



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

CRISTIANE CHEDRAOUI SILVA

**Preparação e caracterização de nanoemulsão de óleo de oliva
contendo quercetina para a melhoria da pele com melasma**

Ribeirão Preto
2020

CRISTIANE CHEDRAOUI SILVA

Preparação e caracterização de nanoemulsão de óleo de oliva contendo quercetina para a melhoria da pele com 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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Priscyla Daniely Marcato Gaspari

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 11/12/2020. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

CHEDRAOUI
SILVA, C.

**Preparação e caracterização de nanoemulsão de óleo de oliva
contendo quercetina para a melhoria da pele com melasma**

MESTRADO
FCRPUSP
2020

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.

Chedraoui Silva, Cristiane

Preparação e caracterização de nanoemulsão de óleo de oliva contendo quercetina para a melhoria da pele com melasma. Ribeirão Preto, 2020. 80 p.: il.; 30cm.

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

Orientador: Marcato Gaspari, Priscyla Daniely.

1. Nanoemulsão. 2. Óleo de oliva. 3. Quercetina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Cristiane Chedraoui Silva

Título do trabalho: Preparação e caracterização de nanoemulsão de óleo de oliva contendo quercetina para a melhoria da pele com 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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esse trabalho,

À minha família e amigos que me apoiaram durante essa jornada, que me ajudaram a vencer as dificuldades e estiveram ao meu lado nos momentos de conquistas e vitórias.

Às pessoas que compartilharam o conhecimento e sabedoria comigo. Que foram e são verdadeiros estímulos e essenciais para o meu aprendizado em diversas áreas do saber e da vida.

Aos que estão sempre ao meu lado...

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer meus pais e meu irmão pelo apoio durante o Mestrado. À orientadora Profa. Dra Priscyla Daniely Marcato Gaspari pelas oportunidades que me proporcionou durante 4 anos, desde a realização, acolhimento e suporte durante a minha iniciação científica à parceria científica e compreensão dos desafios impostos por esse projeto que foram fundamentais para meu aprendizado e amadurecimento. Agradecimentos à Tais, Letícia, Ivana, Caroline, Rogério, Bianca, Andréia e Isabela. A toda essa equipe que tornou meus dias mais alegres com discussões interessantes e que contribui para esse trabalho.

Sou muito grata à vida e as oportunidades de ensino. Várias pessoas foram essenciais para eu estar onde estou. Por isso, devo agradecer imensamente familiares, amigos e profissionais de diversas áreas por terem me ajudado e me concederem suporte pessoal e profissional.

Agradecimentos aos meus colegas de trabalho do GNanobio, coordenação e administração do Programa “Medicamentos e Cosméticos” e aos laboratórios parceiros a esse projeto.

Por último, gostaria de agradecer a CNPq pelo financiamento dessa pesquisa, caso contrário, não seria possível realizá-la. Além disso, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher”.*

Cora Coralina

RESUMO

C. SILVA, C. **Preparação e caracterização de nanoemulsão de óleo de oliva contendo quercetina para a melhoria do melasma**. 2020. 80f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Melasma é uma condição adquirida crônica de hipermelanose em que há formação de manchas homogêneas com bordas irregulares, de coloração marrom clara à escura, distribuídas de forma simétrica na epiderme, sendo muito frequente na face. O tratamento convencional de melasma de grau leve consiste na aplicação de protetor solar, ácido retinoico e hidroquinona tópica. No entanto, hidroquinona pode provocar irritação da pele, alergia, dermatite e, em caso de uso crônico, ocronose exógena, caracterizada como dermatose rara de coloração negro azulada. Nesse contexto, alternativas têm sido investigadas com destaque para produtos naturais como quercetina (QT) e óleo de oliva. A QT apresenta a maior atividade antioxidante entre os flavonoides e é citado como um potente ativo para o clareamento de manchas escuras enquanto que óleo de oliva apresenta compostos fenólicos (tirosol e hidroxitirosol) que já são citados na literatura pela capacidade de inibir a melanogênese. No entanto, a QT apresenta baixa solubilidade em água, baixa permeação cutânea e alta instabilidade química. O objetivo do estudo foi superar essas dificuldades com a incorporação da QT em uma nanoemulsão de óleo de oliva (NE-QT). Esse nanocarreador pode melhorar a permeação cutânea e proteger esse antioxidante natural, garantindo a estabilidade desse ativo. A nanoemulsão foi preparada pelo método de emulsificação e foi otimizada pelo planejamento experimental Box-Behnken através da avaliação de 15 formulações de nanoemulsões (NEs). As NEs foram caracterizadas quanto ao tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta por espalhamento de luz dinâmico e avaliadas em relação ao pH e condutividade elétrica. A morfologia da nanoemulsão foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Além disso, foram realizadas, por UPLC-MS, validação de método analítico de quantificação da QT e avaliação da eficiência de encapsulamento desse ativo. A atividade antioxidante e a atividade inibidora de tirosinase da NE-QT foram avaliadas pelo método DPPH e pelo ensaio *in vitro* de atividade inibidora de tirosinase, respectivamente. Já o potencial de irritação da NE-QT foi avaliado, pelo ensaio HET-CAM, em membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha. Por fim, foram analisadas diferentes bases de gel e emulgel para a incorporação da NE-QT e avaliadas em relação a sua estabilidade física. A NE-QT otimizada apresentou tamanho médio de $183,43 \pm 9,53$ nm com baixo PDI ($\sim 0,19$) e potencial zeta negativo ($-17,13 \pm 0,61$ mV). O pH da dispersão foi ao redor de 7 e a condutividade elétrica foi de $163,96 \pm 8,92$ μ S/cm, indicando a obtenção de uma nanoemulsão óleo em água. Nos estudos de estabilidade preliminar, as formulações de NE e NE-QT otimizadas continuaram estáveis, não sendo observado separação de fases, após teste de centrifugação. Além disso, não foi observado alterações significativas no diâmetro e PDI das partículas em função do tempo, indicando a alta estabilidade físico-química da NE e NE-QT. Por TEM, foi observado nanoestruturas esféricas com tamanho médio ao redor de $82,78 \pm 26,90$ nm. O método analítico desenvolvido por UPLC-MS apresentou-se linear, preciso, exato, robusto e NE-QT apresentou alta eficiência de encapsulamento ($\sim 99\%$). Além disso, a NE manteve a alta atividade antioxidante da QT mesmo após o seu encapsulamento ($\sim 92\%$) e inibiu a tirosinase, indicando o seu potencial antirradicalar e potencial em reduzir a hiperpigmentação do melasma, respectivamente. A NE e a NE-QT não apresentaram potencial irritante, sendo seguras para aplicação tópica. NE-QT foi incorporada em gel e permaneceu estável, após teste de centrifugação. Dessa forma, NE desenvolvida é um sistema com potencial para administração tópica de QT que pode ser utilizado na melhoria da pele com melasma.

Palavras-chave: quercetina, óleo de oliva, nanoemulsão, aplicação tópica, gel.

ABSTRACT

C. SILVA, C. Preparation and characterization of olive oil nanoemulsion containing quercetin for the improvement of the skin of melasma. 2020. 80f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Melasma is a chronic acquired condition of hypermelanosis characterized by homogeneous patches with irregular borders that are light brown to dark, distributed symmetrically in the epidermis, very frequent in the face. The conventional treatment of mild melasma consists of the application of sunscreen, retinoic acid and topical hydroquinone. However, hydroquinone may cause skin irritation, allergy, dermatitis and, in the case of chronic use, exogenous ochronosis, characterized as a rare dermatosis with a bluish-black coloration. In this context, alternatives have been investigated with prominence for natural products such as quercetin (QT) and olive oil. QT presents the highest antioxidant activity among flavonoids and is cited as a potent active for the lightening of dark spots while olive oil presents phenolic compounds (tyrosol and hydroxytyrosol) that are already cited in the literature for the ability to inhibit melanogenesis. However, QT has lower water solubility, low skin permeation and high chemical instability. The objective of the study was overcome these difficulties with the incorporation of QT in an olive oil nanoemulsion (QT-NE). This nanocarrier can improve skin permeation and protect this natural antioxidant, ensuring the stability of this asset. The nanoemulsion was prepared by the emulsification method and was optimized by the Box-Behnken experimental design through the evaluation of 15 nanoemulsion formulations (NE). The NE were characterized in terms of size, polydispersity index (PDI) and zeta potential by dynamic light scattering and evaluated in relation to pH and electrical conductivity. The morphology of the nanoemulsion was evaluated by transmission electron (TEM). In addition, method validation and encapsulation efficiency were performed by UPLC-MS. The antioxidant activity and tyrosinase inhibitory activity of QT-NE were evaluated by DPPH method and by *in vitro* tyrosinase inhibitory activity assay, respectively. The irritation potential of QT-NE was assessed by the HET-CAM essay in a chorioallantoic membrane of embryonated chicken eggs. Finally, different bases of gel and emulgel were analyzed for the incorporation of QT-NE and evaluated in relation to its physical stability. The optimized QT-NE showed an average size of 183.43 ± 9.53 nm with low PDI (~ 0.19), negative zeta potential (-17.13 ± 0.61 mV), pH around 7 and electrical conductivity of 163.96 ± 8.92 μ S/cm, indicating that an oil-in-water nanoemulsion was obtained. In preliminary stability studies, the optimized NE and NE-QT formulations remained stable and did not undergo phase separation after centrifugation test. In addition, no significant changes were observed in the diameter and PDI of the particles as a function of time, indicating the high physicochemical stability of NE and QT-NE. Under TEM, QT-NE exhibited spherical particles with an average size of 82.78 ± 26.90 nm. The analytical method developed by UPLC-MS was linear, precise, accurate, robust and QT-NE showed high encapsulation efficiency ($\sim 99\%$). NE maintained the high antioxidant activity of QT even after its encapsulation ($\sim 92\%$) and the QT-NE inhibited tyrosinase, indicating its antiradical potential and potential to reduce melasma hyperpigmentation, respectively. NE and QT-NE did not present an irritating potential. QT-NE was incorporated in gel and remained stable after the centrifugation test. Thus, developed NE is a system for topical administration of QT to improve skin with melasma.

Keywords: quercetin, olive oil, nanoemulsion, topical application, gel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de ação da produção de melanina (eumelanina e feomelanina).....	2
Figura 2 – Estrutura da quercetina.	5
Figura 3 – Estrutura do hidroxitirosol (A) e tirosol (B).	6
Figura 4 – Estrutura de uma nanoemulsão estabilizada por tensoativo.	8
Figura 5 – Preparação de nanoemulsão O/A por emulsificação à temperatura ambiente com uso de homogeneizador Ultra-Turrax.	12
Figura 6 – Fotomicrografias de amostras de quercetina (QT) em 6,55 mL de óleo de oliva sob microscopia de luz polarizada. A: 0,9 mg de QT. B: 1,8 mg de QT C:11,8 mg de QT. D: 1,8 mg de QT e 1,25 mL de EtOH. E: 11,8 mg de QT e 1,25 mL de EtOH. F: 11,8 mg de QT e 4,25 mL de EtOH.	25
Figura 7 – Filme branco e espesso na parede do tubo de centrifugação das nanoemulsões (NE _s) do ensaio piloto (F3 e F4), indicando excesso de óleo de oliva (OL).....	27
Figura 8 – Gráficos de pareto dos efeitos das variáveis independentes (A: porcentagem de óleo de oliva; B: porcentagem do par de tensoativos; C: velocidade de agitação) e suas interações (AB: porcentagem de óleo de oliva e do par de tensoativos) em relação A) ao diâmetro e B) Pdl.	29
Figura 9 – Gráficos de superfície de resposta de diâmetro (DM) em relação às variáveis: porcentagem de óleo de oliva (OL), teor do par de tensoativo Tween 80+Span 80 (T80+S80) e velocidade de rotação (V).	29
Figura 10 – Gráficos de superfície de resposta de Pdl em relação às variáveis: porcentagem de óleo de oliva (OL), teor do par de tensoativo Tween 80+Span 80 (T80+S80) e velocidade de rotação (V).	30
Figura 11 – Otimização do Box-Behnken para as respostas diâmetro (200 nm) e Pdl (valor mínimo).	34
Figura 12 – Estabilidade das nanoemulsões com diferentes quantidades de quercetina (NE-QT 165 µg/mL (barra vermelha), NE-QT 333,33 µg/mL (barra cinza) e NE-QT 1000 µg/mL (barra azul) e sem quercetina (barra branca) por 15 dias em relação ao: A) Diâmetro e Pdl; B) pH.	35
Figura 13 – Formulações otimizadas contendo 5 mg (F _{otim.1}), 10 mg (F _{otim.2}) e 30 mg de QT (F _{otim.3}), após teste de centrifugação.	36
Figura 14 – A) Curva analítica da quercetina (QT), B) Espectro de absorção no UV-vis do padrão de QT de 12 µg/mL (curva vermelha) e do filtrado de nanoemulsão sem QT (curva preta).	37
Figura 15 – Formulação de NE com 30 mg de QT (NE-QT 1000 µg/mL).	37
Figura 16 – Perfil de distribuição da nanoemulsão otimizada contendo quercetina: (A) no dia 1 (curva vermelha) após 180 dias do seu preparo (curva verde) (B) Correlogramas de cada dia.	39
Figura 17 – Estabilidade da NE-QT (1000 µg/mL de QT) (barra azul) e da NE (barra branca) em relação ao Diâmetro e Pdl por 180 dias.	40
Figura 18 – A) Valor de pH e B) Condutividade da NE-QT final e da NE sem QT; p>0,05 NE-QT vs NE.....	41

Figura 19 – A) Curva analítica para determinação de QT e B) dispersão dos resíduos da curva.	42
Figura 20 – Cromatograma da quercetina (251,25 ng/mL).....	42
Figura 21 – Seletividade do método para quercetina (QT) em relação ao filtrado da NE sem QT (cromatograma verde) e comparada aos picos mínimo (cromatograma vermelho) e máximo (cromatograma roxo) de QT.....	42
Figura 22 – Gráfico de pareto dos efeitos das variáveis independentes (A: temperatura da coluna; B: porcentagem de ácido fórmico; C: variação de acetonitrila; D:fluxo da fase móvel) e suas interações (AB: temperatura da coluna e porcentagem de ácido fórmico AD) temperatura da coluna e fluxo da fase móvel) no A) tempo de retenção e B) área.....	44
Figura 23 – A) Distribuição das NEs de óleo de oliva contendo quercetina (NEs-QT) em imagem de microscopia eletrônica de transmissão; B) Formato esférico da NE-QT em imagem de microscopia eletrônica de transmissão; C) Distribuição de tamanho da população de nanoemulsão contendo quercetina (n=25).	45
Figura 24 – A) Perfil de atividade antioxidante da QT livre (barra cinza), NE-QT (barra azul) e NE (barra branca) avaliada pelo método de sequestro de DPPH (%) (n= 3), *p<0,05 NE-QT vs QT livre e NE; **p<0,01 NE-QT vs QT livre; ***p<0,001 NE-QT vs QT livre; ****p<0,0001 NE-QT vs QT livre; B) Perfil de atividade antioxidante da QT livre (barra cinza), NE-QT (barra azul) e NE (barra branca) expresso por Box plots.	46
Figura 25 – Perfil de sequestro do radical DPPH em função da concentração logarítmica de NE-QT (•), NE () e QT livre ().	47
Figura 26– Capacidade inibidora da enzima tirosinase (%) pelo controle ácido kójico (cor verde); NE-QT (cor azul), QT livre (cor cinza); **p<0,01 NE-QT vs ácido kójico e NE-QT vs QT livre; *** p< 0,001 QT vs ácido kójico.	47
Figura 27 – Avaliação dos efeitos de 0,3 mL de NE na membrana corioalantóide: A) antes da aplicação (tempo 0); B) depois da aplicação (tempo de 5 min).	49
Figura 28 – Avaliação dos efeitos de 0,3 mL de NE-QT na membrana corioalantóide: A) antes da aplicação (tempo 0) e B) depois da aplicação (tempo de 5 min).....	49
Figura 29 – Avaliação dos efeitos de 0,3 mL de SDS 1% na membrana corioalantóide: A) antes da aplicação (tempo 0) e B) depois da aplicação (tempo de 5 min).....	49
Figura 30 – Formulação gel de hidroxietilcelulose sem EDTA, armazenado à temperatura ambiente (FP4A) , formulação gel de hidroxietilcelulose sem EDTA (FP4E), armazenado à temperatura de estufa (FP4E) e formulação gel de hidroxietilcelulose com EDTA (FP5) , armazenado à temperatura de estufa (FP5), após 15 dias de análise para todas as formulações.	51
Figura 31 – Formulações de gel de Goma guar com NE-QT, após teste de centrifugação (n=3).	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Antioxidantes incorporados em nanocarreadores em produtos nanotecnológicos disponíveis no mercado (Salavkar et al. 2011; Montenegro; 2014).....	7
Tabela 2 – Planejamento experimental do Box-Behnken com 3 variáveis independentes (% peso/peso): óleo de oliva (OL); mistura Tween 80 e Span 80 (T80+S80); velocidade (V) (n=1).	12
Tabela 3 – Eluição em modo gradiente, utilizando fase móvel constituída por acetonitrila (ACN) e solução aquosa de ácido fórmico (CH ₂ O ₂) a uma taxa constante de fluxo (0,3 mL/min).....	14
Tabela 4 – Fatores e níveis investigados no teste de robustez.	17
Tabela 5 – Planejamento fatorial fracionado com seleção de 4 fatores (n=2 ⁴⁻¹).....	17
Tabela 6 – Pontuação referente as alterações observadas na membrana corioalantoide de ovo embrionário de galinha.....	22
Tabela 7 – Classificação das amostras em relação ao seu poder de irritação.	22
Tabela 8 – Avaliação da incorporação de NE-QT em relação à 3 diferentes bases cosméticas.	23
Tabela 9 – Composição das NEs avaliadas no estudo piloto, valores de diâmetro (DM) e índice de polidispersão.....	26
Tabela 10 – Avaliação das nanoemulsões (NEs) com 5,67% de EtOH, com e sem quercetina (QT) em relação ao diâmetro (DM) e PDI (n=1).	27
Tabela 11 – Resultados de diâmetro (DM) e índice de polidispersão (PDI) das Nanoemulsões (NEs) obtidos pelo planejamento Box-Behnken nos dias 1 e 15 (n=1).	28
Tabela 12 – Análise de estatística das variáveis independentes e suas interações em relação à resposta DM.	31
Tabela 13 – Análise de estatística das variáveis independentes e suas interações em relação à resposta PDI.	32
Tabela 14 – Nanoemulsão final de óleo oliva contendo quercetina.....	38
Tabela 15 – Precisão (CV (%)) e Exatidão (%) de soluções de QT utilizadas na validação do método analítico no UPLC-MS.....	43
Tabela 16 – Potencial de irritação das amostras no HET-CAM (n=4).	48
Tabela 17 – Matérias primas da formulação tópica.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O	Nanoemulsão do tipo água em óleo
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CH ₂ O ₂	Ácido fórmico
C18	Coluna de fase reversa constituída por grupamentos octadecilsilano
CV	Coefficiente de variação
C ₊	Controle positivo
DLS	Dynamic Light Scattering- Espalhamento de luz dinâmico
DM	Diâmetro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EE	Eficiência de encapsulação
EHL	Equilíbrio hidrofílico lipofílico
ESI+	Ionização positiva por electrospray
FDA	Food and Drug Administration
GL	Grau de liberdade
H ₂ O	Água
LD	Limite de detecção
Log P	Coefficiente de partição óleo/água
LQ	Limite de quantificação
m/z	Relação massa/carga
NE	Nanoemulsão
NEs	Nanoemulsões
NE-QT	Nanoemulsão contendo quercetina
O/A	Nanoemulsão óleo em água
OL	Óleo de Oliva
PdI	Índice de polidispersão
pH	Potencial hidrogênico
PZ	Potencial zeta
QM	Quadrados médios

QT	Quercetina
SDS	Lauril Sulfato de Sódio
SQ	Soma dos quadrados
S80	Span 80
T80	Tween 80
UPLC - MS	Cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada à espectrômetro de massas
UVB	Raios ultravioleta tipo B
UV-vis	Ultravioleta visível

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
λ	Comprimento de onda
g	Gramas
°C	Grau Celsius
h	Hora
min	Minutos
uL	Microlitro
mL	Mililitros
ng	nanogramas
nm	Nanômetros
p/p	Relação peso/peso
R ²	Coefficiente de determinação
%	Porcentagem
™	Trademark
®	Marca Registrada

Sumário

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIII
LISTA DE SÍMBOLOS	XV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Melasma: definição, epidemiologia, etiologia e patogênese	1
1.2 Tratamentos convencionais e alternativos para a melhoria da pele com melasma	3
1.3 Quercetina e óleo de oliva	4
1.4 Nanotecnologia e nanoemulsões	7
2. OBJETIVOS	9
2.1 Objetivos gerais	9
2.2 Objetivos específicos	9
3. MATERIAIS	10
3.1 Matérias-primas	10
3.2 Equipamentos	11
4. MÉTODOS	11
4.1 Solubilidade da quercetina (QT)	11
4.2 Preparação de nanoemulsão O/A	12
4.3 Avaliação da estabilidade das NEs	13
4.4 Construção da curva analítica de QT por espectrofotometria no UV-vis	13
4.5 Validação do método analítico de quantificação de QT por UPLC-ESI- MS	14
4.5.1 Curva analítica e linearidade	15
4.5.2 Seletividade	15
4.5.3 Precisão e Exatidão	15
4.5.4 Limite de detecção e limite de quantificação	16
4.5.5 Robustez	17
4.6 Avaliação da eficiência de encapsulamento da QT na NE	18
4.7 Caracterização da NEs	18
4.7.1 Diâmetro médio, Pdl e potencial zeta	18

4.7.2 Avaliação do pH e condutividade eletrolítica das NEs	18
4.8 Microscopia eletrônica de transmissão	19
4.9 Atividade antioxidante pelo método do DPPH	19
4.10 Avaliação da atividade inibidora de tirosinase.....	20
4.11 Ensaio HET-CAM (Hen's Egg Test-Chorioallantoic).....	21
4.12 Desenvolvimento da formulação tópica e estabilidade preliminar	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1 Solubilidade da quercetina	24
5.2 Preparação da nanoemulsão O/A	25
5.2.1 Ensaio piloto.....	25
5.2.2 Avaliação preliminar da estabilidade das nanoemulsões do ensaio piloto.....	27
5.3 Caracterização das nanoemulsões (diâmetro, PDI, PZ e pH)	34
5.4 Avaliação da estabilidade preliminar	35
5.5 Eficiência de encapsulamento da quercetina na nanoemulsão por método indireto	36
5.6 Caracterização da nanoemulsão final.....	38
5.6.1 Tamanho, PDI e potencial zeta	38
5.6.2 pH e condutividade elétrica.....	40
5.7 Validação do método analítico por UPLC-MS e avaliação da eficiência de encapsulamento de QT	41
5.7.1 Curva analítica e linearidade	41
5.7.2 Seletividade	42
5.7.3 Precisão e Exatidão	43
5.7.4 Limite de detecção e quantificação	43
5.7.5 Robustez.....	43
5.7.6 Eficiência de encapsulamento por UPLC-MS	44
5.8 Microscopia eletrônica de transmissão	44
5.9 Atividade antioxidante pelo método do DPPH	45
5.10 Avaliação da atividade inibidora de tirosinase.....	47
5.11 Ensaio HET-CAM.....	48
5.12 Desenvolvimento da formulação tópica e estabilidade preliminar	50
6. CONCLUSÕES.....	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 Melasma: definição, epidemiologia, etiologia e patogênese

Melasma é uma condição adquirida crônica de hipermelanose em que há formação de manchas ou máculas homogêneas com bordas irregulares, de coloração marrom clara à escura, distribuídas de forma simétrica na epiderme, sendo muito frequente na face, especificamente nas regiões centrofacial, malar e mandibular, podendo destacar testa, bochecha e nariz (Bagherani *et al.*, 2015; Ogbechie-Godec e Elbuluk, 2017). A palavra provém do grego “melas” que significa cor negra (Bagherani *et al.*, 2015) em referência à hiperpigmentação. A desordem atinge ambos os sexos, porém com maior prevalência em mulheres (Ogbechie-Godec e Elbuluk, 2017). No Brasil, essa proporção é de 39 mulheres para 1 homem. Já na Índia essa relação é bem maior, 4 mulheres em relação 1 homem com essa condição (Achar e Rathi, 2011). O melasma pode atingir indivíduos entre 20 a 40 anos e a idade média mais propícia de desenvolvimento está entre os 31-33 anos, podendo variar conforme o estudo clínico e país (Achar e Rathi, 2011; Handel *et al.* 2014).

