovou-se a estabilidade da formulação diante de três diferentes condições de temperatura (5, 25 e 40 °C). Estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro* demonstraram a segurança da formulação cosmética. O ensaio de MTT em fibroblastos L929 mostrou que o produto desenvolvido é seguro para a aplicação na pele sem diminuir a viabilidade celular. Portanto, obteve-se um sistema cosmético nanodisperso estável, biocompatível e de sensorial adequado para aplicação na face contendo ativos cosméticos seguros para o controle do melasma.

Palavras-chave: melasma; pele; *Bellis perennis*; melanócitos; nanodisperso.

ABSTRACT

Melasma is a chronic dermatosis that can result in disharmonious alterations in skin tone and facial physiognomy. It occurs due to excess production of melanin pigments. It mainly affects women around the world and has solar radiation as the main trigger. Melasma hyperpigmentation is difficult to control, because there are many factors involved that act on different mechanisms of melanin synthesis. Melanin pigment is produced in melanocytes as a protective means against ultraviolet (UV) radiation. The use of depigmenting cosmetics is the first option for controlling hyperpigmentation. However, one of the challenges in the development of formulations for the skin (dermatological or cosmetic) is to overcome the stratum corneum, the skin's main barrier to the penetration of substances. Therefore, the objective of this work was the development of a cosmetic formulation capable of conducting the actives: extract of *Bellis perennis*, nicotinamide and alpha-bisabolol to the melanocytes, for effective control of melasma. The vehicle chosen to compose the cosmetic formulation is a nanotechnological system, such as microemulsion. This type of system allows the elaboration of suitable formulations for the face, due to its low viscosity and high water content. The accelerated stability study confirmed the stability of the formulation under three different temperature conditions (5, 25 and 40 °C). In vitro skin permeation and retention studies demonstrated the safety of cosmetic formulation. The MTT test on L929 fibroblasts showed that the developed product is safe for application on the skin without decreasing cell viability. Therefore, a stable, biocompatible and sensory-appropriate nanodisperse cosmetic system was obtained for application on the face, containing safe cosmetic actives for the control of melasma.

Keywords: melasma; skin; *Bellis perennis*; nanodispersed; melanocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diferenciação das camadas da epiderme.....	16
Figura 2 – Escala de cores dos diferentes fototipos.....	21
Figura 3 – Classificação do melasma.....	22
Figura 4 – Unidade epidermomelânica.....	25
Figura 5 – Principal via de regulação da melanogênese.....	27
Figura 6 – Rota de síntese de melanina.....	28
Figura 7 – Migração dos melanossomos do melanócito para o queratinócito.....	29
Figura 8 – Inflorescências de <i>Bellis perennis</i> e apigenina 7- glicosídeo.....	35
Figura 9 – Estrutura da molécula de alfabisabolol.....	36
Figura 10 – Estrutura da molécula de nicotinamida.....	37
Figura 11 – Mecanismos de inibição da síntese e distribuição de melanina.....	38
Figura 12 – Representação de moléculas de tensoativos na interface.....	40
Figura 13 – Tipos de microemulsões.....	40
Figura 14 – Amostras do sistema final para o estudo de estabilidade.....	55
Figura 15 – Modelo de célula de difusão.....	57
Figura 16 – Pele de orelha suína e área de permeação.....	57
Figura 17 – Ensaio MTT para avaliação da viabilidade celular.....	59
Figura 18 – Diagramas de fases 1 e 2.....	61
Figura 19 – Diagramas de fases 3 e 4.....	62
Figura 20 – Diagrama de fases 5.....	63
Figura 21 – Imagem das misturas em diferentes proporções do diagrama 5.....	63
Figura 22 – Condutividade do sistema sem ativos pela titulação de água.....	66
Figura 23 – Análise reológica do sistema PEG.....	67
Figura 24 – Análise reológica do sistema PEGSPAN85-1.....	68
Figura 25 – Análise reológica do sistema PEGSPAN85-2.....	68
Figura 26 – Análise reológica do sistema PEGSILICONE-1.....	69
Figura 27 – Análise reológica do sistema PEGSILICONE-2.....	69
Figura 28 – Análise reológica do sistema PEGSILICONE-3.....	70
Figura 29 – Análise reológica do sistema PEGSPANTWEEN-1.....	70
Figura 30 – Análise reológica do sistema PEGSPANTWEEN-2.....	71
Figura 31 – Análise reológica de PEGSPANTWEEN + os ativos cosméticos.....	71
Figura 32 – Sistema com e sem ativos.....	73
Figura 33 – Produto na embalagem conta-gotas.....	73
Figura 34 – Cromatograma do branco da nicotinamida.....	76
Figura 35 – Curva analítica da nicotinamida na faixa de 5 – 60 mg/L.....	76
Figura 36 – Cromatograma do branco da apigenina-7-O-glicosídeo.....	77
Figura 37 – Curva analítica de apigenina-7-O-glicosídeo na faixa 0,2 e 2,2 mg/L.....	78
Figura 38 – Cromatograma do branco do alfabisabolol.....	79
Figura 39 – Curva analítica do alfabisabolol na faixa de 10 e 100 mg/L.....	79
Figura 40 – Avaliação do tamanho da gotícula e PdI no estudo de estabilidade.....	81
Figura 41 – Condutividade e potencial zeta no estudo de estabilidade.....	82
Figura 42 – Viscosidade e pH no estudo de estabilidade.....	83
Figura 43 – Teor de nicotinamida no estudo de estabilidade.....	84
Figura 44 – Teor de apigenina-7-O-glicosídeo no estudo de estabilidade.....	84
Figura 45 – Teor de alfabisabolol no estudo de estabilidade.....	85
Figura 46 – Perfil de permeação cutânea dos ativos.....	86
Figura 47 – Placa do estudo de viabilidade celular.....	87
Figura 48 – Gráfico da viabilidade celular.....	88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Relação entre tensoativos e fase oleosa dos diagramas e seus sistemas	48
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proporção entre T e FO.....	48
Tabela 2 – Proporção entre FA, FO e T dos sistemas selecionados.....	49
Tabela 3 – Análises do tamanho de gotícula e PDI dos sistemas selecionados.....	64
Tabela 4 – Determinação de pH dos sistemas selecionados.....	65
Tabela 5 – Análises da condutividade e de potencial zeta dos sistemas selecionados.....	67
Tabela 6 – Viscosidade dos sistemas selecionados.....	72
Tabela 7 – Comparação da área e intensidade do sinal pela variação do fluxo.....	77
Tabela 8 – Quantidade permeada dos ativos cosméticos.....	85

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	PELE.....	13
2.2	AÇÕES DA RADIAÇÃO SOLAR SOBRE A PELE.....	19
2.3	CLASSIFICAÇÃO DA COLORAÇÃO DA PELE HUMANA.....	20
2.4	MELASMA E MELANOGÊNESE.....	21
2.4.1	Melasma.....	21
2.4.1.1	Controle do melasma.....	23
2.4.2	Melanogênese.....	24
2.4.2.1	Vias de regulação da melanogênese.....	26
2.4.2.2	Rota de síntese de melanina.....	28
2.4.2.3	Transferência dos pigmentos de melanina.....	29
2.5	FORMULAÇÕES COSMÉTICAS.....	30
2.5.1	Cosméticos despigmentantes.....	30
2.5.2	Cosméticos contendo ingredientes naturais.....	32
2.5.3	Ativos cosméticos da formulação nanodispersa.....	33
2.5.3.1	<i>Bellis perennis</i> e Belides®.....	33
2.5.3.2	Alfabisabolol.....	35
2.5.3.3	Nicotinamida.....	36
2.6	MECANISMO DE AÇÃO DOS ATIVOS COSMÉTICOS.....	37
2.7	SISTEMAS DISPERSOS E NANODISPERSOS.....	38
2.8	DIAGRAMA DE FASES.....	43
3	OBJETIVO.....	44
3.1	OBJETIVO GERAL.....	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1	EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES.....	45
4.1.1	Equipamentos.....	45
4.1.2	Materiais e reagentes.....	45
4.1.2.1	Padrões analíticos.....	46
4.1.2.2	Reagentes.....	46
4.1.2.3	Soluções.....	46
4.1.2.4	Ativos cosméticos e excipientes.....	47
4.1.2.5	Células.....	47
4.2	DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANODISPERSOS PARA INCORPORAÇÃO DE NICOTINAMIDA, BELIDES® E ALFABISABOOL.....	47
4.2.1	Construção dos diagramas de fases e seleção de sistemas transparentes líquidos..	47
4.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SISTEMAS TRANSPARENTES LÍQUIDOS.....	49
4.3.1	Teste de centrifugação pré-estabilidade.....	49
4.3.2	Tamanho das gotículas e índice de polidispersividade.....	49
4.3.3	Determinação de pH	50
4.3.4	Condutividade.....	50
4.3.5	Potencial zeta.....	50
4.3.6	Reologia.....	51
4.4	DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA POR LC-MS/MS PARA QUANTIFICAÇÃO DE NICOTINAMIDA E APIGENINA-7-O-GLICOSÍDEO....	51

4.5	DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA POR GC-MS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ALFABISABOOL.....	52
4.6	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	53
4.7	ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA DO SISTEMA SELECIONADO PARA A FORMULAÇÃO FINAL.....	54
4.7.1	Condições do estudo.....	54
4.8	AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	55
4.9	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	57
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
5	RESULTADOS	59
5.1	DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANODISPERSOS PARA INCORPORAÇÃO DE NICOTINAMIDA, BELIDES® E ALFABISABOOL....	60
5.1.1	Construção dos diagramas de fases e seleção de sistemas transparentes líquidos.....	60
5.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SISTEMAS TRANSPARENTES LÍQUIDOS	64
5.2.1	Teste de centrifugação pré-estabilidade.....	64
5.2.2	Tamanho das gotículas e índice de polidispersividade.....	64
5.2.3	Determinação do pH.....	65
5.2.4	Condutividade e potencial zeta.....	65
5.2.5	Reologia.....	66
5.2.6	Seleção do sistema nanodisperso para o desenvolvimento do produto.....	72
5.3	DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA POR LC-MS/MS PARA QUANTIFICAÇÃO DE NICOTINAMIDA E APIGENINA-7-O-GLICOSÍDEO...	74
5.4	DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA POR GC-MS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ALFABISABOOL.....	75
5.5	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	75
5.5.1	Nicotinamida.....	75
5.5.2	Apigenina-7-O-glicosídeo.....	77
5.5.3	Alfabisabolol.....	78
5.6	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE ACELERADA DO SISTEMA SELECIONADO PARA A FORMULAÇÃO FINAL.....	80
5.6.1	Avaliação macroscópica.....	80
5.6.2	Avaliação físico-química.....	80
5.6.2.1	Tamanho de gotícula e índice de polidispersão (PdI).....	80
5.6.2.2	Potencial zeta e condutividade.....	81
5.6.2.3	Viscosidade e pH.....	82
5.6.3	Teor dos ativos cosméticos.....	83
5.6.3.1	Nicotinamida.....	83
5.6.3.2	Apigenina-7-O-glicosídeo.....	84
5.6.3.3	Alfabisabolol.....	85
5.7	ESTUDO DA PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	85
5.8	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	86
6	DISCUSSÃO.....	88
7	CONCLUSÃO.....	98
	REFERÊNCIAS.....	100

1 INTRODUÇÃO

O melasma é uma dermatose adquirida e recorrente (Trivedi; Yang; Cho, 2017) que se manifesta pela intensa produção e/ou desequilíbrio na dispersão dos pigmentos de melanina. Caracteriza-se por áreas com pigmentação mais intensa, principalmente, na face. Pode ocorrer no sexo masculino, mas tem preponderância feminina (Mahajan *et al.*, 2022), contando com a radiação solar como principal agravante. O melasma, devido às modificações na coloração da pele, pode resultar em alterações inestéticas na fisionomia, proporcionando constrangimento e baixa autoestima. A intervenção no distúrbio da pigmentação é importante para a recuperação da tonalidade da pele, bem como garantir o restabelecimento do bem-estar psíquico dos indivíduos acometidos pelo melasma (Jiang *et al.*, 2018).

A hiperpigmentação que ocorre no melasma é de difícil controle, visto que, a célula produtora de melanina se encontra abaixo da camada córnea, a qual exerce função barreira contra a entrada de substâncias externas ao organismo, inclusive moléculas ativas de medicamentos e cosméticos. Dessa forma, o desenvolvimento de uma formulação nanocosmética pode favorecer a ação de ativos (Tessema *et al.*, 2018) contra o excesso na produção dos pigmentos, por permitir o alcance das moléculas ativas às camadas profundas da epiderme (Gupta *et al.*, 2022). Propor um veículo adequado para compor uma formulação cosmética tal como uma microemulsão, pode facilitar a penetração cutânea de moléculas ativas. As microemulsões são biocompatíveis e interagem com os lipídeos do estrato córneo, alterando os espaços intercelulares, facilitando a rota de penetração dos ativos (Sharma *et al.*, 2015).

Muitos ativos provenientes do metabolismo secundário vegetal podem prevenir e controlar o distúrbio da hiperpigmentação (Fisk *et al.*, 2014). Por isso, a busca por ativos botânicos para o desenvolvimento de formulações cosméticas pode ser de grande interesse para o controle do melasma. Muitos bioativos além de fortalecerem a função barreira e prevenirem a oxidação dos lipídeos, também reduzem a síntese dos pigmentos de melanina, melhorando a saúde e a beleza da pele (Cassiano *et al.*, 2022).

A utilização dos ativos botânicos: alfabisabolol (Sivamani; Clark, 2016) e Belides[®] (extrato floral de *Bellis perennis*) (Murphy; Dow, 2021) e da nicotinamida (Cassiano *et al.*, 2022) para o tratamento do melasma é relatada na literatura. Porém, não há ainda, a descrição da associação ternária desses ativos como uma única formulação nanotecnológica (Leite *et al.*, 2023).

Compreender os inúmeros fatores que determinam a síntese de melanina e formular os ativos em sistemas eficientes à penetração cutânea (Gupta *et al.*, 2022) pode auxiliar no controle e na prevenção das desordens pigmentares. Nesse sentido, supõem-se que a associação (única) dos princípios ativos (alfabisabolol, Belides® e nicotinamida) preparados em um sistema microemulsionado (Leite *et al.*, 2023) possa atuar eficazmente nas lesões de melasma.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A seguir, será apresentado o detalhamento sobre a complexidade do tecido tegumentar, com a descrição das camadas da pele, das principais células e da síntese do pigmento de melanina, bem como sua importante função de proteção para o organismo. Em seguida, haverá uma explanação sobre o melasma, abordando suas causas, classificação, incidência e formas de controle. Por fim, será realizada uma revisão sobre os sistemas dispersos e nanodispersos, amplamente utilizados no desenvolvimento de formulações farmacêuticas e cosméticas.

2.1 PELE

O tecido tegumentar (a pele) é o órgão de maior extensão no organismo, correspondendo cerca de 15% do peso corpóreo total (Azulay; Azulay; Abulafia, 2017). Possui duas camadas: a epiderme e a derme, (Costa; Horswill, 2022) que se relacionam para manter a homeostasia do tecido (Garcia *et al.*, 2021). A epiderme é a camada mais externa formada por vários estratos de células que revestem a superfície corporal. A derme encontra-se profundamente inserida, comunicando-se com os órgãos internos através do tecido conjuntivo frouxo, rico em adipócitos: a hipoderme (Junqueira; Carneiro, 2013).

A pele exerce proteção contra danos externos ao organismo, como lesões mecânicas (fibras colágenas e elásticas), excesso de radiação ultravioleta (melanócitos), fumaça e poluentes (microbiota) (Azulay; Azulay; Abulafia, 2017), e da oxidação dos órgãos funcionais (epiderme e derme) (Michalun; DiNardo, 2014). Atua de forma vital na proteção à desidratação e na termorregulação. Exerce ação imunológica a partir das células de defesa e de peptídeos microbianos do manto hidrolipídico pela eliminação de microrganismos patogênicos (Harris-Tryon; Grice, 2022). Além disso, contribui na percepção tátil devido às terminações neurosensoriais, e encarrega-se da síntese de vitamina D (Junqueira; Carneiro, 2013).

A pele provém a partir de dois folhetos embrionários: a ectoderme e a mesoderme, que originam a epiderme e grande parte da derme, respectivamente (Bolognia *et al.*, 2017; Sadler 2016). A epiderme é composta por um epitélio justaposto e avascular, o qual é constituído em grande parte por queratinócitos, mas conta também com as células de Merkel (percepção sensorial), células de Langerhans (proteção imunológica) e melanócitos (produção de pigmentos melânicos) (Michalun; DiNardo, 2014). A epiderme adere-se à derme através da junção dermoepidérmica, que é uma camada de células situada abaixo dos epitélios, composta principalmente de colágeno tipo IV, sulfato de heparana e laminina (Bolognia; Jorizzo; Schaffer, 2017). A interação entre a epiderme e a derme faz-se, respectivamente, pelas cristas epidérmicas e pelas papilas dérmicas, havendo forte adesão entre estas duas porções (Azulay; Azulay; Abulafia, 2017). Assim, por meios dos capilares dérmicos, a epiderme recebe todo alicerce para sua nutrição, manutenção e renovação.

A epiderme é disposta em cinco camadas: camada basal ou germinativa, camada espinhosa, camada granulosa, camada lúcida e camada córnea. As camadas, basal ou germinativa, espinhosa e granulosa, compõem a epiderme viável (Garcia *et al.*, 2021). A primeira camada (basal ou germinativa) é formada por única fileira de células germinativas (queratinócitos com alta taxa de mitose para a constante regeneração tecidual), estando presentes também as células-tronco, células de Merkel e melanócitos. Os queratinócitos desta região possuem o citoesqueleto composto por microtúbulos, por filamentos de actina e pelos filamentos intermediários de queratina (citoqueratinas: tipo I: K-14 e tipo II: K-5) para suporte à resistência física (Bolognia; Jorizzo; Schaffer, 2017).

A segunda camada é a espinhosa, sendo constituída por diversos estratos de células, cujos citoplasmas contêm os filamentos de queratina K-10 e K-1 (citoqueratinas) (Nishifuji; Yoon, 2013). Além dos queratinócitos, há células de Langerhans (provenientes da medula óssea), que conferem proteção imunitária por meio da ativação dos linfócitos T. Além disso, essa camada conta com abundantes moléculas de desmossomos que se encontram entre cada um dos queratinócitos para a união celular, permitindo também a conexão entre o citoesqueleto do queratinócito (Bolognia; Jorizzo; Schaffer, 2017).

Os desmossomos são compostos proteicos reunidos e compactados, formados pelos polipeptídeos: placoglobina, placofilina e desmoplaquina, em associação com as glicoproteínas transmembrana: desmogleína e desmocolina. Essas glicoproteínas de adesão são caderinas (dependentes de cálcio). A interação entre essas estruturas e as citoqueratinas constitui o vínculo

célula-célula, pois os desmossomos fixam o citoesqueleto à membrana plasmática constituindo forte adesividade entre as células adjacentes, conferindo resistência ao tecido contra lesões mecânicas (Holthöfer *et al.*, 2007; Kowalczyk; Green, 2013)

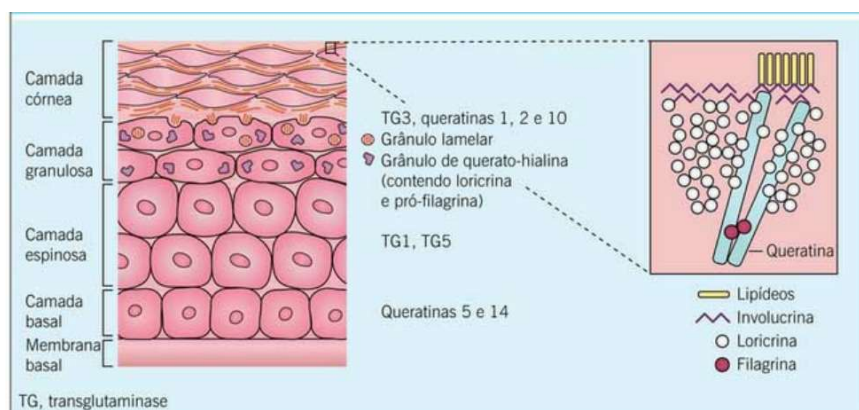
Além de desmossomos, outras junções são encontradas nos queratinócitos como as junções aderentes (formadas pelas caderinas P e E). Essas glicoproteínas ligam-se aos microfilamentos de actina e ao citoesqueleto (Candi; Schmidt; Melino, 2005). Há também as junções de adesão, que evitam a entrada de moléculas grandes entre as células adjacentes. A presença de todos os compostos juncionais em queratinócitos é de grande importância na manutenção da função barreira da pele (Bologna; Jorizzo; Schaffer, 2017).

A camada granulosa (terceira camada) contém células achatadas com citoplasma preenchido com grânulos de querato-hialina formados pelas citoqueratinas (tipo I: K-11 e tipo II: K-2) e pelas proteínas estruturais: pró-filagrina e loricrina (Azulay; Azulay; Abulafia, 2017). Além dos grânulos de querato-hialina, há também os grânulos lamelares que contêm colesterol, glicoproteínas, ácidos graxos, ômega-hidroxiceramida e fosfolipídeos. Estes grânulos lipídicos liberam seu conteúdo no espaço intercelular na formação do estrato córneo. As moléculas de pró-filagrina são convertidas em filagrina, forma ativa da proteína, que se liga as citoqueratinas compactando-as para formar redes entrelaçadas de proteínas (Kierszenbaum; Tres, 2020). Isso promove a modelação celular para a forma plana (devido à forte junção das citoqueratinas). A filagrina também auxilia na retenção de água (já que ao ser degradada, libera aminoácidos hidrofílicos que contribuem para a osmolaridade do tecido, com intuito de estabilizar o entrecruzamento da rede proteica) (Bologna; Jorizzo; Schaffer, 2017). Além das proteínas de suporte existentes no desmossomos, há outras proteínas de grande interesse na epiderme que atuarão de forma importante na formação do estrato córneo, como a involucrina e a loricrina que formam redes com diversas proteínas de suporte na corneificação (Kierszenbaum; Tres, 2020).

Entre a camada granulosa e a camada córnea, há a camada lúcida (quarta camada) que está presente apenas na pele mais espessa: mãos e pés (principalmente) (Junqueira; Carneiro, 2013). É formada por fina camada de células anucleadas, achatadas, com filamentos de queratina agregados por filagrina através das transglutaminases (TGs), que são enzimas (dependentes de cálcio) (Bologna; Jorizzo; Schaffer, 2017), atuantes nas etapas de organização do estrato córneo, formando redes proteicas entre as proteínas de suporte e lipídeos. (Kierszenbaum; Tres, 2020).

A quinta e última camada (córnea) é constituída por células anucleadas e citoplasma rico em queratina (corneócitos). Essa camada forma-se repentinamente após inúmeros processos metabólicos que ocorrem inicialmente na camada espinhosa, como por exemplo, quando a concentração intracelular do íon cálcio se eleva. Com isso, a proteína estrutural filagrina une-se fortemente às citoqueratinas dos queratinócitos, achatando drasticamente as células (Figura 1). As TGs do tipo 1, 3 e 5 atuam na formação do estrato córneo e são indispensáveis à formação de ligações cruzadas (reticulação através do grupamento gamaglutamyl lisina) entre as proteínas da epiderme (Bolognia; Jorizzo; Schaffer, 2017). Todas essas ações exercidas pelas TGs fortificam e estabilizam o envelope cornificado (Kierszenbaum; Tres, 2020). Após os grânulos lamelares liberarem o material lipídico, as hidrolases, lipases e glicosídeos convertem-no em triglicerídeos, ceramidas, colesterol e ácido graxo. Os novos lipídeos formados reúnem-se em torno de cada célula formando um impedimento hidrofóbico à passagem de água ou substâncias polares (Azulay; Azulay; Abulafia, 2017). Após todos estes eventos, forma-se o envelope corneificado epidérmico, que terá ação análoga, sobre os corneócitos, à membrana plasmática nos queratinócitos. Portanto, o estrato córneo é composto por queratinócitos modificados, anucleados (corneócitos), os quais são envolvidos por lipídeos apolares como ceramidas, colesterol e ácidos graxos (Danby *et al.*, 2022). Os corneócitos associados às macromoléculas de lipídeos, junto com o fator natural de hidratação exercem a função barreira contra a perda de água e a entrada de substâncias externas para o interior do organismo (Moore; Rawlings, 2017).

Figura 1 – Diferenciação das camadas da epiderme



Fonte: Dermatologia 4ª edição (Bolognia; Jorizzo; Schaffer, 2017).

Legenda: Diferenciação das camadas da epiderme viável com a expressão das proteínas, involucrina, loricrina e filagrina na camada granulosa para a formação do estrato córneo.

Os anexos da pele compreendem o folículo piloso, as unhas, as glândulas sudoríparas (dos tipos écrina e apócrina) e as glândulas sebáceas. Formam-se após a introdução do tecido epidérmico em direção à camada dérmica, processo que ocorre durante o período embrionário (Bologna; Jorizzo; Schaffer, 2017). O folículo piloso é composto pelo bulbo piloso e pela papila dérmica. Desenvolve-se após a conversão de queratinócitos em tricócitos e lançamento para dentro da derme (Azulay; Azulay; Abulafia, 2017). É responsável pela formação dos pelos existentes na área corporal e no couro cabeludo. As unhas são constituídas principalmente por células queratinizadas compactadas (onicócitos), inseridas dorsalmente nas falanges dos dedos para a proteção contra traumas e auxilia na função tátil (Bologna; Jorizzo; Schaffer, 2017).

As glândulas sudoríparas do tipo écrina estão presentes em quase toda a área corpórea, principalmente na palma das mãos e planta dos pés. Nestes locais, são ativadas por fatores emocionais a liberarem suor, o qual é composto principalmente pela solução aquosa hipotônica de sódio, lactato, potássio, ureia e cloreto, bicarbonato e peptídeos antimicrobianos (Bologna; Jorizzo; Schaffer, 2017). O restante das glândulas écrinas (distribuídas em outras regiões) respondem aos estímulos térmicos do ambiente para tal liberação. A secreção de suor atua na termorregulação, auxilia a excreção e formação do manto hidrolipídico e na proteção antimicrobiana (Park *et al.*, 2011).

As glândulas apócrinas pertencem às áreas específicas da superfície corporal e iniciam suas atividades a partir da puberdade (devido ao estímulo hormonal). São encontradas principalmente na região axilar e genital secretando, sobretudo, líquido rico em lipídeos, carboidratos e hormônios. Por ação bacteriana, as substâncias secretadas são metabolizadas liberando odor (Bologna; Jorizzo; Schaffer, 2017).

As glândulas sebáceas são inexistentes na região palmoplantar, mas em outros locais podem estar conectadas ao folículo piloso, constituindo a unidade pilosebácea, ou apresentarem-se como glândulas independentes. O produto destas glândulas é o sebo (substância consistente de coloração amarelada devido à composição lipídica), que atua na formação do manto hidrolipídico, lubrificando, evitando a perda de umidade e auxiliando a função barreira do estrato córneo (Azulay; Azulay; Abulafia, 2017).

A porção dérmica da pele é, em grande parte, derivada da mesoderme, entretanto, a derme da face é originada a partir do folheto embrionário ectodérmico (crista neural) (Sadler, 2016). A derme localiza-se abaixo da junção dermoepidérmica, onde se apoiam os vasos sanguíneos, os nervos e os anexos epidérmicos. Trata-se de uma camada espessa, que promove

elasticidade, preenchimento, nutrição e sustentação para todo o sistema tegumentar. É ocupada por matriz extracelular aquosa, que modula a biomecânica do tecido devido ao conteúdo abundante em fibras proteicas, proteoglicanos, proteínas, polissacarídeos e células (residentes e transitórias) (Azulay; Azulay; Abulafia, 2017).

Imersas à matriz extracelular, encontram-se as proteínas: colágeno e elastina, fornecendo resistência e elasticidade; as glicoproteínas: integrinas, fibronectina e laminina, que fazem a ligação das células à matriz extracelular; as moléculas de proteoglicanas: versicana, sindecana, perlecana, que formam sistemas com as fibras auxiliando na elasticidade do tecido; os polissacarídeos glucosaminoglicanas: ácido hialurônico, sulfato de queratana, dermatana, heparana e condroitina, para preenchimento e retenção de água (Bolognia; Jorizzo; Schaffer, 2017; Junqueira; Carneiro, 2013). Os fibroblastos são células que auxiliam na reciclagem da matriz extracelular através da biossíntese e degradação de moléculas de colágeno, elastina, glicosaminoglicanas, proteoglicanas e fibronectina (Junqueira; Carneiro, 2013).

A derme é dividida em papilar e reticular. A porção papilar é formada por tecido conjuntivo frouxo com estreitos feixes de colágeno e muitas células (fibroblastos). Formada por tecido conjuntivo denso não modelado, a derme reticular é compacta devido a presença de feixes espessos de fibras de colágeno que são distribuídos em todas as direções. O colágeno é o item proteico mais abundante do organismo compondo os ossos, os músculos, a pele, as cartilagens e os tendões. Age na extensibilidade e na resistência local. Uma molécula de colágeno é formada pela união de três cadeias polipeptídicas alfa (as cadeias podem ser iguais ou não) formando uma tripla hélice. O aminoácido glicina é o mais abundante da molécula (33%) ocupando, sempre, a terceira posição na sequência da cadeia. Os aminoácidos prolina e hidroxiprolina são intercalados favorecendo a formação da tripla hélice (Azulay; Azulay; Abulafia, 2017).

Existem mais de 28 tipos de moléculas de colágeno, que se diferenciam pelo padrão de organização. Os principais tipos de colágeno presentes na derme são: tipo I e tipo III, perfazendo, respectivamente 80% e 10%. O colágeno tipo II é encontrado nas cartilagens, enquanto o tipo IV é encontrado na junção dermoepidérmica (Junqueira; Carneiro, 2013). O colágeno é sintetizado por diversas células do organismo, como os fibroblastos, os condrocitos, os osteoblastos, dentre outras. A molécula de colágeno é primeiramente formada no interior celular após processos que se iniciam no núcleo, como a transcrição do DNA e formação do RNAm, seguido da tradução pelos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso

em molécula de pró-colágeno. Através do complexo de golgi, o pró-colágeno é secretado para o meio extracelular, onde, por ação da vitamina C, sofrerá reações de hidroxilação para a formação da tripla hélice originando o tropocolágeno (colágeno) (Bologna; Jorizzo; Schaffer, 2017).

A pele possui elasticidade devido ao sistema elástico presente na derme, o qual é constituído pela proteína elastina e pelas microfibrilas. Há três tipos de fibras: a oxitalânica que é composta pela glicoproteína fibrilina, onde será depositada a elastina; a fibra elaunínica que contém média quantidade de elastina e a fibra elástica, onde há microfibrilas com grande deposição de elastina. As fibras oxitalânicas prendem-se à membrana basal verticalmente, enquanto as elaunínicas e fibras elásticas conectam-se horizontalmente. A elastina é uma proteína formada por monômero de tropoelastina, que é rico em glicina e em prolina, contando também com os aminoácidos desmosina e a isodesmosina, os quais são responsáveis pela forte elasticidade da molécula proteica (Bologna; Jorizzo; Schaffer, 2017).

2.2 AÇÕES DA RADIAÇÃO SOLAR SOBRE A PELE

A fração ultravioleta da radiação solar exerce efeitos biológicos nos seres vivos. A exposição solar diária é uma prática benéfica e necessária para a saúde do organismo, colaborando com a manutenção do ciclo circadiano, favorecendo a manutenção dos níveis normais de pressão arterial, melhorando problemas de pele como a psoríase e a dermatite atópica. Além disso, previne transtornos mentais, tal como o transtorno afetivo sazonal, diminui o risco da síndrome metabólica e evita o surgimento de vários tipos de cânceres (Rhee; Vries; Coebergh, 2016).

Quando a radiação solar atinge a pele, há início na síntese de vitamina D, liberação de óxido nítrico (NO), produção dos hormônios adrenocorticotrófico e melanotrófico, bem como liberação de β -endorfina (Kondo; Hearing, 2011). A produção e liberação dessas substâncias favorece a homeostasia no organismo.

A radiação ultravioleta A (UVA) atinge as camadas mais profundas da derme, podendo causar danos celulares (Jablonski; Chaplin, 2010). A fração ultravioleta B (responsável pela produção de vitamina D) atinge a epiderme, mas pode alcançar a primeira camada da derme.

A elevada taxa de exposição à radiação ultravioleta é nociva e pode causar hiperpigmentação, alta taxa mitótica dos queratinócitos, eritema solar, bolhas, descamação (Bologna; Jorizzo; Schaffer, 2017), inflamação, mutação, apoptose, peroxidação lipídica, eritema, discromias,

alergias, depleção nos níveis de folato, prejuízo no sistema imunitário cutâneo, lesão ocular, e tardiamente pode provocar o fotoenvelhecimento e a fotocarcinogênese (Juzeniene *et al.*, 2011). Os danos gerados no DNA dos queratinócitos (formação de dímeros de bases pirimídicas) aumentam o risco de câncer de pele (Bolognia; Jorizzo; Schaffer, 2017). Contudo, a pele humana é capaz de proteger-se da radiação ultravioleta através de estruturas absorventes de luz (cromóforos). A melanina é um cromóforo que exerce eficiente proteção biológica, pois impede a incidência direta da radiação no DNA do queratinócito. Portanto, a exposição solar em excesso pode favorecer o aparecimento de hiperpigmentações na pele, devido ao aumento na síntese de melanina (Videira; Moura; Magina, 2013).

2.3 CLASSIFICAÇÃO DA COLORAÇÃO DA PELE HUMANA

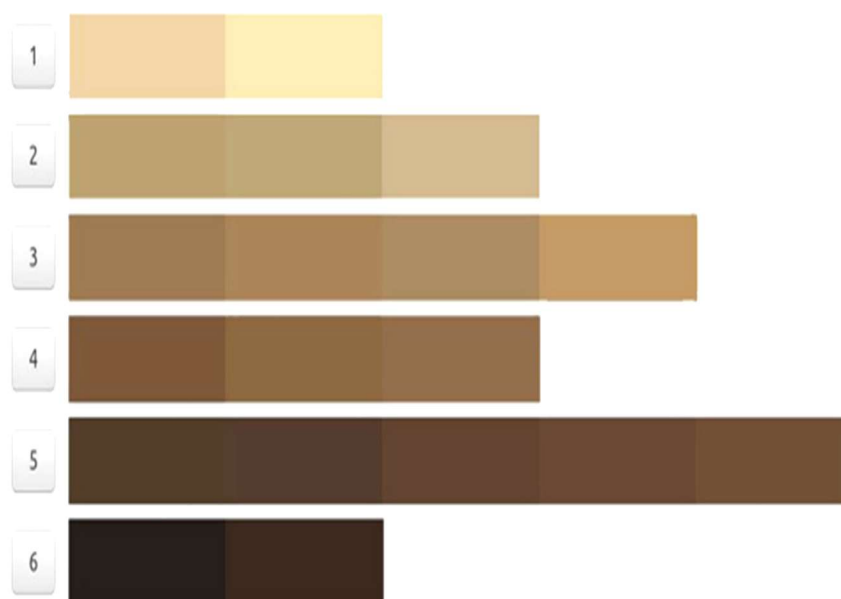
As variadas nuances da espécie humana resultam da associação de pigmentos do tecido cutâneo, como caroteno, hemoglobina e melanina, sendo o último o principal pigmento (Ortonne, 2012).

