UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Eficácia clínica dos tratamentos oral e tópico do extrato de
oliva no controle do melasma**

Julia de Toledo Bagatin

**Ribeirão Preto
2018**

JULIA DE TOLEDO BAGATIN

**Eficácia clínica dos tratamentos oral e tópico do extrato de
oliva no controle do melasma**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto/USP para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos
e Cosméticos

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Patrícia
Maria Berardo Gonçalves Maia
Campos

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 15/05/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2018

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

Bagatin, Julia de Toledo

Eficácia clínica dos tratamentos oral e tópico do extrato de oliva no controle do melasma. 73 f. Ribeirão Preto, 2018.

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

Orientador: Maia Campos, Patrícia Maria Berardo Gonçalves

1. Extrato de oliva. 2. Eficácia clínica. 3. Melasma.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Julia de Toledo Bagatin

Eficácia clínica dos tratamentos oral e tópico do extrato de oliva no controle do melasma

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências
Farmacêuticas e da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto/USP para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração:
Medicamentos e Cosméticos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Ericson e Maria Inês, pelo amor e incentivo

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ericson e Maria Inês, pela base sólida de amor, carinho, apoio e incentivo, e por todos ensinamentos e educação passados, em todos os momentos.

Aos meus irmãos e familiares, em especial, à Laura, Cassio, Maitê e Otávio, pelo carinho e apoio emocional.

À minha tia Ediléia Bagatin por me apresentar à Prof^a. Patrícia e por todo apoio em momentos fundamentais ao desenvolvimento do projeto.

À Prof^a. Dr^a. Patrícia M. B. G. Maia Campos pela confiança adquirida, oportunidade, paciência, grande amizade, conselhos de vida e conhecimento passado.

Aos meus grandes amigos Maísa, Lívia, Victor, Letícia Kakuda e Verônica que tornaram a vida mais leve e me acolheram com amizade, companheirismo e ensinamentos para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À Taís e Carla pela amizade e colaboração.

Ao Rodrigo pelo incentivo e apoio.

Às minhas amigas de laboratório Marina, Francine, Marcella, Jéssica, Elisa, Letícia Nakamura, Letícia Bueno pela colaboração e por bons momentos de conversa e risadas.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pela oportunidade e infraestrutura.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado (n.132907/2016-0).

À Galena, que forneceu gentilmente todo o princípio ativo essencial ao estudo e aos outros fornecedores das matérias primas utilizadas.

À Farmaestética pela manipulação das cápsulas usadas no estudo.

Ao Dr. João Carlos Simão, pela colaboração na pesquisa e desenvolvimento do projeto.

Às Professoras Gislaine Leonardi, Maria José Fonseca Vieira e Lorena Gaspar pelos aconselhamentos.

À todas participantes que permitiram e disponibilizaram tempo para a pesquisa.

“Inteligência é a capacidade de adaptar à mudança”

Stephen Hawking

RESUMO

BAGATIN, J. T. **Eficácia clínica dos tratamentos oral e tópico do extrato de oliva no controle do melasma**. 2018. 73 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O melasma é uma das desordens pigmentativas da pele adquiridas mais comuns que afetam a face da mulher adulta e pode causar comprometimento significativo da qualidade de vida psicossocial. Apesar da grande demanda terapêutica, o tratamento do melasma continua sendo desafiador com resultados inconsistentes, constantes recidivas e frequentes relatos de efeitos adversos. Assim, substâncias ativas alternativas para o controle do melasma são de grande interesse para a área clínica. Considerando que o extrato de oliva com concentração padronizada de hidroxitirosol apresenta propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e potencial ação despigmentante por inibição da tirosinase, a enzima central envolvida na melanogênese, o mesmo apresenta grande potencial para o controle do melasma. Técnicas não invasivas de biofísica e de análise de imagem da pele, como a microscopia confocal de reflectância, são ferramentas fundamentais para a avaliação objetiva da eficácia de tratamentos em estudos clínicos e caracterização do melasma. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia do uso oral e/ou tópico do extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol no controle do melasma por técnicas de biofísica e análise de imagem da pele. Para isso, um estudo clínico randomizado, duplo-cego e placebo controle foi realizado a partir da inclusão de 56 participantes entre 30 e 50 anos, fototipo III ou IV e melasma na região malar. As participantes foram randomizadas em quatro grupos (n=14): controle, tópico, oral e tópico e oral e receberam o tratamento diário contendo o extrato de oliva ou o placebo/veículo por 90 dias. A caracterização das estruturas morfológicas do melasma foi realizada com o microscópio confocal de reflectância. A avaliação objetiva do melasma para verificar a eficácia dos tratamentos foi realizada mensalmente por técnicas de biofísica como as medidas de luminosidade, melanina e eritema, que foram complementadas pelo índice de severidade e área do melasma modificado (mMASI). Os resultados obtidos apresentaram grande variabilidade intrínseca. Ainda, apesar de observada maior redução da pigmentação do melasma no grupo que recebeu o tratamento oral, quando comparado aos outros grupos, incluindo o grupo controle, nenhuma diferença significativa nos seguimentos avaliados foi observada. Por fim, o extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol não é eficaz para o controle do melasma nas concentrações usadas no estudo.

Palavras-chave: melasma, estudo clínico, extrato de oliva, hidroxitirosol

ABSTRACT

BAGATIN, J. T. **Clinical efficacy of olive extract oral and topical treatment in melasma control**. 2018. 73 f. Dissertation (Master). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Melasma is one of the most common hyperpigmentation disorder that affects the face of adult women and can cause significant psychosocial life quality impairment. Despite great therapeutical demand, melasma treatment remains challenging with unpredictable results, relapses and frequent adverse effects. Therefore, alternative active substances for melasma control is of great interest for clinical area. This way, olive extract containing standardized concentration of hydroxytyrosol presents antioxidant effect and potential depigmenting action by tyrosinase inhibition, the main enzyme involved in melanogenesis. Non-invasive biophysical techniques and image analysis, as confocal reflectance microscopy, are indispensable tools to evaluate the treatment efficacy in clinical trials and melasma characterization. This way, the objective of the present study was to evaluate the clinical efficacy of an oral and/or topical treatment based on an olive extract titrated in hydroxytyrosol for melasma control using biophysical and skin imaging techniques. For this, a randomized, double-blinded and placebo-controlled clinical trial was conducted by the inclusion 56 women aged 30-50 years, phototype III and IV and melasma. The participants were randomized in four groups (n=14): control, oral or topical - and received daily treatment containing hydroxytyrosol or placebo for 90 days. Efficacy evaluation were performed once a month by biophysical techniques for lightness, melanin and erythema quantification and complemented by the modified melasma area and severity index (mMASI). Results presented great intrinsic melasma variability. Furthermore, despite reduced pigmentation observed in melasma for the oral group compared to the other treatment groups, including the control group, no significant difference was observed at the evaluations. In conclusion, the oral use of olive extract containing hydroxytyrosol was not efficient for melasma control at the studied concentrations.

Key words: melasma, clinical study, olive extract, hydroxytyrosol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Epiderme estratificada com representação de um melanócito e seus dendritos sobre os queratinócitos.	6
Figura 2. Representação das vias reativas da melanogênese dos dois tipos de melanina (eumelanina e feomelanina) com suas principais enzimas envolvidas (cinza): tirosinase, proteína 2 relacionada à tirosinase (TRP-2) e proteína 1 relacionada à tirosinase (TRP-1)	7
Figura 3. Diidroxifenóis inibidores da tirosinase.	11
Figura 4. Índice de gravidade e área do melasma modificado (mMASI).	27
Figura 5. Características sensoriais imediatas da aplicação das formulações tópicas.	32
Figura 6. Características sensoriais após 5 minutos da aplicação das formulações tópicas.	32
Figura 7. Ensaio antioxidante de quimioluminescência e DPPH.	35
Figura 8. Diagrama de fluxo da etapa clínica seguindo o guia CONSORT de estudos clínicos.	36
Figura 9. Imagens da camada basal por microscopia confocal de reflectância da região malar da face - lesional e perilesional- de uma participante do estudo.	39
Figura 10. Imagens da camada granulosa por microscopia confocal de reflectância da região malar da face - lesional e perilesional- de uma participante do estudo.	39
Figura 11. Imagem da junção dérmica-epidérmica por Microscopia Confocal de Reflectância da região malar lesional de uma participante do estudo. Setas indicando melanófagos.	40
Figura 12. mMASI entre os grupos em estudo nos tempos avaliados - inicial (T0), 30 (T30), 60 (T60) e 90 (T90) dias, em média e IC95%.	41
Figura 13. Fotografia em alta resolução demonstrando resultado de participante do grupo tópico no tempo inicial (A) e após 60 dias (B).	41
Figura 14. Fotografia em alta resolução demonstrando o resultado de participante do grupo oral no tempo inicial (A) e após 90 dias (B).	42
Figura 15. Fotografia em alta resolução demonstrando resultado de participante do grupo controle no tempo inicial (A) e após 60 dias (B).	42
Figura 16. Fotografia em alta resolução demonstrando resultado de participante do grupo oral e tópico (contendo extrato de oliva em ambos) no tempo inicial (A) e após 90 dias (B).	43
Figura 17. Luminosidade da região lesional entre os grupos em estudo nos tempos avaliados – inicial (T0), 30 (T30), 60 (T60) e 90 (T90) dias, em média e IC95%.	44
Figura 18. Medidas de melanina na região lesional entre os grupos em estudo nos tempos avaliados – inicial (T0), 30 (T30), 60 (T60) e 90 (T90) dias, em média e IC95%.	44
Figura 19. Diferença das medidas de melanina e de luminosidade entre a região lesional e perilesional entre os grupos nos tempos avaliados – inicial (T0), 30 (T30), 60 (T60) e 90 (T90) dias, em média e IC95%.	45
Figura 20. Medidas de eritema na região lesional entre os grupos em estudo no tempo inicial (T0) e final (T90), em média e IC95%	46
Figura 21. Imagem em alta resolução comparando tempo inicial (basal - A) e o final (T90 dias - B) de duas participante do grupo oral - contendo o extrato de oliva.	46
Figura 22. Hidratação da camada córnea da região malar entre os grupos em estudo no tempo inicial (T0), 30 (T30), 60 (T60) e 90 (T90) dias, em média e IC95%.	47
Figura 23. Perda transepidérmica de água da região malar entre os grupos em estudo no tempo inicial (T0), 30 (T30), 60 (T60) e 90 (T90) dias, em média e IC95%.	47
Figura 24. Percepção de eficácia entre os grupos ao final das avaliações clínicas (n=43).	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das formulações desenvolvidas.....	20
Tabela 2. Questões pré-definidas na entrevista de recrutamento.	24
Tabela 3. Composição da formulação F8.	33
Tabela 4. Valores de pH das formulações veículo e contendo extrato de oliva nos tempos e temperaturas de armazenagem.	34
Tabela 5. Informações obtidas a partir das entrevistas das participantes alocadas no estudo (n=56).	37
Tabela 6. Características basais das participantes e do melasma por grupo.	37

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS.....	iii
SUMÁRIO	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Melasma	2
2.1.1. Definição e apresentação clínica	2
2.1.2. Impacto social	3
2.1.3. Etiologia	4
2.1.4. Pigmentação cutânea e melanogênese	5
2.1.5. Diagnóstico e tratamento do melasma	9
2.2. Pesquisa e desenvolvimento de formulações dermocosméticas	13
2.3. Estudos clínicos.....	15
3. OBJETIVO	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Matérias-primas.....	17
4.2. Equipamentos e acessórios	18
4.3. Desenvolvimento das formulações	19
4.3.1. Testes preliminares de estabilidade	21
4.3.2. Análise sensorial	21
4.3.3. Estudo de Estabilidade.....	22
4.4. Avaliação da atividade antioxidante do extrato de oliva	22
4.4.1. Ensaio da atividade antioxidante pelo método do DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil)	22
4.4.2. Ensaio de quimioluminescência dependente do luminol- H ₂ O ₂ -HRP	23
5. CASUÍSTICA E MÉTODOS	23
5.1. Protocolo do estudo clínico	23
5.2. Avaliação das características morfológicas e estruturais da epiderme por microscopia confocal de reflectância a laser	26
5.3. Fotografias em alta resolução.....	26
5.4. Índice de severidade e área do melasma (mMASI)	27
5.5. Técnicas de biofísica de análise do melasma e da pele.....	28
5.5.1. Luminosidade.....	28
5.5.2. Quantificação de melanina e eritema.....	28

5.5.3. Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo	29
5.5.4. Determinação da perda transepidérmica de água	29
5.6. Percepção de eficácia	29
5.6. Análise estatística	30
6. RESULTADOS	31
6.1. Desenvolvimento das formulações	31
6.1.1. Testes preliminares de estabilidade	31
6.1.2. Análise sensorial	31
6.1.3. Estabilidade	33
6.2. Atividade antioxidante	34
6.3. Estudo clínico	35
6.4. Avaliação das características morfológicas e estruturais da epiderme por microscopia confocal de reflectância a laser	38
6.5. Índice de Gravidade e Área do Melasma modificado (mMASI) e técnicas de biofísica de análise do melasma e da pele	40
6.6. Percepção de eficácia	47
7. DISCUSSÃO	48
8. CONCLUSÕES	58
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

Entre as principais alterações pigmentares, o melasma é uma hiperpigmentação adquirida das mais comuns que afetam a face, com potencial para causar grande desconforto psicológico e impactar adversamente a qualidade de vida dos afetados (IKINO et al., 2015).

Ainda, as desordens de pigmentação são uma das principais queixas em consultórios dermatológicos no Brasil (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2006; LUPI et al., 2010), representando uma grande importância para a pesquisa de dermocosméticos.

Apesar da grande demanda terapêutica, o tratamento do melasma continua sendo desafiador com resultados inconsistentes, constantes recidivas e frequentes relatos de efeitos adversos (PASSERON & PICARDO, 2018).

Ainda que a etiologia do melasma seja multifatorial, a inibição da melanogênese hiperativada ainda é o principal alvo para o controle da hiperpigmentação. Assim, inibidores da tirosinase provenientes de fontes sintéticas e naturais são de grande interesse (KHAN, 2012; LEE, BAEK & NAM, 2016).

Nesse contexto, o extrato de oliva com concentração padronizada de hidroxitirosol em formulações de uso tópico e oral apresenta potencial para auxiliar no tratamento do melasma por inibir a tirosinase e ainda apresentar alta atividade antioxidante e anti-inflamatória (ZWANE et al., 2012; PARK & KIM, 2017).

Considerando que não há estudos clínicos que avaliem a associação de tratamentos tópico e/ou oral com o extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol para o controle do melasma, estudos de eficácia com protocolo clínico bem delineado usando técnicas avançadas de biofísica e análise de imagem da pele são de grande importância para a comprovação científica dos reais benefícios na pele de tratamentos tópicos e orais, bem como a associação desses.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Melasma

2.1.1. Definição e apresentação clínica

O melasma é uma disfunção adquirida e crônica da melanogênese, resultando em hiperpigmentação da pele caracterizada por máculas e manchas hipercrômicas marrons com bordas irregulares que ocorrem predominantemente na face, mas pode se manifestar na região do colo e braços (CESTARI, PERUZZO & GIONGO, 2017).

A palavra melasma tem origem grega, a qual “melas” significa preto, remetendo a sua cor escura que varia do marrom ao cinza azulado. O termo cloasma, derivado do grego “cloazein”, também se refere à esta dermatose e ainda é utilizado na literatura médica, apesar de seu significado ser esverdeado. As primeiras descrições da doença são reconhecidas desde os relatos de Hipócrates (470-360 A.C.), que referiam sua piora após exposição solar, calor do fogo e inflamações da pele (HANDEL, MIOT & MIOT, 2014).

A classificação do melasma de acordo com a disposição facial é dividida em três padrões clínicos: centro-facial, malar e mandibular. O centro-facial é o mais comum, e abrange lesões no nariz, fronte, supra labial, mento e malar. O padrão malar descreve lesões presentes no nariz e malar, enquanto o mandibular apenas a região que abrange a mandíbula (HANDEL, MIOT & MIOT, 2015).

O melasma é uma das mais comuns hiperpigmentações adquiridas e ocorre em todos os grupos étnicos, com incidência que varia de acordo com a composição étnica e intensidade da radiação solar da região, sendo mais comum em regiões tropicais e com fenótipos de fototipos mais altos como nas populações Latinas Americanas, Hispânicas, Asiáticas, Africanas Mediterrâneas e do Oriente Médio (HANDEL et al., 2014).

A grande miscigenação da população brasileira e o clima tropical favorecem o desenvolvimento da doença. Considerando a vasta extensão territorial e a composição étnica de diferentes regiões no Brasil, estima-se que de 15 a 35% das mulheres adultas brasileiras sejam afetadas pelo melasma (ISHY et al., 2014).