De acordo com Handel *et al.* (2014), o aparecimento de manchas está entre os maiores motivos da procura de tratamento dermatológico. Nesse estudo, é relatado que 15 a 35% das mulheres adultas brasileiras são afetadas por melasma, e também descreve que aproximadamente 30% das mulheres brasileiras consideram desordens pigmentárias como principal razão para a busca de cuidados dermatológicos e estéticos. Entre as justificativas da procura de tratamento estão vergonha, insatisfação e baixa auto estima, já que geram impacto psicossocial e emocional nos pacientes (Handel *et al.*, 2014; Nomakhosi e Heidi, 2018).

A etiologia do melasma não é completamente definida (Bagherani *et al.*, 2015; Ogbechie-Godec e Elbuluk, 2017), mas pode ser multifatorial, a citar a predisposição genética de asiáticos, hispânicos, indianos como também a propensão da população mediterrânea e africana (Handel *et al.* 2014), uso de pílulas hormonais, gravidez, disfunção tireoidiana ou ovariana, e exposição solar que é muito frequente em países tropicais (Bandyopadhyay, 2009).

Histologicamente, no melasma, há aumento de melanina como também dano ao DNA, destruição de colágeno, hiperplasia e inflamação (Choi e Shin, 2016) como consequências da radiação ultravioleta. Já no interior dos melanócitos, que são as células responsáveis pela pigmentação, há aumento de melanossomas, que são organelas que sintetizam e armazenam

melanina (Miot *et al.*, 2009). Além disso, podem surgir vasos sanguíneos dérmicos, e eventualmente infiltrados linfo-histiocíticos perivascularares (Ogbechie-Godec e Elbuluk, 2017).

Devido ao fato do melasma ser frequente em regiões do corpo que são expostas ao Sol, a radiação ultravioleta é considerada um fator chave para o desenvolvimento da hiperpigmentação. A radiação incidente sobre a pele estimula a produção de hormônio estimulador de melanócitos (α -MSH) que por sua vez induz a modificação do receptor de melanocortina (MC1R), levando ao aumento do fator de transcrição associado à melanogênese (MITF), que ativa a tirosinase e as proteínas relacionadas à tirosinase (TRP) no complexo de Golgi, levando à maior produção dos pigmentos eumelanina e feomelanina. Além do receptor MC1R, os receptores adrenérgicos e do fator de crescimento de mastócitos (c-Kit) (Videira *et al.*, 2013) podem levar à mesma resposta final da cascata de sinalização do receptor MCR1, como pode ser verificado na **Figura 1**.

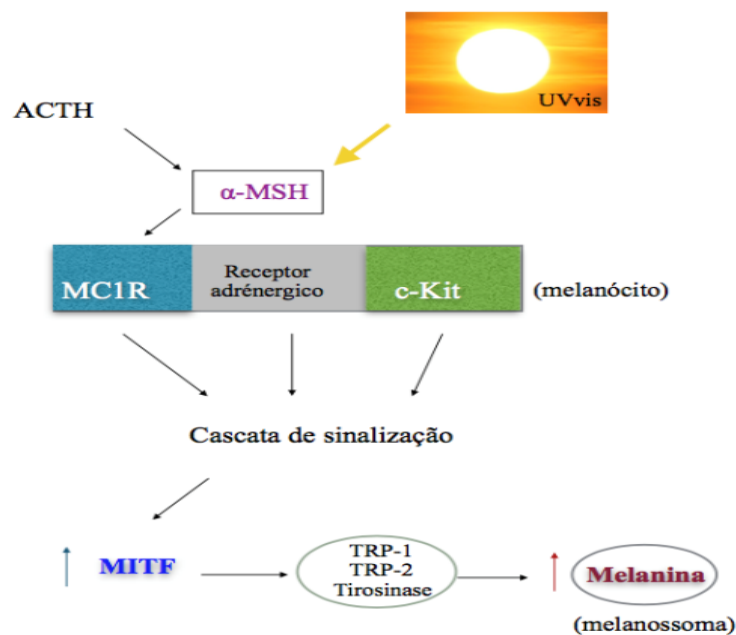


Figura 1 – Mecanismo de ação da produção de melanina (eumelanina e feomelanina).

Além da radiação UVB estimular a melanogênese, pela produção de α -MSH, ela induz danos ao DNA com a formação de adutos e causa danos citoplasmáticos com formação de dímeros de timidina, sendo que ambas situações induzem a melanogênese. No caso dos dímeros

de timidina, eles estimulam a tirosinase, levando ao aumento de melanina (Choubey *et al.* 2017).

Além da interferência de dímeros de timidina na cascata de sinalização de melanogênese via UVB (**Figura 1**), as espécies reativas de oxigênio também são mediadores importantes para a ativação da via. Segundo estudos conduzido por Choubey *et al.* (2017) e Seckin *et al.* (2014), indivíduos portadores de melasma apresentam maiores quantidades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) e de malondialdeído (MDA), produto de peroxidação lipídica, em comparação aos pacientes controles. Portanto, há uma relação entre estresse oxidativo e melasma.

A luz visível (400-700 nm) também pode induzir a melanogênese, no entanto essa influência ainda é pouco explorada (Randhawa *et al.*, 2015). De acordo com a literatura, a luz visível é capaz de estimular a produção de melanina em explantes de pele humana (Alcantâra *et al.* 2020) como também uma produção considerável de espécies reativas de oxigênio que levam a liberação de citocinas pró-inflamatórias e de expressão de metaloproteinase na pele (Liebel *et al.*, 2012).

1.2 Tratamentos convencionais e alternativos para a melhoria da pele com melasma

Para a melhoria de qualidade de vida dos indivíduos com melasma, a literatura destaca tratamentos tópicos tradicionais e procedimentos dermatológicos conforme o grau de intensidade. O tratamento convencional de melasma de grau leve (Bagherani *et al.*, 2015) consiste na aplicação de protetor solar e uso de hidroquinona 2-5% tópica, sozinha ou em conjunto com ácido retinoico (0,05-0,1%), já que ambas moléculas interferem na melanogênese e pelo fato do ácido retinoico atuar na descamação da epiderme (Bandyopadhyay, 2009; Sarkar *et al.* 2013, Bagherani *et al.*, 2015). Além disso, durante o tratamento, utiliza-se corticoides, como dexametasona, pois hidroquinona pode provocar irritação da pele, alergia, dermatite e, em caso de uso crônico, o cronose exógena, caracterizada como dermatose rara de coloração negro azulada (Martins *et al.* 2012; Nomakhosi e Heidi, 2018).

Em função dos efeitos colaterais e de sua baixa segurança, a hidroquinona no Brasil, desde 2007, não é mais registrada pela ANVISA como produto de cunho cosmético e na União Europeia foi banida desde 2000 (Couteau e Coiffard, 2016). Nesse contexto, para uma aplicação tópica de maior segurança, atualmente há pesquisas que buscam alternativas como o uso de produtos naturais (Ogbechie-Godec e Elbuluk, 2017) que apresentam menos efeitos colaterais

que os tratamentos tradicionais. Dessa forma, há uma busca por antioxidantes naturais capazes de proteger as células de radicais livres e do estresse oxidante (Salavkar *et al.* 2011; Sarkar, *et al.* 2013). Entre os antioxidantes estudados estão: ginseng, vitamina B, ácido ascórbico, tocoferol, extratos de soja, de café e de semente de uva e flavonoides presentes em chá verde, aloe vera (Salavkar *et al.* 2011).

Há, entretanto, um grande desafio na incorporação e absorção desses antioxidantes, pois muitos são lipofílicos (ex. licopeno, resveratrol, quercetina) e apresentam baixa penetração na pele. E outros são hidrofílicos (ex. ácido ascórbico), com baixa capacidade de penetrar a camada córnea (Montenegro, 2014). Além disso, diversas moléculas antioxidantes são instáveis e fotodegradáveis na presença de oxigênio, o que dificulta a incorporação nas formulações cosméticas (Pol e Patravale, 2009). Outro desafio é a alta pigmentação de alguns antioxidantes, o que torna difícil a preparação de um produto de coloração esteticamente aceitável pelo público (Pol e Patravale, 2009; Montenegro, 2014).

Para contornar as dificuldades acima citadas, a literatura destaca o desenvolvimento de formulações que apresentem nanocarreadores, como exemplo lipossomas, nanoemulsões e nanopartículas lipídicas, uma vez que possuem diversas vantagens em relação às formulações tópicas tradicionais (Montenegro, 2014; Vinardell e Mitjans, 2015). Entre os benefícios estão: a possibilidade de aumentar a solubilidade e estabilidade dos antioxidantes, melhorando, portanto, a biodisponibilidade; proteção contra hidrólise e oxidação; direcionamento da ação e modulação da liberação do princípio ativo (Vinardell e Mitjans, 2015).

1.3 Quercetina e óleo de oliva

Um antioxidante muito citado em pesquisas e muito aplicado em produtos comerciais (Choi e Shin, 2016), é a quercetina. Segundo Vinardell e Mitjans (2015), a quercetina tem sido considerada o flavonoide com maior atividade antioxidante, pois atua em múltiplos mecanismos de ação, impedindo a oxidação e inflamação da pele, que são processos frequentemente induzidos pela radiação UV (Casanova e Santos, 2016). Esse flavonoide dificulta a formação de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, e impossibilita que haja estresse oxidativo nas células por sua capacidade de inibir o fator de transcrição NF- κ B, que possui papel essencial na produção de citocinas e na modulação da resposta imune (Hatahet *et al.* 2016). Além disso, esse antioxidante é 20 vezes mais potente que vitamina C e 50 vezes mais potente que vitamina E (Brand-Garnys *et al.*, 2007).

A quercetina é encontrada de modo geral em frutas, verduras e legumes e é um potente inibidor da tirosina quinase (Choi e Shin, 2016). Trata-se de um flavonoide com caráter lipofílico ($\log P = 1,82 \pm 0,32$) (Figura 2) e, de acordo com a literatura, essa lipofilicidade tende a favorecer uma penetração mais rápida do ativo pelo estrato córneo. No entanto, a quercetina apresenta baixo poder de penetração na epiderme em função dos grupos hidroxil que dificultam sua penetração. E essa limitação reduz, conseqüentemente, a absorção cutânea de quercetina (Vicentini *et al.*, 2008; Hatahet *et al.* 2016).

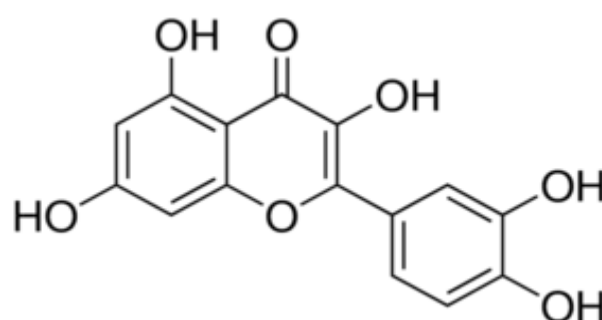


Figura 2 – Estrutura da quercetina.

Para amenizar os problemas descritos acima, a quercetina vem sendo encapsulada em nanoestruturas lipídicas, nanocápsulas, microemulsões, nanopartículas de sílica e nanoemulsões com o intuito de melhorar a sua estabilidade e eficiência de penetração na pele (Ganesan e Choi, 2016). Chen-yu *et al.* (2012), descrevem o aumento da permeação tópica da quercetina quando a mesma foi encapsulada em carreador lipídico nanoestruturado (CLN), além de apresentar maior atividade antioxidante e antiinflamatória. Segundo Chen-yu *et al.*, quercetina- CLN foi capaz de suprimir o edema de orelha induzido por xileno em ratos, e observou maior atividade antioxidante do que a quercetina livre. Pivetta *et al.* (2019) também mostrou que CLN-QT apresentou alta atividade antioxidante e que esse sistema foi capaz de inibir a degranulação de mastócitos e não apresentou potencial citotóxico para queratinócitos da linhagem HaCaT. Já Vicentini *et al.* (2008) constatou que quercetina (0,3%) em microemulsão O/A previne a depleção, induzida pela irradiação UVB, do antioxidante glutathiona (GSH) e diminui a atividade/secreção de metaloproteinases, que são enzimas proteolíticas relacionados ao fot envelhecimento e ao carcinoma de pele que envolve degradação de colágeno e elastina (Vicentini *et al.*, 2008).

Outro antioxidante, citado na literatura para melhoria de melasma, é o óleo de oliva, que contém alta porcentagem de ácido graxos insaturados (ácido oleico e linoleico) e, em menor

quantidade, esqualenos, tocoferóis, esteróis e compostos fenólicos (Romero e Brenes, 2012). De acordo com Baumann (2007), muitos estudos mostram que os compostos fenólicos presentes no óleo de oliva apresentam propriedades antiinflamatórias, protegendo contra a radiação UVB. Além disso, Baumann (2007) afirma que o óleo de oliva é eficaz em tratar dermatites, eczemas e inflamações da epiderme.

Os efeitos farmacológicos e bioquímicos do óleo de oliva são atribuídos principalmente à dois compostos fenólicos, o hidroxitirosol (**Figura 3A**) e em menor extensão ao tirosol (**Figura 3B**) (Romero e Brenes, 2012; Wen *et al.* 2013).

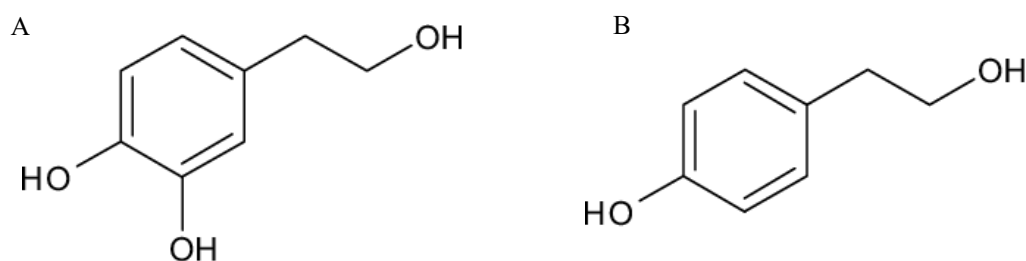


Figura 3 – Estrutura do hidroxitirosol (A) e tirosol (B).

Uchida *et al.* (2014) verificaram que 2-hidroxitirosil foi mais potente que ácido kójico para inibição de tirosinase do fungo *Metarhizium* sp. e que 2-hidroxitirosil se mostrou, portanto, mais eficiente que ácido kójico na inibição da melanina. Desse modo, Uchida *et al* sugerem que 2- hidroxitirosil é um composto promissor para o tratamento de desordens pigmentárias da pele. Já Wen *et al.* (2013) relatou que tirosol e seus derivados (ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético, ácido 2-hidroxifenilacético) são inibidores da melanogênese, impedindo a ativação de MC1R por α -MSH de modo a suprimir a expressão de tirosina quinase e TRP-1. E, portanto, o grupo conclui que tirosol e seus derivados poderiam ser aplicados em cosméticos para a despigmentação.

Nesse contexto, o óleo de oliva e a quercetina têm grande potencial para a melhoria da pele com melasma, sendo que esses dois componentes podem ser associados em uma nanoemulsão.

1.4 Nanotecnologia e nanoemulsões

A Nanotecnologia vem sendo muito utilizada para contornar dificuldades como, por exemplo, solubilidade e estabilidade dos antioxidantes nas formulações cosméticas. O investimento nessa tecnologia cresce em diversos sentidos, não apenas no capital destinado à área, mas também na quantidade de produtos nanotecnológicos já disponíveis no mercado. É possível verificar na **Tabela 1**, a inúmera quantidade de produtos no mercado contendo antioxidantes incorporados em nanocarreadores, como Coenzima Q10 em associação à vitamina B3 ativa em lipossomas; vitaminas A, C e E em nanoemulsão; extrato de semente de uva, chá verde e vitamina E em fulerenos (Salavkar *et al.* 2011; Montenegro; 2014), por exemplo.

Tabela 1– Antioxidantes incorporados em nanocarreadores em produtos nanotecnológicos disponíveis no mercado (Salavkar *et al.* 2011; Montenegro; 2014).

Ingredientes ativos/sistemas	Fabricante	Uso
Vit.E, pantenol/Nanocápsula	L'Oréal	Antienvelhecimento
Coenzima Q10, vit. B3/Lipossoma	I-Wen Naturals	Antienvelhecimento, antioxidante
Vit. A, E, C/ NE	Mibelle Biochemistry	Antienvelhecimento
Extrato de semente de uva, chá verde e vit. E / fulereno	Sircuit Skin Cosmeceuticals Inc.	Antienvelhecimento
Coenzima Q10, vit. E/NE	Mibelle Biochemistry	Antienvelhecimento, anti-inflamatório

Legenda: *Vitamina (Vit.); Nanoemulsão (NE)

Dentre as nanoestruturas destacam-se as nanoemulsões, que apresentam maior capacidade de encapsular compostos lipofílicos em relação aos lipossomas, por exemplo, e são de fácil preparação em larga escala (Bajerski *et al.* 2016).

Nanoemulsão consiste em um sistema de fases líquidas imiscíveis estabilizadas por tensoativos (**Figura 4**), em que a fase dispersa, composta por gotículas, está distribuída em uma

fase contínua. A mistura é constituída por fase aquosa e fase oleosa, podendo ser encontrada na forma de nanoemulsão água/óleo (A/O), óleo/água (O/A) ou como nanoemulsão múltipla (O/A/O ou A/O/A) (Singh *et al.*, 2017). O agente emulsificante diminui a tensão interfacial, contribuindo para a redução do diâmetro dos glóbulos e estabilidade da nanoemulsão (Gupta *et al.*, 2016).

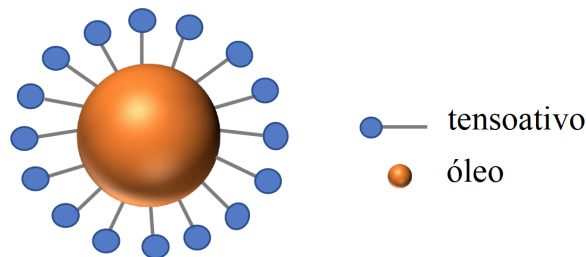


Figura 4 – Estrutura de uma nanoemulsão estabilizada por tensoativo.

As nanoemulsões podem ser obtidas por método de baixa energia como emulsificação espontânea e método de inversão de fases ou por método de alta energia, como por exemplo, homogeneização de alta pressão e ultrassonicação (Jasmina *et al.*, 2017).