Em 1975, o médico dermatologista Thomas B. Fitzpatrick desenvolveu a escala de Fitzpatrick (aceita internacionalmente) para classificar a cor da pele humana em fototipos de I a VI (Figura 2). O intuito era selecionar um valor seguro (em joules por centímetro cúbico) de radiação UVA para tratamentos fotoquimioterápicos. Assim, ele criou a escala com base nas respostas dos pacientes sobre bronzeamento ou queimaduras após a exposição à radiação. Esta classificação é feita visualmente pela coloração da pele, sendo que a pele de coloração clara é mais sensível à radiação solar, enquanto a pele rica em melanina, apresenta resistência à ação da radiação solar (Fitzpatrick, 1988).

A escala de Fitzpatrick é utilizada por muitos profissionais da área estética e dermatológica para a classificação da cor da pele dos pacientes, para auxiliá-los em procedimentos fototerápicos (Gupta; Sharma, 2019). Trata-se de uma avaliação subjetiva, com base na resposta da pele frente à incidência da radiação ultravioleta.

Os fototipos podem ser descritos da seguinte forma: fototipo I, sempre se queima e nunca se bronzeia; fototipo II, queima-se fácil e bronzeia-se muito pouco; fototipo III, queima-se muito pouco e bronzeia-se moderadamente; fototipo IV, queima-se pouco e bronzeia-se com facilidade; Fototipo V, dificilmente se queima e bronzeia-se muito; e Fototipo VI, nunca se queima e bronzeia-se bastante (Bolognia; Jorizzo; Schaffer, 2017).

Figura 2 – Escala de cores dos diferentes fototipos



Fonte: Skin typing: Fitzpatrick grading and others (GUPTA; SHARMA, 2019).
 Legenda: Escala de cores para a identificação do tom de pele

2.4 MELASMA E MELANOGÊNESE

Os itens abaixo detalham o distúrbio na síntese de melanina que ocasiona o melasma.

2.4.1 Melasma

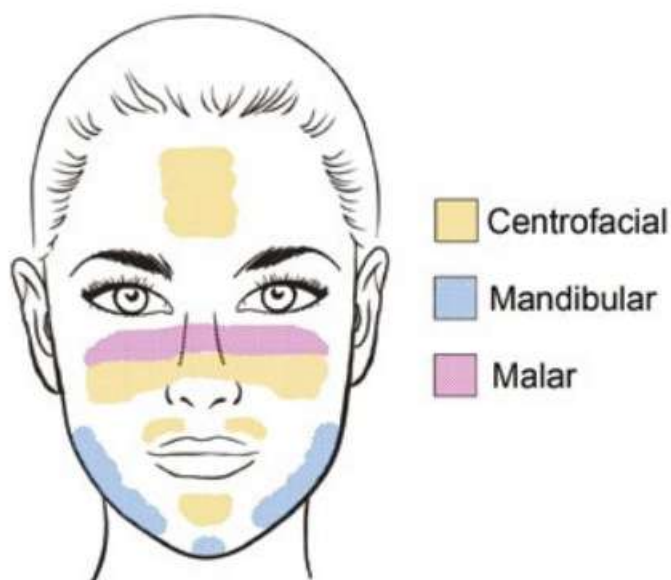
O melasma é uma fotodermatose adquirida crônica, estimulada e intensificada pela radiação solar (Azulay; Azulay; Abulafia, 2017). Acomete mais o sexo feminino e caracteriza-se pelo aparecimento de coloração marrom-clara ou escura, forma irregular, em áreas muito expostas à radiação solar, podendo ocorrer em toda a face ou em regiões específicas, como a região centrofacial, malar e mandibular. Além disso, há possibilidade de ocorrer hiperpigmentação extrafacial (Bostan; Cakir, 2023) na pele do colo (Handel; Miot; Miot, 2014) e dos antebraços (Bologna; Jorizzo; Schaffer, 2017).

Este tipo de hiperpigmentação pode surgir após exposição solar, uso de contraceptivos hormonais ou variação hormonal, como ocorre no período gestacional, ou ainda, ter influência genética na expressão de genes relacionados com a produção de pigmentos melânicos (Aishwarya; Bhagwat; John, 2020).

A presença do melasma pode causar transtornos psicossociais que influenciam o bem-estar dos pacientes (Zhu *et al.*, 2022), interferindo nas relações sociais e emocionais (Misery *et al.*, 2010).

O melasma pode ser classificado de acordo com a sua localização (ver Figura 3), podendo manifestar-se na região epidérmica, na dérmica, em ambas ou ser indefinido (quando há elevados fototipos: V e VI). O melasma epidérmico apresenta-se com excesso de pigmento em todas as suas camadas; já o do tipo dérmico possui melanina na camada papilar (Bolognia; Jorizzo; Schaffer, 2017).

Figura 3 – Classificação do melasma



Fonte: Melasma (Doolan; Gupta, 2021).

Legenda: localização de áreas de melasma para a classificação da distribuição em centrofacial, mandibular e malar.

As lesões de melasma podem ser encontradas em toda a face, sendo que os padrões de distribuição mais comuns são o malar e o centrofacial para as mulheres (Doolan; Gupta, 2021), enquanto o padrão malar predomina em homens (Sarkar; Ailawadi; Garg, 2018). Pode haver também a distribuição mandibular (Bolognia; Jorizzo; Schaffer, 2017).

O diagnóstico é realizado por meio da avaliação clínica e pelo levantamento do histórico do paciente com relação à exposição solar, uso de cosméticos, gestação, terapia medicamentosa e hormonal (contracepção, reposição). Com auxílio do diagnóstico diferencial, pode-se diferir o melasma de outras dermatoses pigmentares, como hiperpigmentação pós-inflamatória,

eritema discrômico persistente, líquen plano pigmentoso, dentre outras (Bolognia; Jorizzo; Schaffer, 2017).

Para a classificação do melasma, pode-se utilizar o método da lâmpada de Wood (Bostan; Cakir, 2023), que consiste na incidência da radiação ultravioleta A (em 365 nm) sobre a pele, evidenciando a área hiperpigmentada. O método da dermatoscopia utiliza um aparelho óptico com lente de aumento ($6\times$ a $400\times$), permitindo a visualização do pigmento em camadas profundas da pele (Tamler *et al.*, 2009).

2.4.1.1 Controle do melasma

Por ser uma desordem recorrente e de difícil controle, a intervenção no distúrbio da pigmentação deverá ser constante, por meio da utilização de cosméticos com ação despigmentante (Cassiano *et al.*, 2022), juntamente com ações fotoprotetivas (McKeseey; Tovar-Garza; Pandya, 2020).

A síntese de melanina é complexa e envolve inúmeros mecanismos que são desencadeados após estímulos químicos e físicos, contando com a participação de genes, enzimas, íons, ligantes e receptores (Maddaleno *et al.*, 2021). Os inúmeros eventos que atuam na formação dos pigmentos de melanina, bem como a barreira imposta pelo estrato córneo, demandam o emprego de terapia combinada, aliados a sistemas de entrega dos ativos cosméticos para facilitar o encontro da célula produtora de melanina.

A utilização de ativos provenientes de extratos botânicos com propriedades clareadoras e antioxidantes, tanto para uso tópico quanto para uso sistêmico, contribui para o restabelecimento da coloração normal da pele e o controle da hiperpigmentação (Chamcheu; Walker; Noubissi, 2021). Além disso, outros métodos para o clareamento das lesões hiperpigmentadas, como peelings, laser de CO₂ fracionado e luz pulsada, podem complementar e potencializar a ação despigmentante (McKeseey *et al.*, 2020). Entretanto, a utilização tópica de ativos clareadores é a mais comum para o controle do melasma (Neagu *et al.*, 2022).

Os extratos vegetais, quando utilizados em formulações cosméticas despigmentantes podem inibir as etapas de formação do pigmento, bem como oferecer demais benefícios para a pele devido à riqueza em compostos bioativos (Chamcheu; Walker; Noubissi, 2021). Os flavonoides, por exemplo, podem atuar estimulando a renovação celular, a produção de

colágeno e na proteção solar (Carvalho *et al.*, 2021). Dessa forma, os ativos vegetais representam opções mais seguras para o controle do melasma (Maddaleno *et al.*, 2021).

2.4.2 Melanogênese

A pele reage à ação da radiação solar produzindo e liberando substâncias específicas para reverter possíveis danos ao tecido cutâneo, ao sistema imunológico e ao DNA. O excesso de radiação ultravioleta origina radicais livres e provoca depleção ou inativação de nutrientes presente na circulação sanguínea (Costin; Hearing, 2007).

Com isso, ocorre nos melanócitos epidérmicos, a melanogênese, um evento fisiológico, responsável pela formação dos pigmentos de melanina (Kumari *et al.*, 2018), que atuam como proteção sobre o material genéticos dos queratinócitos.

A melanina é um biopolímero encontrado em espécies vegetais, animais, bactérias e fungos (Paria *et al.*, 2020). Pode ser representada por eumelanina, feomelanina, neuromelanina, alomelanina e piomelanina (d'Ischia *et al.*, 2020). Esse pigmento atua como antioxidante contra os danos da radiação ultravioleta (radicais livres) e como quelante de metais (Costin; Hearing, 2007). A melanina exerce principalmente função protetora sobre o material genético, pois, após ser produzida, é distribuída para a região nuclear das células epidérmicas, atuando contra fotodanos ao DNA (Shan *et al.*, 2021).

Os melanócitos (células produtoras de melanina) são derivados dos melanoblastos com origem embrionária ectodérmica (Videira; Moura; Magina, 2013). Encontram-se no cérebro (produzindo neuromelanina), na cóclea, na íris, no folículo piloso e na camada basal da epiderme (Yamaguchi; Hearing, 2014); (Bologna; Jorizzo; Schaffer, 2017). Dessa forma, são responsáveis pela coloração da substância nigra, dos olhos, dos cabelos e da pele.

A síntese de melanina inicia-se nos melanossomos, organelas responsáveis pela biossíntese e armazenamento e posterior distribuição do pigmento. Essas estruturas exercem proteção à membrana plasmática do melanócito e aos demais componentes celulares contra os precursores oxidantes da melanina. Além disso, recebem enzimas e outras substâncias necessárias para a produção do pigmento.

Os melanócitos são células com prolongamentos citoplasmáticos que se prendem aos queratinócitos da camada espinhosa, não por vínculo desmossômico, mas por meio das glicoproteínas caderinas (cálcio-dependentes). Além dos queratinócitos, interagem também

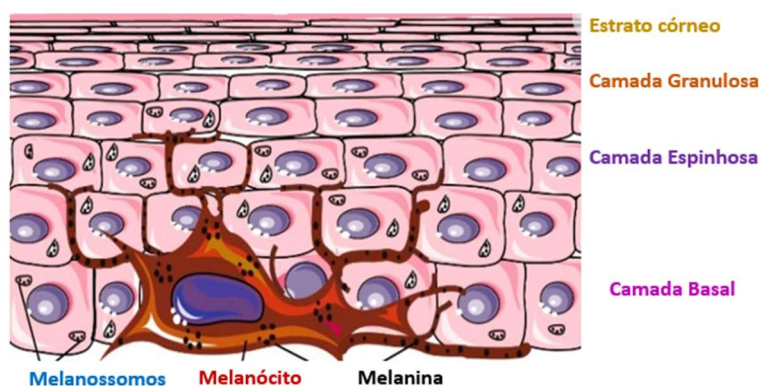
com os fibroblastos da derme por meio de mediadores químicos e receptores (Kondo; Hearing, 2011).

Pelos melanócitos epidérmicos são produzidos dois tipos de melanina: feomelanina (amarelo-avermelhada) e eumelanina (marrom e preta) (Ortonne, 2012). Cada melanócito associa-se a cerca de 30 a 40 células de queratinócitos, constituindo a unidade epidermomelânica (ver Figura 4) (Bolognia; Jorizzo; Schaffer, 2017).

Diversos fatores influenciam a produção de quantidades diferentes dos dois tipos de pigmentos de melanina, dentre estes: as vias de sinalização (ativação de genes, desequilíbrios nutricionais e hormonais) (Rambe; Simanungkalit; Yosi, 2020; Videira; Moura; Magina, 2013), o pH intramelanossomal, a presença de cátions, a quantidade do substrato cisteína e o tamanho das vesículas melanossômicas. Assim, a coloração epidérmica é dependente da síntese e da distribuição dos pigmentos de melanina e será desenvolvida pela mistura das frações de eumelanina e feomelanina (Wakamatsu; Zippin; Ito, 2021).

A compreensão de grande parte dos eventos que ocorrem na melanogênese favorece o controle e a prevenção das desordens pigmentares, pois permite a seleção de ativos capazes de atuar diferentes locais da biossíntese do pigmento. O controle da hiperpigmentação pode ser alcançado através da inibição de enzimas, cofatores, íons e genes, ou ainda pela menor distribuição de melanina para os queratinócitos (Mahajan *et al.*, 2022). Além disso, é importante que os ativos despigmentantes estejam formulados em sistemas adequados à penetração cutânea (Gupta *et al.*, 2022) para que possam atuar eficazmente nas lesões de melasma, garantindo o controle da hiperpigmentação e o restabelecimento da coloração natural da pele.

Figura 4 – Unidade epidermomelânica



Fonte: Adaptado de Signaling Pathways in Melanogenesis (D'Mello *et al.*, 2016).

Legenda: Melanócito entre os queratinócitos da camada basal da epiderme e dendritos com melanossomos para a transferência de melanina para os queratinócitos.

2.4.2.1 Vias de regulação da melanogênese

A melanogênese é ativada por vários mecanismos. Após a incidência de radiação solar na pele, os queratinócitos liberam mediadores químicos e inflamatórios, como peptídeos, fatores de crescimento, citocinas, óxido nítrico, prostaglandinas e histamina (Ansary *et al.*, 2021).

A produção de espécies reativas de oxigênio provoca estresse celular e ativação da proteína supressora de tumor (p53), que estimula a transcrição do gene pró-opiomelanocortina (POMC) (Ver Figura 5) (Kumari *et al.*, 2018).

A clivagem do peptídeo transcrito (POMC) origina o hormônio melanotrófico (α -MSH), o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (D'Mello *et al.*, 2016) e β -endorfina (Kondo; Hearing, 2011). Os hormônios melanotrófico e adrenocorticotrófico atuam como agonistas do receptor MC1-R, desencadeando inúmeras reações para a produção das enzimas melanogênicas: tirosinase, tirosinase relacionada à proteína 1 (TRP-1) e tirosinase relacionada a proteína 2 (TRP-2). Após a ligação do α -MSH ao receptor MC1-R, há elevação de AMPc, que ativa a proteína quinase A (PKA). Esta, por sua vez, fosforila o fator de transcrição nuclear denominado proteína de ligação do elemento de reação AMPc (CREB). Quando fosforilado, CREB regula o Fator de Transcrição Associado à Microftalmia (MITF) (Kumari *et al.*, 2018), responsável pela expressão das enzimas melanogênicas: tirosinase, TRP-1, TRP-2 e Pmel 17 (Bologna; Jorizzo; Schaffer, 2017), essenciais para a síntese de melanina.

A Endotelina-1 (ET-1) é um peptídeo secretado pelos queratinócitos após ação dos raios ultravioletas na pele. Além de atuar na homeostase vascular, desencadeia a ativação dos melanócitos, promovendo sua migração e a formação de dendritos. Estimula a Proteína Transportadora P Associada à Membrana (MATP) e liga-se ao receptor EDNRB, ativando o fator de transcrição MITF (Kondo; Hearing, 2011).

O fator de crescimento do queratinócito (SCF- *Stem Cell Factor*) liga-se ao receptor de tirosina quinase (KIT), ativando a Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK), que irá ativar o fator de transcrição MITF para a produção das enzimas melanogênicas (Park *et al.*, 2009).

As prostaglandinas e demais derivados do ácido araquidônico, além da histamina, aumentam a síntese de melanina (Park *et al.*, 2009). As prostaglandinas do tipo E2, ao se ligarem ao receptor (acoplado à proteína G), ativam o fator MITF, aumentando a melanogênese

(Starner *et al.*, 2010). A melanogênese também é estimulada pelo óxido nítrico, que promove a síntese das enzimas melanogênicas (Yoon *et al.*, 2022).

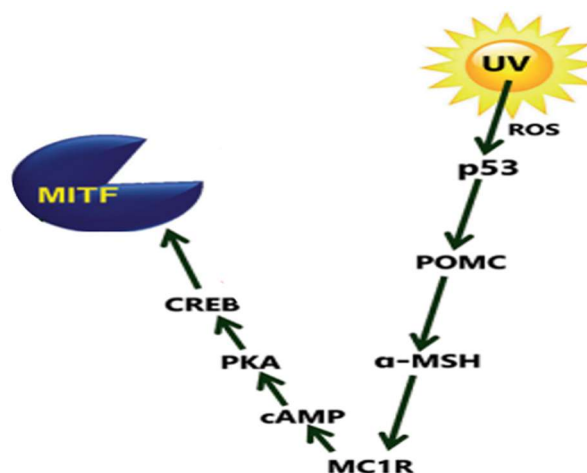
A fragmentação de lipídeos da membrana dos queratinócitos, frente aos danos da radiação solar, estimula a proteína quinase C (PKC), resultando na fosforilação e ativação das enzimas melanogênicas (Videira; Moura; Magina, 2013).

Os receptores adrenérgicos expressos em melanócitos epidérmicos do tipo α_1A e β_2 , quando ativados, podem induzir a melanogênese pela ativação da proteína quinase C (PCK) (Enkhtaivan; Lee, 2021). O receptor α_1A , ao ser ligado pela norepinefrina, libera diacilglicerol da membrana plasmática, o que ativa de PCK, estimulando a tirosinase. A molécula de epinefrina liga-se ao receptor β_2 , ativando a adenilato ciclase para a elevação de AMPc, que vai ativar MITF a transcrever as enzimas melanogênicas (Park *et al.*, 2009).

Os fotorreceptores (OPN₂, OPN₃ e OPN₄), presentes na pele podem induzir a melanogênese. São receptores são acoplados à proteína G e requerem a presença de AMPc. A luz azul atua no receptor OPN₃ (dependente de cálcio), ativando CREB que induz MITF nas enzimas melanogênicas (Shin, 2020).

Existem inúmeras vias de ativação da melanogênese, com a participação de diversos mediadores, como proteínas, fatores de crescimento, que resultam na ativação de MITF, principal regulador da melanogênese (Kondo; Hearing, 2011).

Figura 5 – Principal via de regulação da melanogênese



Fonte: Adaptado de Melanogenesis Inhibitors (Kumari *et al.*, 2018).

Legenda: RUV ativa a P53 e MITF para transcrição das enzimas melanogênicas.

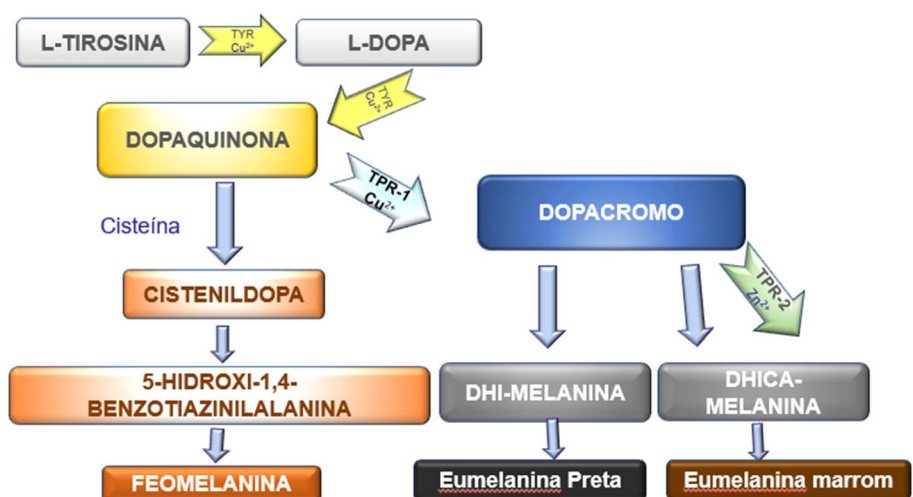
2.4.2.2 Rota de síntese de melanina

Por inúmeras reações bioquímicas, o aminoácido L-tirosina é convertido em eumelanina ou em feomelanina pela ação enzimática da tirosinase. A rota biossintética (ver Figura 6) inicia-se com a oxidação de L-tirosina pela tirosinase formando a molécula de L-Dopa (L-dihidroxifenilalanina) (Wakamatsu; Zippin; Ito, 2021). Logo após, a molécula de L-Dopa sofre oxidação pela dopa-oxidase, formando dopaquinona (DQ). A molécula de DQ é o substrato intermediário para a formação de eumelanina ou feomelanina (Kumari *et al.*, 2018).

Neste ínterim, para a formação da eumelanina, a molécula de DQ sofre ciclização intramolecular, originando a ciclodopa, que, após oxidação pela tirosinase TRP-1, formará dopacromo (DC). A molécula de DC sofre descarboxilação espontânea, originando a eumelanina preta: 5,6 dihidroxi-indol (DHI-melanina). Por ação da enzima (TRP-2/DCT-dopacromo tautomerase, dependente de zinco), a molécula de DC é convertida em melanina marrom: ácido 5,6-diidroxi-indol-2-carboxílico (DHIAC) (Wakamatsu; Zippin; Ito, 2021).

A formação da feomelanina (melanina vermelho-amarelada) é dependente de cisteína, que alcança o interior do melanossomo através do transportador de membrana MFSD12 (Marks; Pavan, 2021). A cisteína condensa-se com a dopaquinona, formando cistenildopa (D'Mello *et al.*, 2016). Após reações de ciclização, intermediários benzotiazínicos são formados e, posteriormente, sofrem polimerização, formando a feomelanina (Kumari *et al.*, 2018).

Figura 6- Rota de síntese de melanina



Fonte: do autor.

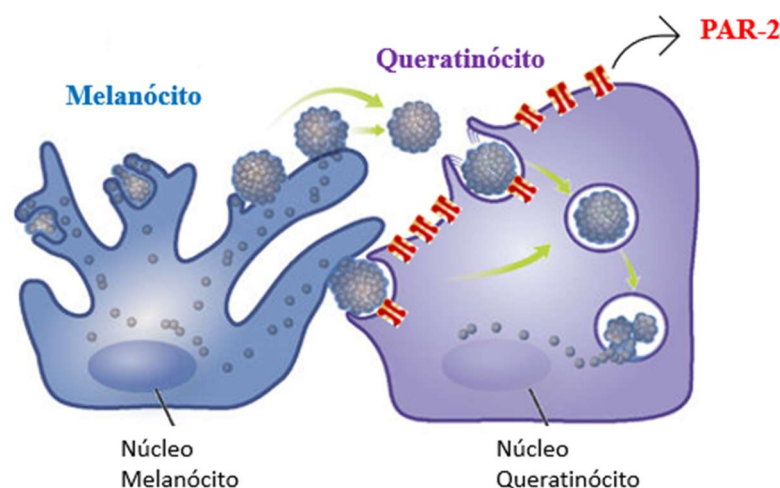
Legenda: L-Tirosina sofre oxidação formando L-Dopa que é convertida em Dopaquinona. A molécula de Dopaquinona pode gerar Feomelanina ou Eumelanina.

2.4.2.3 Transferência dos pigmentos de melanina

A transferência dos pigmentos produzidos ocorre por mecanismos não totalmente compreendidos. Segundo autores, a entrega da melanina pode ocorrer basicamente pela interação entre as membranas do melanócito e do queratinócito, pela fagocitose ou pela fusão entre as membranas (Figura 7) (Benito-martínez *et al.*, 2021; D'Mello *et al.*, 2016).

Os receptores ativados por protease (PAR-2), presente nos queratinócitos, atuam na fagocitose dos melanossomos. A radiação solar ativa o receptor PAR-2 para a transferência dos pigmentos formados (Benito-Martínez *et al.*, 2021).

Figura 7 - Migração dos melanossomos do melanócito para o queratinócito



Fonte: Adaptado de Melanosomes Are Transferred from Melanocytes to Keratinocytes Through the Processes of Packaging, Release, Uptake and Dispersion (Ando *et al.*, 2012).

Legenda: Transferência dos melanossomos do melanócito para o queratinócito;
Os melanossomos dispersam os grânulos de melanina ao redor do núcleo;
PAR-2: Receptor 2 ativado por protease estimulando a fagocitose do melanossomo.

No final da biossíntese de melanina, os melanossomos, ricos em pigmentos, dirigem-se para os dendritos do melanócito facilitando a interação entre o queratinócito (D'Mello *et al.*, 2016).

A melanogênese é, portanto, um evento fisiológico motivado por inúmeros fatores endógenos e externos, acompanhado de incontáveis reações e ações nos queratinócitos e melanócitos, com regulação autócrina e parácrina para a produção dos pigmentos, os quais são necessários para a proteção e coloração da pele, dos cabelos e dos olhos. O melanócito é um dos principais responsáveis pela síntese de melanina, pois produz, armazena e transfere os

pigmentos formados. Além disso, cumpre a sua função na proteção da pele, já que responde para qualquer estímulo recebido (Yuan; Jin, 2018).

2.5 FORMULAÇÕES COSMÉTICAS

A utilização de substâncias cosméticas na pele ou cabelos ocorre desde os tempos antigos, quando egípcios, gregos e romanos utilizavam algum tipo de elemento vegetal, animal ou mineral para proteger, colorir, embelezar ou perfumar a pele (González-Minero; Bravo-Díaz, 2018). As formulações cosméticas compreendem produtos contendo substâncias de origem natural ou sintética para serem aplicados sobre a superfície corporal para a limpeza, proteção e correção de odores corporais; para o embelezamento da pele, cabelos e unhas, com intuito de alterar, colorir ou realçar a aparência (Brasil, 2022). O Brasil é um grande consumidor de cosméticos, destacando-se juntamente com a União Europeia, Estados Unidos, Canadá, Japão, China e Coreia do Sul (Ferreira *et al.*, 2022). Os cosméticos brasileiros são regulamentados pelo Ministério da Saúde, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pela Gerência de Produtos de Higiene, Perfumes, Cosméticos e Saneantes (GHCOS).

No Brasil, os cosméticos são classificados de acordo com o risco oferecido ao consumidor em Grau I ou Grau II. Os produtos de Grau I são aqueles sem contraindicações, utilizados para cuidado, limpeza e realce, como, por exemplo, os produtos para limpeza e hidratação da pele e cabelos. Já os cosméticos de Grau II, são indicados para uso em local específico que precisam de comprovação de eficácia e segurança, como os desodorantes, produtos capilares (tinturas, alisantes e antiquedas), descolorantes, despigmentantes, filtro solar e produtos para uso infantil (Brasil, 2022).

2.5.1 Cosméticos despigmentantes

O aparecimento de lesões hiperpigmentadas na face afeta a harmonia do tom da pele, podendo gerar constrangimento, desconforto psíquico e impacto negativo principalmente na autoestima das mulheres (Jiang *et al.*, 2018). A preocupação com a coloração da face é relevante para as pessoas em diversas partes do mundo. Em alguns países da Ásia, por exemplo, ter-se uma pele uniformemente clara é sinônimo de beleza (Desmedt *et al.*, 2016). Na cultura japonesa, a pele mais pigmentada exerce efeito negativo na aparência, relacionando-a com a classe social inferior. Deste modo, esta população utiliza inúmeras medidas protetivas contra a

exposição solar, como a utilização de cosméticos despigmentantes, fotoprotetores, maquiagem, chapéu, roupas e sombrinhas (guarda-sóis) para prevenir o aumento na síntese de melanina (Hall, 2013). Entre a população brasileira, a maior preocupação é com a aparência física geral, onde o corpo ideal é bem delineado, livre de rugas e com coloração uniforme (Goldenberg, 2005; 2010).

Assim como a aparência física interfere no bem-estar e na autoestima, a uniformidade na coloração da pele traz beleza, segurança e eleva a autoestima (Evangelista *et al.*, 2022). A baixa autoestima pode impactar a saúde mental e fazer com que os relacionamentos e a participação em atividades sociais sejam evitados (Jiang *et al.*, 2018). Por isso, para muitos, corrigir o tom da pele é essencial. Entretanto, o restabelecimento do tom natural da pele pode ser uma etapa difícil, pois determinados tipos de alterações são permanentes exigindo constância nos cuidados cosméticos, além da proteção contra a radiação solar (Trivedi; Yang; Cho, 2017).

Os cosméticos despigmentantes podem interferir na síntese, maturação e liberação dos pigmentos para as camadas superiores da epiderme. Há diversos ativos que interferem na síntese de melanina, como, por exemplo os inibidores da síntese da enzima tirosinase, dependente de cobre (Cassiano *et al.*, 2022). Dentre os inibidores enzimáticos, destacam-se a hidroquinona, o arbutim, os ácidos azeláico, kójico, ascórbico e tranexâmico (Pillaiyar; Manickam; Namasivayam, 2017), a cisteamina (Cassiano *et al.*, 2022), e o ácido salicílico (Wang *et al.*, 2013), entre outros. A hidroquinona é a molécula que exerce maior efeito no clareamento da pele, principalmente quando associada à tretinoína e a um agente corticoide. Contudo, esse ativo pode favorecer o aparecimento de efeitos indesejáveis, como alergia, inflamação e sensibilização no local aplicado (Cassiano *et al.*, 2022). A hidroquinona, assim como a tretinoína e os corticoides, não é permitida em formulações de uso cosmético (Brasil, 2021).

A tretinoína interfere na melanogênese por reduzir a transcrição do gene que codifica a enzima tirosinase (Maddaleno *et al.*, 2021) e por indução da descamação da camada córnea (epidermopoiese), regenerando a epiderme. Além disso, promove a dispersão dos pigmentos melânicos (Leite *et al.*, 2015). Tanto a molécula de arbutim (derivada da uva ursi e do mirtilo) quanto o ácido azeláico (produzido por *Pityrosporum ovale*) (Malik; Kaur, 2020) exercem fraca inibição enzimática.

O ácido kójico, obtido pela fermentação por *Aspergillus spp* (Chaudhary, 2014), e o ácido ascórbico, presente em frutas e vegetais (Valente *et al.*, 2011), inativam a tirosinase,

atuando como quelantes de íon cobre. Entretanto, ambas as moléculas são instáveis, necessitando de um veículo adequado (farmacotecnicamente estabilizado) para garantir a integridade molecular e assim poder exercer a ação (Pillaiyar; Manickam; Namasivayam, 2017).

O ácido tranexâmico apresenta maior efetividade quando utilizado por uso oral ou por aplicação direta (intradérmica) (Cassiano *et al.*, 2022). A cisteamina inibe a tirosinase e eleva os níveis de glutathione no melanossomo. A glutathione liga-se à tirosinase no sítio do íon cobre, inativando-a (Chung *et al.*, 2016). A nicotinamida, forma amida da vitamina B3, atua no receptor ativado por protease (PAR-2), interferindo na interação entre o melanócito e o queratinócito (Wang *et al.*, 2021), inibindo a transferência dos melanossomos contendo os pigmentos formados (Verdy; Branka; Mekideche, 2011).

Os alfa-hidroxiácidos (AHA) são ácidos orgânicos encontrados nos vegetais, como cana-de-açúcar ou em frutas cítricas. Entre eles, destacam-se os ácidos glicólico, fítico, málico, mandélico, entre outros. Esses compostos exercem efeito despigmentante por acelerarem a renovação celular e dispersarem os pigmentos. O ácido salicílico, um beta-hidroxiácido, atua da mesma forma que os AHAs e inibe a tirosinase (Desmedt *et al.*, 2016).

Há muitas substâncias com ação despigmentante atuando em várias etapas da melanogênese. Apesar disso, o controle da hiperpigmentação é muito difícil, pois a formação do pigmento envolve inúmeros estímulos e mecanismos. Muitas formulações destinadas à inibição da síntese de melanina podem acarretar sensibilização, resultando em desistência do tratamento ou serem de elevado valor financeiro (Nautiyal; Wairkar, 2021), desestimulando e inviabilizando seu uso. Dentro dos limites recomendados, os despigmentantes derivados de fontes naturais são considerados mais seguros, já que seus bioativos são sintetizados como metabólitos secundários (Eddin *et al.*, 2022) e podem contribuir para a melhora do melasma devido aos inúmeros benefícios oferecidos à pele (Maddaleno *et al.*, 2021).

2.5.2 Cosméticos contendo ingredientes naturais

Cosméticos contendo extratos naturais vegetais apresentam ativos de origem botânica em sua composição. Este tipo de cosmético está cada vez mais em evidência no mundo, principalmente na América do Norte, Europa e em alguns países da Ásia, que concentram os maiores consumidores de cosméticos à base de plantas (Gamage *et al.*, 2022). O grande

interesse pelo uso de extratos vegetais em cosméticos originou a fitocosmética, área que estuda a ação de princípios ativos vegetais aplicados em cosméticos (Souza; Mello; Lopes, 2012).

Os compostos fitoquímicos pertencem às mais variadas classes, como mucilagens, resinas, gomas, óleos essenciais, lipídeos, peptídeos, aminoácidos, taninos, saponinas, flavonoides, alcaloides e glicosídeos (Souza; Mello; Lopes, 2012). Esses bioativos podem estar presentes em diversas partes do vegetal como nas folhas: boldo (*Peumus boldus*); flores: lavanda (*Lavandula officinalis*); frutos: baunilha (*Vanilla planifolia*); sementes: cacau (*Theobroma cacao*); casca: canela (*Cinnamomum cassia*); lenho: sassafrás (*Ocotea pretiosa*); raiz: valeriana (*Valeriana officinalis*) (Oliveira; Akisue; Akisue, 2014).

Os óleos vegetais podem ser obtidos por prensagem a frio, enquanto os demais componentes são obtidos por maceração, percolação, infusão, decocção, digestão, entre outras.

O teor usual dos extratos vegetais costuma ser no intervalo entre 0,1% e 20%. Concentrações maiores que 5% são indicadas somente para formulações de uso temporário, como sabonetes esfoliantes e máscaras faciais (Souza; Mello; Lopes, 2012).

Para a aplicação em discromias hiperpigmentosas, como o melasma, podem ser utilizados fitoquímicos presentes em várias espécies vegetais, como chá verde (*Camellia sinensis*), extrato de uva (*Vitis vinifera*), alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), cassis ou groselha negra (*Ribes nigrum*), ruibarbo (*Rheum officinale*), sálvia (*Salvia officinalis*), tília (*Tilia platyphyllos*) (Lianza *et al.*, 2020), extrato de margarida (*Bellis perennis*) (Lim, 2014), dentre muitos outros. Assim, devido à riqueza em componentes bioativos, os vegetais podem agir em benefício da saúde geral (medicamentos) e da pele (cosméticos) (Joshi; Pawar, 2015).

