

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Nanoemulsões contendo dipalmitato de ácido kójico e óleo de rosa mosqueta como potencial tratamento para melasma

JÚLIA CAPP ZILLES

PORTO ALEGRE, 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nanoemulsões contendo dipalmitato de ácido kójico e óleo de rosa mosqueta como potencial tratamento para melasma

Dissertação apresentada por Júlia Capp Zilles para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): Profa. Dr. Renata Vidor Contri

Porto Alegre, 2022

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Profa. Dr. Aline Ferreira Ourique

Universidade Franciscana, Santa Maria, RS, Brasil

Prof. Dr. Roselena Silvestri Schuh

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Profa. Dr. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Zilles, Júlia Capp

Nanoemulsões contendo dipalmitato de ácido kójico e óleo de rosa mosqueta como potencial tratamento para melasma / Júlia Capp Zilles. -- 2022.

128 f.

Orientadora: Renata Vidor Contri.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Kójico. 2. Nanoemulsão. 3. Melasma. 4. Despigmentante. I. Contri, Renata Vidor, orient. II. Título.

Agradecimentos ao CNPq, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, bem como à CAPES e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo financiamento da pesquisa. Agradecimentos ao Laboratório 307 (Tecnologia Farmacêutica e Cosmética Aplicada), aos laboratórios 405 e 704 da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e às professoras Sílvia Stanisçuaski Guterres, Leticia Scherer Koester e Ligia Damasceno Ferreira Marczak, pela disponibilização de equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação.

RESUMO

O melasma é um tipo de hiperpigmentação com tratamento agressivo e desafiador. Agentes despigmentantes de uso tópico, como o ácido kójico, são uma opção para seu tratamento. Seus derivados, como o dipalmitato de ácido kójico, podem ser considerados alternativas mais estáveis e que permitem aumento da atividade. Este trabalho teve como objetivo revisar a literatura quanto às atividades do ácido kójico e seus derivados, acessando informações de segurança, e desenvolver uma formulação nanotecnológica inovadora, de alto desempenho e estável. Além da atividade clareadora, o ativo e seus derivados possuem destaque para as atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória, bem como apresentam potencial como agentes antitumorais e ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstram segurança para uso humano. O mecanismo de atividade despigmentante se dá pela ligação da molécula com a enzima tirosinase, pela ação antioxidante e pela regulação de fatores da melanogênese. Sistemas nanotecnológicos também surgem associados a estas moléculas trazendo melhorias na atividade, aumentando permeação cutânea e estabilidade. Unir o dipalmitato de ácido kójico com o óleo de rosa mosqueta em uma nanoemulsão se apresenta como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de uma formulação de alto desempenho. Foi possível desenvolver nanoemulsões, através do Ultra-Turrax®, com até 2 mg/mL de dipalmitato de ácido kójico e com 5% de óleo de rosa mosqueta, com diâmetro de gotícula inferior a 130 nm, distribuição de tamanho homogênea, potencial zeta de aproximadamente -10 mV, com eficiência de encapsulação superior a 95% e estabilidade por 30 dias sob refrigeração. Elevada eficácia antioxidante (ensaio do DPPH) e atividade inibidora da enzima tirosinase similar à do ácido ascórbico (1,0 mM) foram observadas. Concentrações de até 1% das formulações, testadas através do ensaio de MTT em células de fibroblastos, não alteraram a viabilidade celular. Além disso, observou-se possibilidade de produção da formulação em grande escala. Os resultados mostraram o potencial da formulação desenvolvida para tratamento do melasma.

Palavras-chave: despigmentante; kójico; melasma; nanoemulsão; segurança

ABSTRACT

Melasma is a kind of hyperpigmentation whose treatment is challenging and aggressive. Topical depigmenting agents, like kojic acid, are an option for its treatment. Derivatives from this drug, like kojic dipalmitate, can be considered a more stable alternative which can allow enhancement of activity. This study aimed to review the literature concerning kojic acid and its derivatives activity and safety assessments, and developing an innovative nanotechnological formulation, stable and of high performance. Besides skin depigmenting activity, kojic acid and its derivatives have highlights for antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities. They also possess potential as antitumor agents and *in vitro* and *in vivo* assays showed safety for human use. Its depigmenting activity mechanism is due to the molecules bonding with the tyrosinase enzyme, to antioxidant action and to regulation of melanogenesis factors. Nanotechnological systems also rise associated to those molecules, bringing improvements in activity, enhancing skin permeation and stability. To link kojic dipalmitate with rosehip oil in a nanoemulsion is a promising alternative to the development of a high-performance formulation. It was possible to develop nanoemulsions, with Ultra-Turrax[®], with up to 2 mg/mL of kojic dipalmitate and with 5% of rosehip oil, with droplet diameter lower than 130 nm, homogeneous size distribution, zeta potential of approximately -10 mV, with incorporation efficiency higher than 95% and stable for 30 days under refrigeration. High antioxidant activity (DPPH assay) and tyrosinase inhibitory activity similar to ascorbic acid (1.0 mM) were observed. Concentrations up to 1% of the formulations, tested in fibroblasts cells through MTT assay, did not alter cell viability. The possibility of large scale production of the formulation was also observed. The results demonstrated the formulations potential for melasma treatment.