Dentre os benefícios desse sistema, pode-se destacar o fato das nanoemulsões apresentarem gotículas com até 500 nm (Dario *et al.*, 2016; Gupta *et al.*, 2016), o que resulta na alta estabilidade cinética dessa nanoestrutura (Bazana *et al.*, 2015). Há também outras vantagens como alta estabilidade em relação à sedimentação, alta capacidade de solubilização de compostos lipofílicos, alta área superficial, aspecto transparente ou translúcido (Eid *et al.*, 2013; Dario *et al.*, 2016). Além disso, trata-se de sistemas atrativos para a indústria cosmética, pois apresentam baixa quantidade de tensoativo (5-10%) em comparação à microemulsão (20-25%) (Chellapa *et al.*, 2016), prevenindo, irritação ou toxicidade e são versáteis, podendo ser incorporados em cremes, espumas, líquidos, gel e loção (Hougeir e Kircik, 2012; Ribeiro *et al.*, 2015). Além disso, por apresentarem pequenas gotículas, as nanoemulsões apresentam maior contato com o estrato córneo e podem atingir com maior facilidade o local desejado, podendo melhorar a eficácia dos ativos com a maior penetração na pele (Ribeiro *et al.*, 2015). Esses sistemas têm alto poder de hidratação, boa textura sensorial e espalhabilidade (Hougeir e Kircik, 2012; Singh e Sharma, 2016).

Sonneville-Aubrun *et al.* (2004) verificaram que nanoemulsão com 15,0% de fase oleosa, contendo triglicerídeos, ésteres, alcanos ou silicones, permeou mais na pele em comparação à macroemulsão correspondente. Essa nanoemulsão apresentou maior poder de

hidratação do que leite corporal e água corporal após 1h e 24h, sendo observada uma hidratação ao redor de 35% contra aproximadamente 10-15% dos outros produtos. Além disso, 80% das mulheres preferiram a fluidez e transparência da nanoemulsão e 84% se identificaram mais com o resultado da nanoformulação em comparação aos outros produtos (Sonneville-Aubrun *et al.*, 2004). Flores *et al.* (2011) destacam o uso de nanoemulsões para a incorporação de óleos, como os óleos de babassu, argan e romã. A incorporação de óleo de *Melaleuca alternifolia*, por exemplo, em nanoemulsão de 160-220 nm e de PDI menor que 0,25, demonstrou eficácia acima de 90% em proteger o óleo da volatilização, após 30 dias da estocagem inicial.

Portanto, as nanoemulsões se destacam por suas vantagens para uso cosmético, podendo solubilizar ativos lipofílicos como a quercetina, aumentando a sua estabilidade e permeação em pele, além da possibilidade de associar as propriedades biológicas do óleo de oliva com a quercetina.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Preparação e caracterização de nanoemulsão de óleo de oliva contendo quercetina para a melhoria da pele com melasma.

2.2 Objetivos específicos

- Estudo de solubilidade da quercetina em óleo de oliva e preparação de nanoemulsão O/A;
- Otimização da preparação da nanoemulsão através do planejamento Box-Behnken;
- Encapsulamento da quercetina na nanoemulsão;
- Caracterização das nanoemulsões quanto ao diâmetro, índice de polidispersão, potencial zeta, morfologia, pH e condutividade eletrolítica;
- Avaliação da estabilidade das nanoemulsões por teste de centrifugação;
- Validação do método analítico de quantificação de quercetina por UPLC-MS e avaliação da eficiência de encapsulamento da quercetina na nanoemulsão;
- Determinação da atividade antioxidante e atividade inibidora de tirosinase *in vitro* da nanoemulsão com quercetina;
- Avaliação *in vitro* do potencial irritante da nanoemulsão por HET-CAM,

- Preparação de um gel contendo as nanoemulsões e avaliação da estabilidade preliminar.

3. MATERIAIS

3.1 Matérias-primas

- Água (osmose reversa).
- Álcool Etílico Absoluto P.A.-A.C.S.99,5%, Synth, Brasil.
- Acetonitrila, J.T. Baker, EUA.
- Ácido kójico, Sigma Aldrich, EUA.
- Cloreto de potássio, Synth, Brasil.
- Crodamol™ GTCC (triglicerídeos de cadeia média; ácido cáprico/ caprílico), Croda do Brasil.
- DMSO, Sigma-Aldrich, EUA.
- DPPH (2,2 – difenil-1-picril-hidrazil), Sigma-Aldrich, Alemanha.
- EDTA (ácido etilenodiaminotetracético dissódico hidratado, 98%), Sigma-Aldrich, Alemanha.
- Glicerina P.A ACS, Êxodo científica, Brasil.
- Goma Guar, Fibralive, Brasil.
- L-DOPA Sigma-Aldrich, EUA.
- Metanol, J.T. Baker, EUA.
- Metilparabeno, Synth, Brasil.
- Natrosol (Hidroxietilcelulose 4400), Êxodo científica.
- Óleo de oliva (SUPER REFINED® OLIVE-LQ-MH), EHL=7,7, Croda do Brasil.
- Papel indicador de pH, MColorpHast™, Alemanha.
- Propilenoglicol, Ely Martins, Brasil.
- Propilparabeno Synth, Brasil
- Proteg PF (Fenoxietanol, Metilparabeno, Propilparabeno, Etilparabeno, Butilparabeno e Isobutilparabeno), Proserv Química, Brasil.
- Quercetina $\geq 95\%$ (HPLC), Sigma-Aldrich, EUA.
- Span™80 (*Sorbitan Oleate*), EHL=4,3, Croda do Brasil.
- Sepineo P600 (*Acrylamide/Sodium Acryloyldimethyl Taurate Copolymer & Isohexadecane & Polysorbate 80*), Seppic, França.

- Tirosinase (tyrosinase from mushroom) T3824, 25KU, Sigma-Aldrich, EUA.
- Tween TM 80 (*Polysorbate 80*), EHL=15, Croda do Brasil.

3.2 Equipamentos

- Acquity UPLC® H-Class System com SQ-Detector 2, Waters®.
- Centrífuga 352R, MPW.
- Condutivímetro, MA52, Marconi.
- DigiMicro 2.0 Scale camera, Tucsen.
- Leitor de microplacas SpectraMax® Paradigm, Multi-Mode Detection Plataforma, Molecular Devices.
- Microscópio biológico, BEL Photonics.
- Microscópio de luz polarizada Carl Zeiss® Modelo Axioplan 2.
- Microscópio eletrônico de transmissão JEM-200 CX, JEOL.
- Nanophotometer P360, Implen.
- pHmetro mPA-210, Ms Tecnopon.
- Ultraturrax T-25, IKA.
- Zetasizer NanoZs, Malvern.

4. MÉTODOS

4.1 Solubilidade da quercetina (QT)

A solubilidade máxima de QT em óleo de oliva (OL) foi avaliada em 24h, após a adição de diferentes quantidades de QT (0,9 mg; 1,8 mg e 11,8 mg) em 6,55 mL de OL sob agitação, protegidos da luz, sem e com a presença de álcool etílico absoluto (5,67%). Nesse método, a densidade de álcool etílico absoluto ($d= 0,8 \text{ g/mL}$) e a densidade do óleo de oliva ($d= 0,915 \text{ g/mL}$) à 25°C foram utilizadas nos cálculos de concentração. Após o período indicado, uma gota de cada amostra foi colocada em uma lamina de vidro. Em seguida, uma lamínula foi adicionada sobre essas amostras que foram avaliadas, em relação à presença ou cristais de QT, em um microscópio de luz polarizada do laboratório da Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley da FCFRP.

4.2 Preparação de nanoemulsão O/A

NEs foram preparadas pelo método de emulsificação à temperatura ambiente, utilizando o homogeneizador Ultra-Turrax (IKA). A fase aquosa foi constituída de uma solução de Tween 80 (T80) em água destilada, e a fase oleosa foi composta por óleo de oliva (OL), Span 80 (S80), quercetina (QT) e EtOH. A fase aquosa (A) foi vertida sobre a oleosa (B) sob agitação no Ultra-Turrax, conforme o esquema da **Figura 5**.

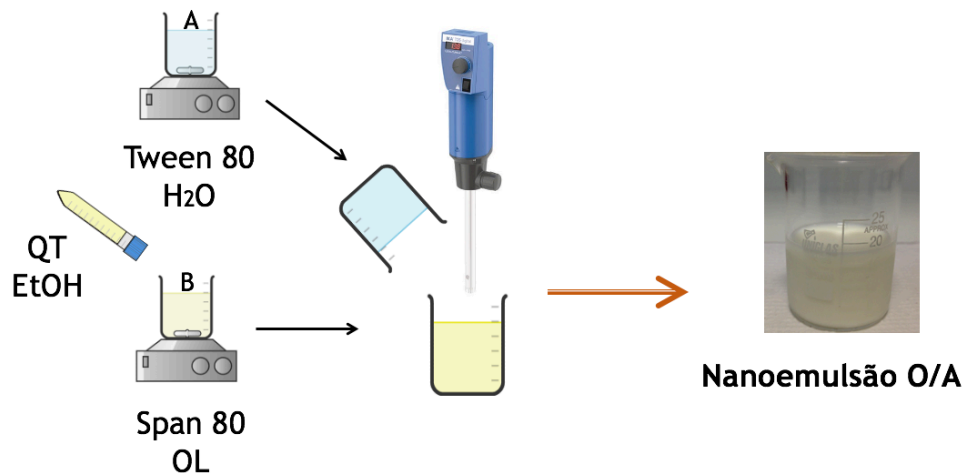


Figura 5 – Preparação de nanoemulsão O/A por emulsificação à temperatura ambiente com uso de homogeneizador Ultra-Turrax.

Os estudos foram iniciados com os ensaios pilotos e posteriormente com o planejamento Box-Behnken, em que foram avaliadas as variáveis independentes: porcentagem de óleo, porcentagem da mistura de tensoativos e velocidade de agitação (**Tabela 2**). As variáveis dependentes foram diâmetro (DM) e índice de polidispersão (PdI).

Tabela 2 – Planejamento experimental do Box-Behnken com 3 variáveis independentes (% peso/peso): óleo de oliva (OL); mistura Tween 80 e Span 80 (T80+S80); velocidade (V) (n=1).

	% OL	%T80+S80	V (rpm)
-1	1	5,0	14000
0	3	7,5	16000
1	5	10,0	18000

Depois que a matriz do Box-Behnken foi criada, os dados foram analisados estatisticamente a partir de gráficos de pareto e superfícies de resposta. Equações polinomiais de segunda ordem foram geradas por BBD para expressar as respostas previstas.

O modelo é mostrado a seguir:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (\text{Eq. 1})$$

onde Y_i é diâmetro (Y_1) ou PdI (Y_2); β_0 é o intercepto; β_1 , β_2 e β_3 são os coeficientes lineares; β_{11} , β_{22} , β_{33} são os coeficientes quadráticos e β_{12} , β_{13} , β_{23} são os coeficientes de interação; X_1 é óleo de oliva (OL); X_2 é a mistura de T80 e S80 (T80+S80); X_3 é a velocidade de agitação(V).

4.3 Avaliação da estabilidade das NEs

As NEs foram analisadas macroscopicamente com o intuito de verificar alguma desestabilização do sistema como precipitação, separação de fases ou modificações na coloração. As amostras foram submetidas à centrifugação de 3000 rpm (785 g) durante 30 min, de acordo com o Guia de estabilidade de produtos cosméticos da ANVISA (2004), após 24h e 48h da sua preparação.

4.4 Construção da curva analítica de QT por espectrofotometria no UV-vis

Inicialmente, a eficiência de encapsulamento da QT foi avaliada por espectrofotometria no Ultravioleta-visível por ser um método rápido, simples e barato. Para isso, foram feitas soluções de diferentes concentrações de QT (faixa 1-12 $\mu\text{g/mL}$) ($n=3$) a partir de uma solução mãe de QT (100 $\mu\text{g/mL}$) em EtOH. Essas amostras foram quantificadas no comprimento de onda de máxima absorção de QT ($\lambda=372$ nm) no Nanophotometer P360 (Implen), permitindo a construção da curva analítica e a análise da linearidade. Em seguida, para a avaliação da seletividade, 500 μL de NE sem QT foi centrifugada por 2 min a 5000 x g em um sistema de filtro Microcon com membrana de ultrafiltração de corte de massa molar de 10 KDa (Millipore) (Marcato *et al.*, 2011). O sobrenadante foi diluído em EtOH (20:580 μL), e analisado no UV-

vis no $\lambda=372$ nm. Por fim, os parâmetros linearidade e seletividade foram analisados, seguindo a RDC 166 (ANVISA).

4.5 Validação do método analítico de quantificação de QT por UPLC-ESI- MS

Com o objetivo de obter um método mais sensível de quantificação, foi desenvolvido um método de quantificação de QT por UPLC- MS. O método analítico foi validado, de acordo com a RDC 166, de 24 de julho de 2017, utilizando um cromatógrafo líquido de ultra-eficiência, modelo Acquity UPLC® H-Class System (Waters®) com detecção em massas (SQD 2 Detector, Waters®). Durante a validação, os analitos foram separados em uma coluna cromatográfica C18 BEH (2,1 mm \times 100 mm; 1,7 μ m) estabilizada à 40°C com eluição em modo gradiente (**Tabela 3**), utilizando uma fase móvel constituída por acetonitrila e solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (v/v, pH 4) na proporção de 10:90 a uma taxa constante de fluxo de 0,3 mL/min. O volume de injeção foi de 10 μ L e o tempo de análise foi de 8 min. O analito, após passar pela coluna cromatográfica, foi analisado por espectrometria de massas (MS) com ionização positiva por electrospray (ESI+). ESI + resultou em QT $[M + H]^+$ com relação massa/carga (m/z) em 303. As condições otimizadas de MS foram definidas como: tensão capilar de 2,00 kV, voltagem do cone de 60 V, temperatura de dessolvatação de 500 °C e vazão do gás de dessolvatação (nitrogênio) de 600 L/ h. Argônio foi usado como gás de colisão.

Tabela 3 – Eluição em modo gradiente, utilizando fase móvel constituída por acetonitrila (ACN) e solução aquosa de ácido fórmico (CH₂O₂) a uma taxa constante de fluxo (0,3 mL/min).

Tempo (min)	% ACN	%CH ₂ O ₂
Inicial	10,0	90,0
0,20	10,0	90,0
3,00	50,0	50,0
6,00	50,0	50,0
6,50	10,0	90,0
8,00	10,0	90,0

4.5.1 Curva analítica e linearidade

A curva de calibração foi construída a partir de soluções de QT em metanol na faixa de 20,1 a 251,25 ng/mL, em triplicata. Essas soluções foram obtidas a partir de uma solução mãe de QT em metanol, na concentração de 10,5 µg/mL.

4.5.2 Seletividade

Seletividade do método analítico consiste em identificar ou quantificar o analito de interesse, de modo evidente, sem que haja interferência nessa análise de outros componentes presentes na amostra ou impurezas ou componentes da matriz (ANVISA, 2017). A seletividade foi realizada em relação ao filtrado da NE sem QT.

4.5.3 Precisão e Exatidão

A precisão consiste em avaliar a proximidade entre medidas realizadas na mesma amostra, sendo expressa pela dispersão dos resultados por meio do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV).

A precisão foi determinada em dois níveis. A repetibilidade (intradia) em que as medidas foram obtidas sob as mesmas condições analíticas em um curto período de tempo e a precisão intermediária (interdia) na qual as análises foram realizadas em 3 dias diferentes. As precisões intra e interdia foram avaliadas pelo CV, segundo a equação 2:

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde,

DP é o desvio padrão; CMD é a concentração média determinada;

Já a exatidão é definida como a proximidade do resultado obtido com o valor real e foi calculada por meio da relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme equação 3:

$$Exatidão = \frac{CMO}{CT} \times 100$$

(Eq 3)

Onde,

CMO é a concentração média obtida; CT é a concentração teórica;

Tanto para a análise da exatidão como da precisão foram consideradas 3 concentrações: baixa (52,5 ng/mL); média (105 ng/mL) e alta (251,25 ng/mL) com 3 réplicas em cada nível que estavam dentro do intervalo linear do método analítico.

4.5.4 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de quantificação (LD) é a menor concentração do analito que pode ser detectada sob condições experimentais, porém não necessariamente quantificado. Já o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser quantificada sob condições experimentais, com exatidão e precisão aceitáveis. Esses parâmetros foram determinados expressos pelas seguintes equações:

$$LD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{IC}$$

(Eq. 4)

$$LQ = \frac{10 \cdot \sigma}{IC}$$

(Eq.5)

Onde,

σ é o desvio padrão; IC é a inclinação da curva de calibração do **Item 4.5.1**;

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados pelos valores obtidos pela regressão linear de três curvas analíticas obtidas em um mesmo dia.

4.5.5 Robustez

A robustez é a capacidade do método desenvolvido em permanecer inalterado sob pequenas variações de condições analíticas, sem interferir significativamente nos resultados obtidos. Para avaliar esse parâmetro, foi realizado um planejamento fatorial fracionado (Christian *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2017), com seleção dos seguintes fatores: vazão da fase móvel (V), variação na concentração de ácido fórmico (CH₂O₂) e de acetonitrila (ACN) na fase móvel e temperatura do forno da coluna (T) (Tabela 4). Além disso, tempo de retenção e área foram selecionados como variáveis dependentes, obtendo, portanto, 8 experimentos, conforme Tabela 5.

Tabela 4 – Fatores e níveis investigados no teste de robustez.

Fatores	Unidades	Limites	Nível		Nominal
			(-1)	(+1)	
Vazão da fase móvel (V)	mL/min	± 0,1	0,28	0,32	0,30
% CH ₂ O ₂ (fase móvel)	%	± 0,002	0,098	0,102	0,100
% ACN (fase móvel)	%	± 1	88	92	90
Temperatura da coluna (T)	°C	± 2	38	42	40

Tabela 5 – Planejamento fatorial fracionado com seleção de 4 fatores (n=2⁴⁻¹).

Exp	V	T	% CH ₂ O ₂	% ACN	tr	área
1	0,32	38	0,102	88	y1	z1
2	0,28	38	0,102	92	y2	z2
3	0,32	42	0,098	88	y3	z3
4	0,28	42	0,102	88	y4	z4
5	0,28	38	0,098	88	y5	z5
6	0,32	38	0,098	92	y6	z6
7	0,28	42	0,098	92	y7	z7
8	0,32	42	0,102	92	y8	z8

Legenda: *vazão da fase móvel (V), temperatura do forno (T), variação nas concentrações de solvente na fase móvel (% CH₂O₂ e ACN), tempo de retenção (tr).

4.6 Avaliação da eficiência de encapsulamento da QT na NE

A EE de QT foi realizada por método indireto. A NE-QT foi centrifugada a 5000xg por 2 minutos no sistema de filtração Microcon, com membrana de ultrafiltração de corte de massa molar de 10 KDa (Millipore®). O filtrado foi diluído em EtOH, e quantificado por UV-vis. No caso da quantificação por UPLC-MS, a diluição foi realizada em metanol. EE foi calculada por meio das equações a seguir:

$$\%QT_{\text{n\~{a}o encapsulado}} = \frac{[Quercetina]_{\text{filtrada}}}{[Quercetina]_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

$$EE(\%) = 100 - QT_{\text{n\~{a}o encapsulada}} \quad (\text{Eq. 7})$$

4.7 Caracterização da NEs

4.7.1 Diâmetro médio, PDI e potencial zeta

O tamanho hidrodinâmico (DM) das NEs, o índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta (PZ) foram determinados por espalhamento de luz dinâmico (Dynamic light scattering-DLS). As análises foram realizadas no aparelho NanoSize ZS (Malvern). As amostras foram diluídas em H₂O destilada antes da leitura de DM e PDI. Para PZ, a diluição foi realizada em solução de KCl 1 mM. A estabilidade das amostras mantidas na geladeira (4°C) foi analisada por DLS em diferentes dias.

4.7.2 Avaliação do pH e condutividade eletrolítica das NEs

O valor de pH das formulações foi avaliado na temperatura ambiente (25,0 ± 2,0 °C), em um pHmetro (mPA-210, Ms Tecnoyon), utilizando um eletrodo de vidro previamente calibrado com dois tampões padrões em pH 4,0 e 7,0. O eletrodo foi aplicado diretamente nas

NEs, sem diluição prévia. A condutividade das NEs foi avaliada na temperatura ambiente (25,0 ± 2,0 °C), utilizando o condutivímetro MA52 (Marconi).

4.8 Microscopia eletrônica de transmissão

A morfologia da NE-QT foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Para isso, uma gota da nanoemulsão previamente diluída foi gotejada em um gride de cobre revestido com carbono, formando um filme fino. Esse filme foi corado negativamente pela adição de uma gota de ácido fosfotúngstico a 1% (p/v). Após 5 min, as análises foram realizadas em um microscópio eletrônico de transmissão JEM-200 CX (JEOL) em 80kV.

4.9 Atividade antioxidante pelo método do DPPH

O efeito antioxidante de diferentes amostras foi avaliado *in vitro* pela reação com o radical livre DPPH, seguindo o método de Sharma *et al.* (2017), com modificações que foram padronizadas pelo grupo de pesquisa envolvido nesse projeto. Esse método se baseia em um processo de oxirredução em que DPPH é reduzido para DPPH-H, levando a alteração da coloração roxo para amarelo (Pires *et al.*, 2017)

Para esse ensaio, preparou-se uma solução de DPPH (3333,33 µM) em metanol e as amostras de NE-QT, NE e QT livre foram diluídas em metanol na faixa de concentração de 0,5 a 40 µg/mL. A quercetina livre foi utilizada como controle padrão, o branco (metanol+H₂O) foi preparado para representar o meio das amostras nos poços e o controle, que continha 100 µl de DPPH e 100 µl de metanol, foi usado para comprovar a ocorrência de reação no experimento.

Na placa de 96 poços, foram adicionados 100 µL de cada amostra com 100 µL de DPPH. As placas foram agitadas por 30 min e lidas em espectrofotômetro SpectraMax® (Molecular Devices) no comprimento de onda 515 nm (Gaba *et al.*, 2019). Um gráfico de atividade antioxidante foi construído com base na capacidade de sequestro do radical DPPH pelas amostras. Posteriormente, um gráfico logarítmico permitiu obter o EC₅₀, que é a concentração necessária da amostra estudada para obter um efeito antioxidante de 50%.