2.5.3 Ativos cosméticos da formulação nanodispersa

2.5.3.1 *Bellis perennis* e Belides®

Bellis perennis é uma planta pertencente à família Asteraceae. Trata-se de uma espécie herbácea e perene, medindo entre 10 e 25 cm de altura. Em razão destas características e da bela aparência de suas inflorescências (Figura 8a), é muito encontrada para fins decorativos (Ghorbani *et al.*, 2022) em jardins e campos (Lim, 2014). De origem europeia e asiática, também é encontrada em diversos países das Américas e no norte da África (Ninomiya *et al.*, 2016). Recebe diversas denominações em todo o mundo, como *bellide* na Itália, *petite*

marguerite na França, *bonina* em Portugal e *margarita* na Espanha. No Brasil, é conhecida como margarida (Lim, 2014).

Dentro do gênero *Bellis* encontram-se as espécies *Bellis perennis*, *Bellis annua*, *Bellis sylvestris*, *Bellis cordifolia*, *Bellis microcephala*, *Bellis papulosa* (Calvo; Quintanar; Aedo, 2012). A espécie *Bellis perennis* possui composição química complexa em suas inflorescências, incluindo saponinas triterpênicas (Ninomiya *et al.*, 2016), flavonoides e glicosídeos (Morikawa *et al.*, 2015). Entre os flavonoides identificados destacam-se: quercetina, apigenina, apigenina 7-O- β -D-glicuronídeo, apigenina-7-O-glicosídeo, apigenina 7-O- β -D-metilglucuronídeo, kaempferol, kaempferol 3-O- β -D-glicosídeo e kaempferol 3-O- β -D-glicopiranosídeo, isoramnetina, isoramnetina 3-O- β -D-galactosídeo e isoramnetina 3-O- β -D-(6"-acetil) - galactopiranosídeo (Lim, 2014).

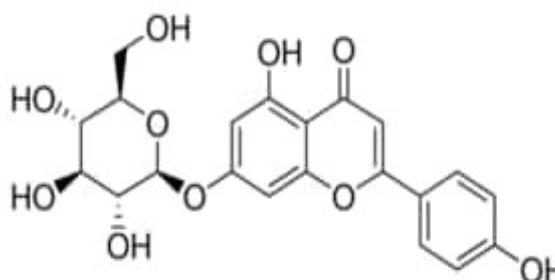
Bellis perennis é utilizada há muito tempo. Durante o período das Cruzadas, na Idade Média, suas propriedades terapêuticas tratavam infecção, indisposição, mal-estar, bem como cicatrizavam os ferimentos (Karahana, 2020). O extrato das flores de *Bellis perennis* possui também substâncias de interesse na área cosmética, as quais conferem ação rejuvenescedora na síntese de colágeno tipo I (Morikawa *et al.*, 2015) e despigmentante (Lim, 2014).

O extrato das flores de *Bellis perennis* é disponível para uso comercial como Belides[®], produto desenvolvido pela empresa alemã CLR-Chemisches Laboratorium (John *et al.*, 2005). Belides[®] apresenta ação despigmentante, atuando na inibição da formação da melanina, interferindo em várias etapas da melanogênese, como diminuição da liberação de endotelina-1 pelos queratinócitos, redução da ligação do hormônio melanogênico em seu receptor, ocasionando a redução na síntese das enzimas melanogênicas. Além disso, Belides[®] pode interferir na transferência da melanina para os queratinócitos (Lim, 2014).

Figura 8 - Inflorescências de *Bellis perennis* e apigenina-7- glicosídeo



a)



b)

Fonte: a) Skin-Lightening Agent with Different Pathways of Action on Melanogenesis (John *et al.*, 2005).
b) www.sigmaaldrich.com

Legenda: a) Imagem das inflorescências de *Bellis perennis*;

b) Estrutura de um dos bioativos presentes no extrato: apigenina-7-O-glicosídeo.

2.5.3.2 Alfabisabolol

A substância alfabisabolol é conhecida também por levomenol e apresenta as conformações α e β , sendo a forma α , a forma ativa (Eddin *et al.*, 2022). Trata-se de um álcool sesquiterpeno insolúvel em água (Souza; Souza; Moraes, 2016). A molécula é composta por 15 átomos de carbono (Figura 9), apresentando-se monocíclica e insaturada (Eddin *et al.*, 2022). Encontrado em várias espécies vegetais, como por exemplo, a sálvia (*Salvia runcinata*), madeira de candeia (*Eremanthus erythropappus*) e na camomila (*Chamomilla recutita*). Este composto bioativo é utilizado como ingrediente cosmético e farmacêutico (Kamatou; Viljoen, 2010).

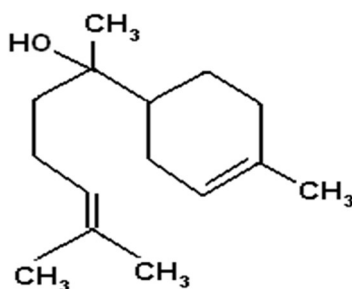
O uso de alfabisabolol é considerado seguro pelo *United States Food and Drug Administration* (FDA). Múltiplas ações farmacológicas do alfabisabolol foram relatadas após a realização estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* (Eddin *et al.*, 2022). Nestes estudos, a molécula de alfabisabolol conferiu ação cicatrizante, calmante, antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana e antineoplásica, bem como exerceu efeito protetor sobre os sistemas: cutâneo, gástrico, renal, cardíaco e nervoso (Eddin *et al.*, 2022).

Na melanogênese, alfabisabolol é capaz de dificultar a interação do hormônio melanogênico α -MSH ao receptor MC1-R, ocasionando a redução nos níveis de AMPc. O baixo nível de AMPc intracelular não é capaz de ativar a proteína de ligação ao elemento responsivo

ao AMPc (CREB), assim, não haverá ativação de MITF, com redução na indução das enzimas melanogênicas (Sivamani; Clark, 2016).

Devido às suas propriedades medicinais, alfabisabolol atua na melhora dos sintomas de distúrbios da pele, como eczema, dermatite atópica, inflamação e melasma (Eddin *et al.*, 2022).

Figura 9- Estrutura da molécula de alfabisabolol



Fonte: www.sigmaaldrich.com.

2.5.3.3 Nicotinamida

A vitamina B₃ é uma vitamina hidrossolúvel, integrando-se ao complexo B. É conhecida também por vitamina PP, devido à sua ação contra a doença pelagra. Apresenta-se na forma ácida como ácido nicotínico ou niacina e na forma amida como nicotinamida ou niacinamida (Bains *et al.*, 2018).

A nicotinamida é um componente de grande importância no metabolismo, sendo convertida nas coenzimas: nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) para atuarem como agentes antioxidantes em diversas reações no organismo (Wohlrab; Kreft, 2014).

A nicotinamida pode ser administrada em uso oral ou em uso tópico. Atualmente a molécula de nicotinamida (Figura 10) disponível para uso cosmético ou farmacêutico é produzida sinteticamente (Wohlrab; Kreft, 2014). A administração oral de nicotinamida é útil no controle das doenças autoimunes por inibir as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF. Também previne a fotocarcinogênese (realiza reparos no DNA) e exerce efeito fotoprotetor (inibe fotodanos no DNA e a imunossupressão induzida por UVA e UVB) (Bains *et al.*, 2018).

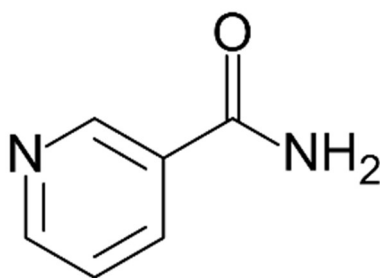
Quando aplicada sobre a pele desempenha inúmeros benefícios à função barreira, pois promove a síntese de ceramidas e de outros lipídeos, reduzindo a perda transepidermal de água.

Além disso, estimula a diferenciação celular e a síntese das proteínas epidérmicas: queratina, involucrina e filagrina. É útil no controle da acne por impedir a proliferação do microrganismo *Cutibacterium acnes*, bem como diminuir a liberação de sebo pelas glândulas sebáceas (Forbat; Al-Niaimi; Ali, 2017; Bains et al., 2018).

Na forma de um cosmético, exerce ação no rejuvenescimento da pele devido ao estímulo na síntese de colágeno e ação contra a glicação das proteínas de sustentação (Bains *et al.*, 2018). Na melanogênese, a nicotinamida interfere na transferência dos pigmentos do melanócito para os queratinócitos.

Numerosas ações benéficas são ofertadas à saúde e à pele pelo uso de nicotinamida, que é um ativo considerado seguro que pode prevenir e tratar danos gerados pela radiação solar e pelo envelhecimento precoce (Boo, 2021).

Figura 10 - Estrutura da molécula de nicotinamida



Fonte: www.sigmaaldrich.com.

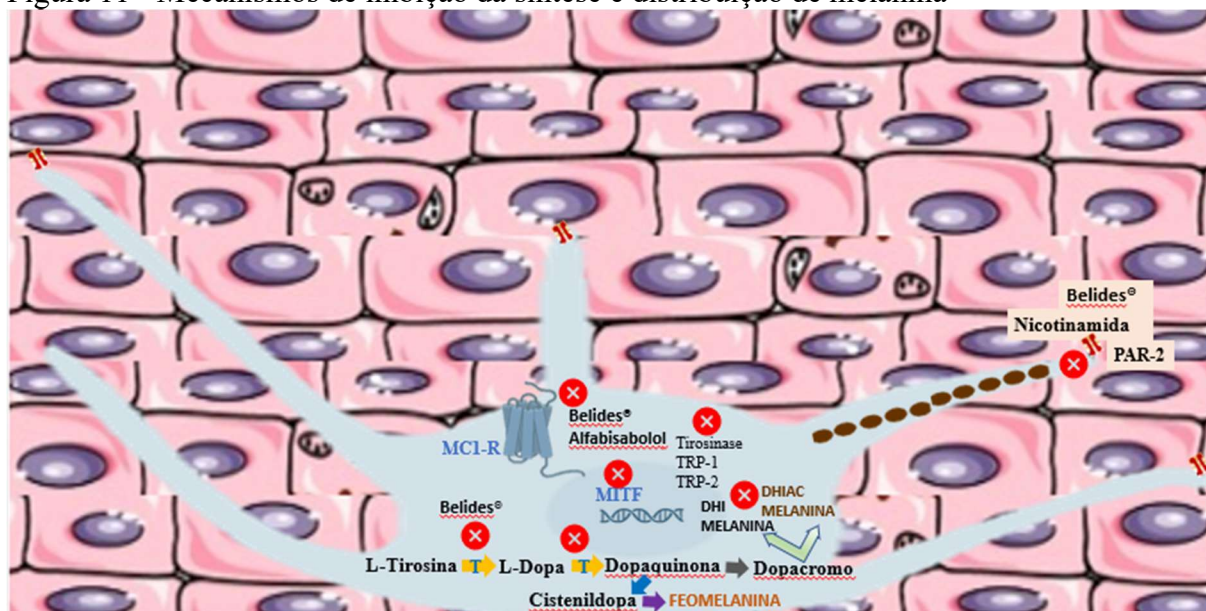
2.6 MECANISMO DE AÇÃO DOS ATIVOS COSMÉTICOS

A diminuição da pigmentação da pele pode ocorrer pela interferência na biossíntese dos pigmentos de melanina por meio do bloqueio de receptores, enzimas e cofatores, bem como na via de regulação e na entrega dos pigmentos (Cassiano *et al.*, 2022). O ativo Belides® atua na diminuição da produção do pigmento de melanina, por diminuir a liberação (pelos queratinócitos) de endotelina-1 após a exposição à radiação solar e dificultar a ligação do hormônio melanogênico em seu receptor, impedindo a síntese das enzimas melanogênicas.

Além disso, inibe a transferência de pigmentos para o queratinócito. O alfabisabolol devido sua ação anti-inflamatória (Amaral *et al.*, 2021) atua na diminuição de mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas e reduz a concentração de AMPc (Sivamani; Clark, 2016) a um nível incapaz de fosforilar os fatores de transcrição para a síntese das enzimas melanogênicas. Já a nicotinamida não diminui a síntese de melanina (Boo, 2021), apenas interfere na entrega dos pigmentos formados.

A Figura 11 demonstra o mecanismo de ação dos ativos Belides®, alfabisabolol e nicotinamida na melanogênese.

Figura 11 - Mecanismos de inibição da síntese e distribuição de melanina



Fonte: Adaptado de Signaling Pathways in Melanogenesis (D'Mello *et al.*, 2016).

Legenda: Após exposição à radiação solar, α -MSH liga-se ao receptor de membrana MC1-R ativando o MITF no núcleo para transcrever as enzimas melanogênicas.

Belides® e alfabisabolol inibem a produção de melanina através do bloqueio de MC1-R.

Nicotinamida e Belides® impedem a transferência dos pigmentos interferindo em PAR-2.

MC1-R: receptor de membrana acoplado a proteína G;

PAR-2: Receptor 2 ativado por protease;

MITF: Fator de Transcrição Associado à Microftalmia,

Enzimas melanogênicas: T: Tirosinase; TPR-1: Tirosinase relacionada a proteína 1;

TPR-2 Tirosinase relacionada a proteína 2.

2.7 SISTEMAS DISPERSOS E NANODISPERSOS

Os sistemas dispersos são formados por duas fases: a fase dispersa e a fase dispersante. Formam-se pela dispersão entre dois compostos imiscíveis, que podem ser de natureza líquida, sólida ou gasosa. Como exemplo, a dispersão de dois líquidos imiscíveis forma uma emulsão,

que é estabilizada por um agente tensoativo. A dispersão entre um gás (na fase dispersa) e um líquido (na fase dispersante) origina uma espuma; já a dispersão entre um líquido ou sólido (na fase dispersa) e um gás (na fase dispersante) produz um aerossol e a dispersão entre um sólido (na fase dispersa) e um líquido (na fase dispersante) forma uma suspensão (Aulton; Taylor, 2016).

Os sistemas nanodispersos possuem dimensões nanométricas, variando entre um nanômetro (nm) até o máximo de 1000 nm (FDA, 2017). São obtidos pela dispersão de duas substâncias imiscíveis, sendo que uma estará na fase dispersa e a outra será a fase dispersante. Compreendem as microemulsões, os cristais líquidos, as nanoemulsões, os lipossomas, as nanopartículas de lipídeo sólido (NLS), os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), dentre outros (Garcia *et al.*, 2021).

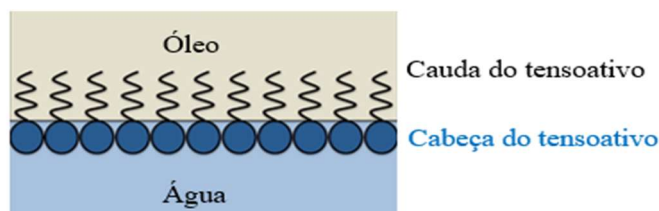
As microemulsões são sistemas nanodispersos homogêneos, transparentes, de baixa viscosidade, comportamento newtoniano (Sisak; Daik; Ramli, 2017) e com gotículas de tamanho nanométrico (entre 10nm e 100 nm) (Garcia *et al.*, 2021). As microemulsões são facilmente preparadas pela dispersão entre as fases aquosa, oleosa e tensoativo(s). Apresentam estabilidade termodinâmica (Szumala; Macierzanka, 2022) e baixa polidispersão, colaborando com a estabilidade do sistema para longo tempo de prateleira (Tessema *et al.*, 2018). Além disso, estes sistemas oferecem proteção ao fármaco da ação enzimática e da variação de pH do trato gastrointestinal (TGI) (Sharma *et al.*, 2015), são biocompatíveis, capazes de solubilizar, abrigar e preservar (contra oxidação e hidrólise) grande concentração de ativos polares e apolares entre a camada interfacial (Leite, 2009), são estáveis à esterilização por filtração (Eloy; Abriata; Marchetti, 2021), podendo ser utilizadas seguramente em medicamentos de uso parenteral.

Estes sistemas receberam a denominação de microemulsão no ano de 1943, por Hoar e Schulman, quando notaram que uma emulsão opaca poderia obter transparência pela adição de um álcool de cadeia média (Sharma *et al.*, 2015).

Os tensoativos são substâncias essenciais para a formação da microemulsão, pois são moléculas capazes de inserir-se na interface de dois líquidos que não se misturam (Figura 12), reduzindo a tensão interfacial e estabilizando a fase dispersa e a dispersante. Os tensoativos são denominados também de surfactantes, anfifílicos, anfipáticos (Aulton; Taylor, 2016) e emulsificantes (Jr; Popovich; Ansel, 2013). São moléculas constituídas por duas porções: hidrofóbica e hidrofílica. A porção hidrofóbica pode ser composta por cadeias de

hidrocarbonetos, enquanto a porção hidrofílica pode ser formada por grupamentos iônicos. Portanto, os tensoativos podem ser de natureza aniônica, catiônica, neutra ou anfótera (Aulton; Taylor, 2016).

Figura 12 – Representação de moléculas de tensoativos na interface



Fonte: Adaptado de Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery (Callender *et al.*, 2017).

Legenda: Molécula de tensoativo com a cabeça polar orientada na região aquosa e cauda hidrofóbica voltada para a região oleosa.

O sistema numérico denominado Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo (EHL) foi elaborado em 1950 por Griffin (Aulton; Taylor, 2016). É baseado na proporção entre os grupamentos lipofílicos e hidrofílicos para classificar o tensoativo e estabilizar o sistema. Na escala entre zero e 18, os tensoativos com números entre três e sete, formarão sistemas água-em-óleo, já tensoativos com números entre oito e 18, formarão sistemas óleo-em-água (Aulton; Taylor, 2016). De acordo com a escolha do(s) tensoativo(s), do(s) cotensoativo(s) e da fase oleosa, podem ser formuladas microemulsões água-em-óleo (A/O) e óleo-em-água (O/A) (Eloy; Abriata; Marchetti, 2021). Nas microemulsões A/O (Figura 12), a camada contínua é oleosa, pois a água se dispersa no óleo; nas microemulsões O/A, as gotículas do óleo são dispersas na água, que compõe a fase externa (Leite, 2009).

Figura 13 -Tipos de microemulsões



Fonte: Adaptado de (MUZAFFAR; SINGH; CHAUHAN, 2013).

Legenda: 1-b microemulsão óleo-em-água

2-b microemulsão água-em-óleo

Para a preparação de microemulsões de uso tópico e oral, os tensoativos não iônicos são os mais seguros e utilizados (Sharma *et al.*, 2015). A adição de cotensoativo expande a área

microemulsionada, aumenta a fluidez da interface (Sisak; Daik; Ramli, 2017) e favorece a formação de gotículas na escala nanométrica (Leite, 2009). A escolha dos constituintes da fase oleosa vai depender do tipo de formulação pretendida, levando-se em consideração as particularidades de cada óleo, como tamanho da cadeia carbônica, tendência à oxidação, características físicas, presença de compostos bioativos e seu poder de solubilização. Uma fase oleosa composta por óleos de cadeias curtas facilita a formação da microemulsão, entretanto, diminuirá o poder de solubilização de ativos lipossolúveis (Sisak; Daik; Ramli, 2017).

Devido às grandes vantagens, os sistemas microemulsionados têm aplicações em diversas áreas, como a farmacêutica, cosmética, biotecnológica, na produção de combustíveis, na indústria de alimentos, dentre outras. Isso aumenta o interesse por parte dos pesquisadores na avaliação desta tecnologia no desenvolvimento e melhoria de medicamentos que apresentam fármacos insolúveis ou instáveis, que podem resultar em baixa dissolução e baixa disponibilidade.

Na área farmacêutica, a utilização de sistemas microemulsionados permite o desenvolvimento de sistema de liberação de fármacos, que podem ser administrados por via oral, parenteral, pulmonar, nasal, ocular (Muzaffar; Singh; Chauhan, 2013), cutânea, (Garcia *et al.*, 2021) e vaginal (Oliveira *et al.*, 2021). A área cosmética beneficia-se das vantagens das microemulsões, pois as formulações apresentam-se com aspecto elegante (transparente), sensorial atrativo e viscosidade adequada, o que permite a formulação de várias formas cosméticas, tais como xampus, desodorantes, loções hidratantes e sérums. Além disso, pode-se utilizar a microemulsão na tecnologia de fabricação de fragrâncias, como produtos funcionais ou na perfumaria fina, eliminando a presença de etanol e promovendo estabilidade (grupos lábeis) das notas olfativas (Azeem *et al.*, 2008). Em alimentos, as microemulsões podem ser úteis na solubilização e na proteção de nutrientes lipofílicos e/ou termolábeis (Silva *et al.*, 2015). A biotecnologia pode contar com melhorias nos processos de síntese e maior estabilidade de enzimas (Muzaffar; Singh; Chauhan, 2013). Em combustíveis, as microemulsões auxiliam na estabilização da amostra para análise de contaminantes (Silva *et al.*, 2015).

Os cristais líquidos são formulações de fase distinta que possuem a organização do estado sólido, mas são fluidos como o estado líquido (Garcia *et al.*, 2021). A proporção de tensoativos, fase oleosa, fase aquosa, temperatura e pH determinam os tipos de estruturas líquidas cristalinas a serem formadas (Eloy; Abriata; Marchetti, 2021), como as mesofases do tipo: lamelar (aspecto de líquido viscoso), hexagonal (aspecto de gel) e cúbica (elevada

viscosidade). A fase cúbica, a lamelar e a hexagonal podem conferir propriedades adesivas (Souza *et al.*, 2021), sendo úteis na preparação de medicamentos para uso interno e tópico (Formariz *et al.*, 2005).

As nanoemulsões são sistemas formados pela dispersão de líquidos imiscíveis, estabilizados por agentes tensoativos. Apresentam-se como sistemas de aspecto translúcido (Rodrigues *et al.*, 2018) e contidas na escala nanométrica (entre 10nm e 1000 nm) (Tayeb *et al.*, 2021). Não apresentam estabilidade termodinâmica; porém, possuem estabilidade cinética (Garcia *et al.*, 2021), pois as gotículas de tamanhos reduzidos sofrem menos colisões (Aulton; Taylor, 2016), evitando a ocorrência de separação de fases, floculação e coalescência (Roberts *et al.*, 2017).

As nanoemulsões diferem das microemulsões na forma do preparo, por possuírem menor concentração de tensoativos e por necessitarem de grande energia para a sua formação. O tamanho reduzido das gotículas auxilia na distribuição homogênea da formulação sobre a pele, formando um filme oclusivo que aumenta a ação. A menor concentração de tensoativos evita a sensibilização do tecido, sendo útil para a produção de medicamentos (de uso contínuo) no tratamento dos distúrbios da pele, tal como as inflamações (Roberts *et al.*, 2017). As nanoemulsões não se formam espontaneamente, sendo produzidas por processos de emulsificação pelos métodos de baixa ou alta energia. Pelo método de baixa energia, as gotículas formam-se com a própria energia do sistema pelo método de inversão de fase. No processo de alta energia, a homogeneização sob alta pressão reduz o tamanho das gotas para a faixa nanométrica (Eloy; Abriata; Marchetti, 2021).

Os lipossomas são estruturas concêntricas compostas por moléculas anfífilas de fosfolipídeos (fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas, fosfatidilgliceróis) que se auto-organizam em vesículas na presença de água e de energia (Aulton; Taylor, 2016). Estas estruturas concêntricas apresentam água no centro das vesículas e entre as bicamadas (Garcia *et al.*, 2021). São formulações bastante utilizadas na área farmacêutica e cosmética (Kathuria *et al.*, 2020), que podem apresentar tamanhos variados (de nanômetro a micrômetro) devido ao número de camadas lipídicas presentes (Aulton; Taylor, 2016). A combinação da formulação de lipossomas convencionais com moléculas de etanol, tensoativos ou outros componentes originou vesículas mais versáteis, como os transfersomas, os etossomas, os invassomas (Garcia *et al.*, 2021), os propossomas, e os glicerosomas (Kathuria *et al.*, 2020).

As nanopartículas de lipídeos sólidos (NLS) são formadas pela dispersão entre um lipídeo sólido e uma fase aquosa, estabilizados por tensoativo(s), produzidos por homogeneização de alta pressão, ultrassom, dentre outros. O carreador lipídico nanoestruturado (CLN), é formado da mesma forma que as nanopartículas NLS; porém possuem além de lipídeo sólido, um ou mais lipídeo na forma líquida (Eloy; Abriata; Marchetti, 2021). A inserção da molécula do lipídeo líquido na nanoestrutura evita a recristalização ordenada do lipídeo sólido na matriz, criando regiões amorfas, o que evita a expulsão do fármaco da matriz lipídica (Garcia *et al.*, 2021). Essas nanopartículas possuem estabilidade física e podem ser empregadas em medicamentos de uso parenteral, oral, tópico, transdérmico, dentre outros (Eloy; Abriata; Marchetti, 2021). A indústria cosmética pode desenvolver produtos com agradável sensorial, garantindo a estabilidade de moléculas hidrofóbicas de interesse cosmético, como vitamina E, retinol e coenzima Q10. Além disso, as nanoestruturas aderem à superfície da pele proporcionando efeito oclusivo (que diminui a perda transepidermal de água), o que aumenta a penetração do ativo e consequente ação (Roberts *et al.*, 2017).

2.8 DIAGRAMA DE FASES

A construção de diagramas de fase é um método pelo qual se podem desenvolver sistemas dispersos. Os diagramas de fase são representações gráficas indicadas na forma de um triângulo equilátero, sendo que os vértices (A, B, C) representam cada um dos componentes, tais como tensoativo(s), fase oleosa e fase aquosa (Damasceno *et al.*, 2011). São elaborados após a mistura de fase oleosa e tensoativos pelo método da titulação lenta de água (Muzaffar; Singh; Chauhan, 2013). Para o desenvolvimento de microemulsões, pode-se utilizar os diagramas de fases como um meio de ilustrar os sistemas formados, indicando as regiões que apresentam alterações macroscópicas como a separação de fases, regiões sugestivas de microemulsão e de cristal líquido, bem como as regiões emulsionadas (Silva *et al.*, 2015). Um sistema composto por água, óleo e tensoativo pode ser representado em um diagrama de fase ternário; já o que possui quatro componentes é demonstrado pelo de diagrama de fase pseudoternário (Damasceno *et al.*, 2011). Deste modo, a construção de diagramas de fase facilita a obtenção de sistemas estáveis, pois permite encontrar as regiões de melhor combinação entre os ingredientes (Jr; Popovich; Ansel, 2013).

3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de um sistema nanodisperso seguro e estável para a formulação de um produto contendo ativos cosméticos para o controle do melasma. Para isso, os objetivos específicos foram cumpridos.

3.1 GERAL

Desenvolver um sistema nanodisperso, preferencialmente uma microemulsão, para a formulação de um produto cosmético sensorialmente adequado, seguro e estável, contendo os ativos Belides[®], nicotinamida e alfabisabolol, para o controle do melasma.

3.2 ESPECÍFICOS

- Construir os diagramas de fase à base de tensoativos, emolientes e água com intuito de selecionar um sistema fluido de baixa viscosidade e elevado conteúdo aquoso com os parâmetros físico-químicos adequados para um sistema nanodisperso do tipo microemulsão;
- Formular um produto cosmético contendo os ativos Belides[®], nicotinamida e alfabisabolol, visando atingir a epiderme viável e inibir/diminuir a produção excessiva de melanina;
- Desenvolver e validar a metodologia analítica por LC-MS/MS para a quantificação de nicotinamida e apigenina-7-O-glicosídeo (marcador do Belides[®]);
- Desenvolver e validar metodologia analítica por GC-MS para a quantificação de alfabisabolol;
- Avaliar a estabilidade físico-química do sistema em conformidade com os critérios de estudo de estabilidade acelerada da ANVISA;
- Avaliar a segurança do sistema desenvolvido para uso na pele por meio de estudo *in vitro* de viabilidade celular ANVISA;
- Avaliar a difusão dos ativos na epiderme viável através de estudos *in vitro* de permeação e retenção cutânea.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nos tópicos a seguir, há a relação dos equipamentos, materiais e métodos utilizados para o desenvolvimento do trabalho.

4.1 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES

4.1.1 Equipamentos

- Banho-maria SL 150, SOLAB;
- Cabine de proteção biológica: Bio protector 09, Grupo Veco;
- Centrífuga 80-2B analógica 12x15 mL 4000 rpm;
- Centrífuga: analógica 12x15 mL 4000 rpm CENTRIBIO CE131;
- Célula de difusão vertical Hanson Research®;
- Condutivímetro: LUCA-150;
- Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas mono quadrupolo, GC-MS, modelo QP 2010 Plus – Shimadzu®, equipado com autoinjeter. Coluna capilar OPTIMA® (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano) com diâmetro interno 0,25mm, espessura do filme 0,25µm, comprimento de 30 metros;
- Cromatógrafo Líquido acoplado ao Espectrômetro de Massas triplo quadrupolo LC-MS/MS, modelo LC-MS 8030 Shimadzu®, com sistema composto por duas bombas LC-20AD, um autoamostrador SIL-20 AHT, uma válvula de seis pórtipos FCV-20AH₂. Coluna Cromatográfica: Phenomenex® Aqua 5µm C18 125 Å, 150 x 4,6 mm;
- Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier, IRAffinity 1;
- Estufa: Lucadema®, modelo 80/100 (220V, 1200w);
- Incubadora de CO₂ Thermo Scientific;
- Lavadora ultrassônica Unique;
- Leitor de microplaca Asys UVM 340;
- Microscópio Nikon Eclipse TS 100;
- pHmetro Sartorius, modelo Docu-pHmeter;

- Refrigerador Eletrolux[®], modelo R 360;
- Reômetro Brookfield, modelo RV-DV3T, cone-placa;
- Zetasiser Nano ZS, modelo ZEN3601 (Malvern Instruments Ltd., UK).

4.1.2 Materiais e reagentes

4.1.2.1 Padrões analíticos

- Nicotinamida: Lote: BCCF2563, Sigma Aldrich Brasil LTDA;
- Apigenina-7-O-glicosídeo: Lote: LRAC2234, Sigma Aldrich Brasil LTDA;
- Alfabisabolol: Lote: BCCCF5411, Sigma Aldrich Brasil LTDA;

4.1.2.2 Reagentes

- Metanol UV/HPLC Lote: 112266, Dinâmica Química Contemporânea LTD;
- Acetonitrila J.T Baker: Lote: UN1648;
- Ácido fórmico 85%: Lote: 0704187, Vetec Química Fina LTDA;
- Solução padrão de KCL 0,001M (146,9 $\mu\text{S}/\text{cm}$) Lote: 73150816, MS Tecnopon Instrumentação;
- DMSO: Lote: 0903581, Vetec Química Fina LTDA.

4.1.2.3 Soluções

- Solução-estoque de apigenina-7-O-glicosídeo e nicotinamida nas concentrações de 1000 mg/mL e 10 mg/mL, preparadas em metanol;
- Solução-estoque de alfabisabolol (1000 mg/mL e 10 mg/mL) preparadas em acetonitrila;
- Fase móvel (LC-MS/MS): metanol/ solução ácido fórmico 0,1% (92:8, v/v) e metanol/ água (92:8, v/v) como fase de limpeza;
- Fase móvel (CG-MS): gás Hélio;
- Tampão Fosfato: PBS 10X pH 7.4;
- Meio de cultura RPMi 1640, Lote: 5599, Cultilab LTDA;
- Meio de cultura dulbecco mem (DMEM), Lote: 5589, Cultilab LTDA;
- Soro fetal bovino Lote: 4520-500, Cultilab LTDA;
- Solução de tripsina: Lote: Cultilab LTDA;

4.1.2.4 Ativos cosméticos e excipientes

- Nicotinamida - Lote: 21E18-B010-078034, Excipienta;
- Belides® - Lote: 3213872, Pharmaspecial;
- Alfabisabolol - Lote: 03406F21, Engenharia das Essências;
- BHT: Lote - ALL 41348, All Chemistry.
- EDTA - Lote: ALL 06200, All Chemistry.
- Caprililglicol - Lote: 190530-15, Engenharia das Essências;
- Fenoxietanol - Lote:143080, Engenharia das Essências;
- Cetiol Ultimate - Lote:79175, Engenharia das Essências;
- Cetiol CC - Lote:0023346526, Engenharia das Essências;
- Tween 20 - Lote: SLBW4062, Sigma Aldrich Brasil LTDA.
- Óleo de rícino hidrogenado etoxilado (RH-40): Lote:AUTO239217, Mapric;
- Span 80 - Lote:1768435, Croda do Brasil.

4.1.2.5 Células

- Fibroblastos (células L929).

4.2 DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANODISPERSOS PARA INCORPORAÇÃO DE NICOTINAMIDA, BELIDES®, E ALFABISABOLOL

4.2.1 Construção dos diagramas de fase e seleção de sistemas transparentes líquidos

Foram construídos cinco diagramas de fase pela titulação lenta de água purificada sobre uma mistura de tensoativo(s) e ingrediente(s) de fase oleosa (peso final de cinco gramas) em nove diferentes proporções (ver Tabela 1 e Quadro 1).

Inicialmente, para cada um dos nove sistemas (1:9; 2:8; 3:7; 4:6; 5:5; 6:4; 7:3; 8:2; 9:1) titulou-se uma quantidade fixa de água, sendo realizadas duas adições de 125 µl. Depois, cada sistema recebeu, gradativamente, mais 19 adições de 250 µl e, por fim, mais 30 adições de 500 µl. Ao final da titulação, o peso total da adição de água sobre cada um dos sistemas resultou na massa de 25 gramas. Entre cada titulação, os sistemas foram homogeneizados e deixados em repouso para posterior observação e avaliação.

Após 10 minutos de repouso, pela observação macroscópica, classificaram-se os sistemas obtidos em: sistema transparente líquido, sistema transparente viscoso, sistema opaco viscoso, sistema opaco líquido ou separação de fases. Todos os diagramas de fases obtidos foram plotados como gráfico pelo software *SigmaPlot10*[®].

Tabela 1 - Proporções de T e FO

Proporção de tensoativo	Proporção de fase oleosa	Sistema
1	9	1:9
2	8	2:8
3	7	3:7
4	6	4:6
5	5	5:5
6	4	6:4
7	3	7:3
8	2	8:2
9	1	9:1

Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos UNIFAL-MG (2021).

Legenda: T: tensoativo; FO: fase oleosa.

Quadro 1 – Relação entre tensoativo(s) e fase oleosa dos diagramas e seus sistemas

Diagrama de Fases	Código do sistema selecionado	Tensoativo(s)	Fase Oleosa
1°	PEG	PEG 40	TACC
2°	PEGSPAN85	PEG 40/SPAN 85	TACC
3°	-	PEG 40	TACC/Silicone Volátil
4°	PEGSILICONE	PEG 40	TACC/Silicone Volátil
5°	PEGSPANTWEEN	PEG 40/SPAN 80/ TWEEN 20	Cetiol Ultimate/ Cetiol CC

Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos UNIFAL-MG, (2021).

