



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.

Ribeirão Preto
2020

CHEDDRAOUI
SILVA, C.

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

MESTRADO
FCFRPUSP
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.

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**.

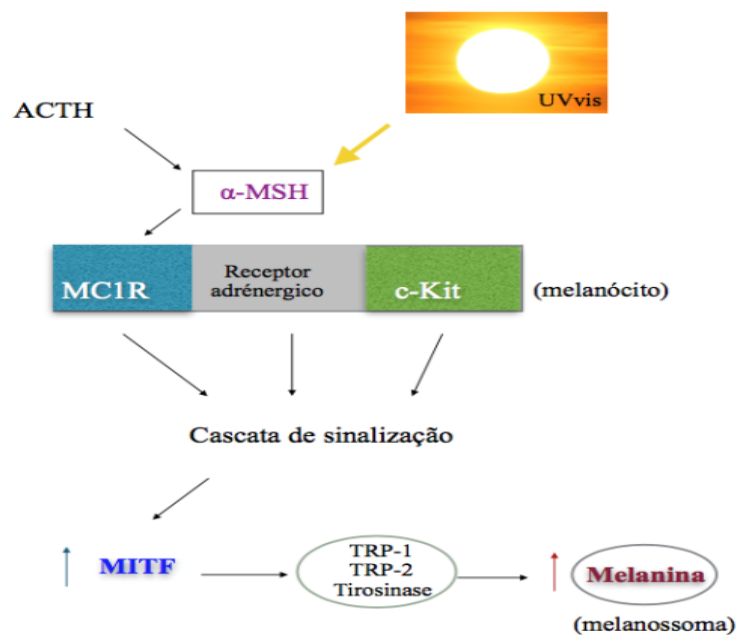


Figura 1 – Mecanismo de ação da produção de melanina (eumelanina e feomelanina).

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).

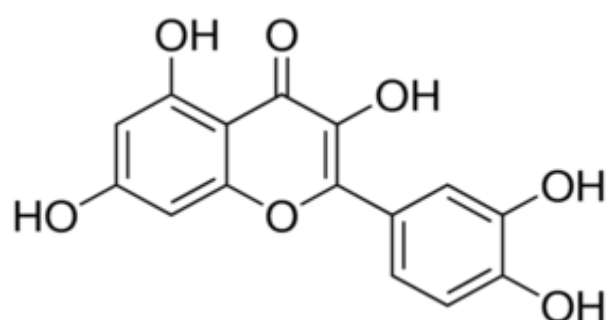


Figura 2 – Estrutura da quercetina.

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).

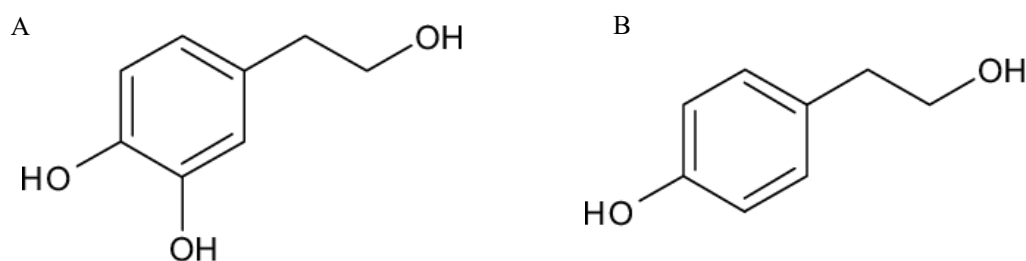


Figura 3 – Estrutura do hidroxitirosol (A) e tirosol (B).

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).

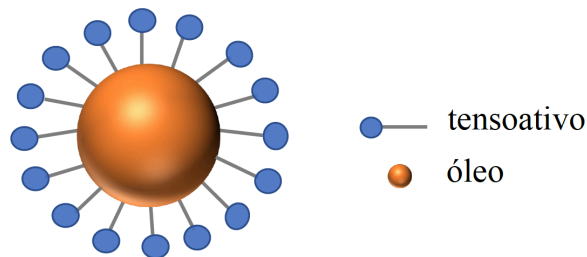


Figura 4 – Estrutura de uma nanoemulsão estabilizada por tensoativo.

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.

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 *Torreyia 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.