A equação (Catenia *et al.* 2015; De Vargas *et al.*, 2016) utilizada para o cálculo da porcentagem de atividade antioxidante foi:

$$\% \text{ Atividade antioxidante} = 100 - \left(\frac{Abs_{Amostra} - Abs_{Branco}}{Abs_{controle}} \times 100 \right) \quad (\text{Eq. 8})$$

onde $Abs_{Amostra}$ é a absorbância de NE-QT, NE ou QT livre; Abs_{Branco} é a absorbância do branco (metanol+H₂O); $Abs_{controle}$ é a absorbância da solução de controle da reação (metanol+solução de DPPH).

4.10 Avaliação da atividade inibidora de tirosinase

Esses ensaios foram realizados para avaliar o potencial de ação clareadora da nanoemulsão com e sem quercetina, visto que a ação despigmentante seria resultante da inibição da tirosinase que catalisa a transformação de L-tirosina em L-DOPA e de L-DOPA em dopaquinona. A inibição dessa enzima leva, conseqüentemente, a uma diminuição na produção de melanina (Cui *et al.*, 2018; Qu *et al.*, 2020).

Os experimentos seguiram o protocolo de Cui *et al.* (2018) com algumas modificações. Em uma placa de 96 poços, adicionou-se 40 µL de L-DOPA (10 mM) com 40 µL de tampão fosfato (0,1 M, pH= 6,8). Em seguida, foram adicionados 80 µL da amostra (NE-QT, NE ou QT livre) na concentração de 5 µg/mL e 40 µL de solução de tirosinase (250 U/mL, em tampão), dissolvidos em tampão fosfato (pH= 6,8). A solução de QT (100 µg/mL) foi preparada em 0,2% (p/v) DMSO. A mistura foi incubada por 10 min a 36 ± 1°C e a absorbância foi determinada, após 30 min, em leitor de placas no comprimento de onda de 475 nm referente à formação de dopacromo, produto da dopaquinona (Moonrugsee *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2015). As medidas foram realizadas em triplicata. O mesmo procedimento foi realizado utilizando diferentes concentrações de ácido kójico, como controle positivo. Tampão fosfato (PBS) com e sem DMSO foi utilizado como branco.

A atividade da tirosinase foi calculada, de acordo com a equação de Kim *et al.* (2018) e Jung *et al.* (2019), com algumas adaptações:

$$\% \text{ Inibição tirosinase} = \left(\frac{1 - (A - B)}{(C - D)} \right) \times 100$$

(Eq. 9)

onde A é a absorbância da amostra; B é a absorbância do controle da amostra (amostra+PBS+L-DOPA); C é a absorbância do controle do meio reacional (L-DOPA, PBS e tirosinase); D é a absorbância de L-DOPA e PBS.

4.11 Ensaio HET-CAM (Hen's Egg Test-Chorioallantoic)

O teste de irritação *in vitro* é um método alternativo à ensaios que envolvam animais, como o teste de Draize, e que possui características de um modelo ocular. Além de não envolver animais, o HET-CAM permite redução de tempo e custo para a análise do potencial irritante de diversos compostos (Cazedey, Carvalho, Fiorentino *et al.*, 2009). Nesse ensaio, realizado em colaboração com a Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro da FCFRP, avaliou-se semi-quantitativamente em membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha, o potencial irritante das seguintes amostras: NE-QT; NE; QT solubilizada em DMSO 1%/OL; DMSO 1%/OL; solução de Lauril Sulfato de Sódio (SDS) 1,0% como controle positivo, e NaCl 0,9%, como controle negativo. No 10º dia de incubação, a casca do ovo foi retirada e a membrana interna lavada com solução salina 0,9%. Em seguida, 300 µL de cada amostra citada anteriormente foi adicionada à membrana corioalantóide do ovo e comparada com o controle positivo, SDS 1,0%, que é considerado irritante e, com o controle negativo, NaCl 0,9%, considerado não irritante. As amostras foram mantidas em contato com a membrana para avaliar efeitos irritantes de hiperemia, hemorragia e coagulação e foram atribuídas a essas amostras uma pontuação referente ao aparecimento dos fenômenos em relação ao tempo como apresentado na **Tabela 6** permitindo, portanto, a classificação da NE-QT em relação ao seu poder de irritação, de acordo com a **Tabela 7** (ANVISA, 2012; Dario *et al.*, 2016).

Tabela 6 – Pontuação referente as alterações observadas na membrana corioalantoide de ovo embrionário de galinha.

Reação	Tempo		
	$t \leq 30s$	$30s < t \leq 2 \text{ min}$	$2 \text{ min} < t \leq 5 \text{ min}$
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Tabela 7 – Classificação das amostras em relação ao seu poder de irritação.

Pontuação acumulativa	Avaliação da irritação
0-0,9	Não irritante
1-4,9	Leve
5-8,9	Moderada
9-21	Forte

4.12 Desenvolvimento da formulação tópica e estabilidade preliminar

As NEs incorporadas em gel foram analisadas macroscopicamente com o intuito de verificar possível desestabilização do sistema como precipitação, separação de fases ou modificações na coloração. As amostras foram submetidas ao estudo de centrifugação preliminar à 3000 rpm durante 30 minutos de acordo com o Guia de estabilidade de produtos cosméticos da ANVISA (2004). Foram avaliadas 3 bases tópicas: 1. Emulgel de Sepineo P 600 e Crodamol™ GTCC (triglicerídeos de cadeia média), 2. Gel de Natrosol, 3. Gel de Goma Guar (**Tabela 8**). A escolha da formulação tópica foi baseada em avaliações macroscópicas, como

aparência, cor, pH e centrifugação, conforme sugerido no Guia de Estabilidade de Cosméticos (ANVISA, 2004). Algumas etapas desse processo foram realizadas em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), temperatura de estufa ($36 \pm 1^\circ\text{C}$) e temperatura de geladeira ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 30 dias (dia 1, dia 7, dia 15 e dia 30).

Tabela 8 – Avaliação da incorporação de NE-QT em relação à 3 diferentes bases cosméticas.

Matérias primas % (p/p)	FP1	FP2	FP3	FP4	FP5	FP6
Sepineo P 600	10	10	-	-	-	-
Crodamol TM GTCC	10	5	-	-	-	-
Natrosol	-	-	2	2	2	-
Goma Guar	-	-	-	-	-	2
Propilenoglicol	5	5	-	-	-	-
Glicerina	-	-	3	3	3	3
NE-QT	30	30	30	30	30	30
Metilparabeno	-	-	0,15	-	-	-
Propilparabeno	-	-	0,05	-	-	-
Fenoxietanol e Propil, Etil, Butil e Isobutilparabeno	-	-	-	0,5	0,5	0,5
EDTA dissódico	-	-	-	-	0,1	0,1
H ₂ O	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp

4.13 Avaliação Estatística

Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio padrão (DP). Os dados foram analisados por one-way ANOVA ou Teste T ou Box plot no software GraphPad Prism 5. O programa Minitab versão 18 foi utilizado para a realização do Box-Behnken e os testes de pareto.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Solubilidade da quercetina

Tendo em vista que a solubilidade da QT em óleo de oliva (OL) encontrada na literatura está na faixa de 250 μ M a 1000 μ M (Di Mattia *et al.* 2009; Rich *et al.* 2017), avaliou-se diferentes quantidades de QT em OL dentro dessa faixa e acima dela também. Nesse estudo, foi possível verificar por microscopia de luz polarizada, nas amostras contendo 0,9 mg (455 μ M), 1,8 mg (909 μ M) e 11,8 mg (5960 μ M) de QT, presença de cristais de QT (**Figuras 6A, 6B, 6D, 6E**). No entanto, após a adição de EtOH, toda a QT foi solubilizada, inclusive na maior concentração (**Figuras 6D e 6F**). Portanto, a solubilidade máxima encontrada foi de 11,8 mg de QT na mistura de 6,55 mL de OL e 4,25 mL de EtOH, após agitação de 24 h. Dessa forma, optou-se por utilizar EtOH na preparação das nanoemulsões com o objetivo de aumentar a solubilidade da QT e conseqüentemente o seu encapsulamento. Além disso, o etanol atua como um co-tensioativo e promotor de penetração (Ren *et al.*, 2018; Elfiyani *et al.*, 2017).

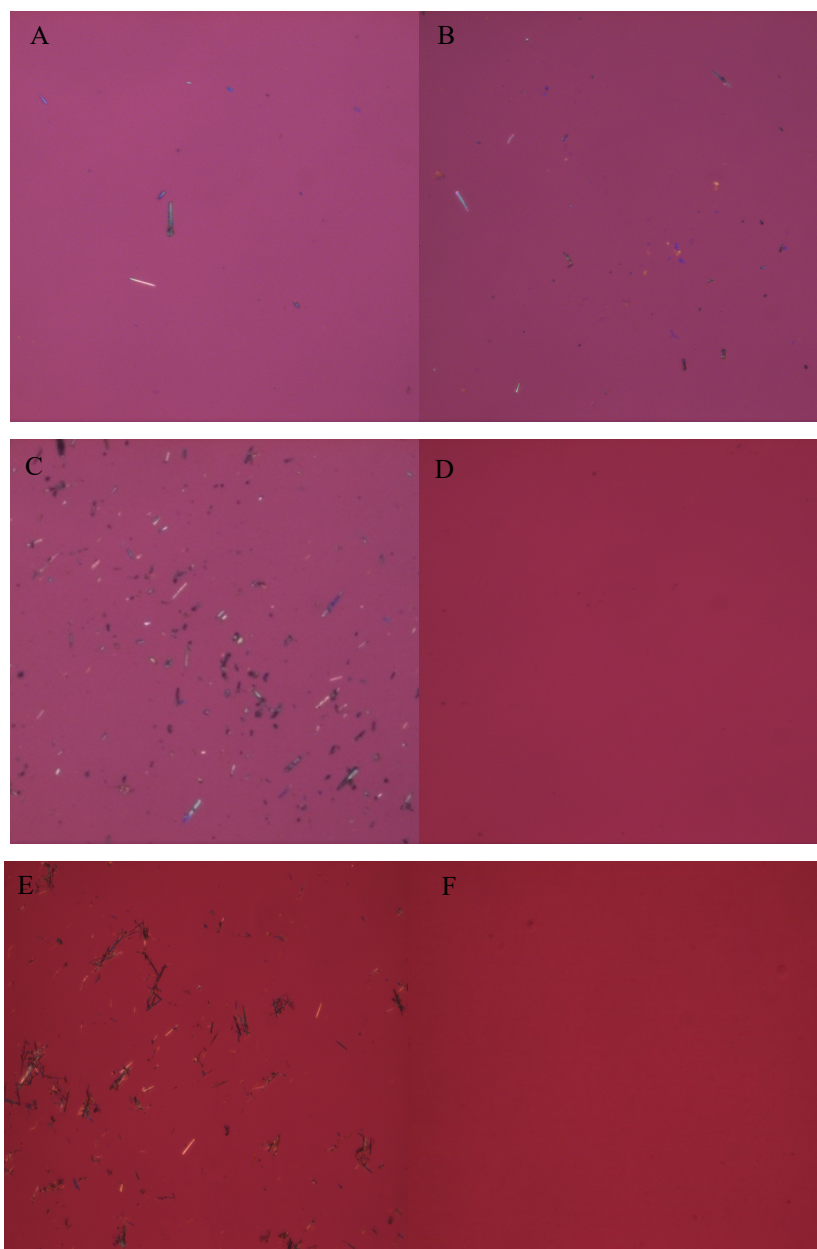


Figura 6 – Fotomicrografias de amostras de quercetina (QT) em 6,55 mL de óleo de oliva sob microscopia de luz polarizada. A: 0,9 mg de QT. B: 1,8 mg de QT C:11,8 mg de QT. D: 1,8 mg de QT e 1,25 mL de EtOH. E: 11,8 mg de QT e 1,25 mL de EtOH. F: 11,8 mg de QT e 4,25 mL de EtOH.

5.2 Preparação da nanoemulsão O/A

5.2.1 Ensaio piloto

Considerando que o EHL mínimo requerido para a formação de NE O/A é 8 e o EHL requerido para OL é 7,7 (Zhang *et al.*, 2014, Komaiko e McClements, 2016), o EHL 8 foi escolhido para a formação da NE do presente estudo. Para obter esse EHL foram escolhidos

dois tensoativos, o Span 80 (EHL=4,3) e o Tween 80 (EHL=15), pois a mistura desses tensoativos não iônicos, fortalece o filme interfacial da nanoemulsão (Peng *et al.*, 2010; Chong *et al.*, 2018) por meio de ligações de hidrogênio (Peng *et al.*, 2010) com esse filme, impedindo que ocorra instabilidades como o crescimento das NEs por envelhecimento de Ostwald (Chong *et al.*, 2018, Pavoni *et al.*, 2020). Além da mistura conferir estabilidade ao sistema, a característica lipofílica do Span 80 e a hidrofiliabilidade do Tween 80 contribuem sinergisticamente para a homogeneização das fases aquosa e oleosa. (Chong *et al.*, 2018). De acordo com estudos, outra vantagem da mistura de tensoativos é a obtenção de NEs com diâmetros menores, diferentemente de quando há a utilização de apenas um tensoativo (Peng *et al.*, 2010).

Em seguida, avaliou-se a rotação mínima necessária para obter as NEs, sendo verificado que a rotação de 10.000 rpm não foi capaz de formar NE. Dessa forma, optou-se por utilizar a rotação mínima de 14.000 rpm.

Além disso, avaliou-se o melhor tempo de agitação (**Tabela 9**). Pode-se verificar, na **Tabela 9**, que o aumento do tempo de agitação de 10 min para 15 min não resultou em diferença significativa ($p > 0,05$) do diâmetro médio (DM) e do índice de polidispersão (PdI) em relação ao tempo. Assim, foi estabelecido o tempo de 10 min para a formação das NEs.

Tabela 9 – Composição das NEs avaliadas no estudo piloto, valores de diâmetro (DM) e índice de polidispersão.

	%OL	%T80+S80	EHL _{final}	V (rpm)	t (min)	DM (nm)	PdI
F1	10	10	8	14.000	10	164,3	0,259
F2	10	10	8	14.000	15	161,4	0,285

Em seguida, avaliou-se a incorporação de QT nas NEs. As formulações da **Tabela 10** foram preparadas com 5,67% de EtOH que tinha a função de co-solvente de QT nas NEs (Kale e Deore, 2016). A adição de QT provocou um acréscimo de tamanho das NEs em 9 nm, mas não alterou significativamente o PdI ($p > 0,05$) demonstrando a possibilidade da incorporação de QT nas NEs.

Tabela 10 – Avaliação das nanoemulsões (NEs) com 5,67% de EtOH, com e sem quercetina (QT) em relação ao diâmetro (DM) e PDI (n=1).

	%OL	%T80+S80	QT (g)	V (rpm)	DM (nm)	PdI
F3	10	10	-	14.000	290,6	0,177
F4	10	10	0,005	14.000	299,7	0,174

5.2.2 Avaliação preliminar da estabilidade das nanoemulsões do ensaio piloto

Após a centrifugação das NEs do piloto (F3 e F4), foi possível constatar a presença de um filme branco e espesso na parede do tubo de centrifugação, indicando excesso de OL (**Figura 7**). Dessa forma, foi preparada uma formulação com menor porcentagem de OL (5% de OL) (F5). Não foi observado filme nessa formulação, após o teste de centrifugação, sendo, portanto, 5% a quantidade máxima de óleo escolhida para as NEs.

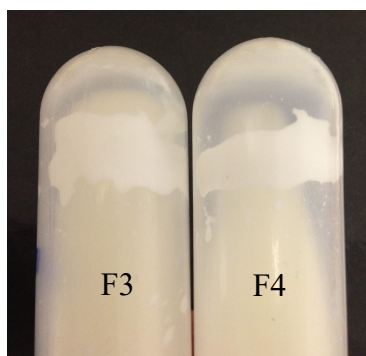


Figura 7 – Filme branco e espesso na parede do tubo de centrifugação das nanoemulsões (NEs) do ensaio piloto (F3 e F4), indicando excesso de óleo de oliva (OL).

5.2.3 Planejamento experimental Box-Behnken

Baseando-se nos resultados dos experimentos pilotos, foi feito um planejamento experimental Box-Behnken, variando-se a porcentagem de OL, de tensoativos (T80+S80) e a velocidade de agitação como mostra a **Tabela 2**. Esse planejamento resultou em 15 NEs que foram avaliadas quanto ao DM e PDI por DLS. Foram obtidas NEs com DM entre 130,7 a 422,5 nm e PDI de 0,211 a 0,376, conforme **Tabela 11**. Esse design experimental seguido de otimização foi realizado para diminuir a quantidade de experimentos a serem realizados, evitando combinações em condições extremas e também para reduzir uso de matéria-prima, evitando desperdícios (Ferreira, Bruns e Ferreira *et al.*, 2007; Yadav, Rastogi e Verma, 2020).

Tabela 11 – Resultados de diâmetro (DM) e índice de polidispersão (PdI) das Nanoemulsões (NEs) obtidos pelo planejamento Box-Behnken nos dias 1 e 15 (n=1).

NE _s	Dia 1		Dia 15	
	DM (nm)	PdI	DM (nm)	PdI
1	165,3	0,223	161,3	0,238
2	264,4	0,254	422,5	0,376
3	130,7	0,239	145,3	0,336
4	198,5	0,225	182,8	0,228
5	145,7	0,261	146,0	0,247
6	238,4	0,259	253,4	0,241
7	129,9	0,249	134,5	0,275
8	214,2	0,247	211,8	0,251
9	221,4	0,241	218,7	0,341
10	152,7	0,230	152,1	0,213
11	215,3	0,238	219,8	0,258
12	157,0	0,245	161,5	0,231
13	182,7	0,222	206,8	0,229
14	162,0	0,221	168,1	0,218
15	159,6	0,214	160,6	0,211

Para todas essas NEs, foi padronizado tempo de 10 min de homogeneização, incorporação de 5 mg de QT e adição de 5,67% de EtOH na formulação. Além disso, como mostra os dados da **Tabela 11**, há uma diferença significativa de DM e PdI obtidos no dia 15 em relação ao dia 1 ($p < 0,05$), devido ao processo de estabilização das NEs. Por essa razão, as variáveis independentes foram analisadas em relação às variáveis dependentes (DM e PdI) do dia 15, conforme o gráfico de Pareto da **Figura 8**. Nele, pode-se observar que as variáveis porcentagem de OL (A), porcentagem do par de tensoativos (B) e a interação entre essas variáveis (AB) influenciaram significativamente ($p < 0,05$) no DM das NEs. Já para o PdI, a porcentagem do par de tensoativos e a interação AB foram significativas enquanto que a velocidade de agitação (C) não foi significativa para nenhuma das respostas ($p > 0,05$).

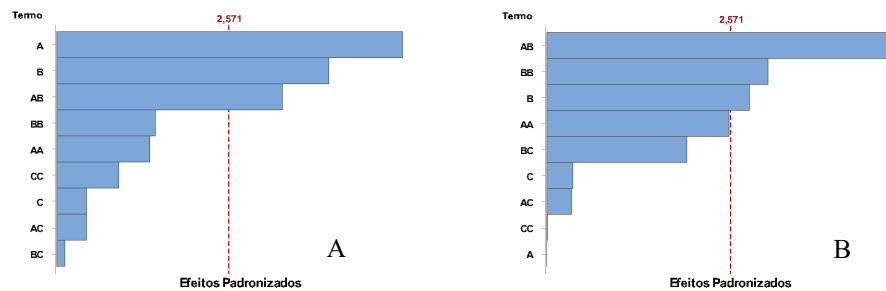


Figura 8 – Gráficos de Pareto dos efeitos das variáveis independententes (A: porcentagem de óleo de oliva; B: porcentagem do par de tensoativos; C: velocidade de agitação) e suas interações (AB: porcentagem de óleo de oliva e do par de tensoativos) em relação A) ao diâmetro e B) Pdl.

No gráfico de superfície de resposta (**Figuras 9A e 10A**), pode-se observar que quanto maior a quantidade de OL, maior o DM assim como verificado nos estudos de Ren *et al.* (2018) e Yukuyama *et al.* (2019) e maior Pdl das partículas ($p > 0,05$). O maior teor de OL aumenta a fase interna, diminuindo a força de cisalhamento, o que leva a um aumento na viscosidade do meio que torna difícil reduzir o tamanho das nanopartículas (Mehmood, Ahmad, Ahmed *et al.*, 2017). Já a maior quantidade do par de tensoativos Tween 80-Span 80 resultou em menores tamanhos e Pdl (**Figuras 9C e 10C**), pois a combinação desses tensoativos diminuiu a tensão interfacial do sistema, reduzindo o diâmetro dos glóbulos (Gupta *et al.*, 2016; Nastiti *et al.*, 2017) e mantendo o sistema mais homogêneo. Em relação à velocidade de agitação (V), não houve influência significativa ($p > 0,05$) para DM e Pdl (**Figura 9B, 9C, 10B e 10C**).

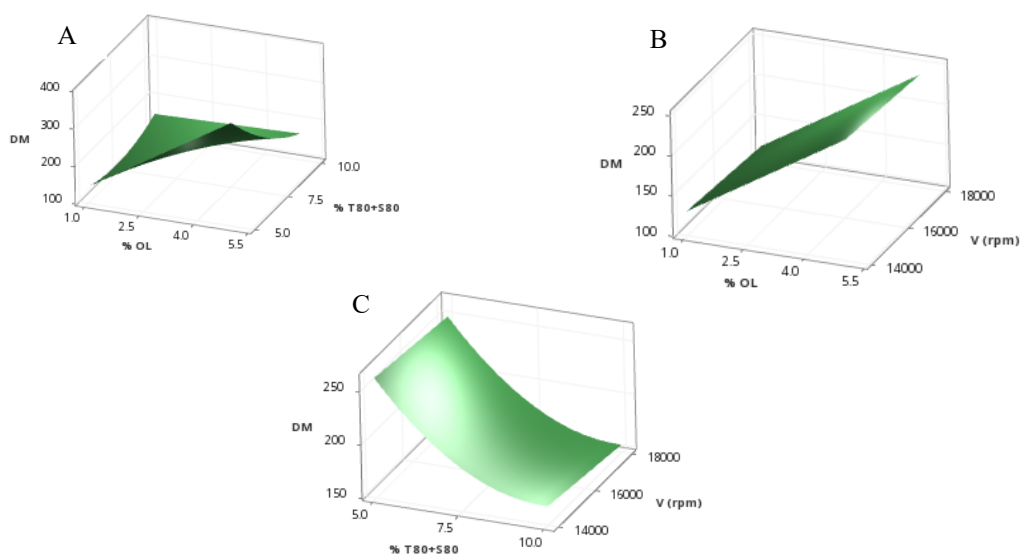


Figura 9 – Gráficos de superfície de resposta de diâmetro (DM) em relação às variáveis: porcentagem de óleo de oliva (OL), teor do par de tensoativo Tween 80+Span 80 (T80+S80) e velocidade de rotação (V).