Key-words: depigmenting; kojic; melasma; nanoemulsion; safety

LISTA DE FIGURAS

Revisão da literatura

- Figura 1: Estrutura molecular do dipalmitato de ácido kójico 27
- Figura 2. Imagem da planta *Rosa aff rubiginosa* L.: A) flor e B) fruto 28

Capítulo 1

- Figure 1: Flowchart of articles selection. 41
- Figure 2: Selected articles by year, from 2010 on (total of 63 articles)..... 42
- Figure 3: Overview of the main biological activities of kojic acid and its derivatives related to human use and its mechanisms. Some of the studies evaluated more than one activity, therefore numbers may overlap..... 50
- Figure 4: Main mechanisms involved in skin depigmenting activity..... 51
- Figure 5: Overview of the main tests employed to evaluate kojic acid and its derivatives safety in the selected studies 66

Capítulo 2

- Figure 1: Stability studies. KDP content of nanoemulsions and KDP dispersions on day 0 and after 30 days of stability studies under different conditions: 25°C, 40°C, and 8°C 95
- Figure 2: KDP crystals formation of nanoemulsions and KDP dispersions after 30 days of storage at room temperature (25°C)..... 95
- Figure 3: Kojic dipalmitate amount in receptor medium from different formulations: nanoemulsion loaded with KDP at 1 mg/mL and 2 mg/mL, KDP dispersions of 1 mg/mL and 2 mg/mL 96
- Figure 4: Inhibition of DPPH percentage by unloaded nanoemulsion, nanoemulsion loaded with KDP at 1 mg/mL and 2 mg/mL, KDP dispersions of 1 mg/mL and 2 mg/mL, and positive control BHT 0.01%. 98
- Figure 5: Inhibition of tyrosinase percentage by unloaded nanoemulsion, nanoemulsion loaded with KDP at 1 mg/mL and 2 mg/mL, KDP dispersions of 1 mg/mL and 2 mg/mL, and positive control ascorbic acid 1 mM..... 99
- Figure 6: Cell viability of fibroblasts (3T3-L1) after 24h of treatment with unloaded nanoemulsion, nanoemulsion loaded with KDP at 1 mg/mL and 2 mg/mL in concentrations from 0.06% to 1% 101
- Figure 7: Nanoemulsions (NE2) processing under heat using equipment Ultra-Turrax® IKA® T10 basic (left side) for 35 mL batch and Ultra-Turrax® IKA® T25 basic (right side) for scaling up to 350 mL batch. Dispensor tools of each equipment and aspect of the formulations in the middle of the image 103

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Table 1: Selected studies, with the molecules studied, activities/safety issues tested, and main conclusions related to kojic acid or derivatives	42
Table 2: Antimicrobial activity of kojic acid against different bacterial and fungi strains	56

Capítulo 2

Table 1: Characterization parameters of unloaded nanoemulsion (NE0), KDP loaded 1 mg/mL nanoemulsion (NE1) and KDP loaded 2 mg/mL nanoemulsion (NE2).....	92
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

KDP: Dipalmitato de ácido kójico (*kojic dipalmitate*)

NERO: unloaded nanoemulsion

NERO1KDP: 1 mg/mL of KDP nanoemulsion

NERO2KDP: 2 mg/mL of KDP nanoemulsion

D1KDP: 1 mg/mL of KDP dispersion

D2KDP: 2 mg/mL of KDP dispersion

SUMÁRIO

1. Introdução	15
2. Objetivos	21
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3. Revisão da literatura	23
3.1 Hiperpigmentações e melasma.....	24
3.2 Ácido kójico e dipalmitato de ácido kójico.....	25
3.3 Óleo de rosa mosqueta.....	28
3.4 Nanotecnologia.....	29
4. Capítulo 1	35
5. Capítulo 2	79
6. Discussão geral	109
7. Conclusão geral	117
8. Referências	119

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD), hiperpigmentações cutâneas são um escurecimento da pele decorrente de uma produção exacerbada de melanina na pele, de causas multifatoriais (SBD, 2021). O melasma é uma dessas hiperpigmentações que, apesar de não trazer riscos para a vida do indivíduo, afeta a autoestima dos pacientes, podendo levar a impactos negativos em sua vida social (FINLAY; KHAN, 1994). Além da produção exacerbada de melanina, um aumento no número de melanócitos, alterações no transporte e distribuição de melanina estão envolvidos em sua fisiopatologia, bem como fatores vasculares e de fotoenvelhecimento (SH *et al.*, 2016).