O melasma é mais frequente em fototipos intermediários de III a V na escala de Fitzpatrick (1988) (ORTONNE et al., 2009). No Brasil, os fototipos III e IV são os de maior frequência de acordo com um estudo multicêntrico envolvendo 953 voluntários, além disso é mais prevalente em mulheres (97,5%) (HEXSEL et al., 2014). Mesmo em outros países, a predominância da manifestação desta disfunção é feminina, estima-se que

a proporção de homens com melasma seja cerca de 10% dos casos (SARKAR & JAIN, 2010; HEXSEL et al., 2014).

Indivíduos com fototipos mais claros (II e III) tendem a desenvolver a doença mais cedo que os fototipos mais escuros (IV e V), sendo que fototipos extremos apresentam raros casos, já que os indivíduos de fototipo I não produzem pigmentação adicional e os de fototipo VI já atingiram a máxima eficiência pigmentar (HEXSEL et al., 2014).

É bem consolidado que mulheres em idade reprodutiva (menacme) entre 20 e 35 anos sejam as mais afetadas, com prevalência decrescente após a menopausa, o que indica a influência hormonal com o desenvolvimento da doença (TAMEGA et al., 2013; HEXSEL et al., 2014).

A região zigomática (malar) do rosto é a mais afetada pelo melasma, seguida pela labial superior e frontal (TAMEGA et al., 2013; HEXSEL et al. 2014; HANDEL et al., 2014).

2.1.2. Impacto social

A distribuição de pigmentação do rosto, envolvendo melanina e hemoglobina (eritema), influenciam diretamente a percepção de idade, atratividade e saúde, sendo que a homogeneidade de coloração da pele é diretamente proporcional ao aspecto positivo destes parâmetros. A distribuição de melanina é o principal parâmetro de coloração para a percepção de idade em mulheres, já que o fotoenvelhecimento proporciona uma concentração localizada e heterogênea de melanina na pele (MATTS et al., 2007).

Assim, o melasma representa uma dermatose que apesar de ser assintomática, apresenta característica estética negativa associada a um acometimento na qualidade de vida, principalmente no âmbito psicossocial (CESTARI et al., 2006; IKINO et al. 2015).

De acordo com o MelasQoL (*Melasma Quality of Life Scale*), questionário desenvolvido exclusivamente para avaliação da qualidade de vida de indivíduos afetados pelo melasma, e outros estudos realizados e validados em outros países, os parâmetros mais evidentes que afetam a qualidade de vida dos afetados com melasma seriam a aparência da pele, frustração e constrangimento com a condição da pele, além do sentimento de não atratividade (CESTARI et al. 2006; MISERY et al. 2010; HARUMI & GOH, 2016; IKINO et al. 2015).

Consequentemente, o impacto psicológico estético do melasma e a sua alta incidência populacional, como uma das mais comuns discromias que afetam a face, levam

a uma intensa busca por tratamentos dermatológicos e cosméticos (IKINO et al., 2015; PASSERON & PICARDO, 2018).

Uma pesquisa envolvendo diversos estados brasileiros em 2010 revelou que desordens pigmentares são a principal causa das buscas por atendimento dermatológico em 30% dos casos avaliados para mulheres (LUPPI et al. 2010).

A Sociedade Brasileira de Dermatologia também verificou que as melanodermias representam o terceiro maior grupo de diagnósticos realizados em consultas dermatológicas no Brasil em 2006, entre os 57 mil diagnósticos analisados (SBD, 2006).

Portanto, pela alta incidência no Brasil e grande comprometimento psicológico do melasma, este apresenta alta demanda por tratamentos eficazes e seguros.

2.1.3. Etiologia

A causa exata do melasma ainda não foi estabelecida, porém tem origem multifatorial, sendo que os fatores de risco envolvidos isoladamente não representam grande influência no desenvolvimento da doença (ORTONNE et al., 2009).

Os fatores mais associados ao risco da patogênese são: histórico familiar, radiação ultravioleta e terapias e alterações hormonais. Outros menos frequentes incluem: disfunção da tireóide, ansiedade e depressão, uso de medicamentos fototóxicos (ex. medicamentos anticonvulsivantes) e uso de cosméticos (ORTONNE et al., 2009; TAMEGA et al., 2013; HEXSEL et al. 2014; HANDEL et al., 2014).

O histórico familiar está presente em cerca de metade dos casos de melasma, principalmente naqueles de fototipos mais altos, o que sugere que o componente hereditário genético é um fator de risco importante (ORTONNE et al. 2009; HEXSEL et al. 2014; HANDEL et al., 2014).

O envolvimento hormonal com o desenvolvimento do melasma ainda não é bem definido. Há grande evidência que a presença majoritária do melasma em mulheres em idade fértil e seu decréscimo após a menopausa é o principal indicador da influência da progesterona e estrogênio na exacerbação da melanogênese (CESTARI, PERUZZO & GIONGO, 2017).

Muito associado à gravidez em mulheres, sendo até já sido chamado como “máscaras da gravidez”, o desenvolvimento do melasma durante a gestação ocorre com menor frequência comparado ao período após o parto, que tem incidência variável dependendo da região, estando frequentemente entre um dos principais fatores subjetivos associados ao melasma (ORTONNE, 2009; TAMEGA et al., 2013; HEXSEL et al. 2014).

Ainda assim, o uso de contraceptivos orais está associado ao risco da melanodermia, já que cerca de 25% das mulheres apresentaram os primeiros sinais do melasma no decorrer da terapia contraceptiva. Porém, o uso contínuo deste não é associado a uma piora no quadro da hiperpigmentação, assim como a interrupção do uso não melhora a discromia (ORTONNE et al. 2009; HEXSEL et al., 2014).

Por outro lado, há hipótese que o envolvimento hormonal no melasma, apesar de ser presente, não é muito relevante em relação a este ser uma desordem decorrente do fotoenvelhecimento, pois em alguns lugares há alta incidência de melasma nos homens e ainda cerca de 10% dos casos de melasma ocorrem após a menopausa (PASSERON & PICARDO, 2018).

De fato, o fator mais relevante que desencadeia o melasma é a exposição solar. Afinal, o aumento da atividade melanogênica após radiação ultravioleta ocorre por diversas vias e é um mecanismo homeostático para a proteção epitelial (LEE, 2015).

Ainda assim, o envolvimento da exposição solar com a patogênese fica evidente ao verificar que este só ocorre em áreas do corpo expostas ao sol, de ter maior incidência nas populações em regiões com maior índice ultravioleta e que uma maior exposição solar, como ocorre durante o verão, piora o quadro hiperpigmentativo progressivamente (DURAES, FONSECA & ISSA, 2016).

Além disso, vários estudos apontam que os participantes de pesquisas sobre melasma associam a exposição solar como fator subjetivo para o desenvolvimento da doença (TAMEGA et al., 2013; HEXSEL et al. 2014).

Estresse e depressão também estão associados ao advento do melasma por estarem associados a maiores níveis de cortisol e produção de melanocortina, que exercem atividade melanogênica (HANDEL et al. 2014).

O uso de cosméticos na manifestação do melasma está associado somente com o evento de dermatite cosmética, o que indica um envolvimento inflamatório (CESTARI, PERUZZO & GIONGO, 2017).

2.1.4. Pigmentação cutânea e melanogênese

A pele é a principal barreira pela qual o corpo mantém a homeostase frente ao meio externo, mantendo a integridade física contra agentes externos, como a radiação solar. Assim, esta depende dos melanócitos para prover fotoproteção por meio da síntese de melanina (LIN & FISHER, 2007).

A estrutura da pele consiste em duas camadas: a epiderme e a derme. A epiderme é a camada mais externa do tegumento, constituída pelo epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, um tecido avascular composto por queratinócitos em diferentes estados de maturação que se distinguem em estratos córneo, granuloso, espinhoso e basal (HABIF, 2015). A derme, que fica sobre o tecido subcutâneo (hipodérmico), é vascularizada e se divide em derme papilar e reticular (RIBEIRO, LEAL & JEUNON, 2017).

Além da extensa estratificação de queratinócitos, na camada basal da epiderme encontramos os melanócitos: células especializadas na síntese de melanina, um pigmento responsável pela coloração da pele e proteção contra a radiação solar.

A síntese de melanina, denominada melanogênese, ocorre nos melanócitos por via de sua organela intracitoplasmática: os melanossomas. Estes são distribuídos dos melanócitos por seus dendritos citoplasmáticos para um grupo de queratinócitos adjacentes e assim promover seu efeito fotoprotetor (NATARAJAN et al., 2014).

Figura 1. Epiderme estratificada com representação de um melanócito e seus dendritos sobre os queratinócitos.

Fonte: adaptado de NATARANJAN et al., 2014.

A quantidade de melanócitos disposta pela camada basal é relativamente constante, mesmo em indivíduos de diferentes cores de pele. A diversidade desta está relacionada com a proporção dos diferentes tipos de melanina contidos nos melanossomas, os quais variam em tamanho e estágio de maturação (LIN & FISHER, 2007).

Há dois tipos de melanina sintetizadas nos melanossomas: a eumelanina e a feomelanina. A eumelanina apresenta cor que varia do marrom escuro ao preto, é

predominante em indivíduos de fototipos mais altos e está contida em melanossomas maiores, em estágios de maturação mais avançados. A feomelanina, de cor que varia do amarelo ao vermelho, são prevalentes em indivíduos de fototipos mais claros, e estão contidas em melanossomas menores e em estados de maturação iniciais.

Indivíduos com a pele clara, que possuem predominância na proporção de feomelanina são mais suscetíveis aos efeitos negativos da radiação solar, pois esta é fotoinstável e leva à formação de intenso estresse oxidativo nas células. Já indivíduos de fototipos mais altos, com prevalência de eumelanina, tem grande eficiência na fotoproteção pois esta apresenta alta estabilidade química sob exposição solar (LAND & RIDLEY, 2000).

Ambas melaninas derivam da L-tirosina ou L-hidroxifenilalanina (L-DOPA), que são hidroxiladas em dopaquinona pela enzima que catalisa as principais reações da melanogênese, a tirosinase. Então, as melaninas progridem por vias distintas por uma sequência de reações oxidativas e redutivas, sendo que a feomelanina sofre conjugação com cisteína ou glutatona (NATARAJAN et al., 2014).

Figura 2. Representação das vias reativas da melanogênese dos dois tipos de melanina (eumelanina e feomelanina) com suas principais enzimas envolvidas (cinza): tirosinase, proteína 2 relacionada à tirosinase (TRP-2) e proteína 1 relacionada à tirosinase (TRP-1)

Fonte: Adaptado de LEE, BAEK & NAM, 2015.

É bem estabelecido que a radiação solar é um dos principais fatores de estímulo ao aumento da síntese de melanina como um mecanismo homeostático para a proteção do epitélio pois até pequenas doses de radiação ultravioleta pode causar danos no DNA (LIN & FISHER, 2007).

A ativação prolongada da melanogênese induzida por uma extensa exposição solar tem consequências prejudiciais por envolver reações pró-oxidativas de alta intensidade energética. Também apresenta potencial genotóxico cumulativo às células epiteliais, além de ativar uma cascata inflamatória principalmente mediada pelo estresse oxidativo e formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (NATARAJAN et al., 2014).

A proteção epitelial pela melanogênese ocorre de modo direto através da mobilização dos melanócitos e de modo indireto pela mediação dos queratinócitos na produção de fatores melanogênicos, como a secreção de interleucina-1, endotelina-1, sintase induzida de óxido-nítrico (iNOS) e o hormônio estimulante de alfa-melanócitos (α -MSH), e de fibroblastos pela secreção de outros fatores pró-melanogênicos como o fator de célula-tronco (*stem cell factor* – SCF) (PARK & KIM, 2017).

A característica macro e microscópica mais evidente do melasma é a grande deposição de melanina na pele lesional, onde está localizada a hiperpigmentação. Os melanócitos são os principais responsáveis pelo aumento da pigmentação epidérmica. Histologicamente não há aumento em quantidade dos melanócitos, porém estes se tornam hiperativos, hipertrofiados, mais pigmentados, com dendritos mais proeminentes e contendo mais melanossomas do que na região perilesional normal. Assim como os queratinócitos basais que também se apresentam maiores, com formato irregular, hiperpigmentados e cromatina heterogênea (KANG e ORTONNE, 2010; BRIANEZI et al., 2014).

Além do característico aumento do conteúdo de melanina na epiderme, o melasma apresenta padrões histológicos característicos de pele fotoenvelhecida: frequente presença de elastose solar (KANG et al., 2007), aumento do número de mastócitos, maior atividade de glândulas sebáceas (HERNANDEZ-BARRERA et al., 2008), aumento na vascularização (NA et al., 2013) e rompimento da membrana basal, que leva à presença de melanócitos em pêndulo e na derme (TORRES-ALVAREZ et al., 2011), evidenciando o papel da radiação solar nessa patologia (KWON & PARK, 2016; PASSERON & PICARDO, 2018).

Além da avaliação clínica, a técnica avançada de microscopia confocal de reflectância possibilita avaliar características histopatológicas do melasma em resolução próxima à da histológica como: queratinócitos hiperpigmentados, presença de células dendríticas hiperativadas na camada basal, elastose solar e melanófagos na camada dérmica ou na junção dermo-epidérmica (KANG, 2010; CHUAH & THNG, 2017).

Muitos outros mecanismos de sinalização podem estar envolvidos no estímulo da tirosinase e da melanogênese (LEE, 2015; PASSERON & PICARDO, 2018).

Uma análise transcricional feita nas lesões melanocíticas no melasma em comparação com a pele não-lesional adjacente enfatizou a complexidade dessa desordem ao revelar que quase 300 genes estão significativamente alterados, incluindo genes do processo biosintético de melanina, de lipídeos e inflamatórios (KANG et al., 2011; LEE et al., 2015).

Portanto, a fisiopatologia do melasma é complexa e heterogênea, envolvendo vários mecanismos não restritos aos melanócitos, sendo que os queratinócitos, mastócitos, sebócitos e componentes dérmicos (fibroblastos), entre outros, estão envolvidos (KWON et al., 2016).

2.1.5. Diagnóstico e tratamento do melasma

O diagnóstico do melasma é eminentemente clínico e de fácil identificação por um dermatologista. Os principais diagnósticos diferenciais são: efélides, lentigo solar, melanodermia tóxica, hiperpigmentação pós-inflamatória, melanose friccional, ocronose, lupus eritematoso cutâneo, fitofotodermatose, pelagra, nevus de Ota, manchas café com leite, ceratose seborreica, poiquilodermia de Civatte, hiperpigmentação periocular, pigmentação induzida por droga (PANDYA & GUEVARA, 2000).

Mesmo que a lâmpada de Wood ainda seja utilizada para predizer o diagnóstico clínico e classificação de acordo com a profundidade da hiperpigmentação na pele como epidérmico, dérmico ou tipo misto, há controvérsias a respeito de existir um tipo exclusivo dérmico, sendo que estudos de microscopia confocal se correlacionaram com os histológicos, indicando que há maior quantidade de melanina presente em ambas camadas da pele lesional (GRIMES, YAMADA & BHAWANKANG, 2005; KANG e ORTONNE, 2010).

Numerosas opções de tratamento, incluindo os agentes tópicos e orais, peelings químicos, microagulhamento e laser estão entre as alternativas testadas para a remissão do melasma (ZHOU, 2017; LEE, 2016; LIMA, 2015).

Apesar da grande demanda terapêutica, o tratamento do melasma continua sendo desafiador com resultados inconsistentes, constantes recidivas e frequentes relatos de efeitos adversos (PASSERON & PICARDO, 2018).

Peelings químicos frequentemente causam hiperpigmentação pós-inflamatória, assim como as opções em tratamentos a laser, que ainda tem as frequentes recidivas como efeito adverso (RODRIGUES & PANDYA, 2015).

A combinação tripla de cremes contendo hidroquinona, ácido retinóico e esteroides por 8 a 16 semanas é considerado o tratamento a mais eficaz (JUTLEY et al., 2014). Apesar da combinação tripla reduzir os efeitos adversos principalmente pela presença de esteroides, não previne a reincidência. Os efeitos adversos mais frequentes são: eritema, irritação e xerose (RODRIGUES & PANDYA, 2015).

A hidroquinona é um agente despigmentante usado há 50 anos, é um composto hidroxifenólico que inibe de forma efetiva a tirosinase na síntese da melanina. Porém, seu potencial citotóxico e mutagênico faz com que sua segurança seja controversa e seu uso proibido em vários países, principalmente da Europa. Seus efeitos adversos incluem: irritação, eritema, dermatite irritativa e casos mais raros de hiperpigmentação pós-inflamatória e ocronose exógena (RODRIGUES & PANDYA, 2015).

O uso de fotoprotetor é imprescindível no tratamento do melasma, já que a radiação UV estimula os mecanismos de melanogênese e mobilização dos queratinócitos para a proteção celular (NICOLAIDOU e KATSAMBAS, 2014). O fotoprotetor precisa abranger um grande espectro da radiação solar, além do UVA e UVB, já até as ondas de menor amplitude da luz visível, conhecida como luz azul, induz a hiperpigmentação, o que pode ser atenuado com inclusão de óxido de ferro nos filtros solares (REGAZZETTI et al., 2017).