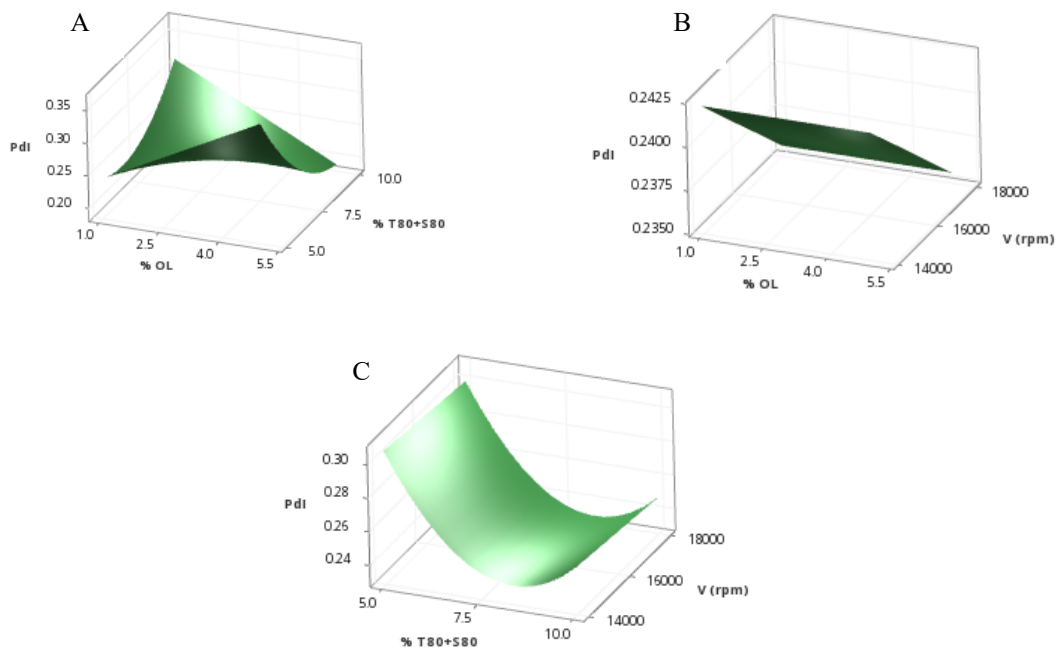


Figura 10 – Gráficos de superfície de resposta de Pdl em relação às variáveis: porcentagem de óleo de oliva (OL), teor do par de tensoativo Tween 80+Span 80 (T80+S80) e velocidade de rotação (V).

De acordo com os dados experimentais do Box-Behnken (**Tabela 11**), as equações do modelo para o diâmetro e Pdl podem ser escritas da seguinte forma:

$$\begin{aligned} DM = & -760 + 108,3 X_1 - 53,4 X_2 + 0,128 X_3 + 5,98 X_1^2 \\ & + 4,09 X_2^2 - 0,000004 X_3^2 - 11,18 X_1 * X_2 - 0,00188 X_1 * X_3 + 0,00041 X_2 * X_3 \end{aligned} \quad (\text{Eq. 10})$$

$$\begin{aligned} Pdl = & 1,059 + 0,0593 X_1 - 0,1531 X_2 - 0,000038 X_3 + 0,00849 X_1^2 + 0,00659 X_2^2 \\ & + 0,000000 X_3^2 - 0,01230 X_1 * X_2 - 0,000001 X_1 * X_3 + 0,000005 X_2 * X_3 \end{aligned} \quad (\text{Eq.11})$$

onde X_1 é óleo de oliva (OL); X_2 é a mistura de Tween 80 e Span 80 (T80+S80); X_3 é a velocidade de agitação(V).

Os modelos matemáticos e as interações entre os fatores para as respostas de DM e Pdl estão na **Tabelas 12 e 13**, respectivamente. A falta de ajuste apresentou valor não significativo ($p > 0,05$), indicando que os modelos matemáticos utilizados para os cálculos de regressão são adequados para explicar as variações observadas para as respostas. Nessas tabelas, valor de

$p < 0,05$ indica os fatores e interações significativos ao passo que valor de $p > 0,05$ indica que o fator não é significativo, como no caso de velocidade de agitação e suas interações.

Tabela 12 – Análise de estatística das variáveis independentes e suas interações em relação à resposta DM.

Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Valor-P
Modelo	9	65925,2	7325,0	6,66	0,025
Linear	3	47543,3	15847,8	14,41	0,007
OL	1	29209,4	29209,4	26,56	0,004
T80+S80	1	18107,0	18107,0	16,47	0,010
V	1	226,8	226,8	0,21	0,669
Quadrado	3	5627,7	1875,9	1,71	0,280
OL* OL	1	2115,7	2115,7	1,92	0,224
(T80+S80) * (T80+S80)	1	2408,0	2408,0	2,19	0,199
V *V	1	946,7	946,7	0,86	0,396
Interação com 2 Fatores	3	12754,1	4251,4	3,87	0,090
OL* (T80+S80)	1	12510,4	12510,4	11,38	0,020
OL*V	1	226,5	226,5	0,21	0,669
(T80+S80) *V	1	17,2	17,2	0,02	0,905
Erro	5	5498,2	1099,6		
Falta de ajuste	3	4268,7	1422,9	2,31	0,316
Erro puro	2	1229,5	614,7	-	-
Total	14	71423,3			

Legenda: * grau de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ); quadrados médios (QM); óleo de oliva (OL); mistura de Tween 80 e Span 80 (T80+S80), velocidade de agitação (V), $p < 0,05$: significativo, $p > 0,05$: não significativo.

Tabela 13 – Análise de estatística das variáveis independentes e suas interações em relação à resposta PdI.

Fonte	GL	SQ	QM	Valor F	Valor-P
Modelo	9	0,032995	0,003666	5,52	0,037
Linear	3	0,005344	0,001781	2,68	0,157
OL	1	0,000000	0,000000	0,00	1,000
T80+S80	1	0,005253	0,005253	7,91	0,037
V	1	0,000091	0,000091	0,14	0,726
Quadrado	3	0,009890	0,003297	4,97	0,058
OL* OL	1	0,004258	0,004258	6,41	0,052
(T80+S80) *(T80+S80)	1	0,006270	0,006270	9,45	0,028
V* V	1	0,000000	0,000000	0,00	0,988
Interação com 2 Fatores	3	0,017760	0,005920	8,92	0,019
OL*(T80+S80)	1	0,015129	0,015129	22,79	0,005
OL*V	1	0,000081	0,000081	0,12	0,741
(T80+S80) *V	1	0,002550	0,002550	3,84	0,107
Erro	5	0,003319	0,000664		
Falta de ajuste	3	0,003154	0,001051	12,77	0,073
Erro puro	2	0,000165	0,000082	-	-
Total	14	0,036314			

Legenda: * grau de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ); quadrados médios; óleo de oliva (OL); mistura de Tween 80 e Span 80 (T80+S80), velocidade de agitação (V), $p < 0,05$: significativo, $p > 0,05$: não significativo.

Embora o modelo matemático de DM tenha apresentado um alto R^2 (0,9230), o valor de R^2 ajustado foi menor (0,7845), o que já era esperado e considerado normal (Fukuda *et al.*, 2018) pelo fato da velocidade de agitação e outras interações não aprimorarem o modelo. Para melhorar o modelo matemático de DM, foram eliminados alguns elementos da resposta, podendo rescrevê-lo da seguinte forma:

$$DM = 267 + 76,3 X_1 - 49,7 X_2 + 6,29 X_1^2 + 4,28 X_2^2 - 11,19 X_1 * X_2$$

(Eq.12)

Com essa alteração, R^2 ajustado (0,8494) ficou mais próximo de R^2 (0,9032). Já em relação ao PdI, o R^2 foi alto (0,9086) e R ajustado menor (0,7441). A equação matemática foi então rescrita:

$$\text{PdI} = 0,467 - 0,01230 X_1 * X_2 - 0,0722 X_2 + 0,0413 X_1 + 0,00659 X_2^2 + 0,00849 X_1^2$$

(Eq.13)

Com essa nova equação da superfície de resposta de PdI, R^2 ajustado (0,7412) ficou mais próximo de R^2 (0,8336).

Nesse contexto, com todos esses modelos matemáticos, pode-se afirmar que para DM as melhores respostas estão relacionadas a OL, T80+S80 e a relação OL-T80+S80 (**Tabela 12**). Já para PdI, as variáveis mais significativas são T80+S80 e OL-T80+S80 (**Tabela 13**).

Posteriormente, a otimização da formulação (**Figura 11**) foi realizada a partir dos resultados do planejamento Box-Behnken, por meio do software Minitab e considerando DM de 200 nm e PdI com valor mínimo. O DM de 200 nm foi escolhido como alvo por se tratar de um tamanho que tem potencial para permitir a penetração de QT na pele, sendo que essa penetração depende de vários fatores, dentre eles a alta área de superfície e baixa tensão superficial da nanoemulsão (Marzuki *et al.*, 2019). Além disso, foi selecionado valor mínimo de PdI com o objetivo de obter uma formulação mais homogênea. Nesse contexto, com a seleção do alvo em 200 nm e mínimo PdI, as quantidades otimizadas para a NE podem ser observadas na **Figura 11**. Nessa otimização, a porcentagem de OL sugerida foi de 5 %, pois esse valor permite a formação de NEs e, de acordo com o estudo de Ren *et al.* (2018), essa porcentagem forma NEs mais estáveis do que as preparadas com 3% ou 1% de OL, diminuindo o envelhecimento de Ostwald. Além disso, o uso de 5% de OL é frequentemente citado nas formulações nanométricas (Ren *et al.*, 2018; Yukuyama *et al.*, 2019, Tungadi e Wicita, 2020).

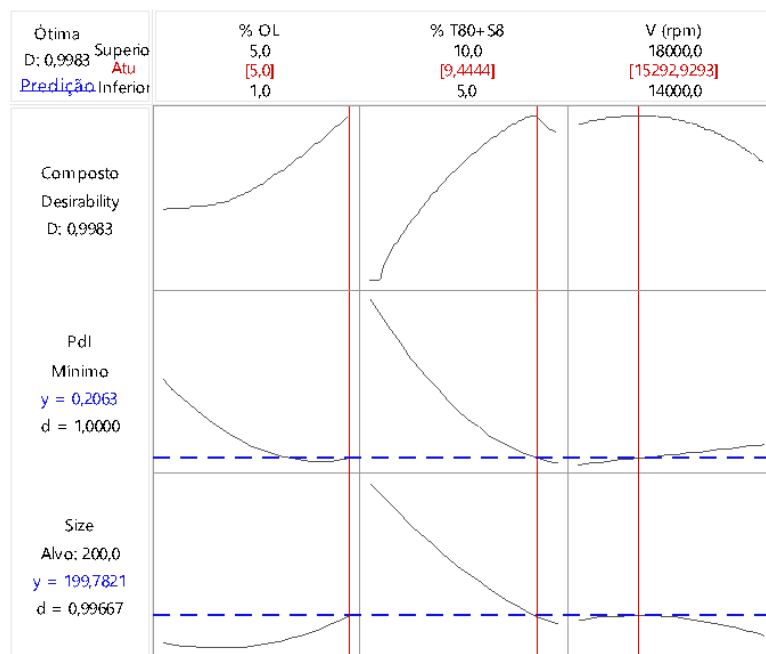


Figura 11 – Otimização do Box-Behnken para as respostas diâmetro (200 nm) e PdI (valor mínimo).

Dessa forma, de acordo com o resultado da otimização do planejamento, partículas de 199,78 nm e com PdI de 0,2 podem ser obtidas com a utilização de 5% de OL, 9,44% de T80+S80 e 15.292,92 rpm de velocidade de agitação no Ultra-Turrax.

5.3 Caracterização das nanoemulsões (diâmetro, PdI, PZ e pH)

Foram preparadas nanoemulsões com e sem QT com base nos resultados do otimizador. As NEs sem QT apresentaram, no dia 1 (24 h após a formação), diâmetro médio de $220,06 \pm 11,23$ nm, PdI de $0,25 \pm 0,05$ e PZ negativo ($-20,7 \pm 1,55$ mV). A incorporação de 5 mg de QT reduziu o diâmetro para 205,4 nm, sem diferença significativa em relação à NE sem QT ($p > 0,05$ vs NE). O PdI (0,248) e potencial zeta ($-16,7$ mV) da NE-QT continuaram próximos aos valores obtidos para as NEs sem QT. Ambas formulações apresentaram perfil de distribuição monomodal e os valores de diâmetro e PdI estavam dentro do valor esperado de (~ 200 nm e PdI próximo de 0,25).

Para avaliar a máxima quantidade de QT que a NE pode carrear com alta eficiência de encapsulamento, além da formulação com 5 mg de QT, foram preparadas também formulações com 10 e 30 mg de QT que foram avaliadas em relação ao DM e PdI. O DM dessas NEs-QT variou na faixa de 176,0 a 205,4 nm com PdI entre 0,237 a 0,248. NE com 30 mg de QT (NE-

QT 1.000 $\mu\text{g/mL}$) apresentou tamanho de 176,0 nm e PDI de 0,237 no dia 1 e PZ negativo (-17,3 mV).

Os valores de DM e PDI de NE-QT nas 3 concentrações de QT avaliadas não foram alterados significativamente após 15 dias de preparo ($p>0,05$) (**Figura 12A**), indicando a estabilidade físico-química dessas dispersões e a possibilidade de se utilizar quantidades maiores de QT, sem modificar o diâmetro e PDI das partículas e sem interferir na estabilidade da formulação.

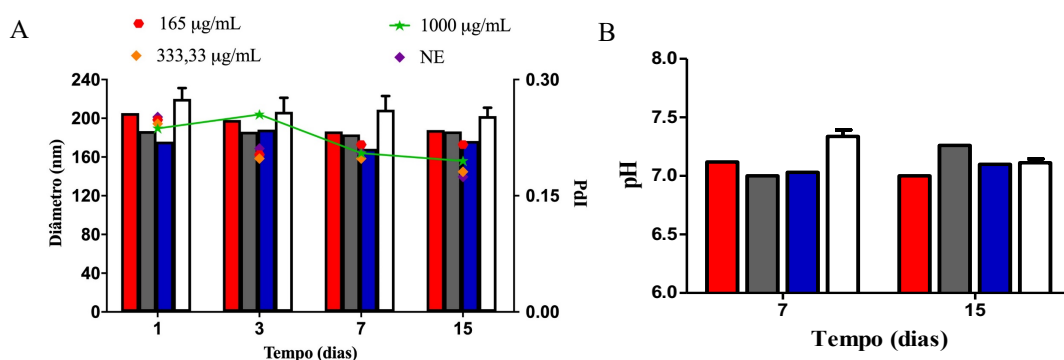


Figura 12 – Estabilidade das nanoemulsões com diferentes quantidades de quercetina (NE-QT 165 $\mu\text{g/mL}$ (barra vermelha), NE-QT 333,33 $\mu\text{g/mL}$ (barra cinza) e NE-QT 1000 $\mu\text{g/mL}$ (barra azul) e sem quercetina (barra branca) por 15 dias em relação ao: A) Diâmetro e PDI; B) pH.

Em relação ao pH das formulações (**Figura 12B**), os valores se mantiveram estáveis entre 7,00 a 7,39 durante os 15 dias, sem diferença significativa entre todos grupos ($p>0,05$).

5.4 Avaliação da estabilidade preliminar

Como mostra a **Figura 13**, não foi observado a formação de filme, após o teste de centrifugação, nas formulações otimizadas contendo 5 mg ($F_{\text{otim.1}}$), 10 mg ($F_{\text{otim.2}}$) e 30 mg de QT ($F_{\text{otim.3}}$) assim como na formulação de NE sem quercetina.



Figura 13 – Formulações otimizadas contendo 5 mg ($F_{otim.1}$), 10 mg ($F_{otim.2}$) e 30 mg de QT ($F_{otim.3}$), após teste de centrifugação.

5.5 Eficiência de encapsulamento da quercetina na nanoemulsão por método indireto

Foi construída a curva analítica de QT pelo método de espectrofotometria no UV-vis (**Figura 14A**). A equação da reta obtida foi $y = 0,0573x - 0,0173$, o coeficiente de determinação (R^2) foi 0,99913 e o coeficiente de correlação (R) 0,995. O coeficiente de correlação obtido indica que o método é linear de acordo com a RDC 166/2017 (ANVISA). Para avaliar a seletividade, foi realizada a medida do filtrado da NE branca, não sendo observado banda de absorção no comprimento de onda da QT (372 nm), indicando que o método é seletivo (**Figura 14B**). Em seguida, foi analisado os filtrados de NE-QT de concentrações 333,33 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$ para avaliar a EE (**Figura 14B**). As concentrações obtidas foram utilizadas nas equações do **Item 4.6**, obtendo eficiência de encapsulamento de 98,36% ($n=1$) e $91,23 \pm 2,76$ % ($n=3$) para NE-QT de concentrações 333,33 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

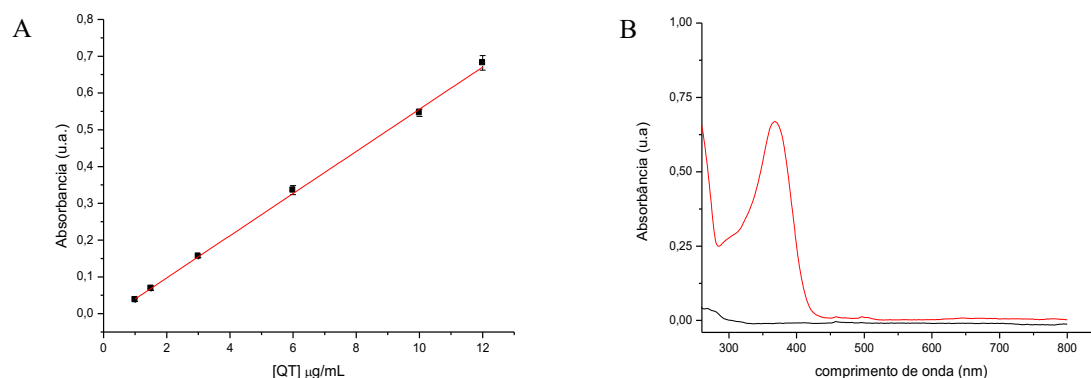


Figura 14 – A) Curva analítica da quercetina (QT), B) Espectro de absorção no UV-vis do padrão de QT de 12 $\mu\text{g/mL}$ (curva vermelha) e do filtrado de nanoemulsão sem QT (curva preta).

Baseando-se nos resultados de DM, PdI, pH, estabilidade por 15 dias e EE, a formulação com 30 mg de QT (NE-QT 1000 $\mu\text{g/mL}$), foi escolhida para a continuidade desse projeto. A NE-QT apresentou aspecto leitoso característico de uma nanoemulsão e cor levemente amarelada devido a presença da quercetina encapsulada (**Figura 15**).

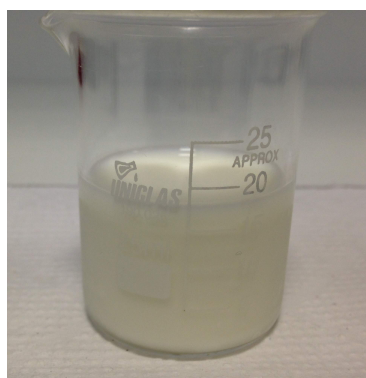


Figura 15 – Formulação de NE com 30 mg de QT (NE-QT 1000 $\mu\text{g/mL}$).

A composição final da formulação otimizada está demonstrada na **Tabela 14**.

Tabela 14 – Nanoemulsão final de óleo oliva contendo quercetina.

NE_{final}	% (p/p)
Tween 80 (T80)	3,27
Óleo de oliva (OL)	5
Span 80 (S80)	6,17
EtOH	5,67
Quercetina (QT)	0,1
H ₂ O	qsp

5.6 Caracterização da nanoemulsão final

5.6.1 Tamanho, Pdl e potencial zeta

Em relação ao diâmetro e Pdl, foi possível verificar que o tamanho da NE-QT se manteve estável ao longo de 180 dias assim como o Pdl ($p > 0,05$). No dia 1, apresentou tamanho de $186,46 \pm 9,06$ nm e Pdl de $0,20 \pm 0,02$ e, após 180 dias, permaneceu estável com tamanho de $183,43 \pm 9,53$ nm e Pdl de $0,19 \pm 0,03$. O perfil de distribuição de diâmetro monomodal dessas formulações foi mantido durante 180 dias, conforme **Figura 16A**. As curvas de correlação desse período na **Figura 16B** indicam um decaimento exponencial suave, sem flutuações na linha de base, com um gradiente que indica que a presença de uma população com baixa polidispersão (Malvern, 2015).