Legenda: **PEG 40**: óleo de rícino RH 40 hidrogenado etoxilado;

Span 80: oleato de sorbitano;

Span 85: trioleato de sorbitano;

Tween 20: monolaurato de polietilenoglicol sorbitano;

Tacc: triglicerídeos de ácido cáprico caprílico;

Cetiol ultimate: undecano e tridecano;

Cetiol cc: carbonato de dicaprilil;

Silicone volátil: ciclopentasiloxano.

A partir da obtenção dos diagramas de fases e da definição por análise macroscópica, foram selecionados vários sistemas líquidos transparentes para serem reproduzidos a partir dos valores correspondentes de água, fase oleosa, tensoativos/cotensoativo, indicados pelos gráficos dos diagramas.

Após a seleção dos sistemas líquidos transparentes (por análise macroscópica), seguiu-se com a avaliação pré-estabilidade e caracterização físico-química para predizer se os sistemas

pertenciam à região de microemulsão quanto ao tamanho de gotícula (inferior a 100 nm) e homogeneidade na distribuição do tamanho de gotículas (com um baixo índice de polidispersividade $<0,2$). Após as análises físico-químicas, escolheu-se o sistema com maior conteúdo aquoso, menor viscosidade, para caracterização mais detalhada, desenvolvimento do produto e avaliação da estabilidade acelerada. A relação entre os constituintes (em porcentagem) está especificada na Tabela 2.

Tabela 2 – Proporção entre FA, FO e T dos sistemas selecionados			
Sistema	Fase Aquosa (%)	Tensoativo(s) (%)	Fase Oleosa (%)
PEG	58,33	37,50	4,17
PEGSPAN85-1	69,70	24,24	6,06
PEGSPAN85-2	69,70	27,27	3,03
PEGSILICONE-1	64,29	25,00	10,71
PEGSILICONE -2	64,29	28,57	7,14
PEGSILICONE -3	69,70	27,27	3,03
PEGSPANTWEEN-1	75,00	20,00	5,00
PEGSPANTWEEN-2	80,00	18,00	2,00

Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos UNIFAL-MG (2021).

Legenda: FA: fase aquosa; FO: fase oleosa; T: tensoativo.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SISTEMAS LÍQUIDOS TRANSPARENTES LÍQUIDOS

4.3.1 Teste de centrifugação pré-estabilidade

Conforme recomendado pelo Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (Brasil, 2004), a estabilidade física do produto deve ser avaliada antes do início do estudo de estabilidade acelerada. As situações de estresse como agitação, altas temperaturas, bem como incompatibilidade entre os ingredientes, podem gerar desestabilização física, resultando em separação de fases, precipitação ou coalescência (Ueoka; Moraes, 2018).

Os sistemas líquidos transparentes foram analisados por meio de centrifugação em temperatura ambiente. Cinco gramas de amostra foram colocados em tubo tipo Falcon (capacidade 15 mL) e centrifugados a 3000 rpm por 30 minutos (Brasil, 2004).

4.3.2 Tamanho das gotículas e índice de polidispersividade

O tamanho de gotículas e o índice de polidispersividade (PdI) dos sistemas líquidos transparentes foram determinados por dispersão dinâmica de luz, utilizando um Zetasizer Nano ZS, modelo ZEN 3601 (Malvern Instruments Ltd., UK), com ângulo fixo de 173°, em 25 °C.

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os dados foram coletados e analisados no Zetasizer Software (v. 7.11).

4.3.3 Determinação do pH

O valor de pH dos sistemas líquidos transparentes foi determinado por um pHmetro Sartorius, modelo Docu-pHmeter.

4.3.4 Condutividade

A condutividade (em $\mu\text{S}/\text{cm}$) dos sistemas líquidos transparentes foi determinada em 25°C, utilizando o equipamento Zetaziser Nano ZS modelo, ZEN 3601 (*Malvern Instruments Ltd., UK*). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os dados foram coletados e analisados no Zetasizer Software (v. 7.11).

Para confirmar o tipo de fase externa do sistema final, utilizou-se o condutivímetro LUCA-150, que foi calibrado com solução padrão de KCl 146,9 $\mu\text{S}/\text{cm}$, em 25 °C. Para o experimento, pesaram-se quantidades já definidas de tensoativos e fase oleosa (9:1) para formar uma mistura de cinco gramas. Sobre essa mistura, introduziu-se o eletrodo diretamente após cada titulação de água (com posterior homogeneização). A mistura recebeu duas adições de 125 μL de água purificada e, em seguida, recebeu, gradativamente, mais 19 adições de 250 μL e, por fim, mais 30 adições de 500 μL . Aguardou-se o tempo para a estabilização da resposta entre cada adição (sob homogeneização), para a leitura da condutividade.

Um gráfico foi construído (Figura 22), relacionando os valores de condutividade em função dos volumes de água adicionados.

4.3.5 Potencial Zeta

Os sistemas líquidos transparentes tiveram o potencial zeta determinado por dispersão eletroforética de luz utilizando um Zetaziser Nano ZS modelo, ZEN 3601 (*Malvern Instruments Ltd., UK*), em 25 °C. A análise foi realizada em triplicata. Os dados foram coletados e analisados no Zetasizer Software (v. 7.11).

4.3.6 Reologia

O perfil reológico dos sistemas líquidos transparentes foi avaliado (em triplicata) por um Reômetro Brookfield, modelo RV-DV3T, cone-placa, acoplado a um computador com o Software *Rheocalc* v.3.2, *Brookfield Engineering Laboratories*. De acordo com o valor de torque encontrado em teste prévio, bem como das características da amostra, o spindle CPA-40Z foi definido para a realização das análises. As determinações foram realizadas em 25 °C.

4.4 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA POR LC-MS/MS PARA QUANTIFICAÇÃO DE NICOTINAMIDA E APIGENINA-7-O-GLICOSÍDEO

O desenvolvimento do método foi realizado utilizando um cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas triplo quadrupolo: LC-MS/MS, modelo LC-MS8030 da Shimadzu®. O sistema é composto por duas bombas LC-20AD, um autoamostrador SIL-20 AHT, uma válvula de seis pórtipos FCV-20AH₂ (todos obtidos da Shimadzu®). Os dados foram tratados pelo software *LabSolutions*® (versão 5.42, Shimadzu®). As temperaturas de dessolvatação e do bloco de aquecimento foram de 250 °C e 400 °C, respectivamente. As vazões utilizadas para o gás de nebulização e o gás de secagem foram, respectivamente 2 e 15 mL/min.

O padrão de apigenina-7-O-glicosídeo foi utilizado no desenvolvimento do método para avaliação do produto Belides® que sendo extrato floral de *Bellis perennis*, possui inúmeros compostos bioativos, inclusive a molécula de apigenina-7-O-glicosídeo.

O modo de ionização por eletrospray positivo (ESI⁺) foi empregado para a nicotinamida, enquanto o modo de ionização por eletrospray negativo (ESI⁻) foi empregado para apigenina-7-O-glicosídeo. As transições individuais para nicotinamida [íon precursor (M+H) 123,05 m/z] e apigenina-7-O-glicosídeo [íon precursor (M-H) 431,38 m/z] foram otimizadas por monitoramento de reações múltiplas (MRM) (Sallabi *et al.*, 2021).

O critério de identificação dos analitos foi a presença de três fragmentos, sendo que para a nicotinamida os íons apresentaram as seguintes razões massa/carga: 80 m/z, 78 m/z e 53 m/z (Liu *et al.*, 2012). O íon de 80 m/z foi selecionado para a quantificação da nicotinamida (apresentou maior intensidade de sinal). Para o analito apigenina-7-O-glicosídeo, a razão massa/carga dos principais fragmentos foi de 269,10 m/z, 268,10 m/z e 311,10 m/z (Jia *et al.*,

2020). A quantificação foi realizada pelo monitoramento do fragmento mais intenso da apigenina-7-O-glicosídeo (268,10 m/z).

Para a análise cromatográfica, empregou-se a coluna cromatográfica Phenomenex® Aqua 5 µm C18 125 Å, 150 x 4,6 mm. Testaram-se várias composições de fase móvel com diferentes solventes. A fase móvel composta por metanol/solução de ácido fórmico 0,1% foi avaliada sob o fluxo de 0,4 mL/min nas seguintes proporções: 90:10 v/v e 95:5 v/v. Na proporção 92:8 v/v, testaram-se três valores de fluxo: 0,30, 0,35 e 0,40 mL/min. Já a fase móvel composta por acetonitrila/solução de acetato de amônio 10 mM foi avaliada nas proporções de 70:30 v/v; 80:20 v/v; 90:10 v/v, sob fluxo de 0,3 mL/min.

Estudou-se também o comportamento dos analitos com relação à área alcançada, bem como a intensidade do sinal nos solventes acetonitrila e metanol. Testaram-se diferentes vazões da fase móvel, para a otimização do fluxo. Após ajustar todos os parâmetros, injetou-se 10 µL de amostra, obtendo-se os espectros de massa dos analitos nicotinamida e apigenina-7-O-glicosídeo.

4.5 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA POR GC-MS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ALFABISABOOL

Para o desenvolvimento do método analítico para o alfabisabolol, utilizou-se um cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas monoquadrupolo, GC-MS, modelo QP 2010 Plus, Shimadzu®. O cromatógrafo é equipado com autoinjeter, coluna capilar Optima® (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano) com diâmetro interno 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm, comprimento de 30 metros. O fluxo do gás Hélio foi ajustado para 10 mL/min, velocidade linear de 44,3 cm/s e pressão de 149,5 kPa. O injetor foi operado no modo *splitless* em 250 °C. O forno foi programado em isoterma a 220 °C por 4 minutos.

O padrão de alfabisabolol foi preparado em acetonitrila na concentração de 1000 mg/L. Para análise no modo SCAN e no modo SIM, foram injetados 2 µL da solução do padrão na concentração de 1 mg/L. As relações m/z observadas foram 109, 119 e 204 (Sethupathy *et al.*, 2016). Realizou-se a quantificação do analito por meio da integração da área do pico de razão massa/carga de 119.

4.6 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

O método analítico foi validado conforme a RDC 166 de 24/07/2017 (Brasil, 2017). A seletividade do método analítico desenvolvido para os ativos foi evidenciada por meio de comparação de um cromatograma do branco com um cromatograma de um padrão do analito.

A linearidade dos métodos foi avaliada por meio de cinco concentrações (em triplicata) no intervalo de 80% a 120% da concentração teórica da formulação. Para a nicotinamida, utilizaram-se as concentrações de 5; 10; 20; 40; e 60 mg/L. Para a apigenina-7-O-glicosídeo, os valores de concentração foram de 0,2; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,2 mg/L, já para o analito alfabisabolol, utilizaram-se as concentrações de 10; 20; 40; 60; 80 e 100 mg/L.

Construiu-se o gráfico das respostas analíticas em função da concentração do analito, juntamente com a avaliação estatística. Apresentou-se a Equação de regressão de y em x, estimada pelo método dos mínimos quadrados, indicando os coeficientes de determinação (r^2) e de correlação (r), sendo que este deve ser superior de 0,990.

A precisão foi avaliada em função da repetibilidade. Efetuaram-se nove análises, sendo três análises para a concentração baixa, três análises para a concentração média e três análises para a concentração alta em relação à concentração teórica. Para a nicotinamida, utilizaram-se as concentrações de 5; 20 e 60 mg/L. Para a apigenina-7-O-glicosídeo, os valores de concentração foram de 0,5; 1,0 e 2,2 mg/L, já para o analito alfabisabolol, utilizaram-se as concentrações de 10; 40 e 100 mg/L. As análises foram realizadas pelo mesmo analista, em uma única corrida. A precisão foi calculada pelo desvio padrão relativo, pela Equação 1, conforme a RDC 166, 24/07/2017, em que: σ = desvio padrão e CMD = concentração média obtida.

$$DPR = \frac{\sigma}{CMD} \times 100 \quad (1)$$

A exatidão do método foi determinada pelas análises (em triplicata) das concentrações de baixa, média e alta (conforme as concentrações utilizadas no ensaio da precisão para cada um dos analitos) em relação à concentração teórica da formulação, sendo expressa pelo percentual de recuperação entre a concentração média obtida e a concentração teórica, conforme Equação 2, em que: σ = desvio padrão; CM exp. = concentração média experimental; C teórica = concentração teórica.

$$\text{Recuperação} = \frac{CM \text{ exp.}}{C \text{ teórica}} \times 100 \quad (2)$$

O limite de detecção é indicado pela menor concentração do analito que pode ser encontrada na amostra. O limite de detecção (LD) foi calculado pelos dados obtidos pela curva analítica por meio da Equação 3, em que: σ = desvio padrão; m = coeficiente angular.

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{m} \times 100 \quad (3)$$

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser obtida com precisão e exatidão, sendo calculado pela Equação 4, em que: σ = desvio padrão; m = coeficiente angular.

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{m} \times 100 \quad (4)$$

4.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA DO SISTEMA SELECIONADO PARA FORMULAÇÃO FINAL

O sistema final escolhido, contendo os ativos cosméticos foi submetido ao estudo de estabilidade acelerada no laboratório de Tecnologia de Cosméticos, UNIFAL-MG. O estudo foi conduzido conforme o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (Brasil, 2004), objetivando verificar as possíveis alterações nos aspectos macroscópicos e físico-químicos, bem como alterações no teor dos ativos cosméticos Belides® (marcador: apigenina-7-O-glicosídeo), nicotinamida e alfabisabolol.

4.7.1 Condições do estudo

As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro incolor (Figura 14), os quais foram bem fechados para impedir a perda de líquido para o meio conforme recomendado (Brasil, 2004).

Figura 14 - Amostras do sistema final para o estudo de estabilidade



Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos, UNIFAL-MG (2022).

Após a preparação do sistema com os ativos, uma amostra foi analisada (dia zero) quanto às características macroscópicas: cor, odor e aspecto; às características físico-químicas: tamanho de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta, condutividade, viscosidade e pH, conforme o item 4.3. O teor dos ativos cosméticos hidrofílicos (nicotinamida e apigenina-7-O-glicosídeo) foi avaliado por LC-MS/MS (conforme o item 4.4) e do ativo alfabisabolol pelo GC-MS (conforme o item 4.5).

Após o acondicionamento, as amostras foram distribuídas em diferentes condições de temperatura e armazenadas no laboratório de Tecnologia de Cosméticos da UNIFAL-MG:

- Temperatura ambiente (aprox. 25 ± 2 °C): amostras protegidas da luz foram mantidas sobre a bancada e analisadas nos dias 1°, 7°, 15°, 30°, 60° e 90°.
- Temperatura de 40 ± 2 °C: amostras permaneceram em estufa e foram analisadas nos dias 1°, 7°, 15°, 30°, 60° e 90°.
- Temperatura de 5 ± 2 °C: amostras foram mantidas em refrigerador e analisadas nos dias 1°, 7°, 15°, 30°, 60° e 90°.

4.8 AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

Para a avaliação da permeação cutânea *in vitro* dos ativos cosméticos, foram utilizados fragmentos de pele de orelha de porco em célula de difusão vertical (tipo Franz). As orelhas suínas (íntegras) foram obtidas e lavadas com água destilada para o preparo da pele. O excesso de pelo do estrato córneo foi removido delicadamente com uma tesoura e com o auxílio de um bisturi, a pele foi descolada. Após a retirada do excesso de tecido adiposo, a pele foi mantida congelada a -70 °C até a sua utilização. Para o experimento, cortou-se a pele em fragmentos de tamanhos adequados à área de difusão.

A célula de difusão vertical (tipo Franz) apresenta área difusional de 1,77 cm² e dois compartimentos: o doador e o receptor (Figura 15). Os compartimentos receptores possuem capacidade de 7 mL e foram preenchidos com tampão fosfato 20 mM com pH 7,4 (previamente filtrado e degaseificado).

Os fragmentos de pele foram colocados entre os compartimentos doador e receptor, estando a porção dérmica em contato com a solução receptora e mantida em 32 ± 1 °C (pelo banho de água circulante) e agitação de 300 rpm. No compartimento doador, adicionou-se 200

μL do sistema cosmético contendo Belides[®], niacotinamida e alfabisabolol. Após 30 minutos do início do experimento, coletou-se 1 mL do meio receptor para a quantificação dos ativos. Após cada coleta, restituiu-se o volume retirado com tampão fosfato. Novas alíquotas de mesmo volume foram coletadas após uma hora e a cada hora, perfazendo sete coletas (0,5; 1; 2; 3; 4; 5 e 6 h). O experimento foi realizado em triplicata.

A quantificação dos ativos foi realizada por LC-MS/MS. Para o cálculo da quantidade real que atravessou a pele, levaram-se em consideração as quantidades retiradas em cada coleta. A Equação 5 foi utilizada para determinar a quantidade real permeada (Sato *et al.*, 2007).

$$Q_{\text{real},t} = C_{\text{mensurada},t} \cdot V_r + V_a \cdot \sum^{n-1} C_a \quad (5)$$

$Q_{\text{real},t}$ = Quantidade real no tempo t;

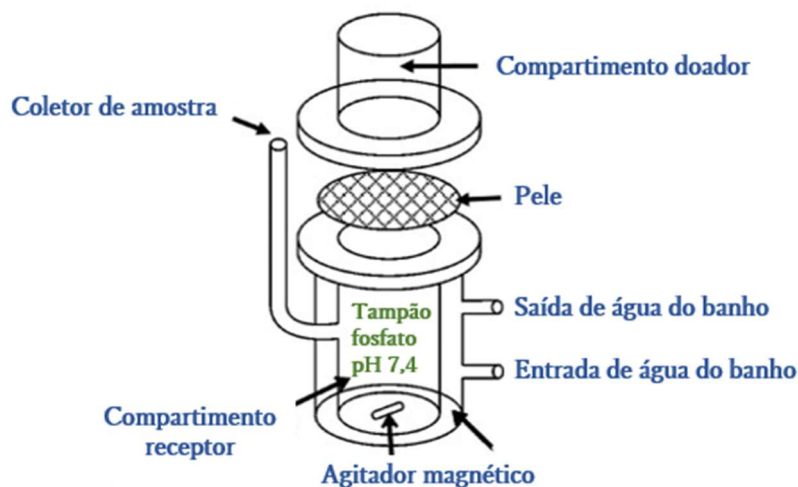
$C_{\text{mensurada},t}$ = concentração mensurada da coleta no tempo;

V_r = volume do compartimento receptor;

C_a = concentração removida; V_a = volume removido.

Após decorridas as seis horas do estudo da permeação cutânea, avaliou-se a retenção dos ativos cosméticos no estrato córneo pela técnica do *tape stripping*. Essa técnica pode indicar se as moléculas ativas ficaram retidas no estrato córneo ou se foram capazes de penetrar nas camadas da pele (Jonsdottir *et al.*, 2022). Os fragmentos de pele foram retirados da célula de difusão vertical, enxaguados com a solução tampão e fixados em um suporte (na área demarcada para a permeação, conforme Figura 16). Para a remoção do estrato córneo, aplicou-se uma leve pressão sobre a pele na área demarcada. Utilizaram-se 15 tiras de fita adesiva transparente Scotch 3M[®] (descartando-se a primeira). As tiras foram colocadas em tubo tipo Falcon de 50 mL com 10 mL de metanol (para a extração dos ativos) e submetidas à agitação por 15 minutos. Em seguida, o tubo contendo as fitas foi mantido por 15 minutos em banho de ultrassom. Logo após, filtrou-se o conteúdo do tubo em membrana de 0,45 μm . O filtrado foi analisado por LC-MS/MS.

Figura 15 – Modelo de célula de difusão



Fonte: Adaptado de (Pulsoni *et al.*, 2022): Comparison Between Franz Diffusion Cell and a novel Micro-physiological System for In Vitro Penetration Assay Using Different Skin Models.

Figura 16 – Pele de orelha suína e área de permeação



Fonte: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, UNIFAL-MG, (2022).

4.9 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Recomendado pelo Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos da ANVISA (ANVISA, 2012), o estudo de viabilidade celular tem por objetivo verificar se os produtos em desenvolvimento são seguros para as células humanas. O ensaio foi realizado com linhagens de fibroblastos L929 obtidas do laboratório de Cultura de Células da UNIFAL-MG, em parceria com o professor Dr. Marcos Vinícius Salles Dias. Este ensaio consiste na reação colorimétrica que ocorre devido a atividade das enzimas mitocondriais em metabolizar o sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT).

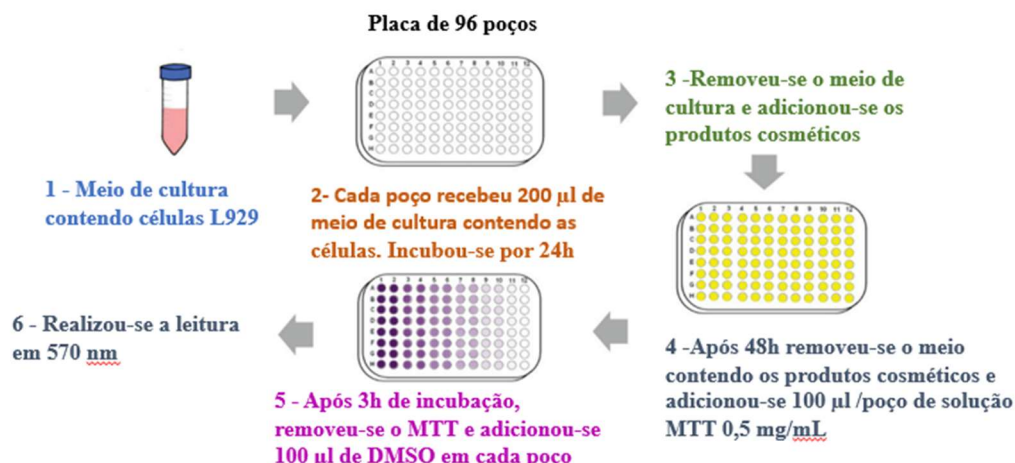
Após terem sido retiradas do reservatório de nitrogênio (-196 °C), uma alíquota (1 mL contendo as células em soro fetal bovino com 5% de DMSO em criotubo) foi descongelada em

banho-maria a 37 °C. Após total descongelamento, em cabine de proteção biológica, o conteúdo do tubo criogênico foi transferido para um tubo tipo Falcon contendo 1 mL de meio de cultura (DMEM) que foi previamente suplementado com soro fetal bovino e antibióticos. O tubo foi centrifugado por seis minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi ressuspensionado com 1 mL de meio de cultura. Em seguida, o conteúdo do tubo foi transferido para uma garrafa de cultura de 25 cm² contendo 4 mL do meio. A garrafa foi acondicionada em incubadora a 37 °C e 5% CO₂. Após o crescimento celular, foi necessário realizar a passagem das células para outras garrafas, com isso obteve-se quatro garrafas contendo células de fibroblastos L929.

Para o preparo da placa, retiraram-se as células das garrafas por meio da tripsinização. As células foram contadas na Câmara de Neubauer e semeadas na concentração de 2×10^4 por poço. Testou-se os ativos cosméticos separadamente, bem como o sistema com e sem os ativos. Belides[®], nicotinamida e alfabisabolol foram avaliados nas concentrações de 0,02; 0,01; 0,005 e 0,0025%. Os sistemas (contendo todos os ativos e o sem os ativos), foram diluídos 60, 120, 240 e 480 vezes.

Cada amostra foi dissolvida em meio de cultura para ser adicionada sobre os poços determinados. Após 48h de incubação, retirou-se o meio de cultura, adicionaram-se 100 µL (por poço) de solução de MTT 5 mg/mL e incubou-se por 3h a 37 °C e 5% CO₂. Após este período, a solução de MTT foi removida dos poços, adicionando-se 100 µl de DMSO sobre cada poço. Após homogeneização da placa, realizou-se a leitura em 570 nm. O experimento foi realizado em triplicata, conforme esquema mostrado na Figura 17.

Figura 17 - Ensaio MTT para avaliação da viabilidade celular



Fonte: Adaptado de Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA (Magalhães; Thá; Leme, 2018). O cálculo da viabilidade celular foi realizado de acordo com a Equação 6.

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Abs\ tratado}{Abs\ controle\ negativo} \times 100 \quad (6)$$

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Realizou-se a análise estatística deste trabalho utilizando os softwares, *Rstudio* e *GraphPad Prism*. No ensaio de linearidade da curva analítica, verificou-se a homocedasticidade dos dados, conforme RDC 166, 2017, com o teste estatístico de *Breusch-Pagan* no *Rstudio*.

A análise estatística do estudo de estabilidade acelerada foi realizada pela estatística descritiva, que teve os valores das médias e do desvio padrão calculados para cada uma das análises.

Para o estudo de viabilidade celular, utilizou-se o *GraphPad Prism*, em que após a análise da distribuição dos dados pelo teste de *Shapiro-Wilk* (normalidade), aplicou-se o teste estatístico de *Dunnett* para a comparação das médias das amostras com o controle.

5 RESULTADOS

Abaixo, encontram-se os resultados de todos os experimentos realizados para a obtenção do produto cosmético.

5.1 DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANODISPERSOS PARA INCORPORAÇÃO DE NICOTINAMIDA, BELIDES® E ALFABISABOOL

5.1.1 Construção dos diagramas de fase e seleção de sistemas transparentes líquidos

Os diagramas de fase foram desenvolvidos para a obtenção e seleção de sistemas na região de transparência líquida, com intuito de obter-se um sistema adequado para a incorporação dos ativos cosméticos para uso no controle do melasma. A elaboração dos cinco diagramas de fases permitiu a verificação do efeito entre a proporção dos componentes (tensoativos, água e adjuvantes de fase oleosa) no desenvolvimento de sistemas transparentes líquidos.

As distintas proporções entre os componentes originaram sistemas com diferentes aspectos macroscópicos, como sistemas transparentes e opacos, tanto líquidos quanto viscosos, bem como sistemas com separação de fases. Houve a formação dos sistemas líquidos, transparentes e pouco viscosos na região sugestiva de microemulsão, sob agitação branda, conforme relatado na literatura (Sisak; Daik; Ramli, 2017).

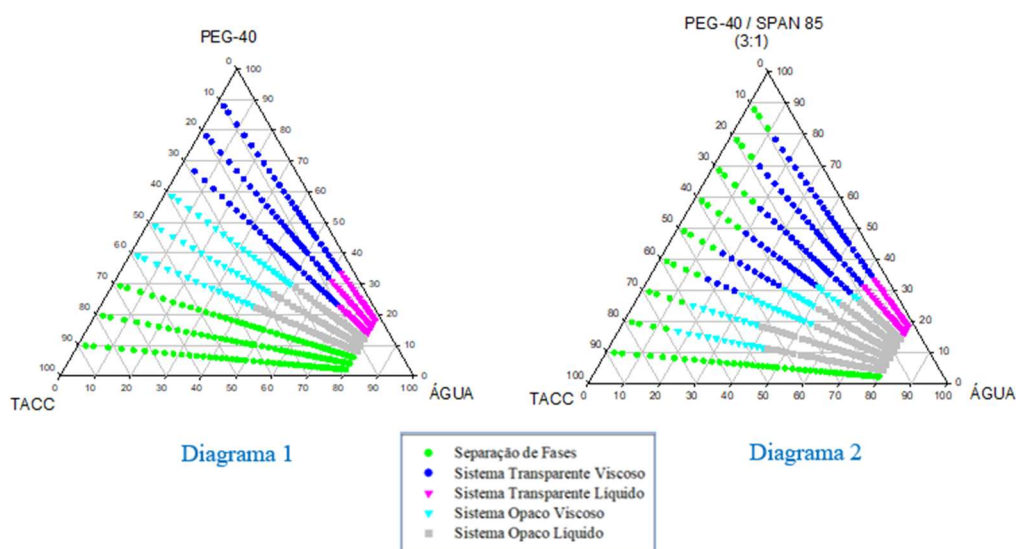
A Figura 18 demonstra os diagramas de fase 1 e 2, que apresentam as regiões de sistemas transparentes líquidos, representadas graficamente pelas linhas na cor rosa.

O tensoativo presente nos sistemas do diagrama 1 é o PEG 40 e a fase oleosa é composta pelo TACC. Do diagrama 1, selecionou-se apenas um sistema (PEG) dentro da região de sistemas transparentes líquidos para a caracterização físico-química. O sistema permaneceu estável após centrifugação e todos os demais parâmetros avaliados como tamanho de gotícula, PDI, pH, condutividade, potencial zeta e viscosidade indicaram valores dentro do especificado para uma microemulsão, entretanto, o sistema deste primeiro diagrama não ofereceu adequado sensorial para o produto em desenvolvimento, pois o tempo para a secagem após aplicação na pele foi muito extenso, oferecendo sensação de pegajosidade.

O diagrama 2 apresenta, além do PEG 40, o Span 85 como cotensoativo na proporção de 3 partes de PEG 40 para 1 parte de Span 85. Neste diagrama, manteve-se TACC como fase oleosa. Escolheu-se dois sistemas da região de sistemas transparentes líquidos (linhas na cor rosa da Figura 18b: PEGSPAN85-1 e PEGSPAN85-2) para caracterização físico-química. Os sistemas mostraram-se estáveis frente à centrifugação. O diagrama 2 forneceu sistemas estáveis e bem caracterizados, porém houve certa dificuldade na homogeneização entre cada titulação,

devido à alta viscosidade alcançada ao longo da adição de água. Estes sistemas indicaram grande tempo para a secagem do produto na pele, além de falta de emoliência e bastante pegajosidade.

Figura 18 - Diagramas de Fase 1 e 2



Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos, UNIFAL-MG (2021).

Legenda: a) Diagrama 1: PEG 40/TACC

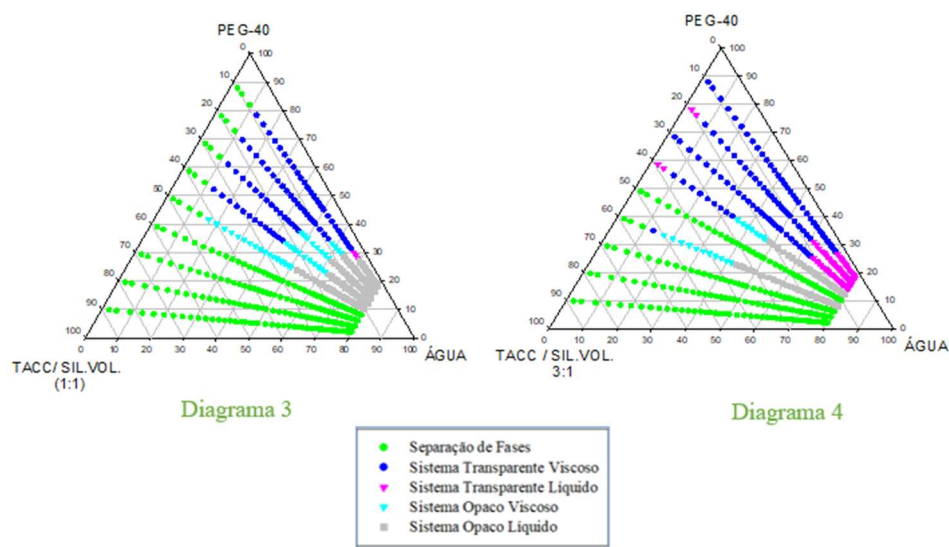
b) Diagrama 2: PEG 40/SPAN 85 (3:1) /TACC.

Com intuito de alcançar sistemas com mais emoliência, testou-se uma nova combinação de fase oleosa, mantendo-se fixa a fase com o único tensoativo, o PEG 40. Na fase oleosa, adicionou-se o silicone volátil (ciclopentasiloxano) na proporção de 1:1 entre TACC e silicone volátil. Esta nova composição originou o diagrama 3. Entretanto, já nas primeiras titulações, percebeu-se vários sistemas com separação de fases e pouco ou nenhum sistema transparente líquido. No diagrama 3 (Figura 19a), pode-se visualizar a pequena região de sistemas transparentes líquidos sugestivos de microemulsão (linhas na cor rosa) e grande área de separação de fases (linhas na cor verde). Portanto, nenhum dos sistemas desse diagrama foi selecionado para a caracterização, pois não houve grande combinação de interesse na região de sistemas transparentes líquidos.

Alterou-se a proporção entre os componentes de fase oleosa do diagrama 3, que passou de 50% entre TACC e silicone volátil, para 75% e 25%, respectivamente. Com esta composição, construiu-se o diagrama 4. Logo após a alteração da proporção entre os componentes de fase oleosa, verificou-se a formação de mais sistemas transparentes líquidos (linhas na cor rosa) (Figura 19b). Deste diagrama, selecionou-se três sistemas transparentes líquidos para a

avaliação da pré-estabilidade e caracterização físico-química. Os sistemas selecionados foram denominados: PEGSILICONE-1, PEGSILICONE-2, PEGSILICONE-3. Estes sistemas ofereceram mais emoliência, entretanto, ainda permaneceu o longo tempo para a secagem do produto na pele.

Figura 19- Diagramas de Fase 3 e 4



Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos, UNIFAL-MG (2021).

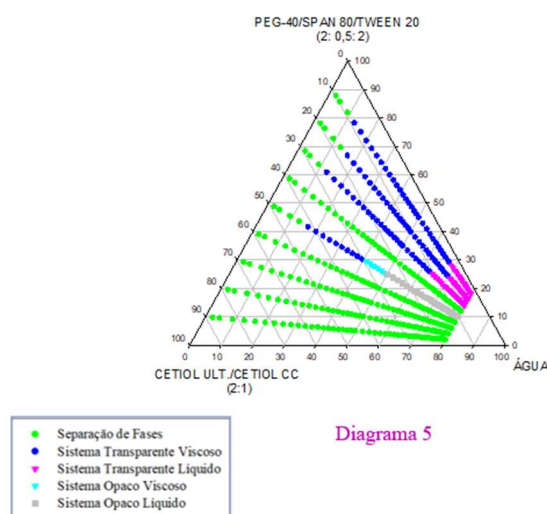
Legenda: a) Diagrama 3: PEG40/ TACC/ Sil. Vol. (1:1);

b) Diagrama 4: PEG40/ TACC/Sil. Vol. (3:1).

Pela falta de emoliência e sensação de pegajosidade, além do elevado tempo de secagem dos sistemas analisados dos diagramas 1, 2 e 4, alterou-se a composição de tensoativos e fase oleosa para a construção do diagrama 5. Este diagrama contou com a participação de mais um tensoativo, o Tween 20 (além do PEG 40) e um cotensoativo, o Span 80. A fase oleosa foi formada por dois emolientes: Cetiol Ultimate® e Cetiol CC®. Os sistemas que apresentaram transparência, estabilidade frente à centrifugação e melhores características com relação ao tempo de secagem, sensorial e espalhabilidade foram selecionados para a caracterização físico-química. Os sistemas foram denominados PEGSPANTWEEN-1 e PEGSPANTWEEN-2. Observou-se no diagrama 5 (Figura 20) maiores proporções de sistemas líquidos (linhas na cor rosa), que pode ser devido à presença de mais um tensoativo e um cotensoativo (Ghosh; Mukherjee; Chandrasekaran, 2013).