Apesar dos recentes mecanismos de sinalização propostos envolvidos na estimulação da melanogênese, a inibição da produção ou dispersão da melanina em qualquer estágio nos melanócitos ainda é a principal alvo para inibir a hiperpigmentação (ABAD-CASINTAHAN & LIM, 2017).

Assim, inibidores da tirosinase provenientes de fontes sintéticas e naturais continuam de grande interesse para alterações pigmentares (KHAN, 2012; LEE, BAEK & NAM, 2016).

A tirosinase, ou polifenol oxidase, é uma enzima que contém grupos ativos de cobre e está envolvida com as duas principais etapas da biossíntese de melanina, na qual a L-tirosina é hidroxilada a 3,4-hidroxifenilalanina (L-DOPA) e em sequência oxidada a o-dopaquinona (HEARING, 2011). Em outras palavras, esta enzima é responsável por catalisar tanto a hidroxilação em monofenóis quanto a oxidação de orto-difenóis a orto-quinonas, envolvidas na síntese da melanina (KIM e UYAMA, 2005; KHAN, 2012).

Os diidroxifenóis, como a hidroquinona e o hidroxitirosol, representam um grupo conhecido de inibidores de tirosinase uma vez que estes servem de substrato à enzima. Dependendo da presença e posição de um grupo adicional ligado a molécula fenólica, este grupo age como substrato ineficaz para a síntese de melanina, competindo pelo sítio

ativo da tirosinase (CHANG, 2009; LEE, BAEK & NAM, 2015). *In vitro*, um análogo do hidroxitirosol (2-hidroxitirosol) apresentou inibição da tirosinase em intensidade semelhante ao ácido kójico (PILLAYAR et al., 2017).

Figura 3. Diidroxifenóis inibidores da tirosinase.

O hidroxitirosol é um fenol diidroxilado anfipático e o principal antioxidante encontrado na oliveira e seus derivados, como no óleo de oliva e no extrato aquoso de suas folhas. Pode ser chamado de 3,4-diidroxifeniletanol (DOPET) ou 4-(2-hidroxi-etil)-1,2-benzenodiol pelo sistema IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) (ROBLES-ALMAZAN et al., 2018).

Este composto demonstrou uma variedade de efeitos farmacológicos, ao qual é associado a benéfica dieta mediterrânea, com destaque para a importante atividade antioxidante que exerce, além dos efeitos anti-inflamatório (RICHARD et al., 2011), anti-cancerígeno (BERNINI et al., 2015), anti-aterogênico (COVAS, DE LA TORRE & FITO, 2015) e neuro-protetor (RODRÍGUEZ-MORATO et al., 2015; HU et al., 2014).

A atividade antioxidante do hidroxitirosol é extremamente potente. Esta apresentou um IC₅₀ (50% da concentração inibitória máxima) no sequestro radicalar maior que a da vitamina C, vitamina E, BHT (hidroxitolueno butilado), compostos de referência para esta atividade (VISIOLI, BELLOMO & GALLI, 1998; VISIOLI & BERNARDI, 2011).

Assim, a atividade mais importante relacionada ao hidroxitirosol é sua grande capacidade em erradicar a produção de espécies reativas de oxigênio tanto em nível intra quanto extracelular, principalmente como qual ocorre após radiação UV, capazes de promover a genotoxicidade das células epiteliais (ZWANE et al., 2012).

Estudos como o de Visioli e colaboradores (1998), indicam ainda que o hidroxitirosol tem atividade antioxidante superior à do ácido ascórbico, princípio ativo com eficácia clínica comparável com a hidroquinona no tratamento do melasma (ESPINAL-PEREZ, MONCADA & CASTANEDO-CAZARES, 2004). O ácido

ascórbico atua no melasma por sua extrema atividade antioxidante, que é capaz de reduzir a o-dopaquinona em DOPA e ainda por quelar os íons metálicos no centro ativo enzimático da tirosinase (RODRIGUES & PANDYA, 2015). Assim, como a atividade antioxidante do hidroxitirosol é superior à do ácido ascórbico e este também tem potente efeito quelante de metais (GRANADO-PRINCIPAL et al., 2010), este apresenta grande potencial no tratamento do melasma.

Além disso, o hidroxitirosol é capaz de prevenir a genotoxicidade e apoptose de queratinócitos humanos expostos a radiação UVB *in vitro*, demonstrando potencial efeito protetor contra os danos da radiação, principalmente pela atenuação do estresse oxidativo e peróxidos formados (GUO et al. 2010; SALUCCI et al., 2014).

O mesmo efeito preventivo ao estresse oxidativo foi observado por D'Angelo et al. (2005) numa linhagem celular de melanoma irradiada com UVA *in vitro* foi verificado, mesmo em baixas dosagens.

Relacionado ao fotoenvelhecimento, o hidroxitirosol tem ação anti-inflamatória capaz de inibir a ação da metaloproteinase 9 (MMP-9) e sua expressão gênica (SCODITTI et al., 2014). Esta é uma das metaloproteinases envolvidas na degradação de colágeno e rompimento da membrana basal característica do fotoenvelhecimento encontrado no melasma (TORRES-ALVARES et al., 2011).

Ainda assim, o hidroxitirosol demonstra evidente caráter anti-inflamatório a nível celular ao prevenir a formação de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias *in vitro* em cultura de monócitos humanos, como: a geração de óxido nítrico (NO), a secreção do fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), a expressão de RNAm, assim como a inibição da sintase induzida de óxido nítrico (iNOS) e a expressão de cicloxigenase-2 (ZHANG, CAO & ZHONG, 2009).

O hidroxitirosol também apresenta efeitos vasomodulatórios ao inibir a atividade enzimática associada com doenças vasculares como a iNOS em estudos *in vitro* e em modelo animal (JO et al, 2009; VISIOLI & BERNARDI, 2011).

A suplementação oral com hidroxitirosol em humanos demonstrou inibir o tromboxano B₂, sugerindo uma atividade anti-trombótica *in vivo* (LEGER et al., 2005).

O hidroxitirosol não possui toxicidade, em modelos animais por via oral mesmo em altas dosagens. Estudos mostram que mesmo altas concentrações não levam a nenhuma alteração micro ou macroscópica, ou morte (KIRKLAND et al. 2015). Também não apresentam mutagenicidade ou genotoxicidade à altas concentrações *in vitro* (AUNON-CALLES et al., 2013).

Além do hidroxitirosol, há evidências anteriormente reportadas de tratamentos orais obtidos a partir de extratos vegetais que atuam na redução de dano induzido pelo UV no fotoenvelhecimento, como o *Polypodium leucotomos* (NESTOR et al. 2014) e na redução da hiperpigmentação em mulheres com melasma, com destaque para o picnogenol, extraído do pinheiro-bravo e rico em polifenóis (NI et al., 2002).

Além disso, o uso do ácido tranexâmico, conhecido agente hemostático, no tratamento oral do melasma vem sendo amplamente reconhecido como um possível auxiliar ao tratamento tópico padrão, demonstrado eficaz redução da hiperpigmentação (KARN et al. 2012; LEE et al., 2016).

Portanto, a aplicação do hidroxitirosol em formulações de uso tópico e oral tem potencial para auxiliar no tratamento do melasma pelas atividades antioxidante, moduladora de vasos e de inibição da tirosinase, resultando em um produto diferenciado que pode ser utilizado a longo prazo pela sua toxicidade inerte.

2.2. Pesquisa e desenvolvimento de formulações dermocosméticas

A pesquisa e desenvolvimento de formulações dermocosméticas são etapas que envolvem amplo conhecimento multidisciplinar para garantir a eficácia destes produtos destinados a serem aplicados na pele.

Conhecimentos físico-químicos em relação à composição das matérias primas, principalmente em relação às suas características químicas e consequentes interações físicas são necessárias para garantir a estabilidade e eficácia da formulação tópica (GUARATINI, GIANETI & CAMPOS, 2006). Além disso, conhecimentos farmacológicos e dermatológicos são fundamentais para assegurar a eficácia do efeito farmacológico do princípio ativo e das matérias primas na sua interação com a epiderme.

Além da cuidadosa seleção dos princípios ativos de acordo com as alterações de pele mais presentes na condição estudada, o estudo dos componentes do veículo desta formulação é fundamental para o sucesso terapêutico. A penetração e permeação do princípio ativo escolhido está diretamente relacionada com as características de afinidade química entre o veículo e a pele, além de seu poder de hidratação.

Assim, em emulsões, o equilíbrio hidrofílico-lipídico aliado à concentração adequada de espessantes, estabilizantes e emulsionantes determinam o sucesso de sua

estabilidade, que também depende do pH final, presença de eletrólitos e procedimento farmacotécnico da formulação.

Como cada formulação cosmética pode conter um conjunto exclusivo de matérias primas, na pesquisa anterior ao desenvolvimento, é necessário que cada componente da formulação seja analisado individualmente em relação à compatibilidade com outros ingredientes, pH de estabilidade e de melhor eficácia (dependente do pK_a), temperatura de degradação, influência nas características sensoriais, consistência e aparência da formulação composta, além de seus possíveis efeitos farmacológicos na epiderme para garantir a segurança e eficácia destas formulações.

Ainda assim, mesmo com a composição pré-definida para a etapa de desenvolvimento daquela forma farmacêutica cosmética, diferentes tipos de processos farmacotécnicos podem ser usados na sua manipulação, levando a diferentes características micro e macroscópicas desta.

Assim, por mais que a pesquisa antecedente ao desenvolvimento seja bem conduzida, a estabilidade e características desejáveis àquela formulação são imprevisíveis e ajustes geralmente empíricos no desenvolvimento são frequentemente realizados até a obtenção da formulação idealizada, levando o formulador a realizar múltiplos experimentos.

Portanto, após o desenvolvimento, a realização de testes de estabilidade a curto prazo usando os processos de centrifugação, análise de pH e das características organolépticas de formulações submetidas a intenso estresse térmico são usadas para prever e pré-selecionar as mais estáveis. Então, para a aplicação destes na pele, a real estabilidade da formulação deve ser confirmada em testes de estabilidade a longo prazo.

Ainda, a adesão terapêutica está muito relacionada com a percepção sensorial que a formulação tópica apresenta ao ser aplicada na pele. Mesmo que a composição do veículo seja destinada a condições específicas e tipo de pele, a análise sensorial é importante para prever a aceitação das formulações e selecioná-las condizentemente com seu público alvo (ISAAC et al. 2013; PARENTE et al., 2011). Assim, as características sensoriais negativas e positivas da formulação como sensação de hidratação, oleosidade, espalhabilidade, consistência, absorção e a presença de resíduos pode aumentar o consumo de um produto dermocosmético e sua adesão ao tratamento.

2.3. Estudos clínicos

Na revisão sistemática Cochrane sobre os tratamentos disponíveis para melasma, os autores concluíram que a qualidade dos estudos para avaliação dos tratamentos para o melasma foram, em geral, de baixo nível de evidência (JUTLEY et al., 2014).

Assim, estudos clínicos randomizados com protocolos bem estabelecidos são necessários para determinar a resposta da eficácia de tratamentos no melasma.

Um guia para estudos clínicos em melasma composto pela Academia de Desordens Pigmentares foi publicado para a correta consecução de protocolos de estudos clínicos e relevância das evidências (PANDYA et al., 2006).

Este descreve que técnicas de avaliação subjetiva como o Índice de Gravidade e Área do Melasma (MASI) devem ser usados e suplementados por técnicas de avaliação objetivas como as técnicas de biofísica e análise de imagem descritas no estudo (PANDYA et al., 2006).

Assim como os guias para estudos clínicos *Consolidated Standards of Reporting Trials – CONSORT* estes sugerem que o protocolo de estudo siga um modelo randomizado, com inclusão de um grupo controle e duplo-cego (SCHULZ, ALTMAN & MOHER, 2010).

O escore dermatológico para avaliação do *Melasma Area and Severity Index* (MASI) foi descrito em 1994 por Kimbrough-Green e colaboradores e é utilizado para avaliação da gravidade e da resposta terapêutica em pacientes com melasma facial. Através da inspeção visual, a face é dividida em quatro regiões (frontal, malar direita e esquerda, mento) e são avaliadas as áreas de acometimento, grau de pigmentação e homogeneidade. As regiões frontal, malar direita, malar esquerda e mento representam, respectivamente, 30%, 30%, 30% e 10% da área da face. Grau de pigmentação e homogeneidade são avaliados em uma escala de 0 a 4 (0, ausente; 1, leve; 2, moderado; 3, importante; 4, máximo).

Em um dos processos de validação do MASI, foi sugerido a eliminação do critério de homogeneidade - MASI modificado (mMASI), que apresentava respostas inconsistentes. Para o cálculo de mMASI, utilizam-se apenas a avaliação de pigmentação e a área de envolvimento das quatro regiões da face. O mMASI é confiável, válido, responsivo a mudanças na gravidade do melasma e mais fácil de calcular. O escore total do mMASI varia de 0 a 24 (PANDYA et al., 2011).

Para complementar a análise subjetiva do observador, que muitas vezes apresenta viés de imparcialidade frente aos resultados, as análises objetivas realizadas por técnicas físicas como a espectrometria de reflectância são muito utilizadas em estudos de eficácia de tratamentos em melasma pela a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados clínicos, além de permitirem a avaliação da pele de forma direta e não invasiva.

Estas fazem a análise objetiva da cor da pigmentação, com a medida da intensidade da luz refletida em comprimentos de onda específicos. O Skin-Colorimeter® CL 400 permite a quantificação de parâmetros colorimétricos da pele através da emissão de luz monocromática, enquanto o Mexameter® MX 18 emite uma luz em comprimento de onda compatível com os absorptíveis pela melanina e eritema, permitindo a medida destes (HANDEL et al, 2014).

Além destas técnicas, a microscopia confocal de reflectância a laser se destaca como tecnologia para captação não invasiva de imagem da epiderme nas reais condições de uso. Esta tem capacidade de avaliar a morfologia celular cutânea em alta resolução, permitindo a identificação de estruturas microanatômicas comparáveis com a histologia convencional, e são amplamente usados para avaliação das características morfológicas do melasma e estudos clínicos (PELLACANI et al, 2008; KANG et al, 2010; MERCURIO et al., 2016).

Ainda, para completar a análise realizada por medidas objetivas e subjetivas do pesquisador, é de grande importância avaliar a percepção de eficácia das participantes do estudo sobre os produtos cosméticos utilizados (PANDYA et al, 2009). Isso pode ser obtido por meio de questionários CATA (*check-all-that apply*), um modelo de questionário simples de múltipla escolha que contém questões pré-definidas pelo pesquisador para melhor ajustar ao objetivo da pesquisa, muito utilizado na pesquisa de aprovação do produto e análise sensorial (PENSÉ-LHÉRITIER, 2015).

Por fim, estudos de eficácia clínica por técnicas avançadas de biofísica e análise de imagem da pele são de grande importância para a comprovação científica dos reais benefícios na pele de tratamentos tópicos e orais, bem como a associação desses.

3. OBJETIVO

Avaliar a eficácia do uso oral e/ou tópico do extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol no controle do melasma por técnicas de biofísica e análise de imagem da pele.

Objetivos específicos:

- Desenvolvimento de uma formulação dermocosmética tópica;
- Análise sensorial para selecionar a formulação mais aceita para etapa clínica;
- Avaliação da atividade antioxidante do extrato de oliva destinado para aplicação tópica;
- Caracterização do melasma por análise de imagem com microscopia confocal;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Matérias-primas

As matérias-primas estão de acordo com o INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*), o nome comercial e o fornecedor/fabricante:

- Cetareth – 20: Álcool Cetoestearílico Etoxilado – 20EO – Mapric;
- Cetyl Alcohol: Álcool Cetílico – Mapric;
- Polysorbate 80: Tween 80 – Mapric;
- Mineral Oil: Vaselina Líquida – Mapric;
- Isopropyl Myristate: Crodamol IPM – Croda;
- Caprylic capric triglyceride: Crodamol GTCC – Croda;
- C12-C15 Alkyl Benzoate: Crodamol AB – Croda;
- Butylated hydroxytoluene: BHT – Mapric;
- Dimethicone: Silicone DC 200/350 – Mapric;
- Cyclopentasiloxane (and) Dimethicone Crosspolymer: Silicone DC 9040 – Mapric;
- Propylene Glycol: Propilenoglicol – Mapric;
- Butylene Glycol: Butilenoglicol – Lubrizol;
- Carbomer: Carbopol ® 980 – Mapric;

- Biosaccharide Gum-1: Fucogel – Mapric;
- Dissodium EDTA: EDTA – Mapric;
- Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben: Fenoxietanol e parabenos – Mapric;
- Glycerin: Glicerina vegetal – Mapric;
- Aminomethyl Propanol: AMP 95 – Mapric;
- Polyacrylamide, C13-14 Isoparaffin, Laureth-7: Sepigel™ 305 – Seppic;
- Sclerotium Gum: Amigel – Mapric;
- Cetearyl Alcohol, Dicetyl Phosphate, Ceteth-10 Phosphate: Crodafos™ CES - Croda
- Water: Água destilada e deionizada

4.2. Equipamentos e acessórios

- Agitador mecânico, Heidolph®, RZR 2021;
- Balança analítica, Ohaus, modelo AS 200;
- Balança eletrônica, Marte, modelo AS 2000;
- Centrífuga, Excelsa Baby II, modelo 206-R;
- Peagâmetro, Digimemed®, modelo DM20;
- Chapa de aquecimento;
- Termômetro;
- Vidrarias em geral;
- Estufas termotizadas com controle de umidade e fotoperíodo Eletrolab, modelo 111FC de 37°C e 45°C;
- Espectrofotômetro UV-Vis U2910 (Hitachi, Japão)
- Tewameter® TM 300 (Courage Khazaka, Alemanha);
- Visioface® (Courage Khazaka, Alemanha);
- Mexameter® MX 18 (Courage Khazaka, Alemanha);
- Skin-Colorimeter CL 400 (Courage Khazaka, Alemanha);
- Vivascope® 1500 (Lucid, Estados Unidos)

4.3. Desenvolvimento das formulações

Foram elaboradas 12 emulsões, em agitador Heidolph, RPZ 2021, constituída de concentrações variadas de emolientes, umectantes, conservantes e emulsionantes não iônicos e polímeros hidrofílicos (aditivos reológicos), as quais estão descritas na Tabela 1.