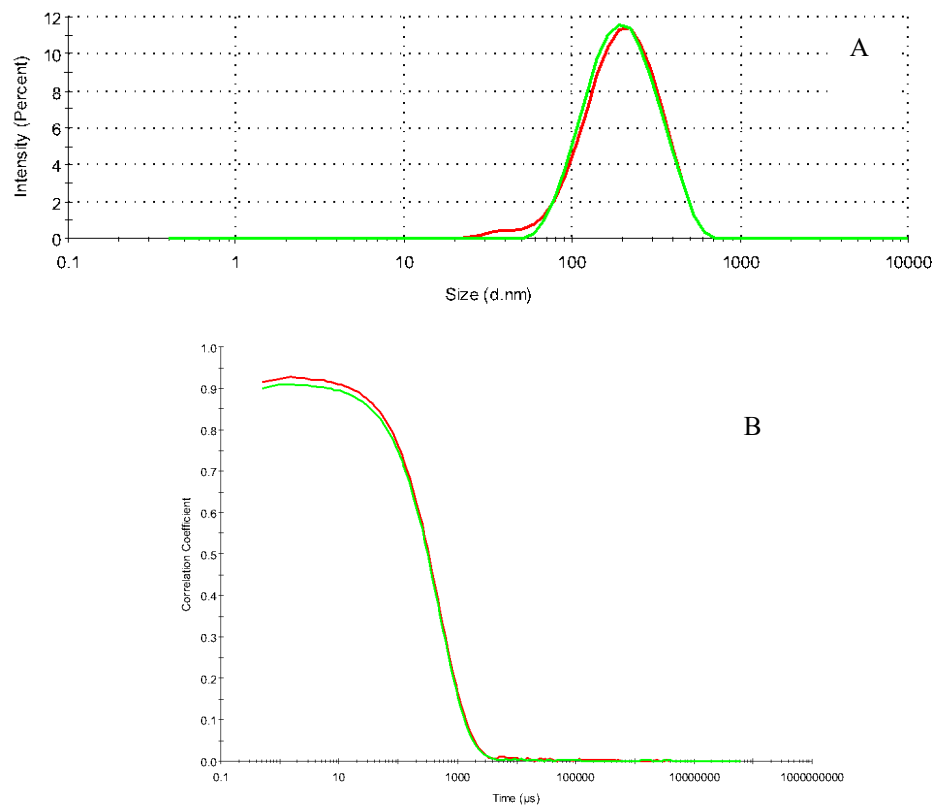


Figura 16 – Perfil de distribuição da nanoemulsão otimizada contendo quercetina: (A) no dia 1 (curva vermelha) após 180 dias do seu preparo (curva verde) (B) Correlogramas de cada dia.

Por meio da comparação da NE sem QT (NE) e a NE-QT, foi verificada pequena diferença significativa ($p < 0,001$) entre estas duas formulações no período de 180 dias. Em relação ao PDI, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) (**Figura 17**). Avaliando todo período, a NE apresentou tamanho médio de $210,23 \pm 11,83$ nm e PDI de $0,20 \pm 0,03$; e a NE-QT apresentou tamanho médio de $188,60 \pm 11,05$ nm e PDI de $0,20 \pm 0,01$. Ambas formulações apresentaram diâmetro dentro do valor esperado (~ 200 nm), com alta estabilidade físico-química durante 180 dias, com PDI menor que 0,3, ou seja, com baixa polidispersão (Danaei *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2018).

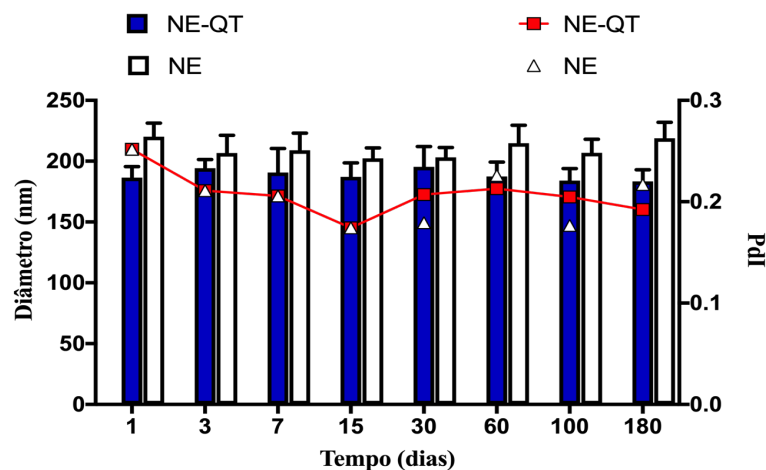


Figura 17 – Estabilidade da NE-QT (1000 µg/mL de QT) (barra azul) e da NE (barra branca) em relação ao Diâmetro e PDI por 180 dias.

A alta estabilidade da NE e NE-QT pode ser atribuída à estabilidade eletroestérica, que é concedida pelos tensoativos não iônicos Tween 80 e Span 80 e pelo valor de potencial zeta verificado por DLS (Kesharwani e Gupta, 2018). O PZ da NE-QT foi negativo ($-17,13 \pm 0,61$ mV) e continuou com valores próximos aos valores de PZ da NE sem QT ($-20,76 \pm 1,55$ mV). Como a NE-QT e NE são estabilizadas por barreira mecânica e elétrica (estabilidade eletroestérica) e não somente por carga, não há um valor ideal de potencial zeta que possa ser correlacionado com sua estabilidade. De acordo com o Fernandes *et al.* (2020), partículas lipídicas estabilizadas por tensoativos não iônicos tendem a ter baixa mobilidade e, portanto, apresentam valores de potencial zeta menores que 30 mv em módulo. Nesse mesmo raciocínio, por se tratar de NE-QT com tensoativos não iônicos, a formulação do presente trabalho apresentou valores menores que 30 mv e foi estável no período avaliado.

5.6.2 pH e condutividade elétrica

O pH da NE-QT final (1000 µg/mL de QT) apresentou média de $7,25 \pm 0,06$, sendo próxima ao pH de $7,21 \pm 0,06$ da NE ($p > 0,05$) e aos valores de pH obtidos ($p > 0,05$) no **Item 5.3 (Figura 18A)**. Esse pH é compatível com nanoemulsões de óleo de oliva da literatura, com pH ao redor de 7,0 (Mohamadi Saani *et al.*, 2019).

A condutividade elétrica indica se a nanoemulsão é do tipo A/O ou O/A. Quando é A/O, a condutividade elétrica é menor que 1 µS/cm. Já valores superiores a 1 µS/cm indicam que é O/A. Esses valores podem variar conforme a condutividade do óleo presente na composição (Kesharwani, P. e Gupta, 2018; Jafari, S. M. e McClements, D.J., 2018). No presente estudo,

NE-QT apresentou condutividade elétrica de $163,96 \pm 8,92 \mu\text{S}/\text{cm}$, que foi próxima à condutividade de $167,66 \pm 5,23 \mu\text{S}/\text{cm}$ da formulação branca (NE) ($p > 0,05$), conforme **Figura 18B**. Baseando-se nos valores encontrados, pode-se afirmar que a NE-QT desse estudo é do tipo O/A e que apresenta pH compatível para aplicação tópica.

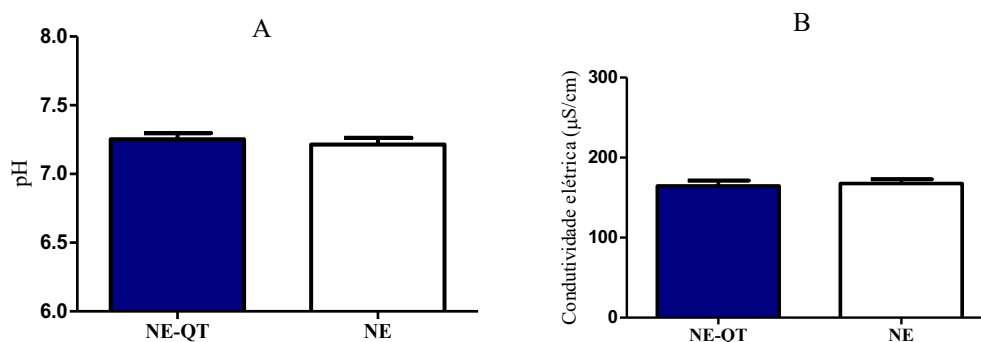


Figura 18 – A) Valor de pH e B) Condutividade da NE-QT final e da NE sem QT; $p > 0,05$ NE-QT vs NE.

5.7 Validação do método analítico por UPLC-MS e avaliação da eficiência de encapsulamento de QT

5.7.1 Curva analítica e linearidade

A linearidade do método foi realizada, levando em consideração 6 concentrações de QT obtendo a seguinte equação da reta $y = 51204,73408x + 66104,6147$, com coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99 ($R^2 = 0,992$) e gráfico de resíduos sem tendência no perfil de distribuição (**Figura 19**). O valor obtido de coeficiente indica a linearidade do método na faixa de concentração avaliada e o gráfico de resíduos mostra o comportamento esperado para a distribuição dos erros.

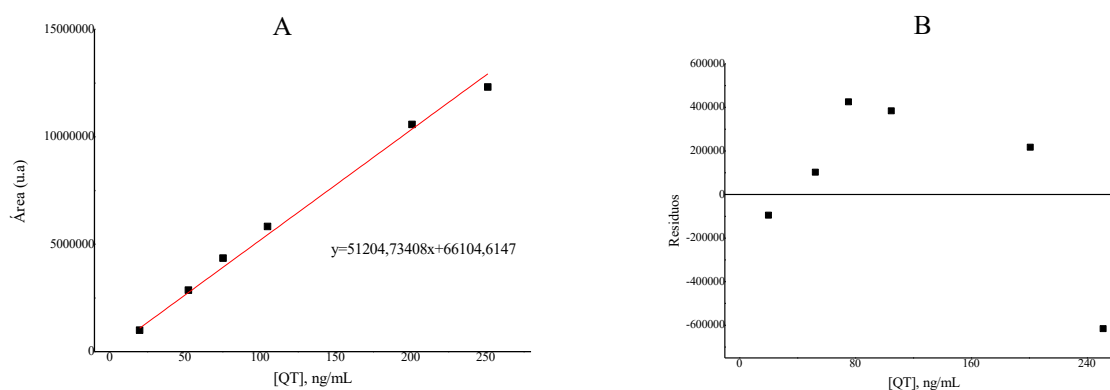


Figura 19 – A) Curva analítica para determinação de QT e B) dispersão dos resíduos da curva.

O tempo de análise foi de 8 min e a QT apresentou pico no tempo de retenção (t_r) de 4,22 min (**Figura 20**).

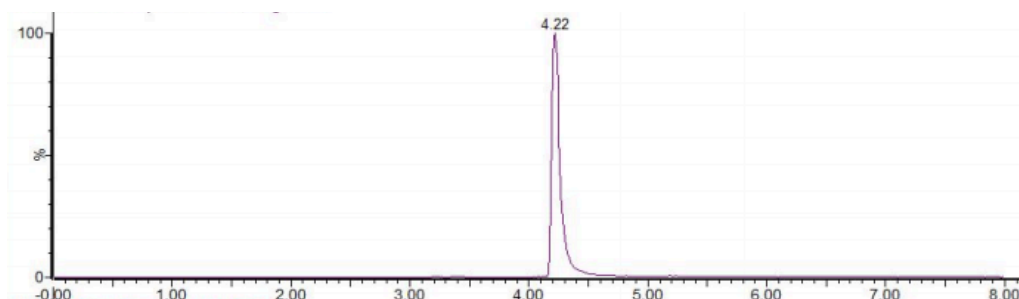


Figura 20 – Cromatograma da quercetina (251,25 ng/mL).

5.7.2 Seletividade

A seletividade do método para QT foi determinada em relação ao filtrado da NE sem QT (cromatograma verde) e comparada aos picos mínimo (cromatograma vermelho) e máximo (cromatograma roxo) de QT. Não foi detectado nenhum pico para o filtrado (**Figura 21**), comprovando a seletividade do método para QT. Dessa forma, o método é seletivo.

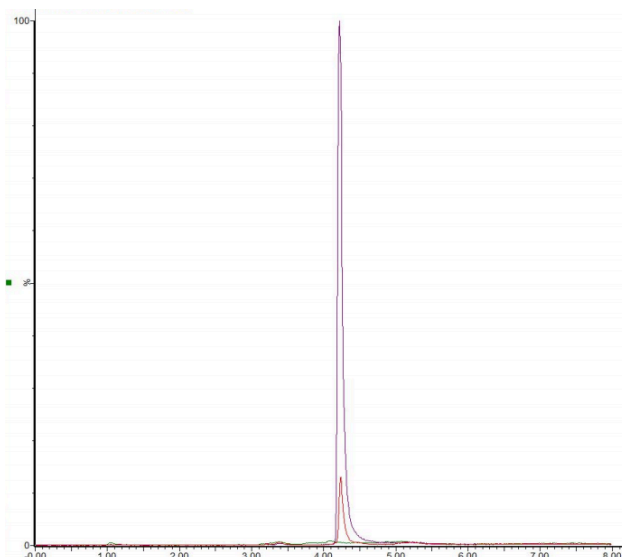


Figura 21 – Seletividade do método para quercetina (QT) em relação ao filtrado da NE sem QT (cromatograma verde) e comparada aos picos mínimo (cromatograma vermelho) e máximo (cromatograma roxo) de QT.

5.7.3 Precisão e Exatidão

Para precisão intra e interdia e para a exatidão, foram consideradas 3 concentrações (baixa, média e alta) com 3 réplicas em cada nível que estavam dentro do intervalo linear do método analítico (**Tabela 15**).

Tabela 15 – Precisão (CV (%)) e Exatidão (%) de soluções de QT utilizadas na validação do método analítico no UPLC-MS.

Conc. teórica (ng/mL)	Precisão intradia				Precisão interdia			
	Conc. média (ng/mL)	DP	CV (%)	Exatidão	Conc. média (ng/mL)	DP	CV (%)	Exatidão
52,5	52,93	4,30	0,8	100,82	53,25	3,31	0,062	101,44
105,00	106,85	0,8	0,008	101,76	107,57	7,75	0,072	102,44
251,25	251,58	2,03	0,008	100,13	252,63	4,67	0,018	100,55

Os valores obtidos estão de acordo com a RE 166 da ANVISA e ICH Q2A (R1) do FDA. Os coeficientes de variação (CV) da precisão intradia como os da interdia não ultrapassaram 5% e a exatidão apresentou valores na faixa aceitável entre 98-104%, como pode ser verificado na **Tabela 15**. A partir desses resultados, pode-se afirmar que o método é preciso e exato.

5.7.4 Limite de detecção e quantificação

Os valores de LD e LQ foram 4,26 ng/mL e 12,90 ng/mL, respectivamente, sendo os valores de LQ abaixo do menor ponto determinado na curva analítica (20,1 ng/mL).

5.7.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada em relação as seguintes variáveis independentes: temperatura da coluna (A), porcentagem de ácido fórmico (CH₂O₂), variação de acetonitrila (% ACN) e fluxo da fase móvel (D). Observa-se de acordo com o gráfico de pareto ($\alpha = 0,05$) da

Figura 22A que o fluxo da fase móvel (D) e a interação da temperatura da coluna com o fluxo da fase móvel (AD) foram significativos para o tempo de retenção ($p < 0,05$). Já em relação à área (**Figura 22B**), entre todas variáveis, apenas a porcentagem de ácido fórmico influencia de forma significativa ($p < 0,05$) esse parâmetro.

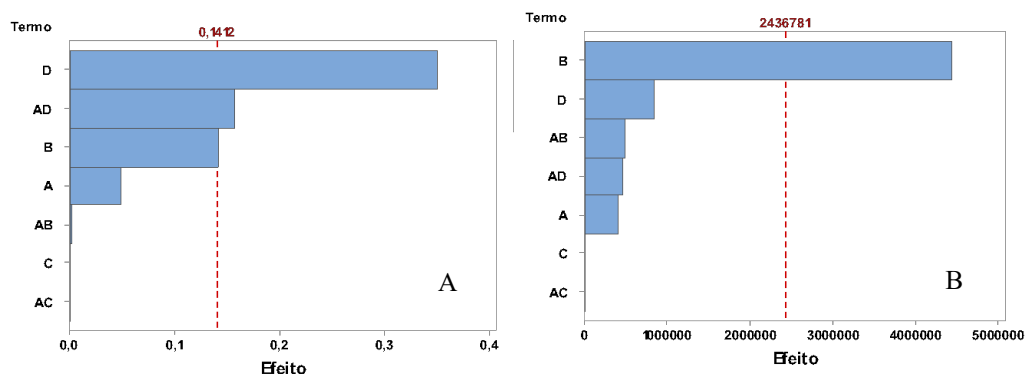


Figura 22 – Gráfico de pareto dos efeitos das variáveis independentes (A: temperatura da coluna; B: porcentagem de ácido fórmico; C: variação de acetonitrila; D:fluxo da fase móvel) e suas interações (AB: temperatura da coluna e porcentagem de ácido fórmico AD) temperatura da coluna e fluxo da fase móvel) no A) tempo de retenção e B) área.

A partir desses resultados, pode-se afirmar que o método é robusto em relação às pequenas variações de temperatura da coluna, porcentagem de ácido fórmico, variação de acetonitrila e fluxo da fase móvel, sendo necessário observar atentamente os termos significativos (Christian *et al*, 2016), já que são fatores críticos para o método.

5.7.6 Eficiência de encapsulamento por UPLC-MS

A EE de encapsulamento da QT em encapsulada na NE final, avaliada por UPLC-MS, foi de $99,62 \pm 0,27\%$ e foi consideravelmente melhor que a EE avaliada por espectrofotometria no UV-vis ($91,23 \pm 2,76\%$), devido à maior sensibilidade do UPLC-MS.

5.8 Microscopia eletrônica de transmissão

A distribuição das NEs-QT pode ser vista na **Figura 23A** enquanto que na **Figura 23B** observa-se o formato esférico dessa nanoestrutura. A população de NE-QT apresentou tamanho que variou de 50,605 nm até 127,801 nm, sendo o tamanho médio de $82,78 \pm 26,90$ nm ($n=25$) de acordo com o histograma da **Figura 23C**. No entanto, esses valores estão abaixo da média de $183,43 \pm 9,53$ nm ($n=3$) obtida por DLS, o que já era esperado, pois há diferenças entre as

medidas de tamanho por DLS e TEM. DLS avalia o comportamento de dispersão e agregação de partículas em solução (Eaton *et al.*, 2017), medindo o tamanho hidrodinâmico, isto é, o diâmetro aparente da partícula mais a camada de hidratação composta pelas cadeias dos tensoativos presentes em sua superfície (Stetefeld *et al.*, 2016; Maguire *et al.*, 2018). Já a análise de TEM avalia medidas de diâmetro das partículas secas, sem a presença de uma camada de hidratação. Dessa forma, é esperado a observação de valores menores de diâmetro de partículas por TEM em comparação aos valores obtidos por DLS (Eaton *et al.*, 2017).

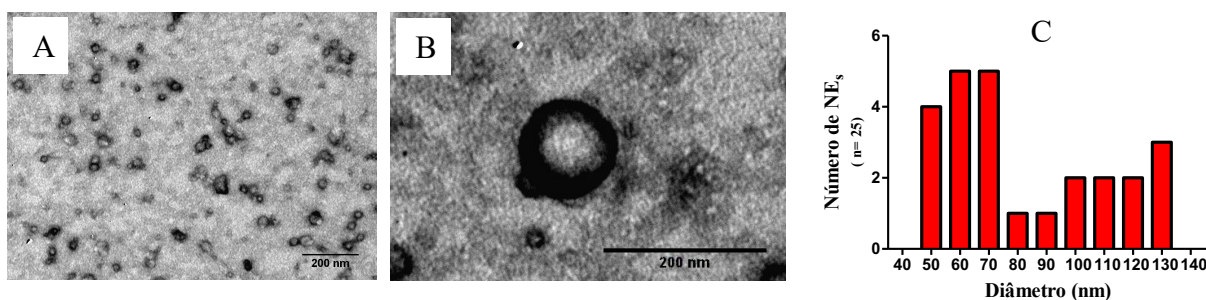


Figura 23 – A) Distribuição das NEs de óleo de oliva contendo quercetina (NEs-QT) em imagem de microscopia eletrônica de transmissão; B) Formato esférico da NE-QT em imagem de microscopia eletrônica de transmissão; C) Distribuição de tamanho da população de nanoemulsão contendo quercetina (n=25).

5.9 Atividade antioxidante pelo método do DPPH

A capacidade de sequestro do radical DPPH por NE-QT, NE e QT livre foi avaliada na faixa de 0,5 a 40 $\mu\text{g/mL}$. Pode-se verificar no gráfico da **Figura 24A** que NE-QT possui alta atividade antioxidante assim como QT livre, com diferença significativa entre as duas amostras nas concentrações de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (** $p < 0,01$), 10 $\mu\text{g/mL}$ (* $p < 0,05$), 20 $\mu\text{g/mL}$ (**** $p < 0,0001$) e 30 $\mu\text{g/mL}$ (** $p < 0,001$), quando utilizado o Teste T para comparar os valores médios e desvios padrão de NE-QT e QT livre. Por Box plots (**Figura 24B**) é possível confirmar essa tendência de maior atividade antioxidante da NE-QT em relação à QT livre, comparando suas médias (símbolos +) e seus intervalos mínimos e máximos.

NE-QT reduziu o DPPH em até $92,44 \pm 1,62 \%$ e apresentou $EC_{50} = 4,113 \mu\text{g/mL}$, segundo o perfil de sequestro do radical DPPH por concentração logarítmica (**Figura 25**). Já QT livre foi capaz de reduzir até $90,54 \pm 0,50 \%$ e apresentou $EC_{50} = 4,300 \mu\text{g/mL}$. O branco (NE), por sua vez, apresentou menor atividade antioxidante, com capacidade máxima de redução de $22,54 \pm 2,91 \%$ e $EC_{50} = 8,904 \mu\text{g/mL}$. Esses valores da NE estão relacionados à

atividade antioxidante do óleo de oliva, que apresenta compostos fenólicos cujos grupos hidroxilas são doadores de hidrogênio.