Os sistemas transparentes líquidos foram alcançados pela proporção entre 70% e 90% de tensoativo para 30% e 10% de fase oleosa, conforme constatado na Figura 21, que contém a imagem dos nove sistemas do diagrama 5. Desse diagrama, o sistema PEGSPANTWEEN-2 foi o escolhido para o desenvolvimento do produto cosmético.

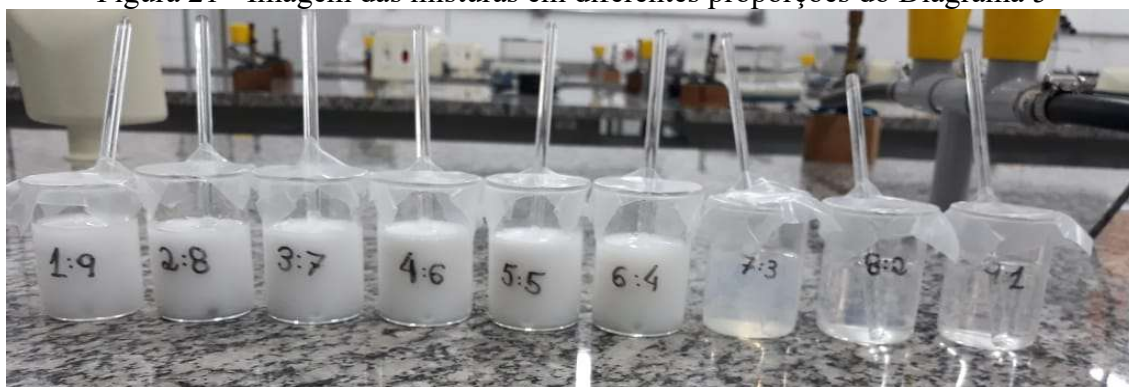
Figura 20- Diagrama de Fase 5



Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos, UNIFAL-MG (2021).

Legenda: Diagrama 5: PEG40/SPAN 80/TWEEN 20 (2: 0,5: 2)/CET.ULT./CET.CC (2:1).

Figura 21 - Imagem das misturas em diferentes proporções do Diagrama 5



Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos, UNIFAL-MG (2021).

Legenda: Separação de fases: Sistemas = 1:9; 2:8; 3:7; 4:6;

Sistema opaco líquido: Sistemas = 5:5; 6:4;

Sistema transparente/translúcido líquido: Sistemas = 7:3; 8:2; 9:1.

5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SISTEMAS TRANSPARENTES LÍQUIDOS

5.2.1 Teste de centrifugação pré-estabilidade

Pela avaliação do ensaio de centrifugação pré-estabilidade não se observou separação de fases e nenhum sinal de instabilidade físico-química. Conclui-se que todos os sistemas selecionados e avaliados foram bem desenvolvidos e estáveis diante do teste de centrifugação.

5.2.2 Tamanho das gotículas e índice de polidispersividade

Determinou-se o tamanho das gotículas e o índice de polidispersividade de cada um dos sistemas desenvolvidos. Objetivou-se o desenvolvimento de sistemas com gotículas de tamanho nanométrico (< 100 nm) e valores de PdI menores que 0,2. Os resultados de ambos os parâmetros são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Análise do tamanho de gotícula e PdI dos sistemas selecionados

Diagrama	Sistema	Tamanho da gotícula (nm)	PdI
1	PEG	$20,8 \pm 0,075$	$0,192 \pm 0,002$
2	PEGSPAN85-1	$28,36 \pm 0,07$	$0,146 \pm 0,004$
2	PEGSPAN85-2	$19,83 \pm 0,11$	$0,115 \pm 0,008$
4	PEGSILICONE-1	$33,25 \pm 0,16$	$0,118 \pm 0,004$
4	PEGSILICONE-2	$23,55 \pm 0,08$	$0,165 \pm 0,009$
4	PEGSILICONE-3	$18,67 \pm 0,06$	$0,095 \pm 0,006$
5	PEGSPANTWEEN-1	$22,45 \pm 0,04$	$0,094 \pm 0,004$
5	PEGSPANTWEEN-2	$16,00 \pm 0,065$	$0,077 \pm 0,007$

Fonte: Laboratórios de Tecnologia de Farmacêutica e de Cosméticos, UNIFAL-MG (2021).

Pelos resultados encontrados na Tabela 3, pode-se concluir que o tamanho das gotículas de todos os sistemas analisados (dos diagramas 1, 2, 4 e 5) apresentaram valores dentro da faixa nanométrica aceitável para os sistemas microemulsionados (< 100 nm) (Oliveira *et al.*, 2021). Ao longo do desenvolvimento dos diagramas de fases, a combinação entre tensoativos e cotensoativos do diagrama de fases 5, originou sistemas com menores tamanhos de gotículas, que pode ser devido à presença do tensoativo Tween 20, já que em função de seu baixo peso molecular, favorece a formação de gotículas menores (Ghosh; Mukherjee; Chandrasekaran, 2013).

Os fatores como declínio na proporção de fase oleosa e aumento na concentração de tensoativos contribuíram para a melhoria na uniformidade da distribuição das gotículas. Os sistemas analisados do diagrama 5 indicaram valores mais baixos de PdI: $0,077 \pm 0,007$ e $0,094 \pm 0,004$ (sistemas PEGSPANTWEEN-1 e PEGSPANTWEEN-2 respectivamente). Portanto,

conclui-se que o sistema selecionado para o desenvolvimento do produto (PEGSPANTWEEN-2) apresentou valores adequados de tamanho de gotículas (Oliveira *et al.*, 2021) e de Pdl para um sistema microemulsionado estável (Danaei *et al.*, 2018).

5.2.3 Determinação do pH

Os sistemas analisados dos diagramas 1, 2 e 4 apresentaram valores de pH dentro da faixa de segurança para uso cutâneo ($4 < \text{pH} < 6$) (Ali; Yosipovitch, 2013) (Tabela 4). Já os sistemas do diagrama de fases 5, devido à alteração na composição de tensoativos, bem como a inserção de ésteres na fase oleosa, apresentaram valores abaixo da faixa ideal para o estrato córneo (Costa; Horswill, 2022).

Tabela 4 - Determinação de pH dos sistemas selecionados

Diagrama	Sistema	pH
1	PEG	$5,65 \pm 0,10$
2	PEGSPAN85-1	$5,63 \pm 0,10$
2	PEGSPAN85-2	$5,67 \pm 0,11$
4	PEGSILICONE-1	$6,02 \pm 0,15$
4	PEGSILICONE-2	$5,99 \pm 0,09$
4	PEGSILICONE-3	$5,48 \pm 0,10$
5	PEGSPANTWEEN-1	$3,79 \pm 0,020$
5	PEGSPANTWEEN-2	$3,77 \pm 0,015$
5	PEGSPANTWEEN-2 + ativos	$4,84 \pm 0,010$

Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos, UNIFAL-MG (2021).

Para a manutenção da função barreira e proteção contra ação de microrganismos, o pH do estrato córneo apresenta-se ligeiramente ácido ($4 < \text{pH} < 6$) (Proksch, 2018). O sistema selecionado para o desenvolvimento do produto apresentou valor abaixo de 4, entretanto, a adição dos ativos cosméticos ao sistema elevou o valor de pH para um valor dentro da faixa de segurança: $\text{pH } 4,84 \pm 0,01$.

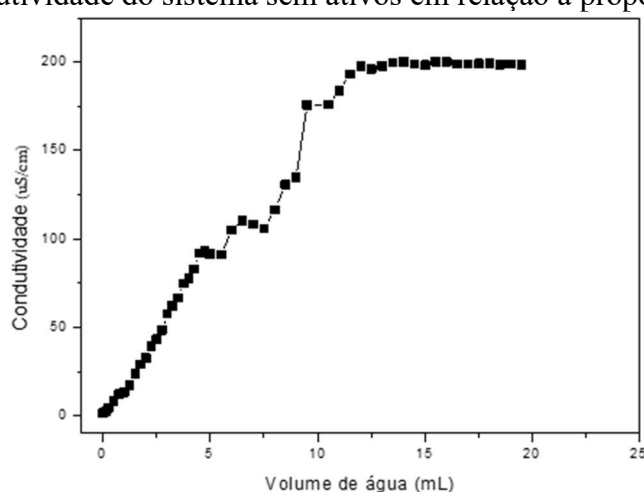
5.2.4 Condutividade e potencial zeta

A variação no valor da condutividade elétrica dos sistemas em desenvolvimento pode indicar alteração estrutural na fase externa. Um sistema contendo microestrutura óleo-em-água apresenta valores elevados de condutividade, ao contrário dos sistemas água-em-óleo (abaixo de $10 \mu\text{S/cm}$) (Ngawhirunpat *et al.*, 2013). De acordo com a Tabela 5, os valores de condutividade elétrica apresentados pelos sistemas dos diagramas 1, 2 e 4 eram abaixo de 35

$\mu\text{S}/\text{cm}$, mas dentro da região óleo-em-água. Já os sistemas do diagrama de fase 5, apresentaram valores próximo ou igual a $100 \mu\text{S}/\text{cm}$. Isso pode ser devido à presença de cotensoativo, que favorece a flexibilidade da interface permitindo a interação entre moléculas de água e as gotículas, elevando a condutividade (Li *et al.*, 2010).

Pela da avaliação dos valores de condutividade em função da titulação de água sobre a mistura de tensoativo/cotensoativo e fase oleosa, comprovou-se que microestrutura presente no sistema final selecionado para a incorporação dos ativos cosméticos é do tipo óleo-em-água.

Figura 22 - Condutividade do sistema sem ativos em relação à proporção de água



Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos, UNIFAL-MG (2022).

Os valores de potencial zeta em todas as amostras analisadas mostram sistemas com cargas negativas com valores diferentes de ± 30 . Dessa forma, não colaboram na estabilidade elétrica (Raspantini *et al.*, 2021). Entretanto, a presença de tensoativos não iônicos (como por exemplo, o Tween) pode favorecer a estabilização estérica, uma vez que esses ingredientes podem adsorver a superfície das gotículas (Aulton; Taylor, 2016).

Tabela 5-Análises da condutividade e de potencial zeta dos sistemas selecionados

Diagrama	Sistema	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Potencial Zeta (mV)
1	PEG	$23,2 \pm 3,7$	$-13,63 \pm 2$
2	PEGSPAN85-1	$32,0 \pm 3,3$	$-8,88 \pm 1,1$
2	PEGSPAN85-2	$26,0 \pm 0,7$	$-4,85 \pm 1,9$
4	PEGSILICONE-1	$24,0 \pm 0,45$	$-8,23 \pm 1,2$
4	PEGSILICONE-2	$27,0 \pm 0,6$	$-6,18 \pm 1,85$
4	PEGSILICONE-3	$26,6 \pm 0,75$	$-8,12 \pm 1,6$
5	PEGSPANTWEEN-1	$100,0 \pm 0,5$	$-3,97 \pm 0,65$
5	PEGSPANTWEEN-2	$95,5 \pm 0,60$	$-4,86 \pm 1,9$

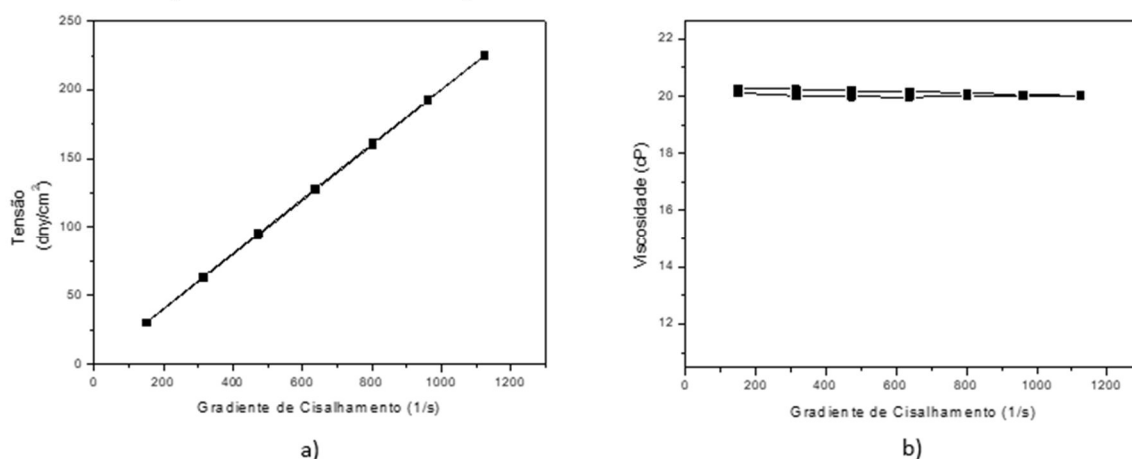
Fonte: Laboratório de Tecnologia de Farmacêutica e de Cosméticos UNIFAL-MG (2021).

5.2.5 Reologia

A caracterização reológica do sistema em desenvolvimento colabora na obtenção de formulações estáveis, uma vez mudanças na microestrutura podem ser evidenciadas a partir da avaliação da reologia (Kumar; Kushwaha; Sharma, 2014). As Figuras 23 a 31 contêm os gráficos do comportamento reológico dos sistemas selecionados. A Tabela 6 demonstra os valores de viscosidade dos sistemas analisados.

A avaliação reológica do sistema PEG (composto por 75% de fase aquosa, 22,5% de tensoativo e 2,5% de fase oleosa) apresentou fluxo tendendo ao newtoniano. Pela Figura 23a, nota-se que a tensão de cisalhamento foi proporcional ao gradiente de cisalhamento, exibindo índice de fluxo de 0,996. O valor da viscosidade ($20,1 \pm 0,1$ cP) manteve-se constante com o aumento do gradiente de cisalhamento, como observado na Figura 23b.

Figura 23 - Análise reológica do sistema PEG



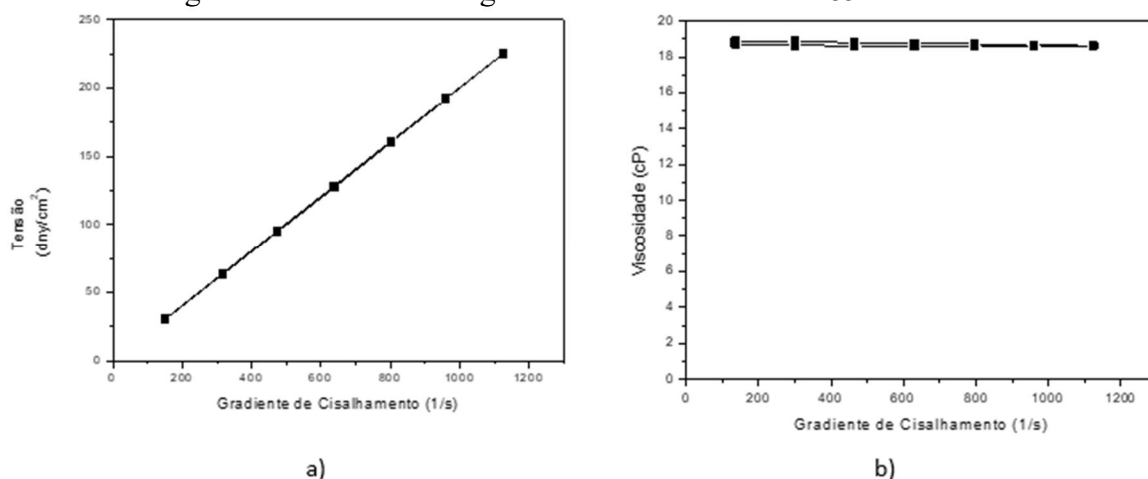
Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos, UNIFAL-MG (2021).

Legenda: a) Sistema PEG: Tensão de cisalhamento versus gradiente de cisalhamento;

b) Sistema PEG: Viscosidade versus gradiente de cisalhamento.

Os sistemas avaliados do diagrama 2 apresentaram fluxo tendendo ao newtoniano com viscosidade constante. Nestes sistemas houve linearidade com índices de fluxo iguais a 0,996 e 0,994 para os sistemas PEGSPAN85-1 e PEGSPAN85-2, respectivamente (Figuras 24a e 25a). O sistema PEGSPAN85-1 apresentou viscosidade de $18,7 \pm 0,1$ cP (Figura 24b), enquanto o sistema PEGSPAN85-2 apresentou valor de $29,9 \pm 0,18$ cP (Figura 25b).

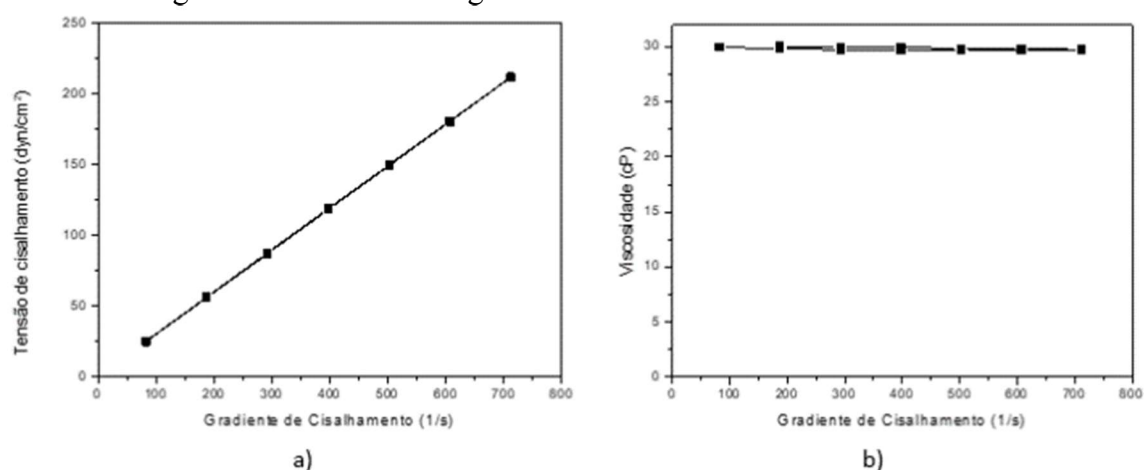
Figura 24 - Análise reológica do sistema PEGSPAN85-1



Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos, UNIFAL-MG (2021).

Legenda: a) Sistema PEGSPAN85-1: Tensão de cisalhamento versus gradiente de cisalhamento;
b) Sistema PEGSPAN85-1: Viscosidade versus gradiente de cisalhamento.

Figura 25 - Análise reológica do sistema PEGSPAN85-2

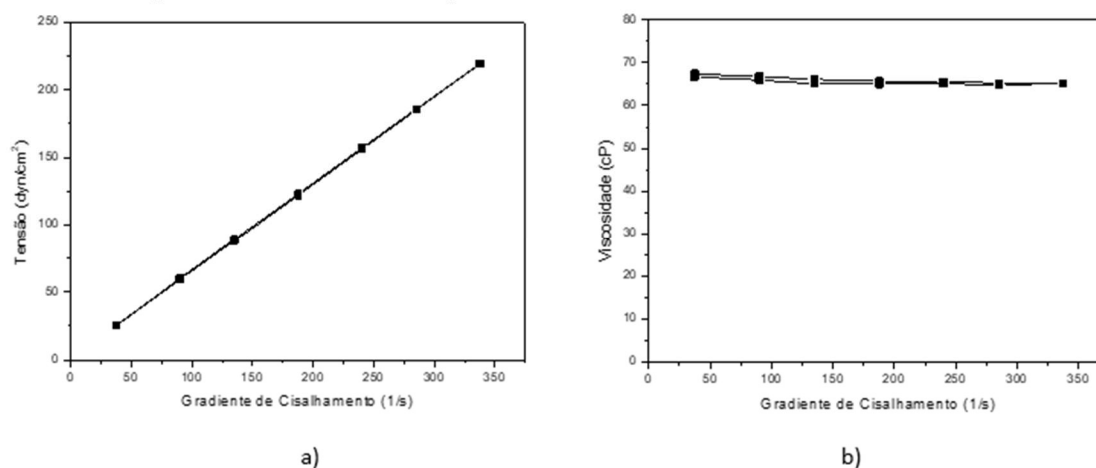


Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos, UNIFAL-MG (2021).

Legenda: a) Sistema PEGSPAN85-2: Tensão de cisalhamento versus gradiente de cisalhamento;
b) Sistema PEGSPAN85-2: Viscosidade versus gradiente de cisalhamento.

Os três sistemas analisados do diagrama 4 apresentaram fluxo newtoniano (Figuras 26a, 27a e 28a) com índices de fluxo de 0,994; 0,990 e 0,993 para os respectivos sistemas: PEGSILICONE-1; PEGSILICONE-2 e PEGSILICONE-3. O valor da viscosidade de cada um dos sistemas manteve-se constante ao longo do gradiente de cisalhamento, como pode ser visto pelas Figuras 26b, 27b e 28b.

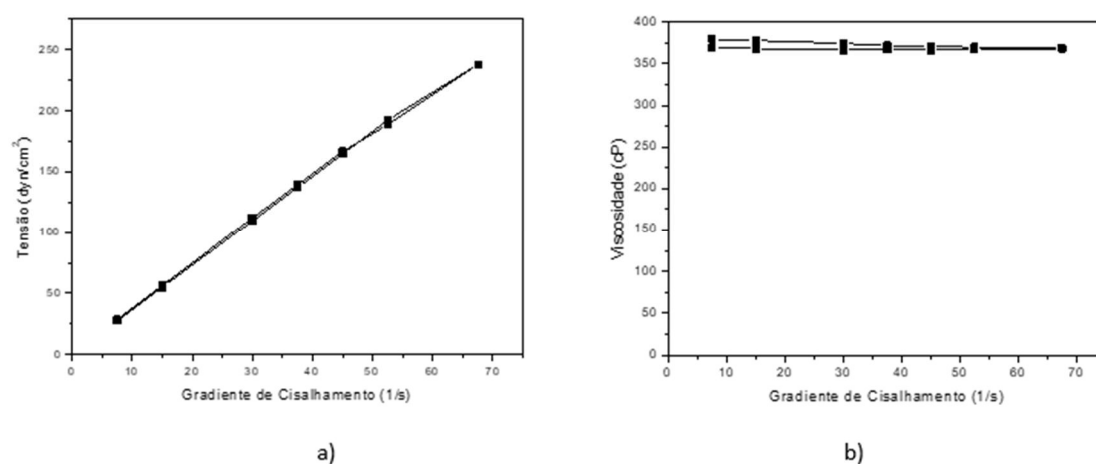
Figura 26 - Análise reológica do sistema PEGSILICONE-1



Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos, UNIFAL-MG (2021).

Legenda: a) Sistema PEGSILICONE-1: Tensão de cisalhamento versus gradiente de cisalhamento;
b) Sistema PEGSILICONE-1: Viscosidade versus gradiente de cisalhamento.

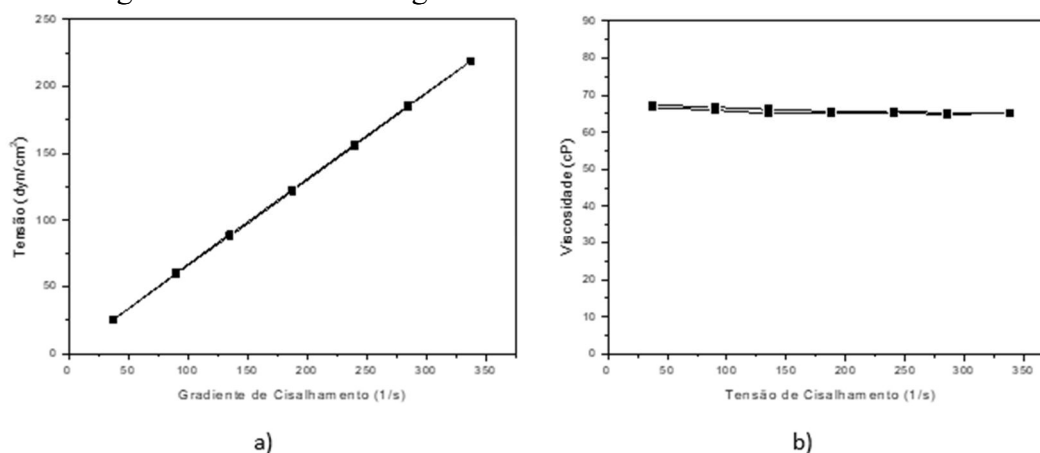
Figura 27 - Gráficos da análise reológica do sistema PEGSILICONE-2



Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos - UNIFAL-MG (2021).

Legenda: a) Sistema PEGSILICONE-2: Tensão de cisalhamento versus gradiente de cisalhamento,
b) Sistema PEGSILICONE-2: Viscosidade versus gradiente de cisalhamento.

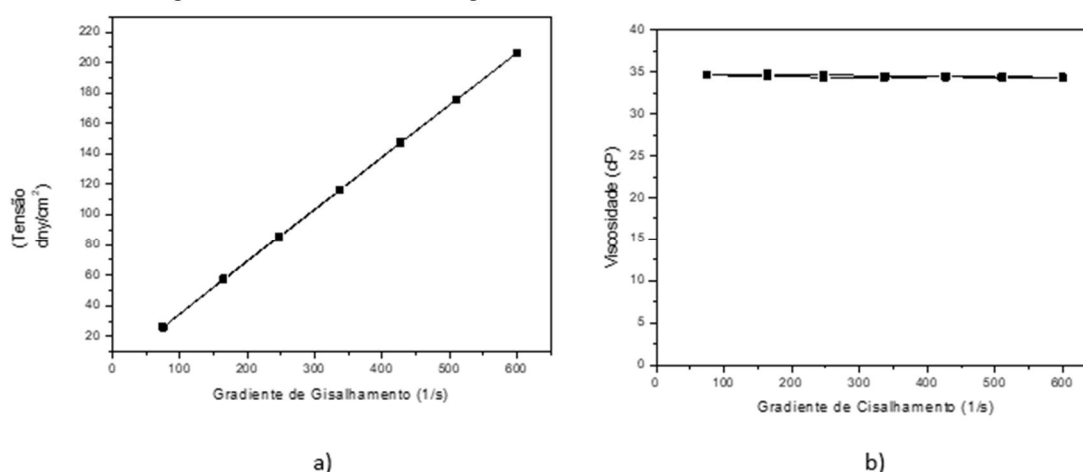
Figura 28 - Análise reológica do sistema PEGSILICONE-3



Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos - UNIFAL-MG (2021).
 Legenda: a) Sistema PEGSILICONE-3: Tensão de cisalhamento versus gradiente de cisalhamento,
 b) Sistema PEGSILICONE-3: Viscosidade versus gradiente de cisalhamento.

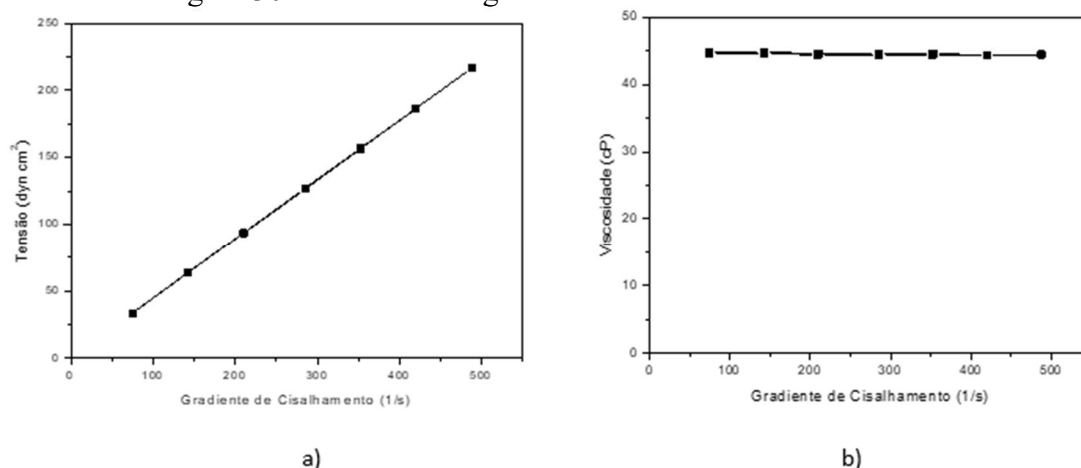
Os sistemas analisados do Diagrama 5 (Figuras 29, 30 e 31) apresentaram viscosidade constante ao longo do gradiente de cisalhamento indicando fluxo tendendo ao newtoniano. Especificamente, o sistema final PEGSPANTWEEN-2 + ativos, apresentou baixa viscosidade de $6,87 \pm 0,028$ cP e índice de fluxo de 0,996 (Figura 31a). Estes parâmetros reológicos estão de acordo com o tipo de formulação proposta: sistema de baixa viscosidade, com elevado conteúdo aquoso.

Figura 29 - Análise reológica do sistema PEGSPANTWEEN-1



Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos UNIFAL-MG (2021).
 Legenda: a) Sistema PEGSPANTWEEN-1: Tensão de cisalhamento versus gradiente de cisalhamento;
 b) Sistema PEGSPANTWEEN-1: Viscosidade versus gradiente de cisalhamento.

Figura 30 - Análise reológica do sistema PEGSPANTWEEN-2

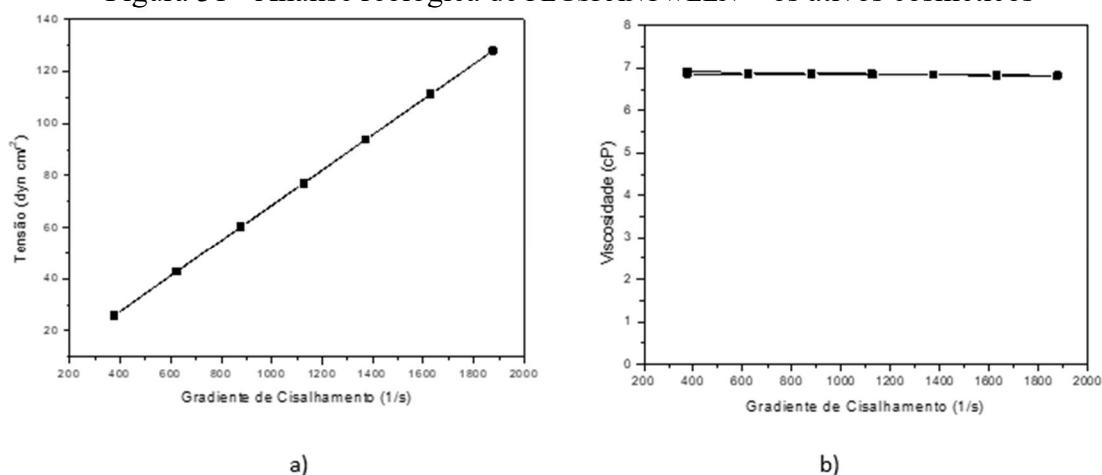


Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos UNIFAL-MG (2021).

Legenda: a) Sistema PEGSPANTWEEN-2: Tensão versus gradiente de cisalhamento;

b) Sistema PEGSPANTWEEN-2: Viscosidade versus gradiente de cisalhamento.

Figura 31 - Análise reológica de PEGSPANTWEEN + os ativos cosméticos



Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos UNIFAL-MG (2021).

Legenda: a) Sistema PEGSPANTWEEN+ ativos: Tensão versus gradiente de cisalhamento;

b) Sistema PEGSPANTWEEN + ativos: Viscosidade versus gradiente de cisalhamento.

De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que em todos os sistemas selecionados a viscosidade se manteve constante ao longo do gradiente de cisalhamento, apresentando com fluxo newtoniano. O sistema final contendo os ativos cosméticos apresenta baixa viscosidade, a qual é requerida para o tipo de formulação proposta (aplicação em gotas). A Tabela 6 ilustra os valores de viscosidade de todos os sistemas caracterizados.

Tabela 6 - Viscosidade dos sistemas selecionados

Diagrama	Sistema	Viscosidade (cP)
1	PEG	$20,1 \pm 0,1$
2	PEGSPAN85-1	$18,7 \pm 0,1$
2	PEGSPAN85-2	$29,9 \pm 0,18$
4	PEGSILICONE-1	$71,62 \pm 0,39$
4	PEGSILICONE-2	$370,4 \pm 4,3$
4	PEGSILICONE-3	$65,7 \pm 0,8$
5	PEGSPANTWEEN-1	$34,5 \pm 0,14$
5	PEGSPANTWEEN-2	$44,5 \pm 0,15$
5	PEGSPANTWEEN-2 + ativos	$6,87 \pm 0,028$

Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos, UNIFAL-MG (2021).

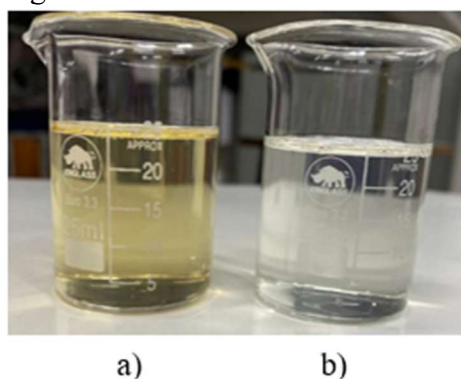
5.2.6 Seleção do sistema nanodisperso para o desenvolvimento do produto

De acordo com as avaliações de pré-estabilidade e caracterização físico-química dos sistemas líquidos transparentes obtidos no desenvolvimento dos diagramas de fases, selecionou-se, do diagrama 5, o sistema PEGSPANTWEEN-2 por possuir maior conteúdo aquoso e menor viscosidade para o desenvolvimento do produto cosmético e avaliação da estabilidade acelerada.

O sistema selecionado (PEGSPANTWEEN-2) indicou as seguintes características: tamanho da gotícula $16,00 \pm 0,065$ nm; PdI $0,077 \pm 0,007$; condutividade $95,00 \pm 1$ μ S/cm; potencial zeta (-) $4,86 \pm 2$ mV; pH $3,77 \pm 0,015$; viscosidade $44,28 \pm 0,134$ cP. Neste sistema, adicionou-se os ativos cosméticos nas concentrações de 5% para o Belides[®], 2% para a nicotinamida e 0,5% para o alfabisabolol. Após a incorporação dos ativos cosméticos, a formulação indicou os seguintes valores de caracterização: tamanho da gotícula $14,63 \pm 0,036$ nm; PdI $0,064 \pm 0,004$; condutividade $127,00 \pm 0,58$ μ S/cm; potencial zeta (-) $8,19$ mV $\pm 2,86$; pH $4,84 \pm 0,01$; viscosidade $6,82$ cP $\pm 0,026$.

Após o desenvolvimento do produto cosmético e avaliação da estabilidade acelerada, realizou-se o depósito de pedido de patente no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) sob o nº BR 10 20230028969 (Leite *et al.*, 2023). A Figura 32 mostra o sistema final desenvolvido com e sem a presença dos ativos.