A escolha das matérias-primas foi feita com base em um levantamento técnico envolvendo os ingredientes mais utilizados em formulações de cremes e géis-cremes hidratantes comercializados. Os ingredientes mais usados foram selecionados a partir da literatura científica e informes técnicos disponibilizados pelos fabricantes/distribuidores de acordo com a capacidade do sistema emulsificante, compatibilidade e interação química entre as matérias-primas, pH e eletrólitos, comedogenecidade dos emolientes e co-emulsionantes e compatibilidade cutânea buscando obter uma formulação com sensorial agradável, que proporcionasse sensação de hidratação em deixar resíduo oleoso.

As formulações de uso tópico foram acrescidas ou não (veículo) de 1% do extrato hidroglicólico de oliva padronizado em 20% de hidroxitirosol (HydrOlive®).

Além disso, foram elaboradas, com prescrição médica em farmácia de manipulação, cápsulas gelatinosas para uso oral contendo 300mg de extrato seco de oliva padronizado em hidroxitirosol a 3% (Oli-Ola®), e cápsulas gelatinosas contendo apenas celulose microcristalina (grupo controle).

4.3.1. Testes preliminares de estabilidade

Todas as formulações desenvolvidas foram analisadas quanto a estabilidade por testes preliminares após vinte e quatro horas do preparo das emulsões.

Os testes preliminares de estabilidade envolveram:

- Centrifugação;
- Determinação de pH;
- Avaliação das características organolépticas e homogeneidade da emulsão;

As amostras foram submetidas ao estresse térmico de 37°C e 45°C, em estufas termostatizadas, com controle de umidade e fotoperíodo, modelo 111FC (marca Eletrolab), no período de 30 dias.

Para o teste de centrifugação, 3 gramas de cada amostra foram centrifugadas por três ciclos de 30 minutos, a 3000rpm, em centrífuga Excelsa Baby II, modelo 206-R.

A medida de pH foi feita em um peagômetro da marca Digimed, diretamente na amostra das formulações.

Na avaliação organoléptica foram consideradas as seguintes alterações: cor, separação de fases, homogeneidade.

Os testes foram realizados nas amostras no 1º, 7º, 15º e 30º de permanência em cada temperatura.

4.3.2. Análise sensorial

Para definir a formulação tópica que resultaria numa maior adesão ao tratamento foi realizada uma avaliação sensorial com as formulações estáveis resultantes do teste preliminar de estabilidade. Para tal, foi aplicada uma quantidade padronizada (30µl) com uma pipeta volumétrica das formulações tópicas veículo em 3 regiões de cada antebraço de 20 participantes recrutadas para a pesquisa.

Os parâmetros foram avaliados por um questionário modelo CATA (check all that apply), considerado a melhor opção para a análise sensorial com um painel não treinado de voluntários (PARENTE, MANZONI e ARES, 2011). Esse descreve as características sensoriais em um formato simples de lista de verificação, a qual podem ser assinaladas todas as opções relacionadas com a percepção sensorial. A

cada opção assinalada é atribuído um valor binário para análise qualitativa sensorial (MARCON et al., 2014).

Assim, as opções a serem assinaladas foram divididas em:

- Sensação imediata: de absorção, oleosidade, espalhabilidade, pegajosidade e suavidade.
- Sensação após 5 minutos: resíduo oleoso, sensação de hidratação e resíduo branco.
- Indicação da formulação preferida.

4.3.3. Estudo de Estabilidade

A partir do teste sensorial, a formulação tópica selecionada para o estudo clínico foi adicionada ou não (veículo) de extrato de oliva para a avaliação da estabilidade frente ao estresse térmico nas temperaturas de 37 e 45°C, em estufas termostatizadas com controle de umidade (UR=90%) e fotoperíodo (modelo 111FC – Eletrolab), no período de 90 dias.

Em intervalos de 30 dias foram avaliadas em relação ao pH e características organolépticas. A medida de pH foi feita em um peagômetro da marca Digimed, diretamente na amostra das formulações. Na avaliação organoléptica foram consideradas as seguintes alterações: cor, separação de fases, homogeneidade.

4.4. Avaliação da atividade antioxidante do extrato de oliva

4.4.1. Ensaio da atividade antioxidante pelo método do DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil)

Dez μL do extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol ou 10 μL de etanol (controle) foram analisados por diluições seriadas com etanol com concentrações que variaram entre 0,039% e 0,0125%, de acordo com o método de Falé et al. (2009):

$$\%AA = (A_{\text{DPPH}} - A_s / A_{\text{DPPH}}) \times 100$$

No qual, %AA é a atividade antioxidante, A_{DPPH} é a absorbância da solução de DPPH e A_s é a absorbância da solução contendo o extrato de oliva.

As soluções foram adicionadas a uma mistura reacional contendo 800 μL de 0,1 M de tampão acetato (pH 5,5) e 200 μL de DPPH· 0.5 mM de solução etanólica absoluta. A alteração na absorbância foi medida após 5 minutos de reação da mistura reacional na cubeta de 1 cm^2 no comprimento de onda de 510 nm à 25°C pelo espectrofotômetro

UV/Vis U-2910 (Hitachi High-Technologies Corporation, Toquio, Japão). A IC₅₀ (concentração que inibe 50% da reação oxidante) foi calculada por regressão linear da curva resultante das concentrações versus a %AA.

4.4.2. Ensaio de quimioluminescência dependente do luminol- H₂O₂-HRP

Dez μ L do extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol foram analisados por diluições seriadas com etanol com concentrações que variaram entre 0.00975% a 0.001215% (v/v) ou 10 μ L de etanol (controle) foram adicionados a sonda do luminômetro com luminol 0,028 M), solução tamponizada de H₂O₂ (0,051ml/L), tampão de fosfato (0,1 M, pH 7,4) e a enzima *horseadish peroxidase* em solução tampão (0,3 ml/L). A quimioluminescência produzida foi medida em triplicada pelo luminômetro (Autolumat LB953 - EG & G Berthold, Baden-Wurttemberg, Germany) por 15 minutos, o qual a luz emitida é gravada pelos fótons contados por minuto. Os valores de área integrada (área sob a curva) foram calculados pela curva da quimioluminescência versus o tempo. A porcentagem de inibição da quimioluminescência de cada amostra é calculada usando a seguinte fórmula:

$$100 - [(AS/AC) \times 100]$$

Ao qual AS é a área integrada para cada amostra avaliada em cada concentração e AC é a área integrada da amostra controle. A IC₅₀ (concentração que inibe 50% da quimioluminescência) foi calculado por interpolação logarítmica de uma curva-dose sigmoide das concentrações x inibição da quimioluminescência.

5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1. Protocolo do estudo clínico

Para avaliar a eficácia do extrato de oliva em formulações tópicas e orais, a etapa clínica foi conduzida seguindo um desenho experimental de estudo clínico, randomizado, duplo-cego, piloto e placebo controlado que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEP/FCFRP n.º 4346115.0.00005403).

Assim, o estudo foi divulgado em mídias sociais na região de Ribeirão Preto pela imprensa da Universidade de São Paulo (USP) - Ribeirão Preto. Os interessados em participar da pesquisa entraram em contato por telefone.

Seguindo os critérios de inclusão: idades entre 30 e 50 anos, fototipos III e IV de acordo com a classificação de Fitzpatrick (1988) e padrões de hiperpigmentação, sugestivos de melasma, visível na pele do rosto, foram recrutadas 80 participantes, que foram convidadas comparecer pessoalmente ao Núcleo de Estudos Avançados em Tecnologia de Cosméticos (NEATEC), localizado no Bloco A da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, as quais foram orientadas sobre os objetivos e métodos da pesquisa.

A seguir, foram tiradas fotos em alta resolução do ângulo frontal e lateral do rosto destas no equipamento Visioface Quick® e foi realizada uma entrevista semi-estruturada seguindo um questionário simples com informações relevantes envolvidas ao desenvolvimento do melasma e dados de identificação pessoais (Tabela 2).

Tabela 2. Questões pré-definidas na entrevista de recrutamento.

Nome
Idade
Fototipo
Fuma?
Localização das manchas
Tem filhos? Quantos? Quantos anos?
Já apresentou alergia a algum produto cosmético?
Faz uso algum medicamento? E suplementos orais (vitamina)?
Com quantos anos notou as primeiras manchas? Associou a qual fator?
Usa ou já usou anticoncepcional? Quanto tempo?
Faz algum tratamento estético ou dermocosmético para as manchas?
Já fez algum tratamento estético/dermocosmético para as manchas?
Já fez tratamento oral para as manchas?
Teve a mancha diagnosticada como melasma por dermatologista?
Já gostou em algum período da vida de ficar bronzeada?
Qual a intensidade de exposição solar durante: (Alta – Média – Baixa)
- 10-19 anos
- 20-29 anos
- 30-39 anos
- 40-50 anos
Usa filtro solar? Qual a frequência de aplicação de filtro solar diariamente?
Qual filtro usa? Qual o fator de proteção solar e marca?
Há alguém na família que também apresenta manchas no rosto?

Para a seleção das participantes à etapa clínica, todos os casos foram analisados e discutidos em conjunto à médica dermatologista Ediléia Bagatin (CRM-SP 37090), a qual avaliou as imagens obtidas pelos equipamentos anteriormente descritos e as informações fornecidas nas entrevistas.

Os seguintes critérios de exclusão foram considerados: hiperpigmentações não diagnosticadas como melasma na região malar; gravidez ou aleitamento; indivíduos com história anterior de reações adversas com o uso de produtos cosméticos; indivíduos em uso de medicamentos passíveis de produzir resposta cutânea anormal; tratamentos cosméticos e dermocosméticos clareadores, peelings químicos superficiais e laser há menos de 3 meses; uso de suplementação com antioxidantes orais há menos de 3 meses; doenças dermatológicas localizadas ou generalizadas; e excesso de pelos na face.

Considerando os critérios de exclusão, 56 participantes foram divididas aleatoriamente, por meio de software estatístico de randomização permutada em blocos, disponível em plataforma eletrônica (URBANIAK & PLOUS, 2015), em quatro grupos distintos com 14 participantes, para a avaliação da eficácia clínica do hidroxitirosol. Os possíveis tipos de intervenção foram divididos com as seguintes combinações:

- **Controle:** formulação tópica veículo e oral placebo.
- **Tópico:** formulação tópica contendo o princípio ativo e oral placebo.
- **Oral:** formulação tópica veículo e oral contendo o princípio ativo.
- **Tópico e oral:** formulação tópica e oral contendo o princípio ativo.

O modelo de randomização permutada em blocos foi realizado para evitar que um dos grupos pudesse ser selecionado em proporções diferentes. Assim, 14 blocos com as opções de 1 a 4, representando os grupos, foi usado e as participantes, que receberam um número de 1 a 56 foram distribuídas.

Com o objetivo de manter o desenho duplo cego, as opções de intervenção do estudo, a partir do resultado da randomização, receberam um número aleatório de 1 a 4 que não representou a ordem descrita acima dos possíveis grupos em estudo. Portanto, uma terceira pessoa participou para definir qual intervenção seria atribuída às opções do resultado de 1 a 4 da randomização.

Ainda assim, a mesma pessoa definiu um número de lote que identificada a qual grupo estas pertenciam e etiquetou as embalagens dos produtos. Todas as embalagens eram idênticas, brancas e foscas.

As participantes alocadas para essa etapa do estudo foram orientadas a utilizar os produtos fornecidos diariamente, por 90 dias: ingerir uma cápsula e aplicar formulação tópica, de preferência à noite.

Essas também foram orientadas a aplicar e reaplicar um fotoprotetor de uso próprio com FPS acima de 30 com cor durante a manhã, e reaplicar ao longo do dia a cada 3 horas.

As participantes que não faziam o uso de fotoprotetor diariamente foram orientadas a iniciar o uso como descrito anteriormente durante todo o estudo, e nestas, as medidas basais foram realizadas a partir de 30 dias do início do uso do fotoprotetor.

As medidas basais da pele foram realizadas por técnicas de biofísica e de análise de imagem no dia inicial da entrega dos produtos (medidas basais) e após 30, 60 e 90 dias, com duração aproximada de 20 minutos, realizadas após o tempo 15 minutos de climatização nas condições ambientes do laboratório clínico: temperatura entre 21-24°C e umidade relativa do ar entre 40-45%.

5.2. Avaliação das características morfológicas e estruturais da epiderme por microscopia confocal de reflectância a laser

As características morfológicas do melasma de 5 participantes foram analisada por microscopia confocal de reflectância a laser com o equipamento Vivascope 1500 (Lucid, Henrietta) para a obtenção de imagens da epiderme e derme papilar em nível celular para a análise das características do melasma in vivo de maneira não invasiva. O sistema usa uma fonte a laser com um comprimento de onda de 830 nm, um poder de iluminação de 20mW, uma objetiva de imersão e uma velocidade de 20 imagens por segundo (MERCURIO et al., 2016).

5.3. Fotografias em alta resolução

Para o recrutamento deste estudo foi utilizado o equipamento Visioface Quick®, que realiza fotografias em alta resolução com padronização da posição do rosto e iluminação, permitindo uma análise da imagem da pele iluminada por diodos

emissores de luz branca (white LED) e por diodos emissores de luz semelhante ao UV (UV-like LED) (MERCURIO et al., 2013).

5.4. Índice de severidade e área do melasma (mMASI)

O índice de gravidade e área do melasma modificado (*Melasma Area and Severity Index – mMASI*) foi calculado por uma avaliação subjetiva do pesquisador sobre dois fatores: área envolvida (A) e pigmentação (P), nas regiões: frontal (f), malar direita (md), malar esquerda (me) e mento - queixo (q), correspondente a 30%, 30%, 30% e 10%, respectivamente.

Para a área envolvida nessas 4 regiões é fornecido um valor numérico de 0 a 6: 0=sem envolvimento; 1<10%; 2=10-29%; 3=30-49%; 4=50-69%; 5=70-89%; 6=90-100%. A pigmentação é classificada de 0 a 4: 0=ausente; 1=leve; 2= moderado; 3= acentuado; 4=intenso. O mMASI é então calculado por adição da soma das classificações de gravidade para a pigmentação multiplicado pelo valor da área de envolvimento nas 4 regiões faciais, como exemplificado na Figura 4 (PANDYA et al, 2011).

Figura 4. Índice de gravidade e área do melasma modificado (mMASI).

$$\text{mMASI} = \frac{\text{Frontal}}{0,3.A.P} + \frac{\text{Malar D}}{0,3.A.P} + \frac{\text{Malar E}}{0,3.A.P} + \frac{\text{Mento}}{0,1.A.P}$$

$$\text{mMASI} = 0,3A(f)P(f) + 0,3A(md)P(md) + 0,3A(me)P(me) + 0,1A(q)P(q) \quad (1)$$

Fonte: adaptada de PANDYA et al., 2011.

O mMASI das participantes foi calculado sobre as fotos de alta resolução obtidas por meio do equipamento de fotos de alta resolução com luz LED, Visioface Quick®,

como descrito anteriormente, para padronizar as condições de análise e ângulo do rosto.