Desse modo, pode-se verificar a partir dos resultados próximos da NE-QT e da QT livre que a atividade antioxidante e a estrutura funcional da quercetina foi preservada quando incorporada em NE_s (Kumari *et al.*, 2010; Ni *et al.* 2017; Milanezi *et al.*, 2019). Além disso, baseando-se nos resultados da **Figura 24A**, a capacidade antioxidante, isto é, a capacidade de sequestro do radical DPPH por NE-QT é elevada, constatando, portanto, potencial antirradicalar ampliado frente ao DPPH.

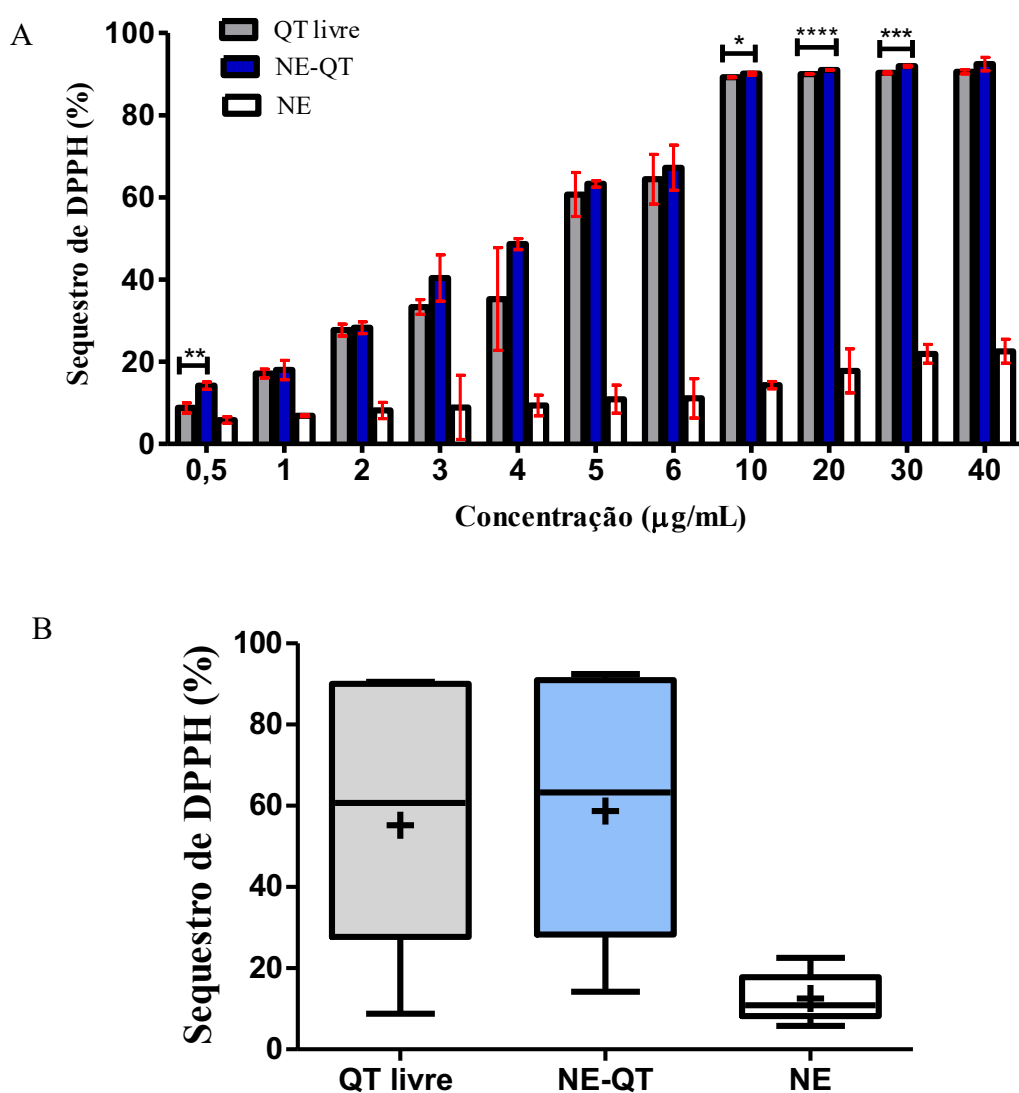


Figura 24 – A) Perfil de atividade antioxidante da QT livre (barra cinza), NE-QT (barra azul) e NE (barra branca) avaliada pelo método de sequestro de DPPH (%) (n= 3), *p<0,05 NE-QT vs QT livre e NE; **p<0,01 NE-QT vs QT livre; ***p<0,001 NE-QT vs QT livre; ****p<0,0001 NE-QT vs QT livre; B) Perfil de atividade antioxidante da QT livre (barra cinza), NE-QT (barra azul) e NE (barra branca) expresso por Box plots.

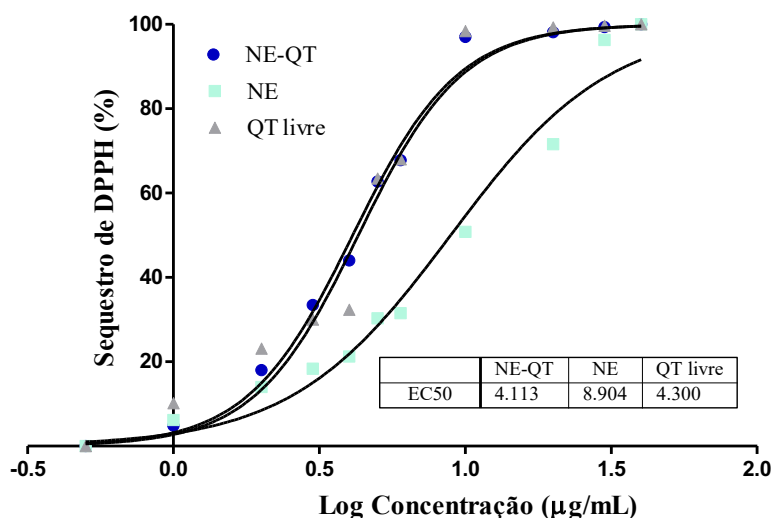


Figura 25 – Perfil de sequestro do radical DPPH em função da concentração logarítmica de NE-QT (●), NE (■) e QT livre (▲).

5.10 Avaliação da atividade inibidora de tirosinase

O ácido kójico, na concentração de 7,1 µg/mL, permitiu a inibição de 79,61 ± 5,86 % de tirosinase, atuando como controle positivo (**p<0,01 NE-QT vs ácido kójico; *** p< 0,001 QT vs ácido kójico). A NE-QT foi capaz de inibir 56,24 ± 3,38 % da tirosinase enquanto QT livre inibiu 20,37 ± 5,94 % da enzima, comparando as duas amostras na concentração de 5 µg/mL (**p<0,01 NE-QT vs QT livre), conforme mostra o gráfico da **Figura 26**.

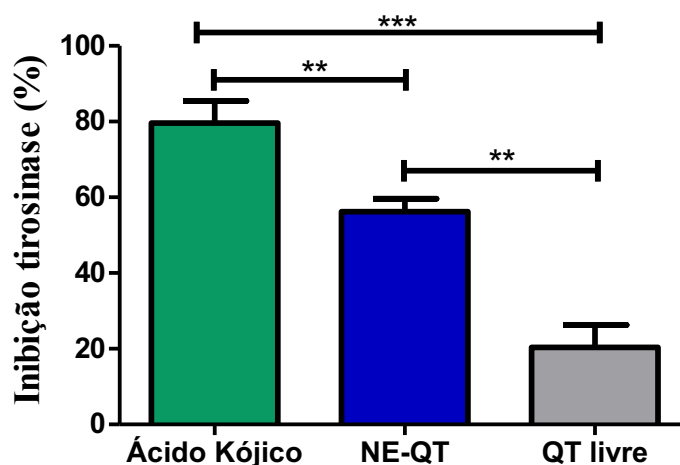


Figura 26– Capacidade inibidora da enzima tirosinase (%) pelo controle ácido kójico (cor verde); NE-QT (cor azul), QT livre (cor cinza); **p<0,01 NE-QT vs ácido kójico e NE-QT vs QT livre; *** p< 0,001 QT vs ácido kójico.

A inibição da tirosinase pela quercetina, de acordo com a literatura (Fan *et al.*, 2017, Lu *et al.*, 2019) acontece, pois há hidroxilas da quercetina que se ligam ao sítio ativo da tirosinase, quelando com o cobre da enzima.

Com esses resultados, foi possível verificar que a incorporação de QT em NE aumenta a capacidade de inibição da tirosinase comparada à QT livre. Desse modo, a inibição da enzima dificultaria a formação de melanina e poderia contribuir no clareamento das manchas escuras do melasma.

5.11 Ensaio HET-CAM

O resultado do potencial irritante da formulação de NE-QT, em membrana corioalantóide de 4 ovos de galinha assim como da NE sem QT, QT em DMSO 1%/OL, DMSO 1%/OL e dos controles positivo (SDS) e negativo (NaCl) são apresentados na **Tabela 16**.

Tabela 16 – Potencial de irritação das amostras no HET-CAM (n=4).

Amostras	Média ± DP	Classificação
NE-QT	0,75 ± 1,50	Não irritante
NE	0 ± 0,00	Não irritante
QT+ DMSO 1%+ OL	0 ± 0,00	Não irritante
DMSO 1%+ OL	0 ± 0,00	Não irritante
SDS 1%	12 ± 0,00	Forte
NaCl 0,9%	0 ± 0,00	Não irritante

Em relação à NE (**Figura 27**), QT em DMSO 1%/OL, DMSO 1%/OL, e controle negativo (NaCl), não houve o aparecimento de hiperemia, hemorragia e/ou coagulação no

período de 5 min na membrana corioalantóide e a pontuação final foi zero para todos os grupos (**Tabela 16**).

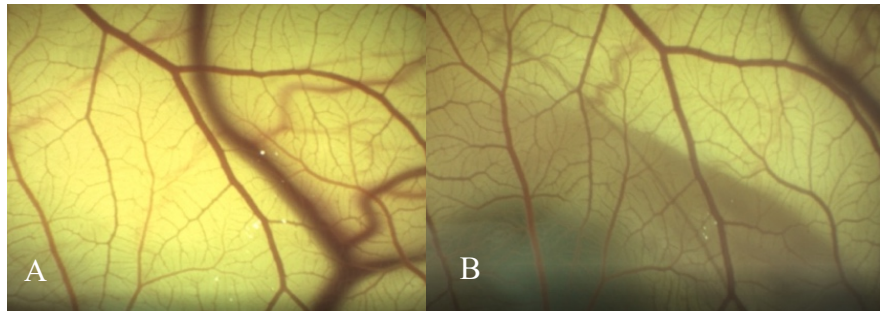


Figura 27 – Avaliação dos efeitos de 0,3 mL de NE na membrana corioalantóide: A) antes da aplicação (tempo 0); B) depois da aplicação (tempo de 5 min).

Em relação à NE-QT (**Figura 28**), de 4 ovos, apenas um sofreu hiperemia, levando a pontuação de $0,75 \pm 1,50$, que é caracterizada como não irritante. (**Tabela 16**).

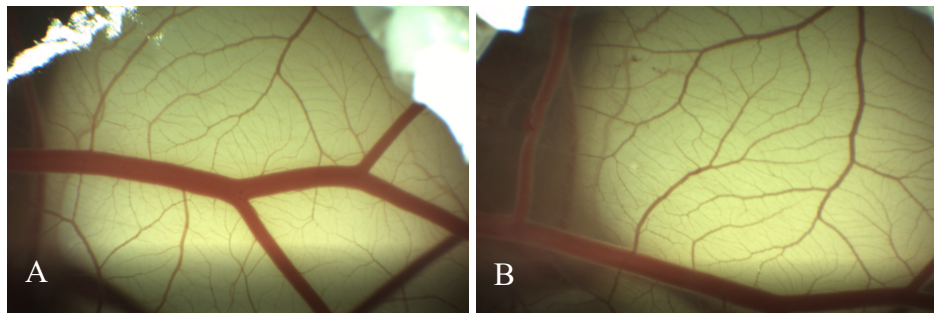


Figura 28 – Avaliação dos efeitos de 0,3 mL de NE-QT na membrana corioalantóide: A) antes da aplicação (tempo 0) e B) depois da aplicação (tempo de 5 min)

Quanto ao controle positivo (**Figura 29**), houve hemorragia e hiperemia até o período de 30 s nos 4 ovos, resultando em uma pontuação média equivalente a 12 (**Tabela 16**), que é classificada como irritante.

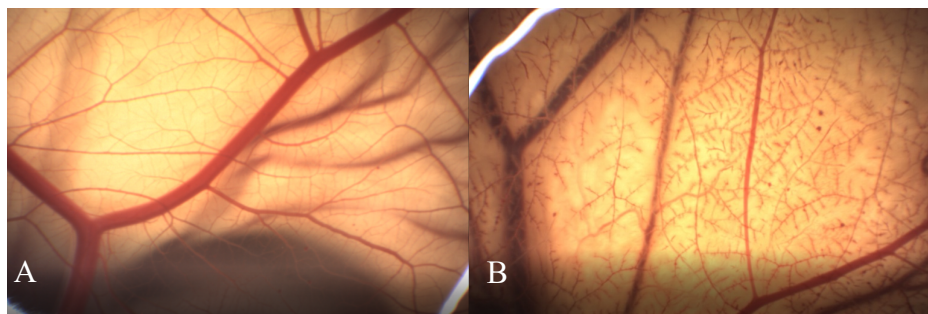


Figura 29 – Avaliação dos efeitos de 0,3 mL de SDS 1% na membrana corioalantóide: A) antes da aplicação (tempo 0) e B) depois da aplicação (tempo de 5 min).

5.12 Desenvolvimento da formulação tópica e estabilidade preliminar

A incorporação de NE-QT foi avaliada em relação à três bases (**Tabela 8**): Emulgel contendo Sepineo P 600 e Crodamol™ GTCC (triglicerídeos de cadeia média); Gel de Natrosol (Hidroxietilcelulose 4400) e Gel de Gomar Guar.

As formulações de NE-QT em emulgel contendo Sepineo P 600 e 10% Crodamol™ GTCC poderiam apresentar toque muito oleoso (FP1), de acordo com a literatura (Martini *et al.*, 2017), mesmo com a redução de triglicerídeos para 5% (FP2) e por esse motivo nenhuma dessas composições foram selecionadas para a continuação do estudo de formulação. Posteriormente, NE-QT passou a ser incorporada em gel de Natrosol a 2%, mas foi verificado em FP3 que os conservantes metilparabeno 0,15% (p/p) e propilparabeno 0,05 % (p/p), com adição à frio, precipitavam na formulação e modificavam a cor da formulação de um amarelo claro para escuro, após 7 dias de análise à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e à $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Esses conservantes sólidos foram substituídos por um conservante líquido Proteg PF (Fenoxietanol, Metilparabeno, Propilparabeno, Etilparabeno, Butilparabeno e Isobutilparabeno) na FP4 (**Figura 30**). Entretanto, mesmo com essa mudança, foi verificado, após 15 dias, modificação da cor da formulação quando armazenada em temperatura de estufa (FP4E), exceto na temperatura ambiente (FP4A) e na temperatura de geladeira ($4 \pm 2^\circ\text{C}$). Esse problema foi superado na formulação FP5 (**Figura 30**), com a adição de EDTA dissódico, pois esse composto atua como quelante de íons metálicos e auxilia na estabilidade e aparência das formulações cosméticas (Lanigan, e Yamarik, 2002). No entanto, após 30 dias de armazenamento, a formulação apresentou separação de fase quando armazenada em estufa e em temperatura ambiente. Dessa forma, optou-se por substituir Natrosol, de caráter não iônico, por Goma guar a 2% (FP6) em função de se tratar de um polímero natural aniônico (Mudgil, Barak e Khatkar, 2014) que não necessita de aquecimento para a formação de gel (Farshi *et al.*, 2019), de fácil incorporação, que se demonstrou mais homogêneo em relação às matérias primas da formulação, que apresenta viscosidade constante em uma ampla faixa de pH (1,0-10,5) (Farshi *et al.*, 2019), que é muito utilizado na área cosmética e , que de acordo com Mukhopadhyay e Prajapati (2015), é uma base compatível com a quercetina.



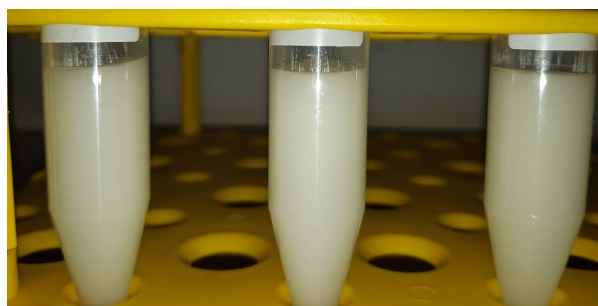
Figura 30 – Formulação gel de hidroxietilcelulose sem EDTA, armazenado à temperatura ambiente (FP4A) , formulação gel de hidroxietilcelulose sem EDTA (FP4E), armazenado à temperatura de estufa (FP4E) e formulação gel de hidroxietilcelulose com EDTA (FP5) , armazenado à temperatura de estufa (FP5), após 15 dias de análise para todas as formulações.

A FP6 foi, portanto, a formulação tópica escolhida (**Tabela 18**), sendo que sua composição pode favorecer a penetração de QT na pele, principalmente em função da contribuição dos excipientes, que alteram a solubilidade e difusividade do estrato córneo (Nastiti *et al.*, 2017). Dentre as matérias primas, glicerina foi utilizada como umectante, pois além de apresentar capacidade de penetração do estrato córneo, as três hidroxilas presentes em sua estrutura química se ligam à água de forma a manter a pele hidratada (Loden e Maibach, 2005; Fevola, 2013). Já o EDTA foi usado para prevenir o escurecimento da formulação (Lanigan, e Yamarik, 2002) como ocorrido na **Figura 30**. O conservante Proteg PF (Fenoxietanol, Metilparabeno, Propilparabeno, Etilparabeno, Butilparabeno e Isobutilparabeno) foi utilizado por seu amplo espectro contra o crescimento de microrganismos, como bactérias e fungos nocivos (Andersen, 2008; ANVISA, 2012; FDA, 2018). Adicionou-se 0,5% desse conservante durante o preparo da formulação tópica, sendo que essa quantidade está de acordo com a RDC n.29/2012, para uso em produtos cosméticos, já que a legislação permite no máximo 1% de fenoxietanol e 0,8% de parabenos (ANVISA, 2012). Além disso, o gel de Goma Guar foi escolhido com base na sua capacidade de dispersar bem a formulação de NE-QT e de ser muito utilizado em cosméticos. A formulação tópica final desenvolvida está descrita na **Tabela 17**.

Tabela 17 – Matérias primas da formulação tópica.

Formulação tópica	% (p/p)
NE-QT	30
Fenoxietanol, Metilparabeno, Propilparabeno, Etilparabeno, Butilparabeno e Isobutilparabeno	0,5
EDTA dissódico	0,1
Glicerina	3
Goma Guar	2
H ₂ O	qsp

A formulação da **Tabela 17** foi preparada em triplicata, submetida a teste preliminar de centrifugação (**Item 4.11**) e não apresentou separação de fases no dia 1 (**Figura 31**).

**Figura 31** – Formulações de gel de Goma guar com NE-QT, após teste de centrifugação (n=3).

O pH 5 da formulação foi compatível com o da pele, que varia de 4,5 a 6 (Da Costa *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2015). A coloração e aparência da formulação permaneceram inalteradas à temperatura ambiente, de estufa e de geladeira, após 24h da preparação, sendo necessário realizar as análises ao longo de 30 dias nas 3 temperaturas.

6. CONCLUSÕES

A nanoemulsão otimizada (NE-QT), obtida a partir do planejamento Box-Behnken, apresentou tamanho médio de 184 nm e condutividade elétrica de 163,96 $\mu\text{S}/\text{cm}$, caracterizando uma nanoemulsão do tipo O/A, que foi observada por microscopia eletrônica de transmissão. A dispersão apresentou baixo PDI ($< 0,3$), pH ao redor de 7,0 e potencial zeta negativo de -17 mV. Pelo período de 180 dias, não houve diferença significativa do diâmetro e PDI das NEs-QT e das NEs, indicando alta estabilidade físico-química desses sistemas. Essa formulação, contendo óleo de oliva, Tween 80, Span 80 e EtOH possibilitou uma alta eficiência de incorporação de quercetina no interior da nanoemulsão (99%). Pelo ensaio HET-CAM, foi verificado que a NE-QT não apresenta potencial irritante sendo, portanto, segura para ser usada em formulações cosméticas. O método de sequestro do radical livre DDPH demonstrou que NE-QT possui alta atividade antioxidante, com capacidade de sequestro de DPPH de $92,44 \pm 1,62$ % na concentração de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, confirmando seu alto potencial antirradicalar. Já o teste de atividade inibidora de tirosinase indicou que a NE-QT possui alta capacidade de inibir a enzima tirosinase ($56,24 \pm 3,38$ %), podendo contribuir no clareamento das manchas escuras do melasma. Além disso, foi possível incorporar NE-QT no gel de Goma guar sem a ocorrência de instabilidade do sistema. A formulação cosmética manteve-se estável, após teste de centrifugação, com pH equivalente a 5-6, que é compatível com o pH da pele. A coloração e aparência da formulação permaneceram inalteradas no período avaliado.