Figura 32- Sistemas com e sem ativos



Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos, UNIFAL-MG (2022).
 Legenda: a) Tensoativos: PEG-40/Span 80/Tween 20 18%;
 FO: Cetiol Ultimate/ Cetiol CC 2%;
 Ativos: Belides® 5%; nicotinamida 2%, alfabisabolol 0,5%;
 FA: água em quantidade suficiente para 100%;
 b) Tensoativos: PEG-40/Span 80/Tween 20; 18%;
 FO: Cetiol Ultimate/ Cetiol CC 2%;
 FA: água em 80%.

As características da formulação cosmética como baixa viscosidade, grande conteúdo aquoso, aliado ao tipo de sistema (microemulsionado), permitem que o cosmético seja utilizado como um sérum para aplicação (em gotas) na face (Figura 33). De acordo com a literatura, a formulação sérum é capaz de atingir as camadas profundas da pele e entregar os ativos (Budiasih *et al.*, 2018). Além disso, o veículo sérum oferece secagem mais rápida e apropriada viscosidade, o que facilita a aplicação (Bonilha; Campos; Costa, 2020).

Figura – 33 Produto na embalagem conta-gotas



a) Sistema microemulsionado

b) Sistema microemulsionado com os ativos cosméticos

Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos, UNIFAL-MG (2022).

Legenda: a) Sistema microemulsionado sem os ativos cosméticos;
 b) Sistema microemulsionado com os ativos cosméticos.

5.3 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA POR LC-MS/MS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE NICOTINAMIDA E APIGENINA-7-O-GLICOSÍDEO

Para a otimização do método analítico, ao selecionar os solventes para a composição da fase orgânica, bem como para o preparo das amostras, notou-se que a nicotinamida reagiu diferentemente aos dois tipos de solventes avaliados. O padrão de nicotinamida diluído a 1 mg/L em acetonitrila resultou em área cinco vezes menor em relação a diluição em metanol. Por outro lado, nenhuma diferença de sinal foi observada para apigenina-7-O-glicosídeo, quando preparada em metanol ou acetonitrila. Assim, o solvente metanol foi selecionado para a diluição das amostras, bem como para compor a fase orgânica. O ácido fórmico foi escolhido para constituir a fase aquosa, pois colabora com a ionização dos íons (Wang *et al.*, 2010).

Após vários testes entre as proporções de fase orgânica e fase aquosa, escolheu-se a fase composta por metanol/solução de ácido fórmico 0,1%, na proporção de 92:8 (v/v), respectivamente, pois esta foi a fase que resultou na melhor definição dos picos. Avaliou-se também o desempenho na eluição dos analitos sob os fluxos de 0,30; 0,35 e 0,40 mL/min (Tabela 7).

Tabela 7 - Comparação da área e intensidade do sinal pela variação do fluxo

Fase Móvel 92:8	Fluxo mL/min	Intensidade		Área	
		apigenina-7-O-glicosídeo	nicotinamida	apigenina-7-O-glicosídeo	nicotinamida
metanol/ác. fórmico 0,1%	0,30	127.524	134.039	4.029.805	2.901.984
	0,35	127.005	98.485	4.025.788	2.154.826
	0,40	118.671	85.371	3.791.460	1.863.800

Fonte: Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos, UNIFAL-MG (2021).

Conforme visto na Tabela 7, o fluxo de 0,3 mL/min resultou em maior intensidade de sinal e maior área para ambos os analitos.

O íon precursor da nicotinamida (123 m/z) fragmentou-se principalmente em 80 m/z (correspondente à molécula de piridina), devido à quebra na região da carbonila (Catz *et al.*, 2005). O tempo de retenção (TR) foi de 7,10 minutos, sendo que o íon responsável pela quantificação desse analito foi o de razão massa carga 80 m/z, já que resulta em maior intensidade de sinal.

O TR do analito apigenina-7-O-glicosídeo foi de 6,87 minutos. A quantificação foi realizada pelo monitoramento do fragmento mais intenso de razão massa carga (268,10 m/z). O íon precursor 431,38 m/z da apigenina-7-O-glicosídeo foi fragmentado em diferentes energias de colisão na otimização pelo equipamento. O fragmento de razão massa carga 269,10 m/z, obtido pela energia de 27 eV, pode ser atribuído à remoção do resíduo de glicose (Yasir; Sultana; Anwar, 2018).

5.4 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA POR GC-MS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ALFABISABOLOL

O método analítico para o alfabisabolol foi otimizado quanto ao fluxo de gás hélio (como fase móvel), temperatura de injeção da amostra e temperatura do forno. A ionização da molécula foi realizada por meio do impacto de elétrons em 70 eV. O solvente acetonitrila foi o escolhido para o preparo dos padrões e das amostras, pois proporcionou em melhor definição do pico. O íon precursor do alfabisabolol originou o fragmento 119, que é o responsável pela sua quantificação. O Tempo de Retenção (TR) do alfabisabolol foi de 2,21 minutos.

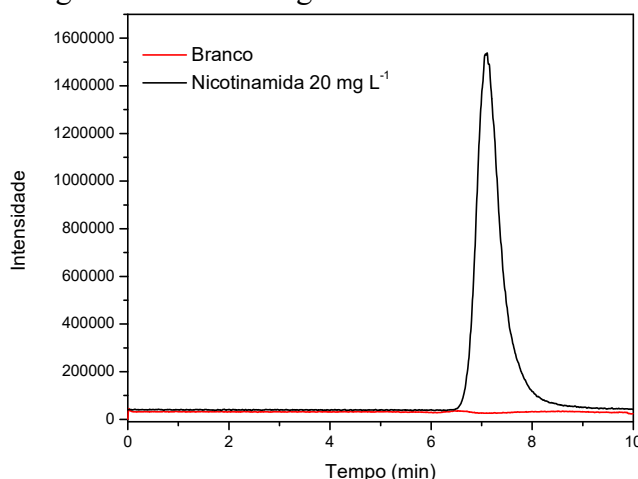
5.5 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

Para a validação dos três métodos desenvolvidos para a quantificação dos ativos, avaliou-se os parâmetros de seletividade (Figuras 34, 36 e 38), linearidade (Figuras 35, 37 e 39), precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação, para os ativos nicotinamida, apigenina-7-O-glicosídeo e alfabisabolol.

5.5.1 Nicotinamida

A seletividade do método analítico foi comprovada pela ausência de sinal no tempo de retenção do analito. A Figura 34 demonstra que a resposta analítica é exclusivamente do analito.

Figura 34 – Cromatograma do branco de nicotinamida

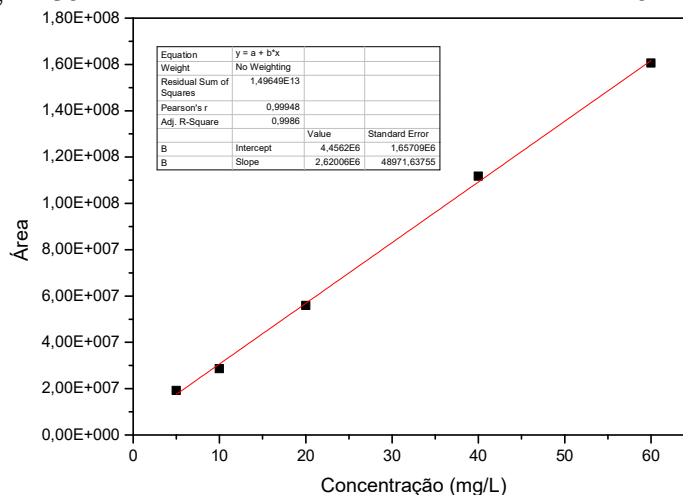


Fonte: Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos, UNIFAL-MG (2022).

A linearidade foi verificada através das respostas analíticas diretamente proporcionais às concentrações do analito (Ferreira; Oliveira, 2020) com coeficiente de correlação de 0,999, conforme a Figura 35.

Pela análise estatística comprovou-se a homoscedasticidade dos dados com o teste estatístico de *Breusch-Pagan* com p-valor = 0,4734.

Figura 35 - Curva analítica da nicotinamida faixa de 5 – 60 mg/L



Fonte: Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos, UNIFAL-MG (2022).

A precisão do método foi avaliada pelo cálculo do desvio padrão relativo. Para a concentração de 5 mg/L, obteve-se o valor de 10 %, já para 20 mg/L, o valor foi de 0,6% e para a concentração de 60 mg/L, o valor foi de 1,39 %.

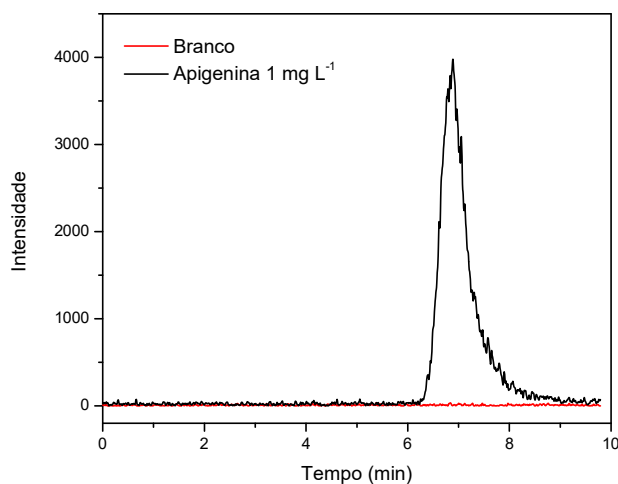
A exatidão foi calculada pelo valor de recuperação do analito com relação ao valor encontrado experimentalmente e o valor teórico. Para a concentração de 5 mg/L, o valor foi de 112,6 %, já para a concentração 20 mg/L, obteve-se o valor de recuperação de 98,2% e para a concentração de 60 mg/L, o valor foi de 99,3%.

O limite de detecção (LD) calculado foi 2,08 mg/L e o de quantificação (LQ) foi definindo em 5 mg/L, pois esta foi a menor concentração em que houve precisão e exatidão.

5.5.2 Apigenina-7-O-glicosídeo

A seletividade do método para foi comprovada pela ausência de sinal analítico no tempo de retenção do analito. A Figura 36, ilustra que o sinal analítico é somente da molécula de apigenina-7-O-glicosídeo.

Figura 36 – Cromatograma do branco apigenina-7-O-glicosídeo

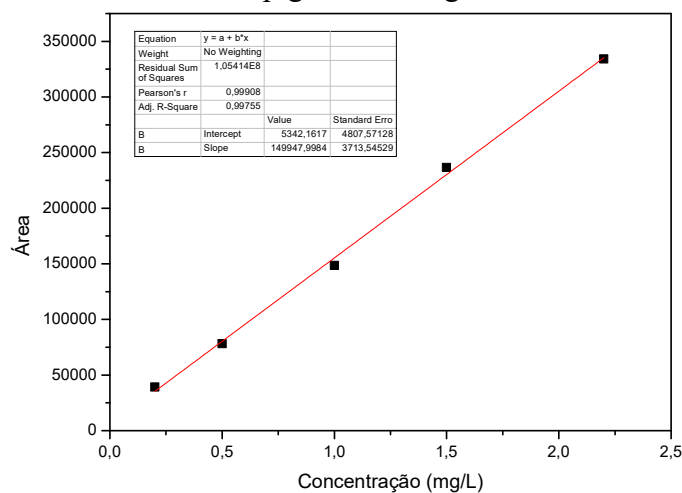


Fonte: Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos, UNIFAL-MG (2022).

A linearidade foi comprovada através do coeficiente de correlação obtido (r : 0,999), conforme Figura 37.

A homoscedasticidade dos dados foi confirmada pelo teste estatístico de *Breusch-Pagan* com p -valor = 0,5142.

Figura - 37 Curva analítica apigenina-7-O-glicosídeo, faixa 0,2 – 2,2 mg/L



Fonte: Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos, UNIFAL-MG (2022).

A precisão do método foi avaliada pelo desvio padrão relativo. Os valores obtidos foram de 2,6; 0,9 e 1,1% para as concentrações de 0,5; 1,0 e 2,2 mg/L, respectivamente.

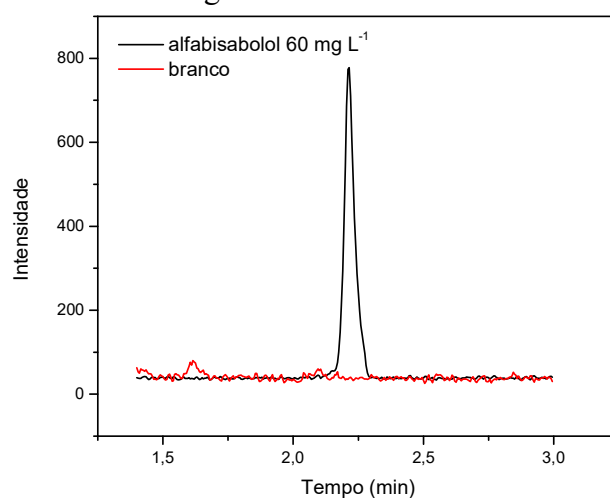
A exatidão foi calculada pela recuperação do analito. Obteve-se valores de 112,3; 96,2 e 99,4% para os padrões de 0,5; 1,0 e 2,2 mg/L, respectivamente.

O limite de detecção (LD) foi de 0,1058 mg/mL. O limite de quantificação (LQ) foi determinado em 0,50 mg/L, sendo esta, a menor concentração em que houve precisão e exatidão.

5.5.3 Alfabisabolol

A seletividade do método foi evidenciada pela ausência de sinal analítico no tempo de retenção do analito alfabisabolol. A Figura 38, elucida que o sinal analítico é apenas do analito alfabisabolol.

Figura 38 – Cromatograma do branco do alfabisabolol

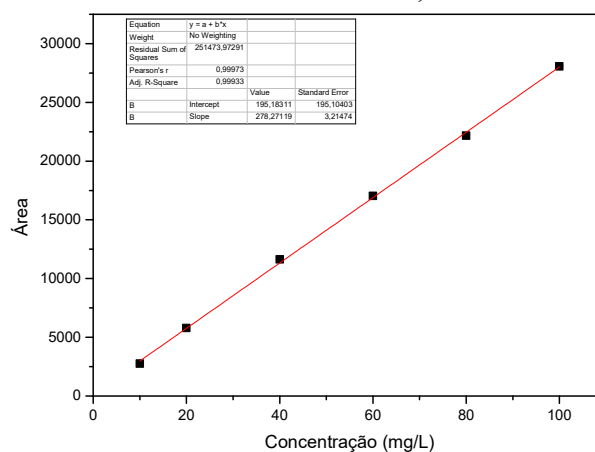


Fonte: Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos, Unifal MG (2022).

A linearidade foi comprovada através do coeficiente de correlação obtido (r : 0,999), conforme a Figura 39.

Os dados foram considerados homocedásticos pelo teste estatístico de *Breusch-Pagan* com p -valor = 0,6941.

Figura 39 – Curva analítica do alfabisabolol, faixa de 10 – 100 mg/L



Fonte: Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos, UNIFAL MG (2022).

A precisão do método foi avaliada pelo cálculo do desvio padrão relativo, com valores de 14,6; 3,8 e 10,8 % para as concentrações de 10; 40 e 100 mg/L, respectivamente.

A exatidão foi calculada como valor de recuperação do analito, sendo de 87,4; 102,7 e 100,1% para os padrões de 10; 40 e 100 mg/L, respectivamente.

O limite de detecção (LD) calculado foi de 2,31 mg/L. O limite de quantificação foi definindo em 7 mg/L (menor concentração em que houve precisão e exatidão).

5.6 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE ACELERADA DO SISTEMA SELECIONADO PARA FORMULAÇÃO FINAL

As amostras submetidas ao estudo de estabilidade acelerada por 90 dias foram analisadas quanto aos parâmetros macroscópicos e físico-químicos (ANVISA, 2004).

5.6.1 Avaliação macroscópica

Não ocorreu alteração na coloração, no odor ou no aspecto ao longo do tempo do estudo. Não houve separação de fases e nem precipitação nas três condições de temperatura. O produto mostrou-se estável na avaliação macroscópica.

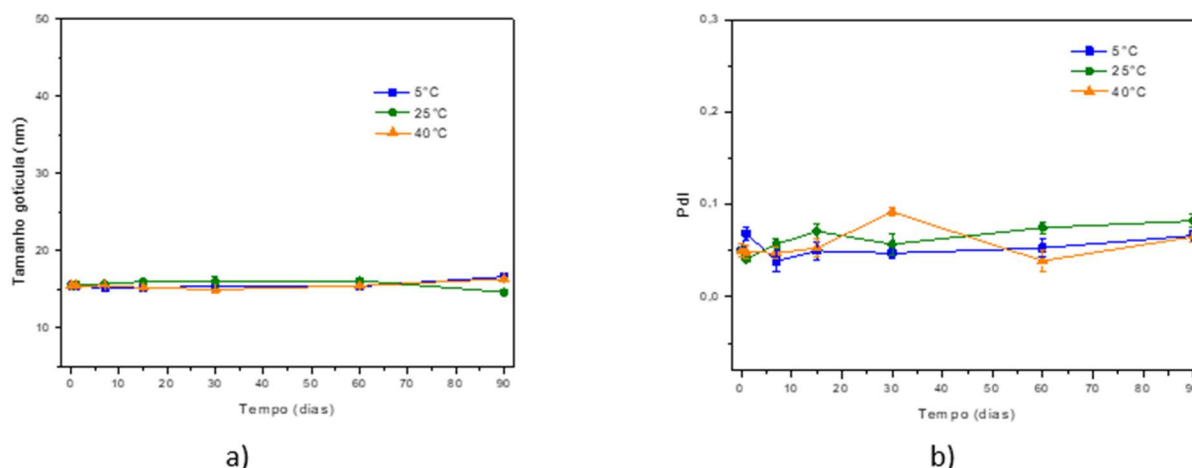
5.6.2 Avaliação físico-química

5.6.2.1 Tamanho de gotícula e índice de polidispersão (PdI)

O tamanho das gotículas do sistema submetido ao estudo de estabilidade acelerada manteve-se estável nas diferentes condições de temperatura (Figura 40a). O valor médio inicialmente encontrado foi de $15,52 \pm 0,032$ nm. Na análise do dia 90 (final do estudo) os valores médios de tamanho foram os seguintes: $16,64 \pm 0,23$ nm; $14,64 \pm 0,22$ nm e $16,36 \pm 0,08$ nm para as temperaturas de 5, 25 e 40 °C, respectivamente.

A análise do índice de polidispersão no dia zero do estudo indicou valor médio de $0,052 \pm 0,007$ mostrando uniforme polidispersão na população de gotículas (Danaei *et al.*, 2018). Os valores médios do PdI na análise do dia 90 foram os seguintes para as temperaturas de 5, 25 e 40 °C, respectivamente: $0,06 \pm 0,006$; $0,08 \pm 0,007$ e $0,065 \pm 0,005$. O PdI manteve-se baixo, menor que 0,1, durante os 90 dias (Figura 40b). Conclui-se que o sistema final se manteve estável ao longo de todo o estudo de estabilidade.

Figura 40 - Avaliação do tamanho da gotícula e Pdl no estudo de estabilidade



Fonte: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, UNIFAL-MG (2022).

Legenda: a) Gráfico do tamanho da gotícula em 5, 25 e 40 °C, entre zero até 90 dias;

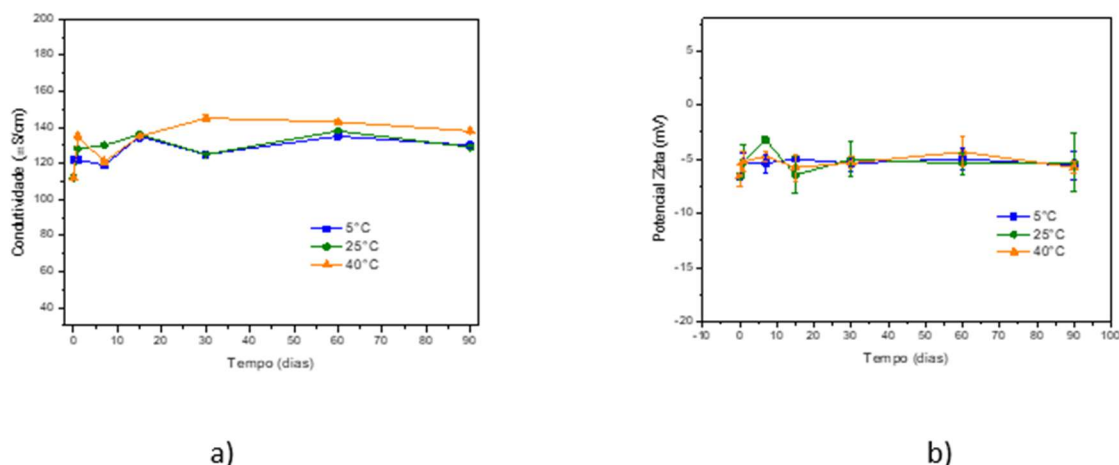
b) Gráfico do Pdl em 5, 25 e 40°C, entre zero até 90 dias.

5.6.2.2 Potencial zeta e condutividade

Pela análise do gráfico da Figura 41a, percebe-se que o valor da condutividade não sofreu variação, indicando que não houve alteração estrutural na fase externa do sistema microemulsionado. O valor médio da condutividade no dia zero foi de $112 \pm 1 \mu\text{S/cm}$, enquanto na análise do dia 90, os valores foram $130,3 \pm 1,52 \mu\text{S/cm}$; $128,6 \pm 0,57 \mu\text{S/cm}$ e $137,6 \pm 1,52 \mu\text{S/cm}$ para as temperaturas de 5, 25 e 40 °C, respectivamente.

O potencial zeta manteve-se estável com valor diferente de zero e com cargas negativas (Figura 41b), porém o sistema é termodinamicamente estável e não depende do potencial zeta para se manter estável. O valor médio do potencial zeta no dia zero foi de $(-) 6,57 \pm 0,99 \text{ mV}$, enquanto na análise do dia 90, os valores foram os seguintes para as temperaturas de 5, 25 e 40 °C, respectivamente: $(-) 5,58 \pm 1,29 \text{ mV}$; $(-) 5,32 \pm 2,7 \text{ mV}$ e $(-) 5,77 \pm 0,52 \text{ mV}$.

Figura 41- Condutividade e do potencial zeta no estudo de estabilidade



Fonte: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, UNIFAL-MG (2022).

Legenda: a: Gráfico da Condutividade em 5, 25 e 40 °C, entre zero até 90 dias;

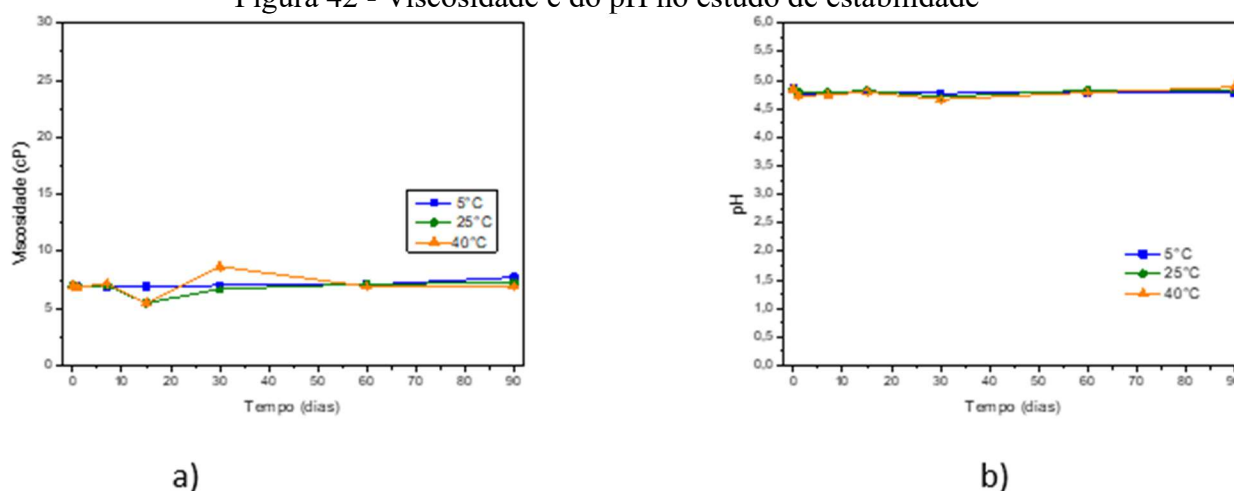
b: Gráfico do Potencial zeta em 5, 25 e 40 °C, entre zero até 90 dias.

5.6.2.3 Viscosidade e pH

A viscosidade dos sistemas analisados manteve-se estável durante o estudo de estabilidade acelerada, confirmando a estabilidade da formulação. Inicialmente o sistema apresentou valor de viscosidade igual a $6,99 \pm 0,023$ cP (Figura 42a). Os valores da análise final (dia 90) foram os seguintes para as temperaturas de 5, 25 e 40 °C, respectivamente: $6,9 \pm 0,03$ cP; $7,2 \pm 0,19$ cP e $7,0 \pm 0,03$ cP.

O valor de pH manteve-se praticamente constante ao longo do estudo nas diferentes condições de temperatura (Figura 42b). Primeiramente o sistema apresentou valor médio de $4,83 \pm 0,02$, chegando nos seguintes valores na análise final para as temperaturas de 5, 25 e 40 °C, respectivamente: $4,85 \pm 0,02$; $4,82 \pm 0,02$; $4,88 \pm 0,01$.

Figura 42 - Viscosidade e do pH no estudo de estabilidade



Fonte: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, UNIFAL-MG (2022).

Legenda: (a): Gráfico da viscosidade 5, 25 e 40 °C, entre zero até 90 dias;

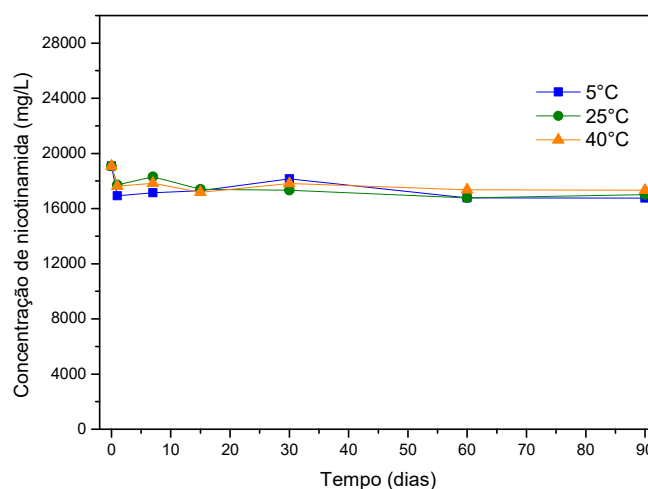
(b): Gráfico do pH em 5, 25 e 40 °C, entre zero até 90 dias.

5.6.3 Teor dos ativos cosméticos

5.6.3.1 Nicotinamida

A nicotinamida é a forma amida da vitamina B₃ que ao sofrer hidrólise se converte na forma ácida: ácido nicotínico. Ao longo do estudo, o valor do pH da formulação manteve-se estável nas três condições de armazenamento (Figura 42b), sugerindo estabilidade da molécula de nicotinamida frente à hidrólise (Kamanna; Ganji; Kashyap, 2009). A avaliação das amostras em estabilidade não indicou alteração macroscópica. Não houve formação de precipitados ou alteração de viscosidade e coloração. Pela observação da Figura 43, verifica-se que a concentração de nicotinamida se manteve estável nas três condições de armazenamento durante o estudo de estabilidade.

Figura 43– Avaliação do teor de nicotinamida no estudo de estabilidade

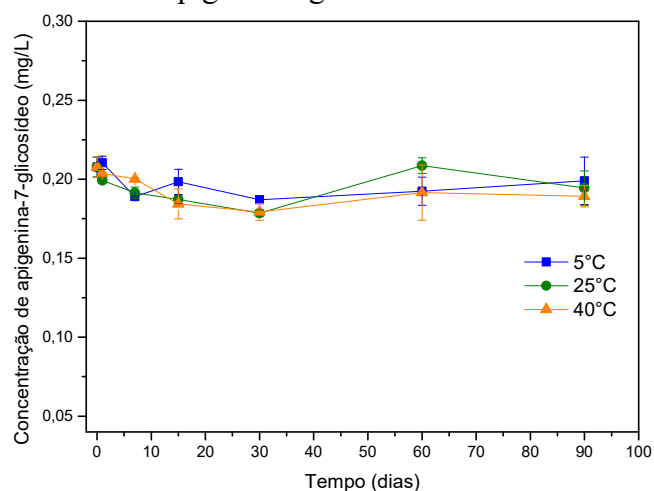


Fonte: Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos, UNIFAL MG (2022).

5.6.3.2 Apigenina-7-O-glicosídeo

As amostras de estabilidade não demonstraram alterações macroscópicas e nem físico-químicas. Pela Figura 44, verifica-se que a concentração de apigenina-7-O-glicosídeo se manteve estável durante o estudo de estabilidade.

Figura 44 – Teor de apigenina-7-glicosídeo no estudo de estabilidade

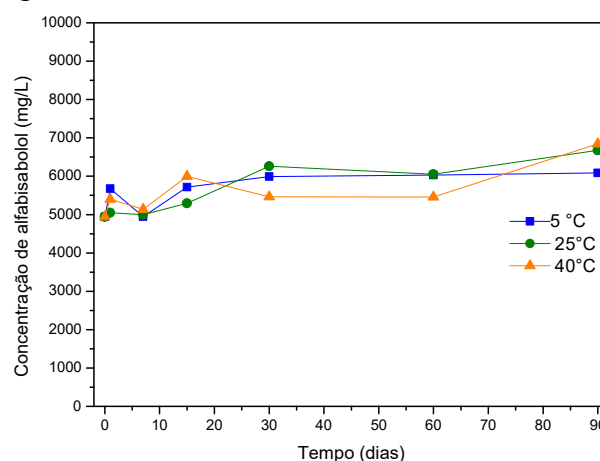


Fonte: Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos, UNIFAL MG (2022).

5.6.3.3 Alfabisabolol

Todas as amostras submetidas ao estudo de estabilidade acelerada mostraram-se estáveis com relação ao teor de alfabisabolol nas três condições de temperatura, ao longo dos 90 dias conforme apresentado na Figura 45.

Figura 45 – Teor de alfabisabolol no estudo de estabilidade



Fonte: Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos, UNIFAL MG (2022).

5.7 ESTUDO DA PERMEACÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

As quantidades permeadas dos ativos cosméticos nicotinamida e apigenina-7-O-glicosídeo são demonstrados na Tabela 8 e Figura 46. A quantificação do ativo cosmético alfabisabolol não pôde ser realizada, já que o equipamento responsável pela sua análise (CG-MS) estava em manutenção.

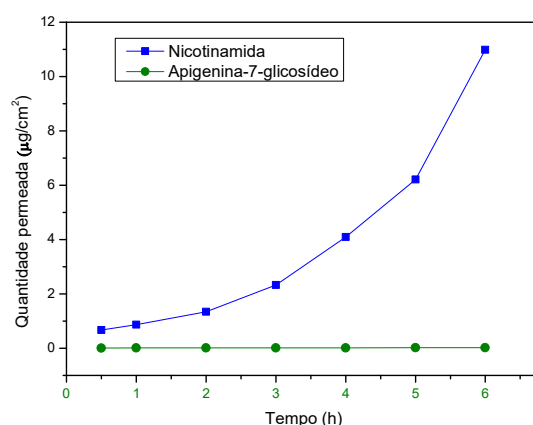
Tabela 8 - Quantidade permeada dos ativos cosméticos

Tempo (h)	Nicotinamida		Apigenina-7-O-glicosídeo	
	µg /cm ²	%	µg /cm ²	%
0,5	0,67	0,029	0,0073	0,000139
1	0,87	0,038	0,013	0,000247
2	1,34	0,059	0,014	0,000266
3	2,32	0,1	0,017	0,000323
4	4,1	0,18	0,017	0,000323
5	6,2	0,27	0,019	0,000362
6	11,0	0,48	0,021	0,0004

Fonte: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, UNIFAL MG (2022).

Os resultados obtidos pela permeação cutânea *in vitro* sugere que formulação é segura para aplicação tópica, uma vez que a proporção dos ativos cosméticos que foi permeada para o compartimento receptor é da ordem de $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Tabela 8), o que caracteriza apenas o efeito tópico almejado para um produto cosmético. Portanto, a formulação cosmética foi considerada segura por este experimento.

Figura 46: Perfil de permeação cutânea dos ativos



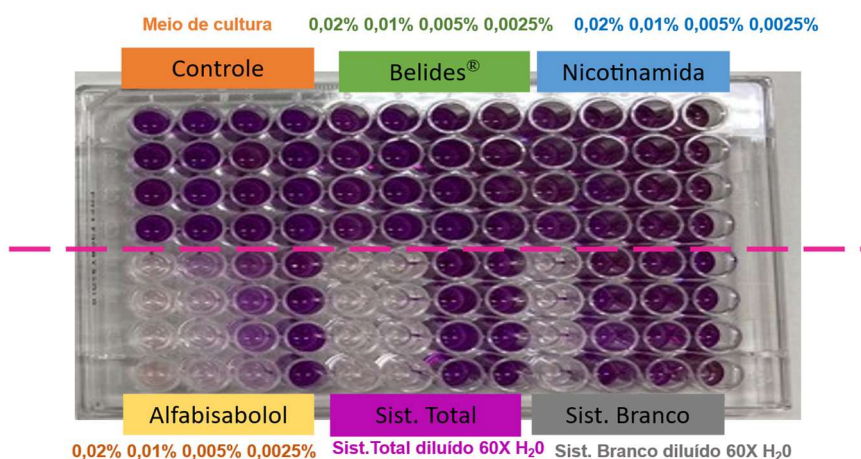
Fonte: Laboratório de Tecnologia de Cosméticos, UNIFAL-MG (2022).

Pelo *tape stripping* não se detectou ativos no estrato córneo, indicando que as moléculas ativas não ficaram retidas, e sim, puderam ser difundidas pelas camadas da epiderme.

5.8 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Ensaio *in vitro* foram realizados com fibroblastos. Essas células são fundamentais pois são responsáveis pela produção de novas moléculas de matriz extracelular na pele, em especial, colágeno. Fibroblastos da linhagem L929 foram testados frente ao sistema nanodisperso com e sem os ativos cosméticos, bem como cada um dos ativos cosméticos, separadamente, para a determinação da viabilidade celular, pelo ensaio de redução de MTT após 48h de exposição (Figura 47).