5.5. Técnicas de biofísica de análise do melasma e da pele

5.5.1. Luminosidade

Para a análise da luminosidade da pele a colorimetria por espectrofotometria de reflectância foi realizada usando o equipamento Colorimeter CL 400 (Courage-Khazaka Eletronic, Koln). Este quantifica objetivamente a da cor da pele usando o sistema de cor de três eixos $L^*a^*b^*$: L^* representa a coordenada de luminosidade (preto-branco), a^* representa o eixo de cor verde-vermelho, e b^* o eixo amarelo-azul, com valores que variam de 0 a 100. Somente a coordenada L^* que representa a luminosidade foi utilizado na região lesional e perilesional do melasma na região zigomática das participantes nos tempos basal, 30, 60 e 90 dias dos diferentes grupos de estudo, para avaliar tanto a redução da pigmentação na região lesional quanto a diferença de pigmentação entre a região lesional e perilesional (PANDYA et al., 2006).

5.5.2. Quantificação de melanina e eritema

A quantificação dos índices de melanina e eritema da pele foi realizada pelo equipamento Mexameter MX 16 (Courage & Khazaka Electronic GmbH, Köln, Alemanha). Este emite uma fonte monocromática com comprimentos de onda compatíveis com os absorbíveis pela melanina e hemoglobina (eritema), e são medidos a partir da intensidade da reflectância desta radiação na epiderme. A intensidade da pigmentação varia de 0-1000.

A quantificação da pigmentação pela de melanina foi realizada na região lesional e foi chamada de medida de melanina. A diferença de melanina (índice de melanina), que é medido através da diferença das medidas entre a região lesional e perilesional do melasma também foi avaliado, sendo que a completa resolução do melasma representa uma diferença igual a zero.

A medida do eritema segue os mesmos princípios anteriores, foi realizado na região lesional e pela diferença entre a região lesional e perilesional do melasma, para comparação da presença de maior vascularização.

Todas as medidas foram realizadas na região zigomática das participantes nos tempos basal, 30, 60 e 90 dias de uso dos produtos (DEL ROSARIO et al., 2018).

5.5.3. Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo

Para a determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo foram realizadas medidas em cada tempo do utilizando o equipamento Corneometer® CM 825 (Courage & Khazaka Electronic GmbH, Köln, Alemanha), que, por meio da medida da capacitância elétrica, mede o nível de hidratação do estrato córneo (MARCON et al., 2014).

5.5.4. Determinação da perda transepidérmica de água

Para avaliação da função barreira da pele foi utilizado o equipamento TM 210 (Courage & Khazaka Electronic GmbH, Köln, Alemanha), cuja função é medir a evaporação de água da superfície da pele (WAGEMAKER et al., 2015).

5.6. Percepção de eficácia

Além das medidas objetivas para a verificação da eficácia do tratamento sugerido, a percepção subjetiva das participantes também foi avaliada através da resposta ao questionário modelo CATA (check all that apply) em um formato simples de lista de verificação, a qual podem ser assinaladas todas as opções relacionadas com a percepção da participante, ao final do período de 90 dias de uso dos produtos.

O questionário contém:

- Efeitos a longo prazo na pele: hidratação, redução das rugas, redução ou aumento da oleosidade da pele, redução ou aumento de cravos/espinhas, redução ou aumento das manchas, aumento da sensibilidade.
- Efeitos adversos: vermelhidão, coceira, descamação (uso tópico) e náusea (uso oral).
- Intenção de compra dos produtos – sim ou não.

5.6. Análise estatística

O plano de análise dos dados envolveu a quantificação do melasma por técnicas não-invasivas de biofísica e por escore a partir da análise de imagem da pele, comparando a eficácia da intervenção entre os grupos ao longo do tempo dos tratamentos. Assim as principais variáveis consideradas foram as derivadas da quantificação da hiperpigmentação, todas contínuas: medida de melanina, MASI, luminosidade da região lesional. As variáveis secundárias foram a hidratação e uniformização da pele por técnicas biofísicas de análise da pele.

Os dados experimentais contínuos obtidos pela quantificação da pigmentação das variáveis principais foram analisados por análise de variância (ANOVA) para verificar a dispersão dos dados e homogeneidade das variâncias entre os diferentes grupos de intervenção a cada tempo avaliado - análises *one-way* nos tempos basal, 30, 60 e 90 dias. A análise de variância também foi utilizada para verificar a distribuição das variáveis de cada intervenção individualmente com os valores de cada variável pareados por tempo, comparando os valores basais com os tempos subsequentes (ANOVA RM). As análises estatísticas destes dados foram realizadas no software estatístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Software - California, USA), com nível de significância estabelecido em 5%.

As tabelas destes resultados serão apresentadas em gráficos de barra contendo todos os grupos em estudo descritos anteriormente – grupo controle, tópico, oral e oral e tópico- nos tempos analisados – inicial (T0), 30 (T30), 60 (T60) e 90 (T90) dias, em médias e intervalo de confiança de 95% (IC95%).

Para dados nominais binários, como os obtidos na análise sensorial, medidas de dispersão utilizando distribuição de frequências foram representadas nos gráficos.

Os dados das características das participantes foram apresentados por medidas resumo descritivas, em porcentagem.

6. RESULTADOS

6.1. Desenvolvimento das formulações

6.1.1. Testes preliminares de estabilidade

A partir das doze formulações desenvolvidas, as formulações F5, F7, F8, F9, F11 e F12 com diferentes composições de polímeros hidrofílicos, emulsificantes não-iônicos e emolientes, entre outros, foram consideradas estáveis nos testes preliminares de centrifugação e análise das características organolépticas, uma vez que apresentaram homogeneidade sob os testes preliminares de estabilidade.

Após 24 horas da formulação inicial das emulsões, as formulações de números F1, F2, F3, F4 e F6 apresentaram separação de fases quando submetidos aos ciclos de centrifugação e foram consideradas instáveis.

Na formulação número F10, o polímero descrito composto de goma biossacarídica não espessou corretamente provavelmente por erro na manipulação, não auxiliando na estabilização da emulsão.

As formulações F5, F7, F8, F9, F11, F12 foram estáveis sob os ciclos de centrifugação no dia posterior às formulações e mantiveram as características organolépticas no período de 30 dias, em ambiente controlados sob estresse térmico de 37°C e 45°C.

Além disso, os valores de pH das formulações durante o período de 30 dias variaram entre 5,2 e 5,8, valores considerados compatíveis para uma formulação de uso tópico (DAL'BELO et al., 2006).

Portanto, as seis formulações estáveis (F5, F7, F8, F9, F11 e F12) passaram para a avaliação sensorial, a qual tem o objetivo de selecionar a formulação mais aceita baseada nas melhores avaliações dos parâmetros sensoriais.

6.1.2. Análise sensorial

Os resultados da análise sensorial imediata está apresentado na Figura 5. Enquanto a análise sensorial após 5 minutos da aplicação das formulações tópicas pode ser analisado na Figura 6.

No parâmetro sensação imediata apenas a formulação número F12, a base de goma de esclerócio como agente de consistência foi associada às características

sensoriais negativas, tais como pegajosidade e oleosidade sendo, portanto, considerada a mais pegajosa e oleosa, além de menos suave e pouco absorvida.

A formulação número F8 foi melhor avaliada nos parâmetros sensação de absorção e oleosidade, apesar de ser a que contém maior concentração de emolientes.

As formulações F5 e F7 apresentam grande semelhança na avaliação sensorial, embora sejam compostas de diferentes emolientes.

Figura 5. Características sensoriais imediatas da aplicação das formulações tópicas.

No questionário aplicado, os resultados da análise sensorial das formulações tópicas após cinco minutos da aplicação podem ser observados na Figura 6, onde fica clara a reprovação da F12, a qual apresentou resíduo oleoso, menor sensação de hidratação, além de evidente resíduo branco.

Figura 6. Características sensoriais após 5 minutos da aplicação das formulações tópicas.

A formulação F8 se destacou em deixar a sensação prolongada de pele hidratada, e ainda apresentou menor resíduo oleoso.

A formulação com maior frequência de indicação como favorita foi a formulação F8 com 32%, seguido da F7 (23%), F11 e F5 (18%) e F9 (9%).

Assim, considerando os resultados da análise sensorial, a formulação que mais se destacou em parâmetros sensoriais imediatos e prolongados foi a formulação F8. Portanto, a formulação F8 passou aos testes de estabilidade prolongada, ao qual neste veículo foi adicionado ou não o extrato de oliva contendo hidroxitirosol para os testes de estabilidade a longo prazo, anteriormente a ser utilizada na etapa clínica. A composição da formulação 8 está descrita na Tabela 3.

Tabela 3. Composição da formulação F8.

Nome químico	INCI	F8 (%p/p)
Álcool Cetoestearílico Etoilado – 20MM	Ceteareth - 20	4
Álcool Cetílico	Cetyl Alcohol	3
Monooleato de Sorbitan Etoilado 20 EO	Polysorbate 80	0,15
Triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico	Caprylic capric triglyceride	6
Benzoato de alquila C12-C15	C12-C15 Alkyl Benzoate	3
BHT	Butylated hydroxytoluene	0,05
Dimeticone	Dimethicone	2
Elastômero de silicone (Dow Corning® 9040)	Cyclopentasiloxane (and) Dimethicone Crosspolymer	1
Butilenoglicol	Butylene Glycol	3
Polímero poliacrilato (Carbopol® 980) – 2,5%	Carbomer	10
EDTA dissódico	Dissodium EDTA	0,05
Fenoxietanol e parabenos	Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben	1
Glicerina	Glycerin	3
Aminometilpropanol	Aminomethyl Propanol	q.s. pH 6
Água Destilada	Water	q.s.p. 100

6.1.3. Estabilidade

Após 90 dias de estocagem da formulação número 8, contendo ou não o extrato de oliva em estudo, não houve alterações significativas nos valores de pH (Tabela 4) e nas características organolépticas.

Tabela 4. Valores de pH das formulações veículo e contendo extrato de oliva nos tempos e temperaturas de armazenagem.

Formulações e temperaturas de estocagem		Valores de pH nos tempos de estocagem			
		Basal	30 dias	60 dias	90 dias
Veículo	TA	5,60	5,64	5,72	5,70
	37°C	5,60	5,67	5,70	5,67
	45°C	5,60	5,68	5,75	5,72
Com ativo	TA	5,65	5,67	5,70	5,62
	37°C	5,65	5,70	5,66	5,60
	45°C	5,65	5,67	5,60	5,51

TA: temperatura ambiente

Apenas a amostra estocada à 45°C contendo o extrato de oliva sofreu alteração gradativa na cor, com escurecimento após 90 dias de estocagem e sem alteração no odor característico do extrato. Porém, de acordo com o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos uma alteração leve de cor em temperaturas elevadas é aceita (ANVISA, 2004).

As demais amostras acondicionadas em temperatura ambiente e em 37°C contendo ou não o extrato de oliva não apresentou alterações aparentes, tanto em relação a cor e separação de fases quanto ao odor característico de cada, apresentando homogeneidade, e assim, consideradas estáveis nestas condições de armazenamento.

Em síntese, formulações estocadas à 37°C e temperatura ambiente por 3 meses que não sofreram alterações são consideradas estáveis nas condições ideais de armazenamento neste período (POPE, 1980; WATERMAN & ADAMI, 2005), então a formulação tópica número 8 acrescida ou não do extrato de oliva foi considerada estável para aplicação na etapa clínica.

6.2. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi analisada para verificar o controle de qualidade do princípio ativo adquirido.

Os resultados obtidos do ensaio da quimioluminescência demonstraram que 0,007% (v/v), equivalente à 83,93 µg/ml, do extrato de oliva em estudo destinado a ser aplicado na formulação tópica inibiu 50% da reação oxidativa derivada da peroxidase da enzima *horseadish*, demonstrando uma propriedade antioxidante relevante, mesmo em concentrações baixas, como pode ser observado na Figura 7.

Ainda, a atividade antioxidante pelo DPPH, medido diretamente pela inibição do radical DPP• no meio aquoso, apresentou inibição de 50% da concentração igual a 0,05% (v/v), o que equivale à 599,5 µg/ml (Figura 7).

Figura 7. Ensaio antioxidante de quimioluminescência e DPPH.

6.3. Estudo clínico

A etapa de triagem do estudo clínico foi realizada de janeiro a abril de 2017. Oitenta participantes, todas mulheres, condiziam com os critérios de inclusão e foram convidadas a fazer a triagem no laboratório a partir das entrevistas e

Como a amostra populacional determinada para a etapa clínica não foi pré-determinada usando cálculo amostral, a amostra de conveniência utilizada classifica este estudo como piloto.

O tempo basal das intervenções clínicas em cada grupo randomizado iniciou-se em junho e a última voluntária no último seguimento clínico foi avaliada em setembro de 2017.

Vinte e quatro participantes condiziam com algum critério de exclusão descrito, o mais comum foi não possuir melasma na região escolhida para a análise biofísica e de imagem, a malar, ou mais especificamente, a região zigomática. Portanto, 56 participantes com melasma na região malar foram randomizadas nos quatro grupos em estudo (Figura 8).

Figura 8. Diagrama de fluxo da etapa clínica seguindo o guia CONSORT de estudos clínicos.

Houveram 12 desistências de participação durante o estudo clínico: 3 no grupo tópico, 3 no grupo placebo, 3 no grupo oral e 3 no grupo oral e tópico. A maioria das desistências ocorreram no primeiro mês de tratamento, sendo que 3 ocorreram após o 30º dia e 2 após o 60º dia.

As informações obtidas a partir das entrevistas pré-estruturadas relacionadas com o melasma e os fatores de risco envolvidos no seu desenvolvimento das 56 participantes inicialmente alocadas no estudo estão descritas na Tabela 4.

A idade das participantes variou de 32 a 49 anos, com média e desvio padrão de 40,9 $\pm$ 4,3. Em geral, 42 (75%) das participantes tinham fototipo III de Fitzpatrick e 14 (25%) fototipo IV.

Tabela 5. Informações obtidas a partir das entrevistas das participantes alocadas no estudo (n=56).

	Número de participantes	%
Duração do melasma		
Até 5 anos	18	32%
6 a 10 anos	13	23%
11 a 15 anos	9	16%
Mais de 15 anos	9	16%
Não informado	7	13%
Fatores subjetivos associados		
Gravidez	18	32%
Terapias hormonais	6	11%
Radiação solar	10	18%
Cosmético	1	2%
Psicológico (estresse/depressão)	5	9%
Nenhum	13	23%
Uso de anticoncepcional previamente		
Sim	48	86%
Não	8	14%
Uso de fotoprotetor diariamente		
Sim	49	88%
Não	7	12%
Tratamento anterior com dermatologista		
Sim	41	73%
Não	15	27%

Após a randomização, as características basais das participantes e do melasma em cada grupo estão descritas na Tabela 5.

Tabela 6. Características basais das participantes e do melasma por grupo.

Grupos	Controle (n=14)	Tópico (n=14)	Oral (n=14)	Tópico e oral (n=14)
Idade (anos), média $\pm$ DP	39,1 $\pm$ 4,6	40,5 $\pm$ 4,1	41,9 $\pm$ 4,0	42,0 $\pm$ 4,35
Fototipo, n (%)				
III	9 (64%)	9 (64%)	11 (78%)	11 (78%)
IV	5 (36%)	5 (36%)	3 (22%)	3 (22%)
Duração do melasma, n (%)				
Até 5 anos	2 (14%)	3 (21%)	5 (36%)	7 (50%)
6 a 10 anos	5 (36%)	4 (29%)	2 (14%)	2 (14%)
Mais de 10 anos	4 (29%)	7 (50%)	6 (43%)	2 (14%)
Não informado	3 (21%)	0	1 (7%)	3 (21%)

Tratamento dermatológico prévio, n (%)	11 (78%)	7 (50%)	12 (85%)	11 (78%)
Escore mMASI, média $\pm$ DP	8,64 $\pm$ 3,9	8,41 $\pm$ 3,5	8,54 $\pm$ 4,0	5,47 $\pm$ 3,0
Medidas biofísicas do melasma (região lesional), média $\pm$ DP				
Melanina (Mexameter)	539,5 $\pm$ 40,9	539,5 $\pm$ 32,8	532,3 $\pm$ 31,5	532,4 $\pm$ 41,7
Eritema (Mexameter)	642,8 $\pm$ 22,8	648,1 $\pm$ 24,4	659,4 $\pm$ 25,3	647,2 $\pm$ 30,6
Luminosidade (Colorimeter)	54,6 $\pm$ 4,0	54,38 $\pm$ 5,4	55,0 $\pm$ 4,4	55,8 $\pm$ 4,8

As participantes também foram questionadas quanto aos hábitos anteriores de exposição solar em diferentes faixas etárias. Da faixa entre os 10 a 19 anos, a maioria das participantes informou que se expunham ao sol com grande intensidade, e a partir principalmente dos 30 anos a intensidade da exposição solar decaiu. Grande parte das participantes informou que a partir do início da hiperpigmentação passaram a evitar a exposição solar e ter o hábito de aplicar o filtro solar diariamente.

6.4. Avaliação das características morfológicas e estruturais da epiderme por microscopia confocal de reflectância a laser

A análise das imagens obtidas pelo microscópio confocal de reflectância (MCR) possibilitou a visualização das principais características morfológicas e estruturais do melasma.