Desse modo, os resultados obtidos nessa pesquisa demonstram que a NE-QT desenvolvida tem grande potencial para ser utilizada em formulações tópicas para a melhoria da pele com melasma e, futuramente, teste de estabilidade acelerada e estudo de permeação cutânea devem ser realizados como também testes clínicos em voluntários com essa hiperpigmentação para confirmar os efeitos obtidos *in vitro*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHAR, Arun and RATHI, Sanjay K. Melasma: a clinico-epidemiological study of 312 cases. **Indian journal of dermatology**, v. 56, n. 4, p. 380–382, 2011.
- ALCANTARA, G. P. et al. Evaluation of ex vivo melanogenic response to UVB, UVA, and visible light in facial melasma and unaffected adjacent skin. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 95, n. 6, p. 684–690, 17 Sep. 2020.
- ANVISA. Cosméticos X Medicamentos. Disponível em: <<http://bit.do/Cosmeticos-X-Medicamentos>>. Acesso em jul.2018.
- ANVISA.Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**, Brasília, DF, Séries Temáticas, v.1, 2004, 52p.
- ANVISA.Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**, 2ª edição, Brasília, 2012.
- ANVISA.Validação de métodos analíticos. **RDC 166/17**, Brasília, DF, 2017.
- ANVISA. Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes **RDC 29/12**, Brasília, DF, 2012.
- ANDERSEN, Allan; Final amended report on the safety assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in cosmetic products. **International Journal of Toxicology**, v. 27, n.4, p.1-82, 2008.
- BAGHERANI *et al.* An overview on melasma. **Journal of Pigmentary Disorders**, v. 2, n. 10, 2015.
- BANDYOPADHYAY, D. TOPICAL TREATMENT OF MELASMA. **Indian journal of dermatology**, v. 54, n. 4, p. 303–309, 2009.
- BAJERSKI, L.; MICHELS, L. R.; COLOMÉ, L. M.; et al. The use of Brazilian vegetable oils in nanoemulsions: an update on preparation and biological applications. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 3, p. 347–363, 2016.
- BAUMANN, L. S. Less-known botanical cosmeceuticals. **Dermatologic Therapy**, v. 20, n. 5, p. 330–342, 2007.
- BAZANA, M. T.; FRANCO CODEVILLA, C.; DE BONA DA SILVA, C.; RAGAGNIN DE MENEZES, C. Nanoencapsulação de licopeno em alimentos. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 38, 2015.
- BRAND-GARNYS *et al.* Flavonoids: A review for cosmetic application. Part two. **Journal of Applied Cosmetology**, v 25, n. 4, p.145-159, 2007.
- CATENIA, Francesca; ALTIERI, Tiziano; ZACCHIGNA, Marina; *et al.* Lipid Metabolites from the Mushroom *Meripilus giganteus*. **Natural product communications**, vol. 10, no. 11, p. 1833–1838, 2015.

-
- CAPITANI, C. D.; CARVALHO, A. C. L.; BOTELHO, P. B.; CARRAPEIRO, M. M.; CASTRO, I. A. Synergism on antioxidant activity between natural compounds optimized by response surface methodology. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, n. 11, p. 1100–1110, 2009.
- CASANOVA, F.; SANTOS, L. Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application--a review. **Journal of microencapsulation**, v. 33, n. 1, p. 1–17, 2016.
- CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A.; et al. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 84, n. 1, p. 21–27, 2006.
- CAZEDEY, Edith Cristina Laignier; CARVALHO, Flávia Chiva; FIORENTINO, Flávia Angélica Másquio; *et al.* Corrositex®, BCOP and HET-CAM as alternative methods to animal experimentation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 4, p. 759–766, 2009.
- CHE MARZUKI, N. H.; WAHAB, R. A.; ABDUL HAMID, M. An overview of nanoemulsion: concepts of development and cosmeceutical applications. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 33, n. 1, p. 779–797, 2019.
- CHEN, W.-C.; TSENG, T.-S.; HSIAO, N.-W.; et al. Discovery of highly potent tyrosinase inhibitor, T1, with significant anti-melanogenesis ability by zebrafish in vivo assay and computational molecular modeling. **Scientific reports**, v. 5, p. 7995, 2015.
- CHEN-YU et al. Development of a quercetin-loaded nanostructured lipid carrier formulation for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, n. 1–2, p. 292–298, 2012.
- CHELLAPA, P. et al. Nanoemulsion for cosmetic application. **EJBPS** 2016, v. 3, n. 7, 2016.
- CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, n. 4, p. 345–358, 2009.
- CHOI, M.-H.; SHIN, H.-J. Anti-Melanogenesis Effect of Quercetin. **Cosmetics**, v. 3, n. 2, p. 18, 2016.
- CHONG, Wai-Ting *et al.* Optimization of process parameters in preparation of tocotrienol-rich red palm oil-based nanoemulsion stabilized by Tween80-Span 80 using response surface methodology. **Plos One** v. 13, n. 8, p. e0202771, 2018.
- CHOUBEY, V.; SARKAR, R.; GARG, V.; et al. Role of oxidative stress in melasma: a prospective study on serum and blood markers of oxidative stress in melasma patients. **International Journal of Dermatology**, v. 56, n. 9, p. 939–943, 2017.

-
- CHRISTIAN, J. R.; G PATEL, K.; GANDHI, T. R. Validation and experimental design assisted robustness testing of RPLC method for the simultaneous analysis of brinzolamide and brimonidine tartrate in an ophthalmic dosage form. **International Journal of Psychological Studies**, v. 78, n. 5, 2016.
- CUI, H.-X. et al. Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Activities of Seed Oils from *Torreya grandis* Fort. ex Lindl. **BioMed research international**, v. 2018, p. 5314320, 2018.
- COUTEAU, C.; COIFFARD, L. Overview of skin whitening agents: drugs and cosmetic products. **Cosmetics**, v. 3, n. 3, p. 27, 2016.
- DA COSTA, S. et al. Stability of positively charged nanoemulsion formulation containing steroidal drug for effective transdermal application. **Journal of chemistry**, v. 2014, p. 1–8, 2014.
- DANAEI, M. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v.10, n.2, 2018.
- DARIO, M. F.; SANTOS, M. S. C. S.; VIANA, A. S.; et al. A high loaded cationic nanoemulsion for quercetin delivery obtained by sub-PIT method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 489, p. 256–264, 2016.
- DARIO, Michelli F.; OLIVEIRA, Camila A.; CORDEIRO, Lorena R.G.; *et al.* Stability and safety of quercetin-loaded cationic nanoemulsion: In vitro and in vivo assessments. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, vol. 506, p. 591–599, 2016.
- DE VARGAS, Fabiano S; ALMEIDA, Patricia D O; DE BOLETI, Ana Paula A; *et al.* Antioxidant activity and peroxidase inhibition of Amazonian plants extracts traditionally used as anti-inflammatory. **BMC complementary and alternative medicine**, vol. 16, p. 83, 2016.
- DI MATTIA, C. D.; SACCHETTI, G.; MASTROCOLA, D.; PITTIA, P. Effect of phenolic antioxidants on the dispersion state and chemical stability of olive oil O/W emulsions. **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 1163–1170, 2009.
- EATON, P; QUARESMA, P; SOARES, C; *et al.* A direct comparison of experimental methods to measure dimensions of synthetic nanoparticles. **Ultramicroscopy**, vol. 182, p. 179–190, 2017
- EID, A.; ELMARZUGI, N.; EL-ENSHASY, H. PREPARATION AND EVALUATION OF OLIVE OIL NANOEMULSION USING SUCROSE MONOESTER. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.5, n. 3, 2013.

-
- ELFIYANI, R.; AMALIA, A.; PRATAMA, S. Y. Effect of using the combination of tween 80 and ethanol on the forming and physical stability of microemulsion of eucalyptus oil as antibacterial. **Journal of Young Pharmacists**, v. 9, n. 1s, p. s1–s4, 2017.
- FAN, Meihui; ZHANG, Guowen; HU, Xing; *et al.* Quercetin as a tyrosinase inhibitor: Inhibitory activity, conformational change and mechanism. **Food research international (Ottawa, Ont.)**, vol. 100, no. Pt 1, p. 226–233, 2017
- FARSHI, P. et al. Whey protein isolate-guar gum stabilized cumin seed oil nanoemulsion. **Food bioscience**, v. 28, p. 49–56, 2019.
- FDA. Text on Validation of Analytical Procedures. Disponível em: <<https://bit.ly/2xFLU1g>>. Acesso em 1 abril, 2020.
- FDA. Parabens in Cosmetics. Disponível em: <<https://bit.ly/2wMeU7E>>. Acesso em 1 abril, 2020.
- FERNANDES, A. V. et al. Design, preparation and in vitro characterizations of fluconazole loaded nanostructured lipid carriers. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, 2020.
- FERREIRA, S L C; BRUNS, R E; FERREIRA, H S; *et al.* Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, vol. 597, no. 2, p. 179–186, 2007.
- FERREIRA, S. L. C. et al. Robustness in analytical methods optimized using experimental designs. **Microchemical Journal**, v.131, p. 163-169, 2017.
- FEVOLA, M.J. Profile of Glycerin. **Cosmetics & Toiletries**, 2013. Disponível em:< <https://bit.ly/2UTS4CN>>. Acesso em abril.2020.
- FLORES, F.C.; RIBEIRO, R.F.; OURIQUE, A.F.; ROLIM, C.M.B.; SILVA, C.B. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Quím. Nova.**, v.34, n.6, p.968-972, 2011.
- FUKUDA, I. M. et al. Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. spe, 8 Nov. 2018.
- GABA, B. et al. Vitamin E Loaded Naringenin Nanoemulsion via Intranasal Delivery for the Management of Oxidative Stress in a 6-OHDA Parkinson's Disease Model. **BioMed research international**, v. 2019, p. 2382563, 2019.
- GANESAN, P.; CHOI, D.-K. Current application of phytochemical-based nanocosmeceuticals for beauty and skin therapy. **International journal of nanomedicine**, v. 11, p. 1987–2007, 2016.
- GUPTA, A.; ERAL, H. B.; HATTON, T. A.; DOYLE, P. S. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft matter**, v. 12, n. 11, p. 2826–2841, 2016.

-
- HANDEL, A. C et al. Melasma: a clinical and epidemiological review. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, n. 5, p. 771–782, 2014.
- HATAHET, T. et al. Quercetin topical application, from conventional dosage forms to nanodosage forms. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 108, p. 41–53, Nov. 2016.
- HOUGEIR, F. G.; KIRCIK, L. A review of delivery systems in cosmetics. **Dermatologic Therapy**, v. 25, n. 3, p. 234–237, 2012.
- JAFARI, S. M.; MCCLEMENTS, D.J. Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization. **Academic Press**, 2018.
- JASMINA, H. PREPARATION OF NANOEMULSIONS BY HIGH-ENERGY AND LOW-ENERGY EMULSIFICATION METHODS. In: **Badnjevic A. (eds) CMBEBIH 2017**. IFMBE Proceedings, v. 62. Springer, Singapore, 2017.
- JUNG, H. J. et al. In vitro and in silico insights into tyrosinase inhibitors with (E)-benzylidene-1-indanone derivatives. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 17, p. 1255–1264, 2019.
- KALE, S. N.; DEORE, S. L. Emulsion micro emulsion and nano emulsion: A review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 8, n. 1, p. 39–47, 2016.
- KESHARWANI, P.; GUPTA, Umesh. NANOTECHNOLOGY-BASED TARGETED DRUG DELIVERY SYSTEMS FOR BRAIN TUMORS. **Academic Press**, 2018.
- KIM, C. S. et al. A Potent Tyrosinase Inhibitor, (E)-3-(2,4-Dihydroxyphenyl)-1-(thiophen-2-yl)prop-2-en-1-one, with Anti-Melanogenesis Properties in α -MSH and IBMX-Induced B16F10 Melanoma Cells. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 23, n. 10, 2018.
- KOMAIKO, J.S.; MCCLEMENTS, D.J. Formation of Food-Grade Nanoemulsions using Low-Energy Preparations Methods: A Review of Available Methods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.15, 2016
- KUMARI, A. et al. Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetin. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 80, n. 2, p. 184–192, 15 Oct. 2010.
- LANIGAN, R.S e YAMARIK, T.A. Final Report on the Safety Assessment of EDTA, Calcium Disodium EDTA, Diammonium EDTA, Dipotassium EDTA, Disodium EDTA, TEA-EDTA, Tetrasodium EDTA, Tripotassium EDTA, Trisodium EDTA, HEDTA, and Trisodium HEDTA. **International Journal of Toxicology**, v. 21, n.2, p.95–142, 2002

-
- LAUS, M.N. Evaluation of synergistic interactions of antioxidants from plant foods by a new method using soybean lipoxygenase. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 52, n. 4, p. 256–260, 2013.
- LIEBEL, F. et al. Irradiation of skin with visible light induces reactive oxygen species and matrix-degrading enzymes. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 7, p. 1901–1907, 2012
- LODEN, Marie and MAIBACH, Howard I. (Eds.). Glycerol — just a moisturizer? biological and biophysical effects. *In: Dry skin and moisturizers: chemistry and function*. [s.l.]: CRC Press, p. 243–260, 2005
- LU, B. et al. Niosomal Nanocarriers for Enhanced Skin Delivery of Quercetin with Functions of Anti-Tyrosinase and Antioxidant. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 12, 2019.
- MAGUIRE, C. M. et al. Characterisation of particles in solution - a perspective on light scattering and comparative technologies. **Science and technology of advanced materials**, v. 19, n. 1, p. 732–745, 18 Oct. 2018.
- MALVERN. Dynamic light scattering, 2015. Disponível em: <<https://bit.ly/3kA1Ntu>> Acesso em setembro.2020
- MARCATO, P.D. et al. Nanostructured polymer and lipid carriers for sunscreen. Biological effects and skin permeation. **J Nanosci Nanotechnol**. v.11, n.3, p.1880-1886, 2011.
- MARTINI, W. et al. Comparative Study of the Lipid Profiles of Oils from Kernels of Peanut, Babassu, Coconut, Castor and Grape by GC-FID and Raman Spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2017.
- MARTINS, V. M. R et al. Exogenous ochronosis: case report and literature review. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 87, n. 4, p. 633–636, 2012.
- MEHMOOD, Tahir; AHMAD, Asif; AHMED, Anwaar; *et al.* Optimization of olive oil-based O/W nanoemulsions prepared through ultrasonic homogenization: A response surface methodology approach. **Food chemistry**, v. 229, p. 790–796, 2017.
- MILANEZI, F. G. et al. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of gold nanoparticles capped with quercetin. **Saudi pharmaceutical journal SPJ: the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society**, v. 27, n. 7, p. 968–974, Nov. 2019.
- MIOT, L. D. B. et al. Fisiopatologia do melasma. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 84, n. 6, 2009.
- MOHAMADI SAANI, S.; ABDOLALIZADEH, J.; ZEINALI HERIS, S. Ultrasonic/sonochemical synthesis and evaluation of nanostructured oil in water emulsions for topical delivery of protein drugs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 55, p. 86–95, 2019.
- MONTENEGRO, L. Nanocarriers for skin delivery of cosmetic antioxidants. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v. 2, n. 4, p. 73–92, 2014.

-
- MOONRUNGSEE, N. et al. Sequential injection spectrophotometric system for evaluation of mushroom tyrosinase-inhibitory activity. **Talanta**, v. 101, p. 233–239, 2012.
- MUDGIL, D.; BARAK, S.; KHATKAR, B. S. Guar gum: processing, properties and food applications-A Review. **Journal of food science and technology**, v. 51, n. 3, p. 409–418, 2014.
- MUKHOPADHYAY, Piyasi and PRAJAPATI, A K. Quercetin in anti-diabetic research and strategies for improved quercetin bioavailability using polymer-based carriers – a review. **RSC Adv.**, vol. 5, no. 118, p. 97547–97562, 2015.
- NASTITI, C. M. R. R. et al. Topical nano and microemulsions for skin delivery. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, 21, 2017.
- NI, S. et al. Nanoemulsions-Based Delivery Systems for Encapsulation of Quercetin: Preparation, Characterization, and Cytotoxicity Studies. **Journal of food process engineering**, v. 40, n. 2, p. e12374, 2017.
- NOMAKHOSI, M.; HEIDI, A. Natural options for management of melasma, a review. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, p. 1–12, 2018.
- OGBECHIE-GODEC, O. A.; ELBULUK, N. Melasma: an Up-to-Date Comprehensive Review. **Dermatology and therapy**, v. 7, n. 3, p. 305–318, 2017.
- PAVONI, L. et al. An Overview of Micro- and Nanoemulsions as Vehicles for Essential Oils: Formulation, Preparation and Stability. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 1, 2020.
- PENG, L.-C. et al. Optimization of water-in-oil nanoemulsions by mixed surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 370, n. 1–3, p. 136–142, 2010.
- PIRES et al. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para o extrato de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, ISBN 978-85-85658-71-7, 2017.
- PIVETTA, T. P. et al. Topical formulation of quercetin encapsulated in natural lipid nanocarriers: Evaluation of biological properties and phototoxic effect. **Journal of drug delivery science and technology**, v. 53, p. 101148, 2019.
- POL, A.; PATRAVALE, V. Novel lipid-based systems for improved topical delivery of antioxidants. **Household and Personal Care TODAY**, v. 4, p. 5–8, 2009.
- QU, L. et al. Simultaneous Determination of Six Isoflavones from Puerariae Lobatae Radix by CPE-HPLC and Effect of Puerarin on Tyrosinase Activity. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 2, 2020.
- RANDHAWA, M. et al. Visible Light Induces Melanogenesis in Human Skin through a Photoadaptive Response. **Plos One**, v. 10, n. 6, 2015.

-
- REN, J.-N. et al. Effect of olive oil on the preparation of nanoemulsions and its effect on aroma release. **Journal of food science and technology**, v. 55, n. 10, p. 4223–4231, 2018.
- RIBEIRO, R. C. DE A.; BARRETO, S. M. DE A. G.; OSTROSKY, E. A.; et al. Production and characterization of cosmetic nanoemulsions containing *Opuntia ficus-indica* (L.) mill extract as moisturizing agent. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 20, n. 2, p. 2492–2509, 2015.
- RICH, G. T.; BUCHWEITZ, M.; WINTERBONE, M. S.; KROON, P. A.; WILDE, P. J. Towards an Understanding of the Low Bioavailability of Quercetin: A Study of Its Interaction with Intestinal Lipids. **Nutrients**, v. 9, n. 2, 2017.
- RODRIGUES, F. et al. Preparation and characterization of nanoemulsion containing a natural naphthoquinone. **Química Nova**, 2018.
- ROMERO, C.; BRENES, M. Analysis of total contents of hydroxytyrosol and tyrosol in olive oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 9017–9022, 2012.
- SALAVKAR, S. et al. Antioxidants in skin ageing - Future of dermatology. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 5, n. 3, p. 161, 2011.
- SARKAR, R. et al. Cosmeceuticals for Hyperpigmentation: What is Available? **Journal of cutaneous and aesthetic surgery**, v. 6, n. 1, p. 4–11, 2013.
- SECKIN *et al.* Oxidative stress status in patients with melasma. **Cutan Ocul Toxicol**, v. 33, p. 212–217, 2014.
- SHARMA, S.; SAHNI, J. K.; ALI, J.; BABOOTA, S. Effect of high-pressure homogenization on formulation of TPGS loaded nanoemulsion of rutin - pharmacodynamic and antioxidant studies. **Drug delivery**, v. 22, n. 4, p. 541–551, 2015.
- SHARMA, B. et al. Resveratrol-loaded nanoemulsion gel system to ameliorate UV-induced oxidative skin damage: from in vitro to in vivo investigation of antioxidant activity enhancement. **Archives of Dermatological Research**, v. 311, n. 10, p. 773–793, 2019.
- SINGH, Thakur Gurjeet and SHARMA, Neha. Nanobiomaterials in cosmetics: current status and future prospects. *In: Nanobiomaterials in galenic formulations and cosmetics*. [s.l.]: Elsevier, 2016, p. 149–174.
- SINGH, Y.; MEHER, J. G.; RAVAL, K.; et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, 2017.
- SONNEVILLE-AUBRUN *et al.* Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, p.108 – 109, p.145–149, 2004.

-
- STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical reviews**, v. 8, n. 4, p. 409–427, 2016.
- TUNGADI, R.; WICITA, P. Formulation, optimization, and characterization of snakehead fish (*Ophiocephalus Striatus*) powder nanoemulgel. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, 2020.
- UCHIDA, R. *et al.* Inhibition of tyrosinase activity and melanine pigmentation by 2-hydroxytyrosol. **Acta pharmaceutica Sinica. B**, v. 4, n. 2, p. 141–145, 2014.
- VIDEIRA, I.F DOS S. *et al.* Mechanisms regulating melanogenesis. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 88, n. 1, p. 76-83, 2013.
- VICENTINI, F. T. M. DE C. *et al.* Assessment of in vitro methodologies to determine topical and transdermal delivery of the flavonoid quercetin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 2, p. 357–364, 2009.
- VICENTINI, F. T. M. C.; SIMI, T. R. M.; DEL CIAMPO, J. O.; *et al.* Quercetin in w/o microemulsion: in vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 3, p. 948–957, 2008.
- VINARDELL, M. P.; MITJANS, M. Nanocarriers for delivery of antioxidants on the skin. **Cosmetics**, v. 2, n. 4, p. 342–354, 2015.
- YADAV, Pragya; RASTOGI, Vaibhav and VERMA, Anurag. Application of Box–Behnken design and desirability function in the development and optimization of self-nanoemulsifying drug delivery system for enhanced dissolution of ezetimibe. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 7, 2020
- YUKUYAMA, M. N. *et al.* Olive oil nanoemulsion preparation using high-pressure homogenization and d-phase emulsification – A design space approach. **Journal of drug delivery science and technology**, v. 49, p. 622–631, 2019.
- WEN, K.-C.; CHANG, C.-S.; CHIEN, Y.-C.; *et al.* Tyrosol and its analogues inhibit alpha-melanocyte-stimulating hormone induced melanogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 12, p. 23420–23440, 2013.
- ZHANG, Y.; SHANG, Z.; GAO, C.; *et al.* Nanoemulsion for solubilization, stabilization, and in vitro release of pterostilbene for oral delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 4, p. 1000–1008, 2014.