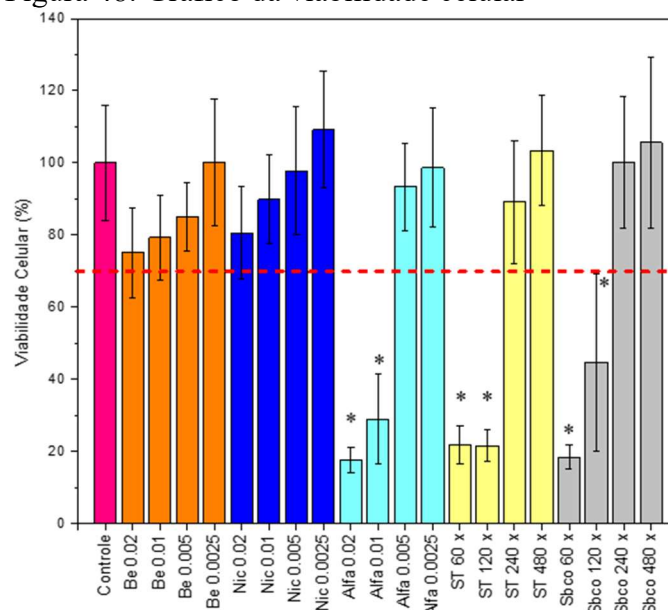
Figura 47 - Placa do estudo de viabilidade celular



Fonte: Laboratório de Cultura de Células, UNIFAL-MG (2023).

A análise estatística demonstrou que as concentrações de alfabisabolol (em 0,02 e 0,01%) e do sistema nanodisperso (com e sem os ativos) nas diluições de 60 e 120x são estatisticamente diferentes do controle, pois nestas concentrações houve redução da viabilidade celular. Já os ativos Belides® e nicotinamida, em todas as concentrações testadas, não apresentaram redução de viabilidade celular, assim como o sistema nanodisperso (com e sem os ativos) nas diluições de 240 e 480x. Estes resultados podem ser mais bem visualizados pela Figura 48.

Figura 48: Gráfico da viabilidade celular



Fonte: Laboratório de Cultura de Células, UNIFAL-MG (2023).

Legenda: Controle: meio de cultura DEMEM; Be: Belides® em água;

Nic: nicotinamida em água; Alfa: alfabisabolol em sistema diluído 50x;

ST: Sistema total com todos os ativos nas diluições: 60, 120, 240 e 480x;

Sbco: Sistema sem os ativos cosméticos nas diluições: 60, 120, 240 e 480x.

*diferença significativa com o controle ($p < 0,05$) teste de *Dunnett*.

De acordo com este estudo *in vitro*, pode-se concluir que o sistema cosmético nanodisperso desenvolvido contendo Belides®, nicotinamida e alfabisabolol é seguro para a utilização tópica, pois manteve as células viáveis.

6 DISCUSSÃO

O melasma é uma dermatose adquirida de difícil controle que altera inesteticamente a imagem individual sendo capaz de causar transtornos psicossociais que afetam a qualidade de vida dos pacientes privando-os, muitas vezes, de atividades sociais e de lazer, pois resulta em baixa autoestima e constrangimento, uma vez que a aparência do indivíduo pode refletir seu estado emocional (Jiang *et al.*, 2018; Misery *et al.*, 2010).

Após a exposição solar, substâncias são liberadas pelos queratinócitos como um mecanismo de defesa, com o intuito de proteger o material genético. Tais substâncias, como peptídeos, fatores de crescimento, citocinas e óxido nítrico, por exemplo, ativam a síntese de melanina, que envolve a participação da enzima tirosinase, denominada também de tirosina hidroxilase, dopa-oxidase e DHI oxidase (Bolognia; Jorizzo; Schaffer, 2017). Há também a

atuação das enzimas: tirosinase relacionada a proteína 1 (TRP-1) e tirosinase relacionada a proteína 2 (TRP-2/DCT - dopacromo tautomerase). As enzimas relacionadas à proteína P (TRP-1 e TRP-2) fortalecem a ação da tirosinase para sua ativação e estabilização, bem como na fabricação dos melanossomos (Videira; Moura; Magina, 2013). Após ser produzida no retículo endoplasmático rugoso do melanócito, a tirosinase é secretada para o aparelho de golgi e enviada para o melanossomo pela proteína transportadora P associada à membrana (MATP) (Costin; Hearing, 2007). A MATP é a responsável por conduzir as enzimas melanogênicas, a glicoproteína Pmel 17 (e qualquer outra substância requerida na síntese) para o interior dos melanossomos (Videira; Moura; Magina, 2013).

A tirosinase é uma glicoproteína inserida em três diferentes porções do melanossomo: interior, citoplasma e transmembrana (Gillbro; Olsson, 2011). A glicoproteína pré-melanossômica, Pmel 17, presente nos melanossomos, é essencial para sua biogênese, pois organiza uma matriz fibrilar (filamentos paralelos de fibrila) necessária à deposição de melanina (Dean; Lee, 2020). Ao inibir a ação da Pmel 17, os melanossomos não chegarão até os queratinócitos, diminuindo a pigmentação da pele. Para o completo processo melanogênico, o melanossomo precisa exibir alto conteúdo de melanina, e para isso, ele deve percorrer quatro etapas de intenso metabolismo enzimático com envolvimento de íons, aminoácidos e proteínas. Na etapa 1, a organela é arredondada sem a presença de melanina; na etapa 2 há presença de filamentos proteicos com baixo depósito de melanina, mas intensa atividade enzimática; na etapa 3 ocorre média deposição de melanina sobre os filamentos proteicos e alta atividade enzimática; finalmente, na etapa 4, há alto conteúdo melânico e redução na atividade enzimática (Miot *et al.*, 2009). No final da etapa 4, os melanossomos dirigem-se para os prolongamentos do melanócito (dendritos) para entregar a melanina ao queratinócito.

Durante as etapas de formação do pigmento de melanina, há variação do pH intramelanossomal, que possui valores mais baixos no início do processo (bomba de prótons), mas eleva-se nas fases finais. O aumento do pH no interior do melanossomo é importante para finalização da formação dos pigmentos de melanina. A movimentação dos melanossomos ocorre através dos microtúbulos sob ação das proteínas: cinesina e dideína, que se aderem ao melanossomo, transportando-os (Videira; Moura; Magina, 2013). Logo após, cada melanossomo liga-se a um complexo formado pelas proteínas: melanofilina, RAB_{27A} e dinactina. Após essa ligação, os melanossomos são aderidos ao citoesqueleto de actina por ação da proteína

citossólica, miosina Va, estando prontos para a entrega aos queratinócitos (Bolognia; Jorizzo; Schaffer, 2017).

O fator de transcrição associado à microftalmia (MITF) é o principal regulador da melanogênese. MITF é ativado pela ligação de α -MSH em MC1-R; endotelina-1 em EDNRB; pela fosforilação de CREB (Kondo; Hearing, 2011). A melanogênese é um evento complexo que pode ser desencadeado por qualquer estímulo recebido pelo melanócito.

Apesar de não causar grave dano à saúde (Zhang *et al.*, 2019), a hiperpigmentação do melasma é crônica e difícil de ser controlada (Babbush; Babbush; Khachemoune, 2020). A mudança na tonalidade da pele, em áreas específicas, pode provocar alteração desfigurante na fisionomia (Zhu *et al.*, 2022). Por isso, o desenvolvimento de uma formulação eficaz e segura para o controle da hiperpigmentação do melasma é indispensável.

A dificuldade em se obter resultados satisfatórios no controle da hiperpigmentação deve-se, principalmente, à complexidade na formação dos pigmentos de melanina. O melanócito responde para todo estímulo recebido seja ele químico, físico ou mecânico. Além disso, há o envolvimento de inúmeros estímulos e vias de regulação (Videira; Moura; Magina, 2013). Ainda, o melanócito encontra-se protegido pelo estrato córneo à ação dos ativos quando veiculados em formulações comuns. O conhecimento a respeito dos inúmeros fatores que determinam a síntese de melanina, aliado ao desenvolvimento de formulações que permitam a entrega na epiderme viável (Gupta *et al.*, 2022) propicia a elaboração de produtos capazes de conduzir (eficazmente) os ativos em locais específicos da rota melanogênica e controle da melanogênese.

Por isso, a ciência cosmética possui grande interesse em desenvolver produtos eficazes para controlar o excesso na produção dos pigmentos de melanina (Cassiano *et al.*, 2022), já que muitos produtos disponíveis podem exercer ação lenta ou serem ineficazes (Bostan; Cakir, 2023). Muitas substâncias de ação antimelanogênica podem causar sensibilização, irritação e inflamação, colaborando com a piora da lesão. Portanto, é necessário que a formulação para o tratamento desta alteração estética, seja segura e capaz de interferir em vários mecanismos de síntese do pigmento. Além disso, a formulação deve ser de fácil aplicação (preferencialmente líquida), não comedogênica, ter boa espalhabilidade, ser biocompatível, além de proporcionar sensorial agradável ao toque.

Objetivou-se o desenvolvimento de uma formulação cosmética com um veículo baseado na nanotecnologia contendo ativos seguros de uso diário (ao longo das 24 horas do dia, para

ação contínua sobre a melanogênese). Portanto selecionou-se ingredientes ativos e adjuvantes técnicos seguros e não tóxicos. Na seleção das substâncias ativas cosméticas, considerou-se o mecanismo de ação que cada uma exerceria no controle da melanogênese, assim escolheu-se para compor a formulação cosmética três ativos que podem ser considerados multifuncionais (Costa, 2012), uma vez que oferecem outros benefícios para a pele, o que é de grande importância, pois na lesão de melasma há inflamação e danos na função barreira (Wang *et al.*, 2021). A formulação desenvolvida contém uma associação de três ingredientes, tais como Belides[®], nicotinamida e alfabisabolol. O ativo Belides[®] é um extrato botânico das flores de *Bellis perennis* que possui substâncias bioativas para o clareamento da pele, como saponinas, flavonoides e glicosídeos (Morikawa *et al.*, 2015). Atua na redução da liberação de endotelina pelos queratinócitos irradiados por UV, dificulta a interação entre o hormônio melanogênico (α -MSH) ao seu receptor. A nicotinamida exerce ação clareadora à pele, pois inibe a transferência dos melanossomos para os queratinócitos, atua como antioxidante, previne o envelhecimento cutâneo com o estímulo da renovação celular e a síntese de colágeno (Bains *et al.*, 2018). O ativo alfabisabolol atua como emoliente, anti-inflamatório, calmante, suavizante e clareador por inibir a interação do hormônio melanogênico ao receptor (Sivamani; Clark, 2016).

O veículo da formulação cosmética é uma microemulsão que oferece vantagens ao produto como garantia de solubilização e proteção dos ativos contra hidrólise e oxidação (Leite, 2009). Além disso, é um sistema líquido termodinamicamente estável, formado por gotículas nanométricas que potencializam a ação dos ativos. Para o desenvolvimento da microemulsão selecionou-se os tensoativos não iônicos, que são os de escolha e mais seguros para aplicação tópica (Sharma *et al.*, 2015). Primeiramente, selecionou-se o PEG 40 - óleo de rícino hidrogenado etoxilado, comercialmente denominado Cremophor[®] RH 40. Este é um tensoativo hidrofílico, não iônico e viscoso em temperatura ambiente. Atua também como agente solubilizante em muitas formulações cosméticas e farmacêuticas. Não é tóxico e não causa reação alérgica (Rachmawati *et al.*, 2017).

O monolaurato de polietilenoglicol sorbitano, Tween 20, é um tensoativo viscoso, não iônico, hidrofílico, seguro para ser utilizado como aditivo alimentar e como ingrediente técnico em formulações cosméticas e farmacêuticas. Um recente estudo indicou que o Tween 20 é seguro como excipiente para uma formulação injetável, na preparação de toxina botulínica sorotipo A (BoNT/A), em substituição da albumina sérica humana (HSA) (Kim *et al.*, 2021).

O oleato de sorbitano, Span 80, é um tensoativo lipofílico, não iônico e viscoso. É considerado como ingrediente seguro para o uso em produtos cosméticos (Fiume *et al.*, 2019). No sistema em desenvolvimento, o Span 80 está atuando como cotensoativo, com intuito de reduzir o EHL total da formulação (Sharma *et al.*, 2015) e garantir a estabilidade do ativo lipofílico, alfabisabolol.

A fase oleosa do sistema pode auxiliar na solubilização de princípios ativos lipossolúveis, atuar na espalhabilidade e aumentar o poder de condicionamento da pele, por agir como um ingrediente de nutrição (Gallerande, 2020). A fase oleosa do sistema é constituída pela associação dos hidrocarbonetos tridecano e undecano (alcanos renováveis), presentes no produto comercial Cetiol Ultimate® e pelo éster carbonato de dicaprilil (Cetiol CC®). Estes dois componentes de fase oleosa oferecem emoliência, reposição da camada lipídica, sensorial agradável e toque seco/aveludado (Salimon; Salih; Yousif, 2012). São muito utilizados em produtos cosméticos para a face, inclusive na composição de produtos para a proteção solar e maquiagens.

Algumas formulações cosméticas contêm ingredientes nutritivos, como vitaminas, ácidos graxos, peptídeos, extratos vegetais e grande quantidade de água, o que origina um meio propício para o crescimento de microrganismos. Portanto, um produto cosmético seguro deve conter substâncias preservantes capazes de inibir a proliferação microbiana, bem como inibir a degradação de seus constituintes pela ação do oxigênio atmosférico (Halla *et al.*, 2018). O sistema conservante da formulação desenvolvida contém substâncias de ação antimicrobiana, como o fenoxietanol e o caprililglicol, mas conta também com a participação de adjuvantes de ação sequestrante etilenodiaminotetracético (EDTA), e ação antioxidante, como o hidroxitolueno butilado (BHT).

O fenoxietanol é um ingrediente bastante utilizado em formulações cosméticas (Dréno *et al.*, 2019) constando na lista de conservantes para uso cosmético (Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 528, de 4 de agosto de 2021, (Brasil, 2021). A substância caprililglicol (1,2 octanodiol) é considerada segura para uso cosmético (Johnson *et al.*, 2012) e atua como um ingrediente multifuncional, pois oferece ação emoliente, umectante, exercendo também ação contra microrganismos. Em um estudo, essa substância foi capaz de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* (Lawan; Kanlayavattanukul; Lourith, 2009). Por não ser considerada como um agente conservante, não está contida na RDC nº 528 (Brasil, 2021). O

EDTA é uma molécula com grande capacidade de complexar e quelar metais (Banfi; Salvagno; Lippi, 2007). O BHT é um antioxidante permitido na fabricação de alimentos, medicamentos e cosméticos (Yehye *et al.*, 2015).

O tamanho da gotícula de uma nanodispersão coloidal é um requisito fundamental na caracterização da microemulsão (deve ser inferior a 100 nm) (Costa *et al.*, 2021). As gotículas nanométricas podem auxiliar na penetração e retenção de substâncias ativas de interesse na epiderme viável e até mesmo contribuir para a permeação à derme (Boonme *et al.*, 2016). As microemulsões podem, portanto, transportar as substâncias mesmo que não sejam tão pequenas (≤ 500 Da) ou que não tenham ideal coeficiente de partição (Szumala; Macierzanka, 2022). Os cosméticos veiculados em microemulsão exercem ação elevada na entrega epidérmica, devido a maior estabilidade dos ativos (Azeem *et al.*, 2008). Os tamanhos de gotículas medidos nos sistemas dos diagramas de fases 1, 2, 4 e 5 ficaram dentro da faixa nanométrica (entre $16 \pm 0,065$ nm até $33,3 \pm 0,16$ nm) indicando que os sistemas desenvolvidos se encontravam dentro faixa granulométrica atualmente aceita para sistemas microemulsionados (inferior a 100 nm) (Oliveira *et al.*, 2021). O menor tamanho da gotícula foi alcançado com os sistemas do diagrama 5 (PEGSPANTWEEN- 2: $16 \pm 0,065$ nm). Isso pode ser justificado pelo aumento na concentração de tensoativos e pela menor proporção de fase oleosa (Hadnadev *et al.*, 2013).

A avaliação do índice de polidispersão (PdI) indica o modo em que as gotículas estão distribuídas com relação ao tamanho. Os valores baixos de PdI (abaixo de 0,3) indicam boa distribuição das gotículas, sendo que valores abaixo de 0,05 indicam monodispersão (Danaei *et al.*, 2018). Houve valores distintos de PdI entre os sistemas analisados, mas todos os sistemas avaliados dos diagramas 1, 2, 4 e 5 apresentaram $PdI < 0,2$, o que demonstra sistemas com uniformidade na distribuição das gotículas. Com as alterações realizadas entre os componentes, alcançou-se bons resultados de tamanho de gotícula e de PdI com os sistemas do diagrama 5 (PEGSPANTWEEN-1: $PdI = 0,094 \pm 0,008$ e PEGSPANTWEEN-2: $PdI = 0,077 \pm 0,007$), indicando que o sistema selecionado para a incorporação dos ativos possui homogeneidade no tamanho das gotículas.

Os sistemas microemulsionados, assim como os demais sistemas dispersos, sofrem colisões aleatórias (movimento browniano) que podem resultar e desestabilização da formulação (Aulton; Taylor, 2016). Portanto a presença no sistema de tensoativos não iônicos (como por exemplo, o Tween) pode favorecer a estabilização estérica, uma vez que esses ingredientes podem adsorver a superfície das gotículas (Aulton; Taylor, 2016).

A avaliação da condutividade dos sistemas em estudo pode indicar a ocorrência de mudanças estruturais na fase externa do sistema microemulsionado. O valor da condutividade dos sistemas do Diagrama 5, que continham, cada um, 80% de fase aquosa (PEGSPANTWEEN-1 e PEGSPANTWEEN-2) apresentaram, respectivamente, valores de $100 \pm 0,57 \mu\text{S}/\text{cm}$ e $95,5 \pm 0,5 \mu\text{S}/\text{cm}$, sugerindo a formação de sistema óleo-em-água.

O valor do pH da formulação deve ser acompanhado ao longo do desenvolvimento do produto, pois variações podem indicar alterações na formulação, como degradação dos ingredientes pelo crescimento de microrganismos. Além disso, o pH de uma formulação para a pele deve ser biocompatível ($4 < \text{pH} < 6$) (Proksch, 2018). O pH adequado contribui para a manutenção do manto hidrolipídico garantindo a função barreira. O aumento no valor do pH do estrato córneo pode danificar a função barreira por diminuir a síntese de ceramidas (Ali; Yosipovitch, 2013). Além disso, a elevação do pH resulta em inflamação, bem como proliferação de microrganismos patogênicos. Formulações apresentando valor de pH em torno de 4, contribui com a conservação antimicrobiana (Halla *et al.*, 2018). Um produto apresentando valor de $\text{pH} \leq 5$ pode colaborar no controle da hiperpigmentação, pois na melanogênese, a principal enzima (tirosinase) que converte o substrato L-tirosina em melanina, tem seu ótimo de atividade em $\text{pH} \geq 7,4$ (Wakamatsu; Zippin; Ito, 2021).

Os sistemas avaliados dos diagramas 1, 2 e 4 apresentaram sistemas com valores de pH entre 5,48 e 6,02, confirmando valor seguro para utilização na face. No entanto, o diagrama de fases 5 originou sistemas com pH abaixo de 4 ($3,79 \pm 0,006$ e $3,77 \pm 0,005$ para os sistemas PEGSPANTWEEN-1 e PEGSPANTWEEN-2, respectivamente). Contudo, ao adicionar os três ativos cosméticos (Belides[®], nicotinamida e alfabisabolol) o valor do pH atingiu valor de $4,84 \pm 0,01$ alcançando a faixa ideal para o estrato córneo (Proksch, 2018). Portanto, o sistema final completo (com os ativos) possui pH biocompatível com o estrato córneo.

Uma microemulsão óleo-em-água oferece propriedades reológicas adequadas à concepção de um sérum. Além disso, sistemas óleo-em-água são mais leves e adequados à face. Dentre as particularidades da microemulsão, a baixa viscosidade facilita a aplicação do produto e a penetração cutânea (Alkrad; Mrestani; Neubert, 2016). O comportamento newtoniano de um sistema aliado a maior fluidez permite que a formulação seja extraída da embalagem facilmente (Acharya; Hartley, 2012). Todos os sistemas analisados dos diagramas 1, 2, 4 e 5 apresentaram fluxo tendendo ao newtoniano, pois a viscosidade se manteve praticamente constante com o aumento da taxa de cisalhamento. Observando os gráficos da viscosidade em

função do gradiente de cisalhamento, nota-se que em todos os sistemas houve tendência linear, já que os sistemas apresentaram valores constantes de viscosidade e fluxo newtoniano, conforme previsto para um sistema microemulsionado (Sisak; Daik; Ramli, 2017).

Uma formulação cosmética que ofereça um sensorial agradável durante e após sua aplicação na pele possui atributos para maior aceitabilidade e garantia de uso. As características individuais de cada um dos ingredientes presentes na formulação podem determinar o sensorial final. Uma boa espalhabilidade pode ser alcançada pela utilização de ingredientes emolientes, tais como os óleos vegetais, o silicone e os ésteres (Savary; Grisel; Picard, 2013). A espalhabilidade e o tempo de secagem são qualidades que podem impactar no sensorial final, pois indicam a facilidade da aplicação do produto, bem como a sensação proporcionada após a aplicação.

Após a caracterização físico-química dos sistemas selecionados, escolheu-se do diagrama 5 (para o desenvolvimento do produto cosmético), o sistema PEGSPANTWEEN-2, que se mostrou um sistema transparente e de baixa viscosidade. O sistema PEGSPANTWEEN-2 (composto por 18% de tensoativos, 2% de fase oleosa e 80% de fase aquosa) proporcionou adequada espalhabilidade, secagem rápida e toque seco/macio. De acordo com (Costa *et al.*, 2021), a incorporação de ativos botânicos em sistemas microemulsionados normalmente pode alterar a cor e o odor dos cosméticos. Após a incorporação dos ativos o sistema adquiriu coloração levemente amarelada e odor característico do extrato de *Bellis perennis*, porém manteve a transparência característica de uma microemulsão (Leite, 2009).

O carregamento do sistema com os ativos cosméticos não modificou o tamanho das gotículas. De acordo com a análise estatística realizada pelo teste de *Wilcoxon Mann-Whitney*, não houve diferença, ao nível de 95% de confiança, entre as médias de tamanho das gotículas do sistema sem os ativos e com o carregamento dos ativos ($p\text{-valor} = 0,1$). Não houve também alteração na ordenação das gotas dispersas, pois o valor do índice de polidispersão manteve-se menor que 0,1, indicando que a população de gotículas se encontra em equilíbrio (Danaei *et al.*, 2018).

A formulação desenvolvida contém três substâncias ativas, que foram associadas para a promoção de uma ação sinérgica no controle do melasma. Duas das substâncias ativas apresentam caráter hidrofílico (nicotinamida e apigenina-7-O-glicosídeo) e uma de caráter lipofílico (alfabisabolol). Diante disso, para o desenvolvimento do método, foi necessária a utilização do espectrômetro de massas acoplado à cromatografia líquida (para os compostos

hidrofílicos) e do espectrômetro de massas acoplado à cromatografia gasosa para o composto lipofílico. Para cada um dos analitos, estudou-se o comportamento em diferentes solventes, sendo que, para o preparo dos padrões, utilizou dois tipos: acetonitrila e metanol, com intuito de avaliar o comportamento dos analitos com relação à área alcançada e a intensidade do sinal. Ao verificar a melhor resolução do pico e maior área, definiu-se o metanol para os analitos hidrofílicos (nicotinamida e apigenina-7-O-glicosídeo), pois este foi favoreceu a ionização da nicotinamida. A acetonitrila foi escolhida para o preparo do alfabisabolol.

Durante o desenvolvimento do método analítico para o ingrediente ativo Belides[®], elegeu-se (dentre os inúmeros compostos bioativos presentes no extrato de *Bellis perennis*) um marcador: apigenina-7-O-glicosídeo. A seleção de um marcador é necessária, pois os extratos vegetais são matrizes complexas formadas por várias classes de compostos bioativos contendo diferentes arranjos moleculares (substituintes). Essa complexidade dificulta a atribuição do componente ativo à ação. Logo, a seleção de um dos componentes (em maior abundância) no extrato, viabiliza a avaliação do produto no controle de qualidade do extrato vegetal (Souza; Mello; Lopes, 2012). A molécula de apigenina-7-O-glicosídeo é um flavonoide do tipo glicona, por possuir uma molécula de açúcar ligada à hidroxila da posição 7 (O-heterosídeo) (Siatka; Kašparová, 2010). Estas gliconas estão presentes nas folhas de *Bellis perennis*, (Morikawa *et al.*, 2015). Os flavonoides são moléculas bioativas que podem colaborar com a ação despigmentante, devido suas propriedades antioxidantes (Mahajan *et al.*, 2022), sendo, portanto, considerado como um marcador ativo (Simões *et al.*, 2017).

O método foi desenvolvido e validado para cada um dos ativos. O ensaio de linearidade demonstrou uma correlação entre a área dos padrões analíticos e as concentrações, sendo que a faixa analítica para a nicotinamida foi entre 5 e 60 mg/L, para apigenina-7-O-glicosídeo foi entre 0,2 e 2,2 mg/L e para o alfabisabolol entre 10 e 100 mg/L. Alcançou-se coeficiente de correlação acima de 0,999 para os três analitos, indicando forte correlação (Ferreira; Oliveira, 2020).

A análise estatística não demonstrou desvio da linearidade. Para os três analito houve homocedasticidade da variância. Os limites de detecção e quantificação foram calculados por meio da curva analítica de cada analito. Os LQs foram 5; 0,5 e 7 mg/L para nicotinamida, apigenina-7-O-glicosídeo e alfabisabolol, respectivamente. A exatidão foi comprovada pela recuperação dos analitos, sendo que a porcentagem de recuperação para a nicotinamida ficou em 112,6% para a concentração de 5 mg/L; 98,18% para a concentração de 20 mg/L e 99,3%

para a concentração de 60 mg/L. Para a apigenina-7-O-glicosídeo, o valor de recuperação foi de 112,3%; 96,2% e 99,4% para as concentrações de 0,5; 1 e 2,2 mg/L, respectivamente. Para o alfabisabolol a recuperação ficou entre 87,4% (10mg/L); 102,7% (40 mg/L) e 100,1 % (60 mg/L).

A utilização dos espectrômetros de massa acoplados à cromatografia líquida (LC-MS/MS) e à cromatografia gasosa (GC-MS) ofereceu inúmeras vantagens para o desenvolvimento do método, pois o detector de massas permite a quantificação e a identificação inequívoca dos analitos (Silverstein; Webster; Kiemle, 2005). Além disso, a fonte de ionização por eletrospray pode ser utilizada com moléculas lábeis e muito solúveis (Pavia *et al.*, 2010) como é o caso do extrato vegetal de Belides[®], que possui inúmeros bioativos (Lim, 2014) e da nicotinamida que é bastante hidrossolúvel. Entretanto, não foi possível o desenvolvimento de um método simultâneo para a quantificação dos hidrofílicos devido a grande diferença de concentração entre apigenina-7-O-glicosídeo e a nicotinamida na amostra.

A utilização do CG-MS permite o desenvolvimento de um método reprodutivo, seletivo e sensível (Beale *et al.*, 2018) sem a necessidade de consumo de muitos reagentes. Com a utilização do CG-MS, pode-se identificar e quantificar o ativo lipossolúvel, alfabisabolol. Através dos espectrômetros de massa acoplados à cromatografia líquida e gasosa, foi possível o desenvolvimento e a validação dos métodos para a quantificação dos analitos no estudo de estabilidade e no estudo de permeação e retenção cutânea *in vitro*.

O sistema cosmético desenvolvido foi considerado estável pelo estudo de estabilidade acelerada nas diferentes condições de temperatura. Não houve perda de teor ou sequer alteração nas propriedades físico-químicas. Todos os parâmetros avaliados se mantiveram adequados para um sistema microemulsionado. A boa resposta na avaliação da estabilidade da formulação pode estar relacionada com o tipo de veículo escolhido, uma vez que formulações nanodispersas estabilizados por tensoativos (microemulsão) protegem as moléculas ativas da degradação, previnem alterações de pH, bem como promovem aumento de solubilidade de moléculas tanto polares, quanto apolares. Além disso, o pequeno tamanho das gotículas desses sistemas colabora para adequada dispersão, o que previne aglomeração, garantindo a estabilidade e consequente longo tempo de prateleira (Swarbrick, 2007).

A pele de orelha de porco foi utilizada no ensaio da permeação cutânea *in vitro*, pois de acordo com a literatura, esta é a pele mais adequada para estes estudos (Jonsdottir *et al.*, 2022) devido à grande semelhança na composição lipídica entre os dois tipos de pele, fazendo com

que esta pele responda de forma semelhante aos experimentos quando comparada à humana (Godin; Touitou, 2007). Na avaliação da permeação cutânea *in vitro*, a formulação mostrou-se segura, pois a quantidade que permeou para a solução receptora de ambos analitos foi muito baixa, não sugerindo possibilidade de absorção sistêmica. A avaliação por *tape stripping* mostrou que os ativos não ficaram retidos no estrato córneo indicando que eles puderam se difundir às camadas da epiderme. O tipo de veículo do produto cosmético pode facilitar o alcance dos ativos ao alvo, pois a presença de tensoativos e ésteres podem alterar a função barreira, agindo como promotores da penetração cutânea (Huh *et al.*, 2022). A baixa concentração de ativos na solução receptora, aliada à ausência de sinal analítico nas análises do estrato córneo corroboram que os ativos cosméticos alcançaram a epiderme viável onde se encontra a célula alvo (melanócito). Isso poderá ser comprovado através da análise em microscópio confocal, que evidencia a presença de moléculas inseridas na pele (Choe; Lademann; Darvin, 2015). O sistema nanodisperso foi efetivo e permitiu a entrega dos ativos para as camadas da epiderme viável.

No estudo da viabilidade celular, além da avaliação dos ativos individuais, analisou-se também o sistema carregado com os ativos cosméticos e o sistema sem os ativos, com intuito de conferir a viabilidade das células diante dos componentes da formulação (tensoativos, adjuvantes de fase oleosa). Neste estudo, apenas as menores diluições (60 e 120x) e as maiores concentrações para o ativo alfabisabolol diminuíram a viabilidade celular. Os componentes bioativos de *Bellis perennis* protegem as células e aumentam a viabilidade celular por exercem efeito antioxidante. Um estudo mostrou que o extrato de *Bellis perennis* foi capaz de prevenir danos celulares após a irradiação UVA, exercendo ação fotoprotetora (Carvalho *et al.*, 2021). A nicotinamida apresenta ação antioxidante exercendo benefícios à pele pela diminuição do estresse oxidativo (Philips; Khaosaat; Gonzalez, 2015). Através do estudo de viabilidade celular pode-se concluir que o sistema cosmético desenvolvido contendo Belides[®], nicotinamida e alfabisabolol é seguro para a utilização na hiperpigmentação de melasma.

7 CONCLUSÃO

Com este trabalho, desenvolveu-se um cosmético nanotecnológico estável, composto por Belides[®], nicotinamida e alfabisabolol para o controle do melasma, que é uma hiperpigmentação adquirida e recorrente. O veículo cosmético é um sistema microemulsionado que permite que as moléculas ativas sejam conduzidas até a célula produtora de melanina, controlando a síntese.

Esse sistema microemulsionado apresenta baixa viscosidade e elevado conteúdo aquoso; microestrutura em óleo-em-água; transparência, gotículas nanométricas e baixa polidispersão. Estas características favorecem a concepção de uma formulação com alta estabilidade, aspecto elegante e sensorial adequado para aplicação na face.

Com o estudo de estabilidade acelerada comprovou-se a estabilidade da formulação com a manutenção constante de todos os parâmetros analisados diante de três diferentes condições de temperatura (5, 25 e 40 °C).

Pelos estudos *in vitro* de permeação/retenção cutânea e viabilidade celular, comprovou-se a segurança para uso tópico deste cosmético, uma vez não houve permeação das moléculas ativas em quantidades importantes, bem como não houve diminuição da viabilidade sobre as células L929 (fibroblastos), respectivamente. A avaliação da penetração cutânea por *tape stripping* sugeriu que os ativos se difundiram para as camadas da epiderme viável, pois nas análises do estrato córneo (após permeação) não se detectou a presença de ativos. Portanto, obteve-se um sistema cosmético nanodisperso estável, biocompatível e de sensorial adequado para aplicação na face contendo ativos cosméticos seguros para o controle do melasma.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, Durga P.; HARTLEY, Patrick G. Progress in microemulsion characterization. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, [s. l.], vol. 17, nº 5, p. 274–280, 2012.
- AISHWARYA, K.; BHAGWAT, Pradeep Vittal; JOHN, Nimmi. Current concepts in melasma - A review article. **Journal of Skin and Sexually Transmitted Diseases**, [s. l.], vol. 2, p. 13, 2020.
- ALI, S; YOSIPOVITCH, G. Skin pH: From Basic Science to Basic Skin Care. **Acta Dermato Venereologica**, [s. l.], vol. 93, nº 3, p. 261–267, 2013.
- ALKRAD, Jamal Alyoussef; MRESTANI, Yahya; NEUBERT, Reinhard H.H. Development and characterization of microemulsions containing hyaluronic acid. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], vol. 86, p. 84–90, 2016.
- AMARAL, Valéria do *et al.* Alfa-bisabolol: uma revisão de propriedades bioativas antiflogísticas. **Research, Society and Development**, [s. l.], vol. 10, nº 12, p. e447101220618, 2021.
- ANDO, Hideya *et al.* Melanosomes Are Transferred from Melanocytes to Keratinocytes through the Processes of Packaging, Release, Uptake, and Dispersion. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], vol. 132, nº 4, p. 1222–1229, 2012.
- ANSARY, Tuba M. *et al.* Inflammatory Molecules Associated with Ultraviolet Radiation-Mediated Skin Aging. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], vol. 22, nº 8, p. 3974, 2021.
- ANVISA, BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolution of the collegiate board - RDC nº 752, of 19th September 2022**. Dispõe sobre a definição, a classificação, os requisitos técnicos para rotulagem e embalagem, os parâmetros para controle microbiológico, bem como os requisitos técnicos e procedimentos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Brazil: 2022.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. [S. l.]: [s. d.], 2004. vol. 1
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**. 2. ed. Brasília: ANVISA, 2012.
- ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166 de 24 de julho de 2017. Guia para validação de métodos analíticos**. Brasil: 2017.
- ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 528, de 4 de agosto de 2021**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/regulamentacao/legislacao/bibliotecas-tematicas/arquivos/cosmeticos>. Acesso em: 5 maio 2022.
- ANVISA. **RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 529, DE 4 DE AGOSTO DE 2021**. [S. l.], 2021. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br>. .
- ANVISA, BRASIL. **validação**. [S. l.]: [s. d.], 2004. vol. 1

AULTON, ME; TAYLOR, KMG. **Aulton: Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

AZEEM, Adnan *et al.* Emerging Role of Microemulsions in Cosmetics. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, [s. l.], vol. 2, n° 3, p. 275–289, 2008.

AZULAY, R. D; AZULAY, D. R.; ABULAFIA, L. A. **Azulay**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

BABBUSH, Kayla; BABBUSH, Remy; KHACHEMOUNE, Amor. The Therapeutic Use of Antioxidants for Melasma. **Journal of Drugs in Dermatology**, [s. l.], vol. 19, n° 8, p. 788–792, 2020.