Na região lesional da camada basal em comparação com a mesma camada na região perilesional observa-se a presença de queratinócitos hiperpigmentados que aparecem como células difusas brilhantes, bem como no início da junção dérmica-epidérmica evidenciado nas papilas dérmicas (Figura 9).

O mesmo ocorre na camada granulosa na qual os queratinócitos da região lesional aparecem com alta refletividade em comparação com a região perilesional (Figura 10).

Figura 9. Imagens da camada basal por microscopia confocal de reflectância da região malar da face - lesional e perilesional- de uma participante do estudo.

Em relação ao fotoenvelhecimento, frequentemente observado nas características no melasma, podemos observar na camada basal e a desfiguração e achatamento dos anéis circundando a derme papilar, que representam as vilosidades da junção dérmica-epidérmica (Figura 9).

Na camada granulosa também podemos observar que em ambas regiões, lesional e perilesional, o padrão de favo de mel apresenta irregularidades pois os queratinócitos não se apresentam com tamanho e forma homogênea poligonais, o que indica fotoenvelhecimento (Figura 10).

Figura 10. Imagens da camada granulosa por microscopia confocal de reflectância da região malar da face - lesional e perilesional- de uma participante do estudo.

Na figura 11, podem ser observados melanóforos na derme papilar, que se apresentam como células de maior diâmetro em relação aos queratinócitos hiperplásicos

com alta reflectância, que podem ser observados nessa região devido a rompimento da membrana basal, possivelmente consequente de fotodano e ativação da cascata inflamatória.

Figura 11. Imagem da junção dérmica-epidérmica por Microscopia Confocal de Reflectância da região malar lesional de uma participante do estudo. Setas indicando melanóforos.

6.5. Índice de Gravidade e Área do Melasma modificado (mMASI) e técnicas de biofísica de análise do melasma e da pele

A análise estatística da amostra de dados basais do mMASI resultou em grande variação interindividual, porém a análise de variância dos valores basais indicou não haver diferença estatística entre os grupos ($p=0,165$).

Os valores de mMASI de cada tratamento demonstra que todos os grupos tiveram redução na gravidade do melasma. Porém, como o decaimento ocorreu de forma homogênea entre os grupos, não houve diferença significativa na análise de variância ao comparar aqueles que receberam o extrato de oliva e o grupo controle nos tempos subsequentes de 30 ($p=0,186$), 60 ($p=0,129$) e 90 dias ($p=0,119$).

Ainda assim, o grupo oral foi o que apresentou maior redução do mMASI, aproximadamente 22% dos 90 dias em comparação ao basal. O grupo controle apresentou menor redução (11%) em relação aos outros grupos oral e oral e tópico, ambos com redução de 15% no mMASI.

Pela análise de variância pareada por tempo intragrupo (ANOVA RM), verificamos que o grupo oral e o grupo tópico individualmente apresentaram redução

significativa no mMASI quando os valores basais foram comparados com os tempos de 60 e 90 dias ($p<0,001$).

Figura 12. mMASI entre os grupos em estudo nos tempos avaliados - inicial (T0), 30 (T30), 60 (T60) e 90 (T90) dias, em média e IC95%.

As imagens de alta resolução obtidas por meio do equipamento Visioface® permitiram a padronização de posição e intensidade luminosa para a análise da gravidade do melasma pelo mMASI.

A representação dos resultados de uma participante de cada grupo pode ser observados nas Figuras 13 (grupo tópico), 14 (grupo oral), 15 (grupo controle) e 16 (grupo tópico e oral).

Figura 13. Fotografia em alta resolução demonstrando resultado de participante do grupo tópico no tempo inicial (A) e após 60 dias (B).

Figura 14. Fotografia em alta resolução demonstrando o resultado de participante do grupo oral no tempo inicial (A) e após 90 dias (B).

Figura 15. Fotografia em alta resolução demonstrando resultado de participante do grupo controle no tempo inicial (A) e após 60 dias (B).

Figura 16. Fotografia em alta resolução demonstrando resultado de participante do grupo oral e tópico (contendo extrato de oliva em ambos) no tempo inicial (A) e após 90 dias (B).

Pelos valores basais de luminosidade da região lesional, a análise das variâncias das medidas de pigmentação entre os grupos em cada tempo não apresentaram diferença significativa.

A análise de luminosidade da região lesional entre os grupos nos tempos avaliados (Figura 17) permitem verificar que o grupo controle no tempo de 30 dias sofreu uma redução. Porém, este retorna a uma luminosidade próxima a basal a partir dos 60 dias. Os grupos tópico, oral e tópico e oral apresentaram leve clareamento observado pelo aumento da luminosidade. Ainda assim, pela análise de variância entre os grupos a cada tempo, nenhum tratamento apresentou diferença significativa em relação ao controle. Os mesmos resultados foram obtidos quando analisadas as variâncias de forma pareada entre os tempos de cada grupo (intragrupo), deste modo avaliando os tratamentos individualmente.

Figura 17. Luminosidade da região lesional entre os grupos em estudo nos tempos avaliados – inicial (T0), 30 (T30), 60 (T60) e 90 (T90) dias, em média e IC95%.

Pela análise das variâncias das medidas de melanina na região lesional no tempo basal não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,831$).

As medidas de melanina na região lesional permitem verificar que assim como os resultados do mMASI, o grupo oral apresentou a maior redução da pigmentação em relação aos outros grupos, principalmente no tempo de 60 dias. Porém, não houve diferença significativa entre os grupos de tratamento comparados ao controle nos tempos 30 ($p=0,962$), 60 ($p=0,376$) e 90 dias ($p=0,838$) (Figura 18).

Por outro lado, pelas análises de variância pareadas por tempo intragrupo verificamos que o grupo oral apresenta diferença significativa quando o tempo basal foi comparado com o de 60 dias ($p=0,0466$).

Figura 18. Medidas de melanina na região lesional entre os grupos em estudo nos tempos avaliados – inicial (T0), 30 (T30), 60 (T60) e 90 (T90) dias, em média e IC95%.

Pela Figura 19, observamos que a diferença das medidas de melanina e luminosidade entre a região lesional e perilesional do melasma apresentam resultados semelhantes. Ambos mostram que o grupo controle apresentou decrescente diferença da pigmentação entre as regiões lesional e perilesional, tanto na luminosidade como na medida de melanina, em relação aos outros grupos.

Pela alta variabilidade dos dados em ambas variáveis, a análise de variância não encontrou diferenças significativas nos grupos de tratamento em comparação com o controle no tempo basal, assim como nos subsequentes avaliados ($p>0,05$).

Figura 19. Diferença das medidas de melanina e de luminosidade entre a região lesional e perilesional entre os grupos nos tempos avaliados – inicial (T0), 30 (T30), 60 (T60) e 90 (T90) dias, em média e IC95%.

Como o envolvimento da maior vascularização da região lesional é bem estabelecido em relação à região perilesional, as medidas de eritema na região lesional foram comparadas entre o tempo inicial e final em todos os tratamentos.

Os valores basais da medida de eritema não apresentaram diferença significativa na análise de variância entre os grupos.

Assim como os resultados do mMASI e mexameter na região lesional, é possível verificar uma maior redução do eritema no grupo recebendo o tratamento oral em relação aos outros. Apesar disso, não apresentou diferença significativa pela análise de variâncias entre os grupos de tratamento comparados com o controle nos tempos basal e 90 dias (Figura 20).

Figura 20. Medidas de eritema na região lesional entre os grupos em estudo no tempo inicial (T0) e final (T90), em média e IC95%.

Apesar de grande intravariabilidade, a redução do eritema foi bem pronunciada em algumas participantes do grupo oral, como pode ser visualizado na Figura 21.

Figura 21. Imagem em alta resolução comparando tempo inicial (basal - A) e o final (T90 dias - B) de duas participante do grupo oral - contendo o extrato de oliva.

A verificação dos parâmetros de hidratação e integridade da epiderme foram realizadas pelas técnicas de biofísica por medidas no estrato córneo e demonstraram a manutenção de ambos parâmetros, sem diferença estatística (Figuras 22 e 23).

Figura 22. Hidratação da camada córnea da região malar entre os grupos em estudo no tempo inicial (T0), 30 (T30), 60 (T60) e 90 (T90) dias, em média e IC95%.

Figura 23. Perda transepidermica de água da região malar entre os grupos em estudo no tempo inicial (T0), 30 (T30), 60 (T60) e 90 (T90) dias, em média e IC95%.

6.6. Percepção de eficácia

Pela avaliação da percepção de eficácia podemos verificar que todos os grupos apresentaram evidente sensação de hidratação e redução das manchas de modo similar. Os outros parâmetros avaliados foram variáveis e não apresentam grandes evidências (Figura 19).

O questionário de percepção de eficácia também verificou a segurança dos tratamentos oferecidos, sendo que não houve nenhuma ocorrência de efeitos adversos como vermelhidão, coceira ou descamação da pele do rosto com as aplicações tópicas,

assim como náuseas ou outros efeitos gastrointestinais frequentemente associados ao uso oral.

A intenção de compra foi bem homogênea entre os grupos, sendo que 88% do total de participantes indicou que adquiriria os produtos utilizados: no grupo tópico e o grupo controle 10 participantes indicaram a intenção de compra, enquanto nos grupos tópico e oral e no grupo oral foram 9 participantes.

Figura 24. Percepção de eficácia entre os grupos ao final das avaliações clínicas (n=43).

7. DISCUSSÃO

O melasma é uma das hiperpigmentações adquiridas mais comuns que afetam a face (HANDEL et al., 2014). Apesar de ser assintomático, causa grande prejuízo psicossocial e emocional (IKINO et al., 2015). Assim, o melasma apresenta grande demanda terapêutica, sendo considerado uma das principais queixas em consultórios dermatológicos no Brasil (LUPU et al., 2010).

Além disso, ainda não há uma terapia realmente eficaz para o tratamento do melasma e que previna as frequentes recidivas, considerando que sua etiopatogenia é multifatorial e os de alta complexidade (JUTLEY et al., 2014; PASSERON & PICARDO, 2018).

Portanto, estudos visando possíveis substâncias ativas para auxiliar no tratamento do melasma que não apresentem efeitos adversos apresentam grande demanda.

Por ser uma doença de mecanismo heterogêneo, as terapias para o melasma devem conter mais do que apenas um agente despigmentante e também devem apresentar uma

abordagem anti-idade e anti-inflamatória (KWON et al, 2016; PASSERON & PICARDO, 2018).

Assim, o hidroxitirosol é um princípio ativo que pode além de inibir a tirosinase (CHANG, 2009; LEE, BAEK & NAM, 2015), ainda pode atuar no suporte à restauração da membrana basal (TORRES-ALVARES et al, 2011), atenuar a ação das citocinas e outros fatores inflamatórios (ZHANG, CAO & ZHONG, 2009) e ainda exercer potente atividade antioxidante (ZWANE et al, 2012; ROBLES-ALMAZAN et al., 2108). Portanto, este apresenta grande potencial como tratamento alternativo ou adjuntivo de longo prazo para o melasma.

Nesse contexto, o extrato de oliva com concentração padronizada de hidroxitirosol foi selecionado no presente estudo para avaliar a sua eficácia clínica em tratamentos orais e tópicos para o melasma.

O desenvolvimento da formulação tópica utilizada no estudo clínico foi realizado visando a obtenção de um gel-creme estável, com baixa oleosidade e sensorial agradável às participantes, e desse modo aumentar a adesão ao tratamento tópico. Assim, testes de estabilidade e análise sensorial foram usadas como ferramentas para escolher a melhor formulação tópica para a etapa clínica.

A compatibilidade físico-química entre os ingredientes foi estudada e nenhuma incompatibilidade foi encontrada para a formulação do gel-creme tópico.

As matérias primas selecionadas para as formulações tópicas veículo variaram principalmente em relação aos emolientes, as quais foram usados inicialmente em duas combinações: a vaselina e o miristato de isopropila devido a característica inerte e de alta espalhabilidade da vaselina, e evidências de que o miristato de isopropila promove um aumento da penetração cutânea de fármacos (LANE, 2013). Porém foram substituídos por triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico e benzoato de alquila C12-C15, os quais apresentam menor oclusão e toque mais seco, mais adequados à aplicação na pele da face (CORREA, 2012).

Na etapa de desenvolvimento das formulações houve troca do umectante propilenoglicol para butilenoglicol por este último ser descrito como menos irritante para a pele (ROWE et al., 2006).

Ainda, foram avaliados três tipos de emulsionantes e quatro tipos de polímeros espessantes resultando em formulações homogêneas e compatíveis às finalidades propostas, que foram submetidas aos testes preliminares de estabilidade.

Nos testes preliminares de estabilidade, as formulações F1, F2, F3, F4 e F6 foram instáveis sob centrifugação, apresentando separação de fases provavelmente por apresentar um desequilíbrio hidrofílico lipofílico dos componentes da fórmula em relação a concentração dos emulsionantes usados. O polímero usado na formulação F10 não a espessou e nem estabilizou, assim apresentou instabilidade.

Assim, os testes preliminares de estabilidade permitiram selecionar seis formulações estáveis para a etapa de análise sensorial.

A análise sensorial permitiu prever a aceitação sensorial do produto de aplicação tópica com base em parâmetros sensoriais negativos como oleosidade e resíduo branco, e positivos como a sensação de hidratação. Ainda, os participantes demarcaram a formulação que mais lhes agradaram sensorialmente, favorecendo a aderência terapêutica nos estudos clínicos.

Pela análise sensorial foi possível verificar que altas concentrações de emolientes não estão relacionadas com a sensação de oleosidade na pele, como já reportado anteriormente em estudos de análise sensorial de Parente, Gámbaro e Ares (2007), já que a formulação mais indicada (F8) possuía a maior concentração de emolientes em relação às outras.

Esse resultado pode estar relacionado com a maior quantidade de triglicérides de ácido cáprico caprílico e benzoato de alquila, ambos hidrocarbonetos de baixo peso molecular. Há uma relação direta entre o tamanho da molécula lipídica e sua viscosidade: quanto menor a molécula lipídica, menor sua viscosidade e assim a sensação de espalhabilidade e oleosidade na pele são afetadas de forma positiva.

Na análise sensorial, a formulação F8 apresentou os melhores parâmetros sensoriais como sensação de hidratação e de baixa oleosidade, e assim, foi selecionada para a etapa clínica. Porém, sua aplicação só poderia ocorrer após confirmação da estabilidade pelo tempo estabelecido no protocolo clínico, de 3 meses, não somente da formulação veículo, mas contendo o princípio ativo objeto de estudo, o extrato de oliva.

No teste de estabilidade em longo prazo, a formulação tópica F8, acrescida ou não do extrato de oliva, foi considerada estável em condições ideais de armazenamento para aplicação na etapa clínica, uma vez que as formulações estocadas à temperatura ambiente e 37°C por 3 meses não sofreram alterações organolépticas e de pH significativas (POPE, 1980; WATERMAN & ADAMI, 2005).

Concomitantemente, a análise de qualidade da matéria prima foi realizada pelo ensaio da atividade antioxidante do extrato hidroglicólico contendo o hidroxitirosol a 20% para a aplicação tópica.

Considerando que a hiperativação da melanogênese envolve reações pró-oxidativas de alta intensidade energética (NATARAJAN et al., 2014) e do envolvimento dos radicais livres de oxigênio e nitrogênio no melasma (JO et al., 2009), a confirmação do potencial antioxidante da matéria prima em estudo permitiu analisar o potencial para o controle do melasma.

Em estudo realizado por Fki e colaboradores (2005), a atividade de sequestro radicalar do DPPH com uma amostra de hidroxitirosol puro foi avaliada, resultando em uma IC₅₀ de 0,57 µg/ml, superior à do BHT e a todos os compostos fenólicos analisados, incluindo o ácido cafeico, ácido ferrúlico. O valor de IC₅₀ obtido pelo extrato de oliva usado como princípio ativo no estudo foi de 599,5 µg/ml, um valor em até mil vezes à essa referência, que não pode ser atribuído à concentração padronizada de 20% de hidroxitirosol indicada pelo distribuidor da matéria-prima. Portanto, este resultado pode indicar erro experimental ou má qualidade da matéria prima do distribuidor.

A menor concentração da IC₅₀ do método da quimioluminescência em comparação com o do DPPH pode ser explicado pelo seu mecanismo indireto de formação radicalar pela ação da enzima sobre o peróxido de hidrogênio. Além da potente atividade antioxidante do extrato de oliva na redução da luminescência, o hidroxitirosol tem uma estrutura fenólica capaz de inibir a ação da peroxidase *horseadish* (DIAZ, SACHEZ & GARCIA, 1998). Portanto, a atividade antioxidante pelo método da luminescência não é o parâmetro ideal para avaliar amostras contendo o hidroxitirosol.

Confirmada a estabilidade das formulações contendo ou não o extrato de oliva no período de 3 meses, os estudos clínicos foram conduzidos para a avaliação da eficácia *in vivo* deste.