BAINS, Pooja *et al.* Nicotinamide: Mechanism of action and indications in dermatology. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, [s. l.], vol. 84, n° 2, p. 234, 2018.

BANFI, Giuseppe; SALVAGNO, Gian Luca; LIPPI, Giuseppe. The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. **Clinical Chemical Laboratory Medicine**, [s. l.], vol. 45, n° 5, 2007.

BEALE, David J. *et al.* Review of recent developments in GC–MS approaches to metabolomics-based research. **Metabolomics**, [s. l.], vol. 14, n° 11, p. 152, 2018.

BENITO-MARTÍNEZ, Silvia *et al.* Melanin Transfer and Fate within Keratinocytes in Human Skin Pigmentation. **Integrative and Comparative Biology**, [s. l.], vol. 61, n° 4, p. 1546–1555, 2021.

BOLOGNIA, J.L.; JORIZZO, J.L.; SCHAFFER, J.V. **Dermatologia**. 4. ed. New York: Elsevier, 2017.

BONILHA, G. C.; CAMPOS, P. M. B. G. M.; COSTA, G. M. D. Rheological, texture, and sensory analyses and in vivo clinical efficacy of cosmetic formulations containing ascorbyl tetraisopalmitate. **Biomedical and Biopharmaceutical Research Journal**, [s. l.], vol. 17, n° 1, p. 1–12, 2020.

BOO, Yong Chool. Mechanistic Basis and Clinical Evidence for the Applications of Nicotinamide (Niacinamide) to Control Skin Aging and Pigmentation. **Antioxidants**, [s. l.], vol. 10, n° 8, p. 1315, 2021.

BOONME, Prapaporn *et al.* Evaluation of nicotinamide microemulsion on the skin penetration enhancement. **Pharmaceutical Development and Technology**, [s. l.], vol. 21, n° 1, p. 116–120, 2016.

BOSTAN, Ecem; CAKIR, Aysel. The dermoscopic characteristics of melasma in relation to different skin phototypes, distribution patterns and wood lamp findings: a cross-sectional study of 236 melasma lesions. **Archives of Dermatological Research**, [s. l.], vol. 315, p. 1927–1938, 2023.

BUDIASIH, S *et al.* Formulation and Characterization of Cosmetic Serum Containing Argan Oil as Moisturizing Agent. **SCITEPRESS – Science and Technology Publications, Lda**, [s. l.], p. 1–8, 2018.

- CALLENDER, Shannon P. *et al.* Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], vol. 526, n° 1–2, p. 425–442, 2017.
- CALVO, Joel; QUINTANAR, Alejandro; AEDO, Carlos. Typification of four species names of *Bellis* (Compositae). **Nordic Journal of Botany**, [s. l.], vol. 30, n° 6, p. 668–670, 2012.
- CANDI, Eleonora; SCHMIDT, Rainer; MELINO, Gerry. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], vol. 6, n° 4, p. 328–340, 2005.
- CARVALHO, Vivian Maria Souza de *et al.* *Bellis perennis* extract mitigates UVA-induced keratinocyte damage: Photoprotective and immunomodulatory effects. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], vol. 221, p. 112247, 2021.
- CASSIANO, Daniel P. *et al.* Update on Melasma—Part II: Treatment. **Dermatology and Therapy**, [s. l.], vol. 12, p. 1989–2012, 2022.
- CATZ, Paul *et al.* Simultaneous determination of myristyl nicotinate, nicotinic acid, and nicotinamide in rabbit plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using methyl ethyl ketone as a deproteinization solvent. **Journal of Chromatography B**, [s. l.], vol. 829, n° 1–2, p. 123–135, 2005.
- CHAMCHEU, Jean Christopher; WALKER, Anthony Lynn.; NOUBISSI, Felicite Kamdem. Natural and Synthetic Bioactives for Skin Health, Disease and Management. **Nutrients**, [s. l.], vol. 13, n° 12, p. 4383, 2021.
- CHAUDHARY, Jignesh. Production Technology and Applications of Kojic Acid. **Annual Research & Review in Biology**, [s. l.], vol. 4, n° 21, p. 3165–3196, 2014.
- CHOE, ChunSik; LADEMANN, Jürgen; DARVIN, Maxim E. Analysis of Human and Porcine Skin in vivo/ex vivo for Penetration of Selected Oils by Confocal Raman Microscopy. **Skin Pharmacology and Physiology**, [s. l.], vol. 28, n° 6, p. 318–330, 2015.
- CHUNG, Bo *et al.* The Glutathione Derivative, GSH Monoethyl Ester, May Effectively Whiten Skin but GSH Does Not. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], vol. 17, n° 5, p. 629, 2016.
- COSTA, Ana *et al.* Evaluating the Presence of Lycopene-Enriched Extracts from Tomato on Topical Emulsions: Physico-Chemical Characterization and Sensory Analysis. **Applied Sciences**, [s. l.], vol. 11, n° 11, p. 5120, 2021.
- COSTA, Adilson. **Tratado Internacional de Cosmecêuticos**. 1ªed. Rio de Janeiro: [s. d.], 2012.
- COSTA, Flavia G; HORSWILL, Alexander R. Overcoming pH defenses on the skin to establish infections. **PLOS Pathogens**, [s. l.], vol. 18, n° 5, p. e1010512, 2022.
- COSTIN, Gertrude-E.; HEARING, Vincent J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. **The FASEB Journal**, [s. l.], vol. 21, n° 4, p. 976–994, 2007.
- DAMASCENO, B.P.G.L *et al.* Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, [s. l.], 2011.

DANAEI, M. *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, [s. l.], vol. 10, n° 2, p. 57, 2018.

DANBY, Simon G. *et al.* Enhancement of stratum corneum lipid structure improves skin barrier function and protects against irritation in adults with dry, eczema-prone skin*. **British Journal of Dermatology**, [s. l.], vol. 186, n° 5, p. 875–886, 2022.

DEAN, Dexter N.; LEE, Jennifer C. Modulating functional amyloid formation via alternative splicing of the premelanosomal protein PMEL17. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], vol. 295, n° 21, p. 7544–7553, 2020.

DESMEDT, B. *et al.* Overview of skin whitening agents with an insight into the illegal cosmetic market in Europe. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, [s. l.], vol. 30, n° 6, p. 943–950, 2016.

D'ISCHIA, Marco *et al.* Melanin Biopolymers: Tailoring Chemical Complexity for Materials Design. **Angewandte Chemie International Edition**, [s. l.], vol. 59, n° 28, p. 11196–11205, 2020.

D'MELLO, Stacey *et al.* Signaling Pathways in Melanogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], vol. 17, n° 7, p. 1144, 2016.

DOOLAN, Brent J; GUPTA, Monisha. Melasma. **Australian Journal of General Practice**, [s. l.], vol. 50, n° 12, p. 880–885, 2021.

DRÉNO, B. *et al.* Safety review of phenoxyethanol when used as a preservative in cosmetics. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, [s. l.], vol. 33, n° S7, p. 15–24, 2019.

EDDIN, Lujain Bader *et al.* Health Benefits, Pharmacological Effects, Molecular Mechanisms, and Therapeutic Potential of α -Bisabolol. **Nutrients**, [s. l.], vol. 14, n° 7, p. 1370, 2022.

ELOY, Josimar O.; ABRIATA, Juliana Palma; MARCHETTI, Juliana Maldonado. **Nanocarriers for Drug Delivery**. Cham: Springer International Publishing, 2021. (Nanomedicine and Nanotoxicology).

ENKHTAIVAN, Enkhmend; LEE, Chang Hoon. Role of Amine Neurotransmitters and Their Receptors in Skin Pigmentation: Therapeutic Implication. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], vol. 22, n° 15, p. 8071, 2021.

EVANGELISTA, Marta *et al.* Usage Patterns and Self-Esteem of Female Consumers of Antiaging Cosmetic Products. **Cosmetics**, [s. l.], vol. 9, n° 3, p. 49, 2022.

FDA. **Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials Guidance for Industry**. EUA: 2017.

FERREIRA, Mariana *et al.* Overview of Cosmetic Regulatory Frameworks around the World. **Cosmetics**, [s. l.], vol. 9, n° 4, p. 72, 2022.

FERREIRA, Eric. Batista; OLIVEIRA, Marcelo. Silva. **Introdução à Estatística com R**. 1. ed. Alfenas: Editora Universidade Federal de Alfenas, 2020.

FISK, Whitney A. *et al.* The use of botanically derived agents for hyperpigmentation: A systematic review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s. l.], vol. 70, nº 2, p. 352–365, 2014.

FITZPATRICK, Thomas B. The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I Through VI. **Archives of Dermatology**, [s. l.], vol. 124, nº 6, p. 869, 1988.

FIUME, Monice M. *et al.* Safety Assessment of Sorbitan Esters as Used in Cosmetics. **International Journal of Toxicology**, [s. l.], vol. 38, nº 2_suppl, p. 60S-80S, 2019.

FORBAT, E.; AL-NIAIMI, F.; ALI, F. R. Use of nicotinamide in dermatology. **Clinical and Experimental Dermatology**, [s. l.], vol. 42, nº 2, p. 137–144, 2017.

FORMARIZ, Thalita Pedroni *et al.* Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s. l.], vol. 41, nº 3, 2005.

GALLERANDE, Hélène de Clermont. Functional roles of lipids in make-up products. **OCL**, [s. l.], vol. 27, p. 33, 2020.

GAMAGE, Dehel Gamage Nadeeshani Dilhara *et al.* Global Perspective of Plant-Based Cosmetic Industry and Possible Contribution of Sri Lanka to the Development of Herbal Cosmetics. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], vol. 2022, p. 1–26, 2022.

GARCIA, L B *et al.* Incorporation of glycolic extract of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) into microemulsions and emulgels for skincare. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], vol. 161, p. 113181, 2021.

GARCIA, M T J *et al.* Nanocarriers of Drugs for Topical Delivery. *In*: SPRINGER. [S. l.]: [s. d.], 2021a. p. 153–181. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-63389-9_8.

GHORBANI, Nayyereh *et al.* Total Flavonoids and Phenolic Compounds of English Daisy (*Bellis Perennis* L.) Affected by Foliar Application of NanoPhosphorus Fertilizers. **International Journal of Horticultural Science and Technology**, [s. l.], vol. 9, nº 4, p. 405–414, 2022.

GHOSH, Vijayalakshmi; MUKHERJEE, Amitava; CHANDRASEKARAN, Natarajan. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], vol. 20, nº 1, p. 338–344, 2013.

GILLBRO, J. M.; OLSSON, M. J. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents - existing and new approaches. **International Journal of Cosmetic Science**, [s. l.], vol. 33, nº 3, p. 210–221, 2011.

GODIN, B; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], vol. 59, nº 11, p. 1152–1161, 2007.

GOLDENBERG, Mirian. Gênero e corpo na cultura brasileira. **Psicologia Clínica**, [s. l.], vol. 17, nº 2, p. 65–80, 2005.

GOLDENBERG, Mirian. The Body as Capital Understanding Brazilian Culture. **VIBRANT - Vibrant Virtual Brazilian Anthropology**, Brasília, vol. 7, n° 1, p. 220–238, 2010.

GONZÁLEZ-MINERO, Francisco; BRAVO-DÍAZ, Luis. The Use of Plants in Skin-Care Products, Cosmetics and Fragrances: Past and Present. **Cosmetics**, [s. l.], vol. 5, n° 3, p. 50, 2018.

GUPTA, Vaibhav *et al.* Nanotechnology in Cosmetics and Cosmeceuticals—A Review of Latest Advancements. **Gels**, [s. l.], vol. 8, n° 3, p. 173, 2022.

GUPTA, Vishal; SHARMA, Vinod Kumar. Skin typing: Fitzpatrick grading and others. **Clinics in Dermatology**, [s. l.], vol. 37, n° 5, p. 430–436, 2019.

HADNAĐEV, Tamara Dapčević *et al.* Influence of oil phase concentration on droplet size distribution and stability of oil-in-water emulsions. **European Journal of Lipid Science and Technology**, [s. l.], vol. 115, n° 3, p. 313–321, 2013.

HALL, Ronald E. (org.). **The Melanin Millennium**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013.

HALLA, Nouredine *et al.* Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies. **Molecules**, [s. l.], vol. 23, n° 7, p. 1571, 2018.

HANDEL, Ana Carolina; MIOT, Luciane Donida Bartoli; MIOT, Hélio Amante. Melasma: a clinical and epidemiological review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], vol. 89, n° 5, p. 771–782, 2014.

HARRIS-TRYON, Tamia A.; GRICE, Elizabeth A. Microbiota and maintenance of skin barrier function. **Science**, [s. l.], vol. 376, n° 6596, p. 940–945, 2022.

HOLTHÖFER, Bastian *et al.* Structure and Function of Desmosomes. In: [S. l.]: [s. d.], 2007. p. 65–163. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0074769607640030>.

HUH, Yoonjung *et al.* Effect of Cosmetics Use on the In Vitro Skin Absorption of a Biocide, 1,2-Benzisothiazolin-3-one. **Toxics**, [s. l.], vol. 10, n° 3, p. 108, 2022.

JABLONSKI, Nina G.; CHAPLIN, George. Human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], vol. 107, n° supplement_2, p. 8962–8968, 2010.

JIA, Qi *et al.* Pharmacokinetic Study of Thirteen Ingredients after the Oral Administration of Flos Chrysanthemi Extract in Rats by UPLC-MS/MS. **BioMed Research International**, [s. l.], vol. 2020, p. 1–10, 2020.

JIANG, J. *et al.* The effect of melasma on self-esteem: A pilot study. **International Journal of Women's Dermatology**, [s. l.], vol. 4, n° 1, p. 38–42, 2018a. Disponível em: Acesso em: 24 abr. 2021.

JOHN, Sabrina *et al.* Skin-Lightening Agent with Different Pathways of Action on Melanogenesis. **SÖFW-Journal**, [s. l.], vol. 131, p. 40–49, 2005.

JOHNSON, Wilbur *et al.* Safety Assessment of 1,2-Glycols as Used in Cosmetics. **International Journal of Toxicology**, [s. l.], vol. 31, n° 5_suppl, p. 147S–168S, 2012.

JONSDOTTIR, Fjola *et al.* Transdermal Drug Delivery: Determining Permeation Parameters Using Tape Stripping and Numerical Modeling. **Pharmaceutics**, [s. l.], vol. 14, n° 9, p. 1880, 2022.

JOSHI, LAXMI S; PAWAR, A HARSHAL. Herbal Cosmetics and Cosmeceuticals: An Overview. **Natural Products Chemistry & Research**, [s. l.], vol. 3, n° 2, 2015.

JR, LVA; POPOVICH, NG; ANSEL, HC. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

JUNQUEIRA, LC; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

JUZENIENE, Asta *et al.* Solar radiation and human health. **Reports on Progress in Physics**, [s. l.], vol. 74, n° 6, p. 066701, 2011.

KAMANNA, V. S.; GANJI, S. H.; KASHYAP, M. L. The mechanism and mitigation of niacin-induced flushing. **International Journal of Clinical Practice**, [s. l.], vol. 63, n° 9, p. 1369–1377, 2009.

KAMATOU, Guy P. P.; VILJOEN, Alvaro M. A Review of the Application and Pharmacological Properties of α -Bisabolol and α -Bisabolol-Rich Oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, [s. l.], vol. 87, n° 1, p. 1–7, 2010.

KARAHAN, Faruk. Morphology, anatomy, palynology and achene micromorphology of *Bellis L.* (Asteraceae) species from Turkey. **Acta botanica Croatica**, [s. l.], vol. 79, n° 1, p. 59–67, 2020.

KATHURIA, Himanshu *et al.* Proposome for transdermal delivery of tofacitinib. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], vol. 585, p. 119558, 2020.

KIERSZENBAUM, Abraham L; TRES, Laura L. **Histology and cell biology an introduction to pathology**. 5. ed. Philadelphia: Elsevier, 2020.

KIM, Junhyung *et al.* Safety verification for polysorbate 20, pharmaceutical excipient for intramuscular administration, in Sprague-Dawley rats and New Zealand White rabbits. **PLOS ONE**, [s. l.], vol. 16, n° 8, p. e0256869, 2021.

KONDO, T.; HEARING, V.J. Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. **Expert Rev Dermatol**, [s. l.], p. 97–108, 2011.

KOWALCZYK, Andrew P.; GREEN, Kathleen J. Structure, Function, and Regulation of Desmosomes. In: [S. l.]: [s. d.], 2013. p. 95–118. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123943118000054>.

KUMAR, Anoop; KUSHWAHA, Vibha; SHARMA, Pankaj Kumar. Pharmaceutical Microemulsion: Formulation, Characterization and Drug deliveries across skin. **International Journal of Drug Development & Research** 6, [s. l.], vol. 6, n° 1, p. 1–21, 2014.

KUMARI, S *et al.* Melanogenesis Inhibitors. **Acta Dermato Venereologica**, [s. l.], vol. 98, n° 10, p. 924–931, 2018.

LAWAN, Kunlayakorn; KANLAYAVATTANAKUL, Mayuree; LOURITH, and Nattaya. Antimicrobial efficacy of caprylyl glycol and ethylhexylglycerine in emulsion. **Journal of Health Research**, [s. l.], vol. 23, nº 1, p. 1–3, 2009.

LEITE, Mateus Freire *et al.* **Composições cosméticas nanodispersas contendo extrato de *Bellis perennis* para controle do melasma**. BR 10 2023 002896 9. Concessão: 2023.

LEITE, Mateus Freire. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões contendo extrato e óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* para enxaguatório bucal**. 2009. - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

LEITE, Mateus Freire *et al.* Prospecção tecnológica sobre o uso de retinóides em formulações despigmentantes. **Cadernos de Prospecção**, [s. l.], vol. 8, nº 4, p. 754–760, 2015.

LI, Xiangcun *et al.* Study on conductivity property and microstructure of TritonX-100/alkanol/n-heptane/water microemulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], vol. 360, nº 1–3, p. 150–158, 2010.

LIANZA, Mariacaterina *et al.* Screening of ninety herbal products of commercial interest as potential ingredients for phytocosmetics. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [s. l.], vol. 35, nº 1, p. 1287–1291, 2020.

LIM, T. K. *Bellis perennis*. In: EDIBLE MEDICINAL AND NON-MEDICINAL PLANTS. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 204–212.

LIU, Man *et al.* Simultaneous quantification of niacin and its three main metabolites in human plasma by LC–MS/MS. **Journal of Chromatography B**, [s. l.], vol. 904, p. 107–114, 2012.

MADDALENO, Adriana Solange *et al.* Melanogenesis and Melasma Treatment. **Cosmetics**, [s. l.], vol. 8, nº 3, p. 1–11, 2021.

MAGALHÃES, Washington Luiz Esteves; THÁ, Emanoela Lundgren; LEME, Daniela Moraes. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. Colombo, PR, p. 12, 2018.

MAHAJAN, Vikram K. *et al.* Medical therapies for melasma. **Journal of Cosmetic Dermatology**, [s. l.], vol. 21, nº 9, p. 3707–3728, 2022.

MALIK, Deepinder Singh; KAUR, Gurpreet. Exploring therapeutic potential of azelaic acid loaded NLCs for the treatment of acne vulgaris. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], vol. 55, p. 101418, 2020.

MARKS, Michael S.; PAVAN, William J. How a membrane transporter keeps melanocytes in the red. **Pigment Cell & Melanoma Research**, [s. l.], vol. 34, nº 4, p. 666–669, 2021.

MCKESEY, Jacqueline; TOVAR-GARZA, Andrea; PANDYA, Amit G. Melasma Treatment: An Evidence-Based Review. **American Journal of Clinical Dermatology**, [s. l.], vol. 21, nº 2, p. 173–225, 2020.

MICHALUN, M.V; DINARDO, J.C. **Skin Care and Cosmetic Ingredients Dictionary**. 4. ed. Clifton Park, NY, EUA: Cengage Learning, 2014.

MIOT, Luciane Donida Bartoli *et al.* Fisiopatologia do melasma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], vol. 84, nº 6, p. 623–635, 2009.

- MISERY, L *et al.* Melasma: Measure of the Impact on Quality of Life Using the French Version of MELASQOL after Cross-cultural Adaptation. **Acta Dermato Venereologica**, [s. l.], vol. 90, n° 3, p. 331–332, 2010.
- MOORE, D. J.; RAWLINGS, A. V. The chemistry, function and (patho)physiology of stratum corneum barrier ceramides. **International Journal of Cosmetic Science**, [s. l.], vol. 39, n° 4, p. 366–372, 2017.
- MORIKAWA, Toshio *et al.* Oleanane-type triterpene saponins with collagen synthesis-promoting activity from the flowers of *Bellis perennis*. **Phytochemistry**, [s. l.], vol. 116, p. 203–212, 2015.
- MURPHY, Michael J; DOW, Aileen A. Natural Cosmeceutical Ingredients for the Management of Hyperpigmentation in Hispanic and Latino Women. **The Journal of clinical and aesthetic dermatology**, [s. l.], vol. 14, n° 8, p. 52–56, 2021.
- MUZAFFAR, FAIZI; SINGH, U. K.; CHAUHAN, LALIT. Review on microemulsion as futuristic drug delivery. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], vol. 5, n° 3, p. 39–53, 2013.
- NAUTIYAL, Avni; WAIRKAR, Sarika. Management of hyperpigmentation: Current treatments and emerging therapies. **Pigment Cell & Melanoma Research**, [s. l.], vol. 34, n° 6, p. 1000–1014, 2021.
- NEAGU, Nicoleta *et al.* Melasma treatment: a systematic review. **Journal of Dermatological Treatment**, [s. l.], vol. 33, n° 4, p. 1816–1837, 2022.
- NGAWHIRUNPAT, Tanasait *et al.* Cremophor RH40-PEG 400 microemulsions as transdermal drug delivery carrier for ketoprofen. **Pharmaceutical Development and Technology**, [s. l.], vol. 18, n° 4, p. 798–803, 2013.
- NINOMIYA, Kiyofumi *et al.* Acylated oleanane-type triterpene saponins from the flowers of *Bellis perennis* show anti-proliferative activities against human digestive tract carcinoma cell lines. **Journal of Natural Medicines**, [s. l.], vol. 70, n° 3, p. 435–451, 2016.
- NISHIFUJI, Koji; YOON, Ji Seon. The stratum corneum: the rampart of the mammalian body. **Veterinary Dermatology**, [s. l.], vol. 24, n° 1, p. 60-e16, 2013.
- OLIVEIRA, Denise A.J. *et al.* Associating chitosan and microemulsion as a topical vehicle for the administration of herbal medicines. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], vol. 255, p. 117482, 2021.
- OLIVEIRA, F; AKISUE, G; AKISUE, M.K. **FARMACOGNOSIA - Identificação de Drogas Vegetais**. 2. ed. São Paulo: ATHENEU, 2014.
- ORTONNE, J.P. Normal and abnormal skin color. **Annales de Dermatologie et de Vénéréologie**, [s. l.], vol. 139, p. S125–S129, 2012.
- PARIA, Kishalay *et al.* Synergy of melanin and vitamin-D may play a fundamental role in preventing SARS-CoV-2 infections and halt COVID-19 by inactivating furin protease. **Translational Medicine Communications**, [s. l.], vol. 5, n° 1, p. 21, 2020.
- PARK, Ji-Hye *et al.* An antimicrobial protein, lactoferrin exists in the sweat: proteomic analysis of sweat. **Experimental Dermatology**, [s. l.], vol. 20, n° 4, p. 369–371, 2011.

PARK, H Y *et al.* Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], vol. 66, nº 9, p. 1493–1506, 2009.

PAVIA, L. Donald; *et al.* **Introdução à Espectoscopia**. 4ª editioned. [S. l.]: Cengage Learning, 2010.

PHILIPS, Neena; KHAOSAAT, Jovinna Chalensouk-; GONZALEZ, Salvador. Stimulation of the Fibrillar Collagen and Heat Shock Proteins by Nicotinamide or Its Derivatives in Non-Irradiated or UVA Radiated Fibroblasts, and Direct Antioxidant Activity of Nicotinamide Derivatives. **Cosmetics**, [s. l.], vol. 2, nº 2, p. 146–161, 2015.

PILLAIYAR, Thanigaimalai; MANICKAM, Manoj; NAMASIVAYAM, Vigneshwaran. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [s. l.], vol. 32, nº 1, p. 403–425, 2017.

PROKSCH, Ehrhardt. pH in nature, humans and skin. **The Journal of Dermatology**, [s. l.], vol. 45, nº 9, p. 1044–1052, 2018.

PULSONI, Ilaria *et al.* Comparison Between Franz Diffusion Cell and a novel Micro-physiological System for In Vitro Penetration Assay Using Different Skin Models. **SLAS Technology**, [s. l.], vol. 27, nº 3, p. 161–171, 2022.

RACHMAWATI, Heni *et al.* The In Vitro–In Vivo Safety Confirmation of PEG-40 Hydrogenated Castor Oil as a Surfactant for Oral Nanoemulsion Formulation. **Scientia Pharmaceutica**, [s. l.], vol. 85, nº 2, p. 18, 2017.

RAMBE, Puspita Sari; SIMANUNGKALIT, Rointan; YOSI, Ariyati. The Relationship between Serum Zinc Level and Severity of Melasma. **International Journal of Scientific and Research Publications (IJSRP)**, [s. l.], vol. 10, nº 1, p. p9749, 2020.

RASPANTINI, Giovanni Loureiro *et al.* Physicochemical Characterization of Drug Nanocarriers. *In*: [S. l.]: [s. d.], 2021. p. 83–105.

ROBERTS, MS *et al.* Topical and cutaneous delivery using nanosystems. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], vol. 247, p. 86–105, 2017.

RODRIGUES, Fernando *et al.* PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF NANOEMULSION CONTAINING A NATURAL NAPHTHOQUINONE. **Química Nova**, [s. l.], 2018.

SADLER, T.W, PhD. **Langman: Embriologia Médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

SALIMON, Jumat; SALIH, Nadia; YOUSIF, Emad. Industrial development and applications of plant oils and their biobased oleochemicals. **Arabian Journal of Chemistry**, [s. l.], vol. 5, nº 2, p. 135–145, 2012.

SALLABI, Sundus M. *et al.* Determination of Vitamin B3 Vitamer (Nicotinamide) and Vitamin B6 Vitamers in Human Hair Using LC-MS/MS. **Molecules**, [s. l.], vol. 26, nº 15, p. 4487, 2021.

SARKAR, Rashmi; AILAWADI, Pallavi; GARG, Shilpa. Melasma in Men: A Review of Clinical, Etiological, and Management Issues. **The Journal of clinical and aesthetic dermatology**, [s. l.], vol. 11, nº 2, p. 53–59, 2018.

SATO, Mayumi Eliza Otsuka *et al.* Permeação cutânea in vitro do ácido kójico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s. l.], vol. 43, n° 2, p. 195–203, 2007.

SAVARY, Géraldine ; GRISEL, Michel; PICARD, Céline. Impact of emollients on the spreading properties of cosmetic products: A combined sensory and instrumental characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], vol. 102, p. 371–378, 2013.

SETHUPATHY, Sivasamy *et al.* Alpha-bisabolol from brown macroalga *Padina gymnospora* mitigates biofilm formation and quorum sensing controlled virulence factor production in *Serratia marcescens*. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], vol. 28, n° 3, p. 1987–1996, 2016.

SHAN, Jiang *et al.* The regional distribution of melanosomes in the epidermis affords localized intensive photoprotection for basal keratinocyte stem cells. **Journal of Dermatological Science**, [s. l.], vol. 103, n° 3, p. 130–134, 2021.

SHARMA, Aman Kumar *et al.* Role of microemulsions in advanced drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, [s. l.], p. 1–9, 2015.

SHIN, Dong Wook. Various biological effects of solar radiation on skin and their mechanisms: implications for phototherapy. **Animal Cells and Systems**, [s. l.], vol. 24, n° 4, p. 181–188, 2020.

SIATKA, Tomáš; KAŠPAROVÁ, Marie. Seasonal Variation in Total Phenolic and Flavonoid Contents and DPPH Scavenging Activity of *Bellis perennis* L. Flowers. **Molecules**, [s. l.], vol. 15, n° 12, p. 9450–9461, 2010.

SILVA, José Dilson F. da *et al.* Microemulsions: components, characteristics, potentialities in food chemistry and other applications. **Química Nova**, [s. l.], vol. 38, n° 9, p. 1196–1206, 2015.

SILVERSTEIN, Robert. M.; WEBSTER, X. F.; KIEMLE, D. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7. ed. [S. l.]: John Wiley & Sons, 2005.

SIMÕES, C.M.O *et al.* **Farmacognosia- Do produto natural ao medicamento**. PORTO ALEGRE, RS: Artmed, 2017.

SISAK, Muhammad Asri Abd; DAIK, Rusli; RAMLI, Suria. Study on the effect of oil phase and co-surfactant on microemulsion systems. **Malaysian Journal of Analytical Science**, [s. l.], vol. 21, n° 6, p. 1409–1416, 2017.

SIVAMANI, Raja; CLARK, Ashley. Phytochemicals in the treatment of hyperpigmentation. **Botanics: Targets and Therapy**, [s. l.], vol. Volume 6, p. 89–96, 2016.

SOUZA, Isabelly Fernanda Ferraz de *et al.* The liquid crystalline phase behaviour of a nasal formulation modifies the brain disposition of donepezil in rats in the treatment of Alzheimer's disease. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], vol. 203, p. 111721, 2021.

SOUZA, GHB; MELLO, JCP; LOPES, NP. **Farmacognosia: coletânea científica**. 1. ed. Ouro Preto: EDUFOP, 2012.

SOUZA, F. C. Bombaldi de; SOUZA, R. F. Bombaldi de; MORAES, Â. M. Incorporation and release kinetics of alpha-bisabolol from pcl and chitosan/guar gum membranes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], vol. 33, n° 3, p. 453–467, 2016.

STARNER, R.J. *et al.* PGE2 is a UVR-inducible autocrine factor for human melanocytes that stimulates tyrosinase activation. **Experimental Dermatology**, [s. l.], p. 682–684, 2010.

SWARBRICK, James. **Encyclopedia of PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY**. 3. ed. New York, NY: Informa Healthcare USA, Inc., 2007.

SZUMAŁA, Patrycja; MACIERZANKA, Adam. Topical delivery of pharmaceutical and cosmetic macromolecules using microemulsion systems. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], vol. 615, p. 1–12, 2022a.

TAMLER, Carla *et al.* Classificação do melasma pela dermatoscopia: estudo comparativo com lâmpada de Wood. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, [s. l.], vol. 1, p. 115–119, 2009.

TAYEB, Hossam H. *et al.* Nanoemulsions: Formulation, characterization, biological fate, and potential role against COVID-19 and other viral outbreaks. **Colloid and Interface Science Communications**, [s. l.], vol. 45, p. 100533, 2021.

TESSEMA, Efrem N. *et al.* Delivery of oat-derived phytoceramides into the stratum corneum of the skin using nanocarriers: Formulation, characterization and in vitro and ex-vivo penetration studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], vol. 127, p. 260–269, 2018.

TRIVEDI, M.K.; YANG, F.C.; CHO, B.K. A review of laser and light therapy in melasma. **International Journal of Women's Dermatology**, [s. l.], vol. 3, n° 1, p. 11–20, 2017.

UEOKA, Andreza Rodrigues; MORAES, Carla Aparecida Pedriali. Development and Stability Evaluation of Liquid Crystal-Based Formulations Containing Glycolic Plant Extracts and Nano-Actives. **Cosmetics**, [s. l.], vol. 5, n° 2, p. 25, 2018.

VALENTE, Ana *et al.* Ascorbic acid content in exotic fruits: A contribution to produce quality data for food composition databases. **Food Research International**, [s. l.], vol. 44, n° 7, p. 2237–2242, 2011.

VERDY, C.; BRANKA, J.E; MEKIDECHE, N. Melanosome transfer evaluation by quantitative measurement of Pmel 17 in human normal melanocyte-keratinocyte co-cultures: effect of an *Alaria esculenta* extract. **Journal of cosmetic science**, [s. l.], vol. 63, n° 3, p. 197–203, 2011.

VIDEIRA, Inês Ferreira dos Santos; MOURA, Daniel Filipe Lima; MAGINA, Sofia. Mechanisms regulating melanogenesis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], vol. 88, n° 1, p. 76–83, 2013.

WAKAMATSU, Kazumasa; ZIPPIN, Jonathan H.; ITO, Shosuke. Chemical and biochemical control of skin pigmentation with special emphasis on mixed melanogenesis. **Pigment Cell & Melanoma Research**, [s. l.], vol. 34, n° 4, p. 730–747, 2021.

WANG, Yu *et al.* LC-MS–MS Simultaneous Determination of Niacin, Niacinamide and Nicotinuric Acid in Human Plasma LC-MS–MS and Its Application to a Human Pharmacokinetic Study. **Chromatographia**, [s. l.], vol. 72, n° 3–4, p. 245–253, 2010.

WANG, Yu *et al.* The Application of Skin Care Product in Melasma Treatment. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, [s. l.], vol. 14, p. 1165–1171, 2021.

WANG, Zhi-Jiang *et al.* Toward the inhibitory effect of acetylsalicylic acid on tyrosinase: Integrating kinetics studies and computational simulations. **Process Biochemistry**, [s. l.], vol. 48, n° 2, p. 260–266, 2013.

WOHLRAB, Johannes; KREFT, Daniela. Niacinamide - Mechanisms of Action and Its Topical Use in Dermatology. **Skin Pharmacology and Physiology**, [s. l.], vol. 27, n° 6, p. 311–315, 2014.

YAMAGUCHI, Y.; HEARING, V. J. Melanocytes and Their Diseases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], vol. 4, n° 5, p. a017046–a017046, 2014.

YASIR, Muhammad; SULTANA, Bushra; ANWAR, Farooq. LC–ESI–MS/MS based characterization of phenolic components in fruits of two species of Solanaceae. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], vol. 55, n° 7, p. 2370–2376, 2018.

YEHYE, Wageeh A. *et al.* Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], vol. 101, p. 295–312, 2015.

YOON, Ji Hye *et al.* Anti-Melanogenesis Effects of a Cyclic Peptide Derived from Flaxseed via Inhibition of CREB Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], vol. 24, n° 1, p. 1–18, 2022.

YUAN, X.H.; JIN, Z.H. Paracrine regulation of melanogenesis. **British Journal of Dermatology**, [s. l.], vol. 178, n° 3, p. 632–639, 2018.

ZHANG, Qiongyu *et al.* A cream of herbal mixture to improve melasma. **Journal of Cosmetic Dermatology**, [s. l.], vol. 18, n° 6, p. 1721–1728, 2019.

ZHU, Yuan *et al.* Evaluating the quality of life among melasma patients using the MELASQoL scale: A systematic review and meta-analysis. **PLOS ONE**, [s. l.], vol. 17, n° 1, p. e0262833, 2022.