O delineamento adequado do protocolo experimental é importante para a comparabilidade entre a eficácia de diferentes tratamentos. De acordo com a revisão sistemática Cochrane sobre os tratamentos disponíveis para melasma, vários estudos clínicos selecionados foram descartados da revisão por serem mal conduzidos (JUTLEY et al., 2014).

Assim, o delineamento experimental deste estudo seguiu os critérios da Academia de Desordens Pigmentares (PANDYA et al., 2006) e o guia de Padrões Consolidados em Relatos de Ensaio, em tradução livre, *Consolidated Standards of Reporting Trials – CONSORT* (SCHULZ, ALTMAN & MOHER, 2010).

De acordo com os *guidelines* sugeridos aos estudos clínicos em melasma (PANDYA et al., 2006), inicialmente, deve-se realizar o diagnóstico diferencial de hiperpigmentações, portanto todas as participantes foram analisadas por foto e foram analisadas através das entrevistadas com a dermatologista Profa. Dra. Ediléia Bagatin para o recrutamento adequado e exclusão de participantes.

As entrevistas semi-estruturadas permitiram confirmar algumas características relacionadas aos fatores de risco e desenvolvimento do melasma como descrito anteriormente por Handel *et al.* (2014) e Tamega *et al.* (2014). Assim como descrito nestes estudos, a partir das informações fornecidas pelas participantes podemos verificar o caráter crônico do melasma pelo extenso tempo no qual a maioria das voluntárias apresentava as hiperpigmentações. Além disso, também pode se correlacionar o grande envolvimento de alterações hormonais, como gravidez e terapias hormonais (anticoncepcional, repositiva ou progestacional), e da radiação solar como desencadeantes da doença na população de estudo.

Pelas descrições da intensidade da exposição solar informada, verificou-se que houve redução da exposição solar com a idade. Além disso, grande parte das participantes informou que passaram a evitar a exposição solar e ter o hábito de aplicar o filtro solar diariamente somente a partir do início do aparecimento da hiperpigmentação.

A alta procura por alternativas terapêuticas pode ser observada pela procura pelo estudo, já que mais de 240 contatos telefônicos foram recebidos em apenas 2 semanas.

O número de consultas dermatológicas anteriormente realizadas reportado pelas participantes também evidenciou a grande busca por tratamento para as hiperpigmentações como reportado por Lupi *et al.* (2010), provavelmente relacionado também ao impacto psicológico. Destaca-se o efeito positivo desta busca ao dermatologista para o desenvolvimento de hábito de fotoproteção diária e consciência dos efeitos negativos da radiação solar pelas participantes.

Houve casos de desistência semelhantes nos grupos em estudo, a maioria anteriormente à possibilidade de verificação de qualquer efeito na pele a médio prazo,

uma vez que de acordo com Pandya e colaboradores (2006), são necessários, no mínimo, 56 dias para a percepção de qualquer efeito na pele.

É possível que essas desistências tenham ocorrido justamente pela falta de resultados mais rápidos dos tratamentos, como costuma ser observado no tratamento do melasma. A cada nova proposta terapêutica as pacientes esperam resultados melhores e mais rápidos do que os já experimentados e abandonam o tratamento quando suas expectativas não são atingidas.

Em seguida, as características morfológicas do melasma tais como a presença de melanófagos na junção dérmica-epidérmica, queratinócitos hiperplásicos com alta reflectância nas camadas granulosa e basal, foram observadas pela microscopia confocal de reflectância, e estão de acordo com os achados de Pellacani *et al.* (2008) e Kang *et al.* (2010), indicando elevada deposição de melanina na região lesional comparada com a perilesional.

Assim como indicado por Kwon *et al.* (2016) e Picardo e Passeron (2018), muitas características observadas pela microscopia confocal confirmam a presença de fotoenvelhecimento principalmente na região lesional do melasma. No presente estudo foram observados: irregularidades do padrão favo de mel indicam a variação no tamanho e forma poligonal dos queratinócitos na camada granulosa; desfiguração e achatamento dos anéis circundando a derme papilar na camada basal; e a presença de melanófagos na derme e junção dérmica-epidérmica que evidencia comprometimento da membrana basal.

A partir da análise das características morfológicas do melasma em algumas voluntárias, o estudo clínico foi conduzido para avaliar a eficácia do extrato de oliva. Além da análise clínica subjetiva do pesquisador através do escore da mancha realizado pelo mMASI, a aplicação de técnicas de biofísica com os equipamentos Mexameter® e Colorimeter® são fundamentais para a verificação objetiva de despigmentação da área lesional (PANDYA *et al.*, 2006).

A região zigomática foi a região escolhida para análise do melasma por ser a mais comum hiperpigmentada de acordo com os estudos de Hexsel e colaboradores (2014).

Como o tamanho amostral da etapa clínica não foi previamente determinado, o protocolo experimental pode se classificar como um estudo piloto, importante para a obtenção de dados preliminares a eficácia de tratamentos inovadores e alternativos.

A alta variabilidade interindividual é característica dos padrões de pigmentação do melasma, gerando imprevisibilidade da resposta individual aos tratamentos e frequente

alta variabilidade na distribuição amostral dos resultados de análise objetivas (MENDONZA et al., 2014; FARSHI et al., 2015; DEL ROSARIO et al., 2018). Esta variabilidade foi observada em todas as análises objetivas para avaliar a eficácia do tratamento em estudo. Uma maior população de estudo com uma seleção da gravidade do melasma mais próxima entre as voluntárias poderia reduzir a variabilidade observada.

Mesmo assim, a análise de variâncias no tempo basal de cada variável quantitativa para a análise do melasma, como o mMASI, luminosidade, quantidade de melanina e eritema, permitiu verificar que as diferenças entre as medidas médias e de dispersão de cada grupo de intervenção não são significativamente diferentes, sendo assim, comparáveis nos tempos subsequentes de análise.

O mMASI permitiu o cálculo do Índice de Gravidade e Área do Melasma modificado, medida amplamente utilizada em estudos clínicos para a quantificação do melasma subjetiva ao pesquisador. Este foi realizado por meio das fotos de alta resolução feitas no equipamento Visioface Quick®, que permitiu padronizar a posição e intensidade de luz para avaliação do melasma em cada avaliação.

Os resultados do mMASI demonstraram que ocorreu redução na gravidade do melasma em todos os grupos, porém o grupo das participantes que recebeu o tratamento oral apresentou uma maior redução em comparação aos outros tratamentos. Pela análise de variância não houve diferença significativa dos grupos que receberam o extrato de oliva em comparação com o grupo controle a cada tempo avaliado.

Em estudo feito por Farshi (2011), o MASI foi o principal parâmetro usado para avaliar a redução do melasma em um tratamento comparando a hidroquinona a 4% com o ácido azeláico a 20% por 2 meses. O grupo que recebeu a hidroquinona obteve redução do MASI em 14% em comparação com o grupo do ácido azeláico, que teve redução significativa de 50%. Assim os resultados obtidos neste estudo clínico na avaliação do mMASI dos tratamentos contendo extrato de oliva não estão obstatos daqueles observados pela hidroquinona no estudo de Farshi (2011).

Por outro lado, quando cada grupo foi analisado de forma pareada em relação ao tempo, como realizado em protocolos clínicos de braço único (single arm), o grupo tópico e o grupo oral tiveram melhora significativa nos tempos de 60 e 90 dias em comparação com os valores basais. Apesar disso, este tipo de análise tem menor nível de evidência em relação ao estudo clínico com análise estatística dos grupos de tratamento comparados com o controle.

É importante ressaltar que não houve, em geral, redução dos escores atribuídos à área do melasma, que é um dos parâmetros para o cálculo do mMASI. Assim somente a redução da intensidade de pigmentação, a outra variável para o cálculo do escore, foi observada nas participantes, o que pode indicar que houve certa redução da melanogênese nas participantes em geral.

Pelos valores obtidos nas medidas efetuadas como o Colorimeter® verificou-se que o parâmetro utilizado, a luminosidade, apresentou alta variabilidade. Nesta, analisada na região lesional, foi observado um leve clareamento em todos os grupos que receberam o extrato de oliva, principalmente do grupo oral. Por outro lado, o grupo controle apresentou um escurecimento inicial no tempo de 30 dias, que nas avaliações seguintes retornou aos valores basais. Assim, a análise da luminosidade na região lesional do melasma não permitiu a confirmação de um efeito despigmentante significativo para o melasma nos grupos e tempos avaliados.

Os valores da medida de melanina na região lesional no tempo basal e nas avaliações seguintes também não obtiveram diferenças significativas entre os grupos que receberam o extrato de oliva em relação ao grupo controle.

Por outro lado, na análise de variância intragrupo pareada por tempo para verificar a resposta individual de cada tratamento realizado, novamente como um estudo *single-arm*, o grupo oral apresentou uma melhora significativa na redução da quantidade de melanina na região lesional.

Assim, as medidas de melanina na região lesional mostraram o melhor resultado para o tratamento oral em relação aos outros grupos, mesmo que não significativo, o qual corrobora com os resultados do mMASI.

Ainda assim, pela análise do eritema, relacionado à maior presença vascular na região lesional característica do melasma (NA et al, 2013), também é possível observar que há maior redução deste parâmetro no grupo de tratamento oral ao final dos 90 dias de tratamento em comparação com os outros grupos. Este efeito observado pode ter sido resultado da grande atividade anti-inflamatória do hidroxitirosol, que atenua as citocinas pró-inflamatórias e a sintase induzida de óxido nítrico (iNOS) (Zang, Cao & Zhong, 2009), envolvidos com o aumento do componente vascular na pele lesional (NA et al, 2013). Por outro lado, não houve diferenças significativas entre os grupos em relação ao placebo em ambos tempos.

Pela diferença das análises biofísicas de luminosidade e medida de melanina entre as regiões lesional e perilesional do melasma, observamos que a região não lesional

influencia na análise de eficácia dos tratamentos pois também está sujeita ao efeito despigmentante.

No caso, o grupo que apresentou menor diferença entre a área pigmentada e a perilesional, ou seja, maior homogeneidade ao longo do tempo de estudo, foi o grupo controle. Ainda assim, os tratamentos não reduziram significativamente a diferença de luminosidade ou de melanina entre as regiões nos tempos avaliados.

Os resultados obtidos de avaliação do melasma nos grupos contendo o extrato de oliva em comparação com o controle indicam que a biodisponibilidade do hidroxitirosol na camada basal da epiderme, onde a melanogênese ocorre predominantemente, pode não ter sido o suficiente para exercer a inibição da tirosinase tanto na via tópica quanto na oral. Os extratos de oliva usado no estudo apresentavam concentrações de hidroxitirosol de 3% no tratamento oral, e de 20% no tratamento tópico. Ainda assim, a concentração máxima de extrato de oliva recomendada por seu distribuidor foi a utilizada, com 1% aplicado na formulação tópica.

Alonso *et al.* (2015) mostrou que o perfil de absorção epidérmica *in vitro* do hidroxitirosol apresenta baixa penetração através do estrato córneo e ainda reduzida permeação até a camada dérmica, o que pode ser melhorado pela conversão do hidroxitirosol em derivados esterificados com maior lipofilicidade.

Ainda, apesar de o hidroxitirosol apresentar grande distribuição a todos os tecidos, a biodisponibilidade por via oral é também pobre. Somente 2% da forma livre de composto pode ser encontrada no plasma após a ingestão (ROBLES-ALMAZAN *et al.*, 2018).

Por outro lado, o efeito despigmentante mais pronunciado no tratamento oral em relação ao tópico sugere uma maior biodisponibilidade na camada basal por via oral em relação à penetração cutânea através da formulação tópica desenvolvida.

Assim, outros estudos clínicos com maiores concentrações padronizadas de hidroxitirosol, como as usadas nos tratamentos com despigmentantes bem-conceituados, pode apresentar um efeito significativo no tratamento do melasma e outras hiperpigmentações.

A análise do conteúdo aquoso do estrato córneo e da integridade da barreira cutânea, pelos equipamentos Corneometer® Tewameter®, respectivamente, permitiram verificar a manutenção das condições gerais da pele, resultado positivo esperado pela composição emulsionante e umectante selecionada no desenvolvimento da formulação

veículo tópica desenvolvida. O tratamento oral não apresentou influência significativa nas referidas medidas.

Adicionalmente, a percepção de eficácia pelas participantes ao longo do estudo mostrou boa aceitação dos tratamentos. Os efeitos clínicos avaliados na percepção da eficácia permitiram verificar homogeneidade das respostas entre os grupos, incluindo o controle, com destaque para a redução das manchas e hidratação da pele. Deste modo, os resultados obtidos nas análises objetivas corroboram com a percepção da eficácia das voluntárias, ao qual foi observado clareamento modesto em todos os grupos, incluindo o controle. Assim, os resultados observados podem estar associados ao efeito placebo e maiores cuidados com a pele pelas orientações fornecidas durante a pesquisa, como sobre a importância da fotoproteção.

Nenhum efeito adverso foi reportado demonstrando que o extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol é seguro nas concentrações usadas nos tratamentos tópicos e orais descritos, o que está de acordo com Aunon-Calles e colaboradores (2013).

De acordo com a revisão toxicológica de Robles-Almazan (2018), um aumento na concentração do hidroxitirosol, tanto por via oral ou tópico, é seguro. Assim, o extrato de oliva com uma maior concentração padronizada de hidroxitirosol por via oral apresenta potencial como terapia coadjuvante aos tratamentos clássicos do melasma.

Em síntese, os estudos de caracterização por análise de imagem foram importantes para a análise morfológica do melasma. Além disso, o delineamento experimental bem definido permitiu verificar que, considerando a alta variabilidade interindividual característica do melasma, não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo controle e os que receberam o extrato de oliva com concentração padronizada de hidroxitirosol nos tratamentos oral e tópico para o controle do melasma.

Por fim, estudos desta natureza são de fundamental importância para a caracterização do melasma e para a avaliação da eficácia de tratamentos já comercializados a partir de protocolo clínico bem delineado.

8. CONCLUSÕES

A formulações desenvolvidas foram consideradas estáveis nos estudos de estabilidade física, com exceção das formulações que apresentaram desequilíbrio hidrofílico lipofílico em relação a concentração de emulsionante usados.

A formulação F8 a base de carbômero, mistura de emulsionantes não-iônicos e emolientes de baixo peso molecular foi selecionada para a etapa clínica de avaliação de eficácia do uso tópico do extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol por apresentar sensorial mais adequado às finalidades propostas e ser estável em condições ideais de armazenamento.

O extrato de oliva com concentração de hidroxitirosol indicada a 20% destinado para aplicação tópica apresentou baixa atividade antioxidante pela inibição direta de formação radicalar.

A microscopia confocal de reflectância foi de grande valia para a caracterização do melasma, permitindo verificar grande deposição de melanina na região lesional e a presença de características comuns do fotoenvelhecimento.

Não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo controle e os que continham o extrato de oliva com concentração padronizada de hidroxitirosol nos tratamentos oral e tópico para o controle do melasma.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-CASINTAHAN, M. F. LIM, H. G. Topical Agents in Melasma. In: **Melasma and Vitiligo in Brown Skin**. Springer, New Delhi, 2017. p. 93-101.

ALONSO, Cristina et al. Skin delivery of antioxidant surfactants based on gallic acid and hydroxytyrosol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 7, p. 900-908, 2015.

ANDEL, Ana Carolina; MIOT, Luciane Donida Bartoli; MIOT, Hélio Amante. Melasma: a clinical and epidemiological review. *Anais brasileiros de dermatologia*, v. 89, n. 5, p. 771-782, 2014.

ANDRADE, J. P.; MERCÚRIO, D. G.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Avaliação celular das estruturas cutâneas por meio da Microscopia Confocal de Reflectância. **RBM: Revista Brasileira de Medicina**, v. 72, p. 4-13, 2015.

AUNON-CALLES, D. CANUT, L., VISIOLI, F. Toxicological evaluation of pure hydroxytyrosol. **Food and Chemical Toxicology**, v.55, p.498–504, 2013.

BALKRISHNAN, R. et al. Development and validation of a health-related quality of life instrument for women with melasma. **British Journal of Dermatology**, v. 149, n. 3, p. 572-577, 2003.

BERNINI et al. Hydroxytyrosol-derived compounds: A basis for the creation of new pharmacological agents for cancer prevention and therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 23, p. 9089–9107, 2015.

BELLOSTA et al. Mediterranean diet and cardioprotection: wild artichoke inhibits metalloproteinase 9. **Molecular nutrition & food research**, v. 52, n. 10, p. 1147-1152, 2008.

BRIANEZI, G. et al. Changes in nuclear morphology and chromatin texture of basal keratinocytes in melasma. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 29, n. 4, p. 809-812, 2015.

BOGANI et al. Thiol supplementation inhibits metalloproteinase activity independent of glutathione status. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 363, n. 3, p. 651-655, 2007.

CESTARI, T. F. et al. Validation of a melasma quality of life questionnaire for Brazilian Portuguese language: the MelasQoL-BP study and improvement of QoL of melasma patients after triple combination therapy. **British Journal of Dermatology**, v. 156, n. s1, p. 13-20, 2006.

CESTARI, T. PERUZZO, J. GIONGO, N. Definition, incidence, and etiology of melasma in brown skin. In: **Melasma and Vitiligo in Brown Skin**. Springer, New Delhi, 2017. p. 13-19.

CHANG, T.S. An updated review of tyrosinase inhibitors. **International journal of molecular sciences**, v. 10, n. 6, p. 2440-2475, 2009.

CHUAH, S. Y. THNG, T. G. Diagnosis of Melasma in Brown Skin: Wood's Lamp, Dermoscopy, and Confocal Microscopy. In: **Melasma and Vitiligo in Brown Skin**. Springer, New Delhi, 2017. p. 41-49.

COVAS, M. I. DE LA TORRE, R. FITÓ, M. Virgin olive oil: a key food for cardiovascular risk protection. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. S2, p. S19-S28, 2015.

DAL'BELO, Susi Elaine; RIGO GASPAR, Lorena; BERARDO GONÇALVES MAIA CAMPOS, Patrícia Maria. Moisturizing effect of cosmetic formulations containing Aloe vera extract in different concentrations assessed by skin bioengineering techniques. **Skin Research and Technology**, v. 12, n. 4, p. 241-246, 2006.

D'ANGELO, S. et al. Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 7, p. 908-919, 2005.

DEL ROSARIO, E. et al. Randomized, placebo-controlled, double-blind study of oral tranexamic acid in the treatment of moderate-to-severe melasma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 78, n. 2, p. 363-369, 2018.

DIAZ, A. Navas; SANCHEZ, F. Garcia; GONZÁLEZ GARCIA, J. A. Phenol derivatives as enhancers and inhibitors of luminol-H₂O₂-horseradish peroxidase chemiluminescence. **Luminescence**, v. 13, n. 2, p. 75-84, 1998.

DURÃES, S. M. B.; FONSECA, R. R.; ISSA, Maria Claudia Almeida. Approach in Photodamaged Skin, Melasma, Acne, and Rosacea. **Daily Routine in Cosmetic Dermatology**, p. 1-34, 2016.

DURÃES, Sandra Maria Barbosa; FONSECA, Rosa Rabello; ISSA, Maria Claudia Almeida. Approach in Photodamaged Skin, Melasma, Acne, and Rosacea. **Daily Routine in Cosmetic Dermatology**, p. 67-99, 2017.

ESPINAL-PEREZ, L. E. MONCADA, B. CASTANEDO-CAZARES, J.P. A double-blind randomized trial of 5% ascorbic acid vs. 4% hydroquinone in melasma. **International journal of dermatology**, v. 43, n. 8, p. 604-607, 2004.

FALÉ, P. L. et al. Rosmarinic acid, scutellarein 4'-methyl ether 7-O-glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus*. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 798-805, 2009.

FARSHI, S. Comparative study of therapeutic effects of 20% azelaic acid and hydroquinone 4% cream in the treatment of melasma. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 10, n. 4, p. 282-287, 2011.

FARSHI, S. MANSOURI, P. KASRAEE, B. Efficacy of cysteamine cream in the treatment of epidermal melasma, evaluating by Dermacatch as a new measurement

method: A randomized double blind placebo controlled study. **Journal of Dermatological Treatment**, p. 1-8, 2017.

FKI, I. ALLOUCHE, N. SAYADI, S. The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3, 4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 93, n. 2, p. 197-204, 2005.

GRANADOS-PRINCIPAL, Sergio et al. Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutrition reviews*, v. 68, n. 4, p. 191-206, 2010.

GRIMES PE. Melasma: etiologic and therapeutic considerations. **Archives of Dermatology**, v. 131, p. 1453-7, 1995.

GRIMES, P. E.; YAMADA, N.; BHAWAN, J. Light microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural alterations in patients with melasma. **The American journal of dermatopathology**, v. 27, n. 2, p. 96-101, 2005.

GUARATINI, T. GIANETI, M. D. CAMPOS, PMBGM. Stability of cosmetic formulations containing esters of Vitamins E and A: chemical and physical aspects. **International journal of pharmaceutics**, v. 327, n. 1-2, p. 12-16, 2006.

GUO, Wei et al. The protective effects of hydroxytyrosol against UVB-induced DNA damage in HaCaT cells. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 3, p. 352-359, 2010.

HABIF, T. P. **Clinical Dermatology E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2015.

HANDEL, Ana Carolina; MIOT, Luciane Donida Bartoli; MIOT, Hélio Amante. Melasma: a clinical and epidemiological review. *Anais brasileiros de dermatologia*, v. 89, n. 5, p. 771-782, 2014.

HARUMI, O. GOH, C. L. The effect of melasma on the quality of life in a sample of women living in Singapore. **The Journal of clinical and aesthetic dermatology**, v. 9, n. 1, p. 21, 2016.

HEARING, V. J. Determination of melanin synthetic pathways. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, p. E8-E11, 2011.

HERNÁNDEZ-BARRERA, R. et al. Solar elastosis and presence of mast cells as key features in the pathogenesis of melasma. *Clinical and Experimental Dermatology: Continuing professional development (CPD)*, v. 33, n. 3, p. 305-308, 2008.

HEXSEL, D. et al. Epidemiology of melasma in Brazilian patients: a multicenter study. **International journal of dermatology**, v. 53, n. 4, p. 440-444, 2014.

HU, T. et al. Hydroxytyrosol and its potential therapeutic effects. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 7, p. 1449-1455, 2014.

IKINO, J.K. et al. Melasma and assessment of the quality of life in Brazilian women. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 90, n. 2, p. 196-200, 2015.

ISAAC, V. L. B. et al. Análise sensorial como ferramenta útil no desenvolvimento de cosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 479-488, 2013.

ISHIY, P. S. et al. Skin diseases reported by workers from UNESP campus at Rubiao Jr, Botucatu-SP (Brazil). **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, n. 3, p. 529-531, 2014.

JO, Ho-Youn et al. Co-localization of inducible nitric oxide synthase and phosphorylated Akt in the lesional skins of patients with melasma. *The Journal of dermatology*, v. 36, n. 1, p. 10-16, 2009.

JUTLEY, Gurpreet Singh et al. Systematic review of randomized controlled trials on interventions for melasma: an abridged Cochrane review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 70, n. 2, p. 369-373, 2014.

KANG, H. Y. et al. Transcriptional Profiling Shows Altered Expression of Wnt Pathway– and Lipid Metabolism–Related Genes as Well as Melanogenesis–Related Genes in Melasma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 8, p. 1692-1700, 2011.

KANG, Hee Young; ORTONNE, Jean-Paul. What should be considered in treatment of melasma. *Annals of dermatology*, v. 22, n. 4, p. 373-378, 2010.

KARN, D. et al. Oral tranexamic acid for the treatment of melasma. **Kathmandu University Medical Journal**, v. 10, n. 4, p. 40-43, 2014.

KHAN, M. Novel tyrosinase inhibitors from natural resources—their computational studies. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2262-2272, 2012.

KIM NH, LEE CH, LEE AY. H19 RNA downregulation stimulated melanogenesis in melasma. *Pigment cell Melanoma Research*, v. 23, p. 84–92, 2010.

KIM, Y.J.; UYAMA, H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 62, n. 15, p. 1707-1723, 2005.

KIMBROUGH-GREEN, Candance K. et al. Topical retinoic acid (tretinoin) for melasma in black patients: a vehicle-controlled clinical trial. **Archives of dermatology**, v. 130, n. 6, p. 727-733, 1994.

KIRKLAND, David et al. Investigations into the genotoxic potential of olive extracts. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 777, p. 17-28, 2015.

KWON, Soon-Hyo et al. Heterogeneous pathology of melasma and its clinical implications. *International journal of molecular sciences*, v. 17, n. 6, p. 824, 2016.

LANE, M. E. Skin penetration enhancers. **International journal of pharmaceutics**, v. 447, n. 1, p. 12-21, 2012.

LEE, A. Recent progress in melasma pathogenesis. **Pigment cell & melanoma research**, v. 28, n. 6, p. 648-660, 2015.

LEE, S. Y.; BAEK, N.; NAM, T. Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 31, n. 1, p. 1-13, 2016.

LEGER, C. L. et al. A thromboxane effect of a hydroxytyrosol-rich olive oil wastewater extract in patients with uncomplicated type I diabetes. **European journal of clinical nutrition**, v. 59, n. 5, p. 727, 2005.

LIMA, Emerson de Andrade. Microneedling in facial recalcitrant melasma: report of a series of 22 cases. *Anais brasileiros de dermatologia*, v. 90, n. 6, p. 919-921, 2015.

LIN, Jennifer Y.; FISHER, David E. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, v. 445, n. 7130, p. 843, 2007.

LUPI, O. et al. Doenças dermatológicas no Brasil: perfil atitudinal e epidemiológico. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 1 Supl 1, p. S5-19, 2010.

MANSOURI, P. et al. Evaluation of the efficacy of cysteamine 5% cream in the treatment of epidermal melasma: a randomized double-blind placebo-controlled trial. **British Journal of Dermatology**, v. 173, n. 1, p. 209-217, 2015.

MARCON, A. F. V. S. et al. Rheology, clinical efficacy and sensorial of a silicone – based formulation containing pearl extract. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**. v.11, n.2, p. 247-255, 2014.

MATTS, P. J. et al. Color homogeneity and visual perception of age, health, and attractiveness of female facial skin. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 57, n. 6, p. 977-984, 2007.

MERCURIO, D. G. et al. Clinical scoring and instrumental analysis to evaluate skin types. **Clinical and Experimental Dermatology**. v.38, p. 302-309, 2013.

MERCURIO, D. G. et al. Morphological, structural and biophysical properties of French and Brazilian photoaged skin. **British Journal of Dermatology**, 2016.

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**, v. 90, n. 3, p. 331-332, 2010.

NA, J. I. et al. Effect of tranexamic acid on melasma: a clinical trial with histological evaluation. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 27, n. 8, p. 1035-1039, 2013.

NATARAJAN, V. T. et al. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. **Nature chemical biology**, v. 10, n. 7, 2014.

NESTOR, M. et al. Polypodium leucotomos as an adjunct treatment of pigmentary disorders. **The Journal of clinical and aesthetic dermatology**, v. 7, n. 3, p. 13, 2014.

NI, Z.; MU, Y.; GULATI, O. Treatment of melasma with Pycnogenol®. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 6, p. 567-571, 2002..

NICOLAIDOU, E.; KATSAMBAS, A. D. Pigmentation disorders: hyperpigmentation and hypopigmentation. **Clinics in dermatology**, v. 32, n. 1, p. 66-72, 2014.

- ORTONNE, J. P. et al. A global survey of the role of ultraviolet radiation and hormonal influences in the development of melasma. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 23, n. 11, p. 1254, 2009.
- PANDYA, A. et al. Guidelines for clinical trials in melasma. *British Journal of Dermatology*, v. 156, p. 21-28, 2006.
- PANDYA, A. G.; GUEVARA, I. L. Disorders of hyperpigmentation. **Dermatologic clinics**, v. 18, n. 1, p. 91-98, 2000.
- PARENTE, M. E. MANZONI, A. V. ARES, G. External preference mapping of commercial antiaging creams based on consumers' responses to a check-all-that-apply question. **Journal of Sensory Studies**, v. 26, n. 2, p. 158-166, 2011.
- PARENTE, M. E.; GÁMBARO, A.; SOLANA, G. Study of sensory properties of emollients used in cosmetics and their correlation with physicochemical properties. *Journal of Cosmetics Science*, v. 56, p. 175-182, 2005.
- PARK, E. S. et al. C. Application of a pigment measuring device – Mexameter® – for the differential diagnosis of vitiligo and nevus depigmentosus. **Skin Research Technology**, v. 12, p. 298-302, 2006.
- PARK, K. C. KIM, I. S. Pathogenesis of Melasma. In: **Melasma and Vitiligo in Brown Skin**. Springer, New Delhi, 2017. p. 21-31.
- PASSERON, Thierry; PICARDO, Mauro. Melasma, a photoaging disorder. *Pigment cell & melanoma research*, v. 31, n. 4, p. 461-465, 2018.
- PELLACANI, G. et al. In vivo confocal microscopic and histopathologic correlations of dermoscopic features in 202 melanocytic lesions. **Archives of dermatology**, v. 144, n. 12, p. 1597-1608, 2008.
- PENSÉ-LHÉRITIER, A.M. Recent developments in the sensorial assessment of cosmetic products: a review. **International journal of cosmetic science**, v. 37, n. 5, p. 465-473, 2015.
- PILLAIYAR, T. MANICKAM, M. NAMASIVAYAM, V. Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 32, n. 1, p. 403-425, 2017.
- POPE, D. G. ACCELERATED STABILITY TESTING FOR PREDICTION OF DRUG PRODUCT STABILITY. 2. **Drug & Cosmetic Industry**, v. 127, n. 6, p. 48-&, 1980.
- REGAZZETTI, C. et al. Endothelial cells promote pigmentation through endothelin receptor B activation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 12, p. 3096-3104, 2015.
- REGAZZETTI, C. et al. Melanocytes Sense Blue Light and Regulate Pigmentation through Opsin-3. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, n. 1, p. 171-178, 2017.
- RIBEIRO, Camila Sampaio; LEAL, Fabiano; JEUNON, Thiago. Skin Anatomy, Histology, and Physiology. *Daily Routine in Cosmetic Dermatology*, p. 3-14, 2017.
- RICHARD, N. et al. Hydroxytyrosol is the major anti-inflammatory compound in aqueous olive extracts and impairs cytokine and chemokine production in macrophages.

Planta Medica -Natural Products and Medicinal Plant Research, v. 77, n. 17, p. 1890, 2011.

ROBLES-ALMAZAN, María et al. Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. Food Research International, 2017.

RODRIGUES, M.ichelle; PANDYA, A.Amit G. Melasma: clinical diagnosis and management options. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 56, n. 3, p. 151-163, 2015.

RODRÍGUEZ-MORATÓ, J. et al. Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. **Molecules**, v. 20, n. 3, p. 4655-4680, 2015.

ROWE, R. C. et al. Handbook of pharmaceutical excipients. London: Pharmaceutical press, 2006.

SARKAR, R. et al. Melasma in men: a clinical, aetiological and histological study. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 24, n. 7, p. 768-772, 2010.

SCHULZ, Kenneth F.; ALTMAN, Douglas G.; MOHER, David. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. BMC medicine, v. 8, n. 1, p. 18, 2010.

SCODITTI, E. et al. Hydroxytyrosol suppresses MMP-9 and COX-2 activity and expression in activated human monocytes via PKC α and PKC β 1 inhibition. **Atherosclerosis**, v. 232, n. 1, p. 17-24, 2014.

SHETH, V. M.; PANDYA, A.G. Melasma: a comprehensive update: part II. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 4, p. 689-697, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. Perfil nosológico das consultas dermatológicas no Brasil. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, Rio de Janeiro , v. 81, n. 6, p. 549-558, 2006 .

TAMEGA, A. de et al. Clinical patterns and epidemiological characteristics of facial melasma in Brazilian women. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 27, n. 2, p. 151-156, 2013.

TORRES-ÁLVAREZ, B. et al. Histochemical and immunohistochemical study in melasma: evidence of damage in the basal membrane. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 33, n. 3, p. 291-295, 2011.

VISIOLI, F. BELLOMO, G. GALLI, C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 247, n. 1, p. 60-64, 1998.

VISIOLI, F.; BERNARDINI, E. Extra virgin olive oil's polyphenols: biological activities. **Current pharmaceutical design**, v. 17, n. 8, p. 786-804, 2011.

WAGEMAKER T. A. L. et al. Green Coffea arabica L. seed oil influences the stability and protective effects of topical formulations. **Industrial Crops and Products**. v.63, p. 34-40, 2015.

WAGEMAKER, T. A. L. et al. Integrated approach in the assessment of skin compatibility of cosmetic formulations with green coffee oil. **International journal of cosmetic science**, v. 37, n. 5, p. 506-510, 2015.

WATERMAN, Kenneth C.; ADAMI, Roger C. Accelerated aging: prediction of chemical stability of pharmaceuticals. **International journal of pharmaceutics**, v. 293, n. 1-2, p. 101-125, 2005.

ZHANG, X. CAO, J. ZHONG, L. Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 379, n. 6, p. 581, 2009.

ZHOU, Linghong Linda; BAIBERGENOVA, Akerke. Melasma: systematic review of the systemic treatments. *International journal of dermatology*, v. 56, n. 9, p. 902-908, 2017.

ZWANE, R. E. et al. Novel, biocatalytically produced hydroxytyrosol dimer protects against ultraviolet-induced cell death in human immortalized keratinocytes. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 46, p. 11509-11517, 2012.