Com o intuito de buscar alternativas para o clareamento da pele e atenuação do melasma, pode-se fazer uso de agentes tópicos clareadores de pele. Um dos agentes mais conhecidos é a hidroquinona, utilizada na fórmula de Kligman, tratamento padrão-ouro para o melasma (PASSERON, 2013). Contudo, a hidroquinona é um ativo dermatológico que pode trazer efeitos adversos a longo prazo e causar irritações cutâneas (ZAID; AL RAMAHI, 2019). No Brasil, a hidroquinona não pode ser utilizada em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, conforme consta na RDC 529/21 (ANVISA, 2021). Como alternativa, temos o ácido kójico, um ácido orgânico derivado da fermentação de fungos como os do gênero *Aspergillus* (SAEEDI; ESLAMIFAR; KHEZRI, 2019).

O ácido kójico age inibindo diretamente a tirosinase, enzima chave para a produção de melanina, quelando cobre (substrato da enzima). Sua atividade clareadora também se dá através do estímulo à liberação de leucócitos e eliminação de radicais livres, possuindo atividade antioxidante que auxilia tanto na despigmentação quanto na prevenção do envelhecimento (ZAID; AL RAMAHI, 2019). Todavia, o ácido kójico é sensível à luz e ao calor (EPHREM; ELAISSARI; GREIGE-GERGES, 2017). Logo, estratégias que possam aumentar a estabilidade desse ativo se mostram interessantes, como é o caso da esterificação da molécula. O dipalmitato de ácido kójico (KDP) é a forma esterificada do ácido kójico, apresentando maior estabilidade e, como sofre hidrólise pelas esterases localizadas nas células cutâneas, libera ácido kójico *in situ*, mantendo seus efeitos e sendo também utilizado como clareador (BALAGUER; SALVADOR; CHISVERT, 2008). Porém, este ativo é altamente lipofílico e apresenta difícil solubilização e,

consequentemente, difícil incorporação em formulações cosméticas (GONÇALEZ, Maíra Lima *et al.*, 2015).

O uso de agentes lipofílicos, como é o caso de óleos vegetais, pode auxiliar na solubilização e incorporação do KDP. O óleo de rosa mosqueta é um óleo vegetal rico em ácidos graxos, ácido ascórbico e fenóis (SANTOS; VIEIRA; KAMADA, 2009), sendo bastante utilizado devido a sua ação cicatrizante e antioxidante. Porém, o mesmo se encontra suscetível ao processo natural de oxidação, que pode ser retardado com o uso da nanotecnologia (CONTRI, Renata V. *et al.*, 2016). A nanotecnologia é a aplicação da ciência que trabalha na escala nanométrica, com partículas de aproximadamente 100 nanômetros, e permite, além da proteção de ativos da degradação do meio, uma melhora no desempenho de substâncias devido ao aumento de sua área superficial (CONTRI, Renata V. *et al.*, 2011). Nanoemulsões são um tipo de nanopartícula que consiste na dispersão de dois líquidos imiscíveis e se apresentam como uma boa escolha para fins de permeação cutânea dos ativos devido ao reduzido tamanho de gotícula (GAZZI *et al.*, 2021; SINGH *et al.*, 2017).

O uso do KDP já foi previamente associado a sistemas nanotecnológicos (AL-EDRESI; BAIE, 2009; ALEDRESI; ALSHAIBANI; ABOOD, 2020; GONÇALEZ, Maíra Lima *et al.*, 2015). Estudos demonstram que formulações lipofílicas podem aumentar a capacidade de carreamento do ativo KDP, como é o caso dos lipossomas (ALEDRESI; ALSHAIBANI; ABOOD, 2020), já nanoemulsões podem agir como eficientes transportadores do ativo e prolongar sua atividade na pele (AL-EDRESI; BAIE, 2010), além de aumentar sua estabilidade (AL-EDRESI; BAIE, 2009). Este trabalho teve o intuito de desenvolver nanoemulsões de KDP e óleo de rosa mosqueta, aliando às características dos ativos com os benéficos trazidos pela nanoemulsão.

A hipótese geradora deste trabalho é a de que a incorporação de dipalmitato de ácido kójico em uma nanoemulsão apresente benefícios de forma a garantir solubilização deste ativo altamente lipofílico, facilitando sua incorporação em veículos semissólidos, incluindo os géis, enquanto o protege da degradação. Além disso, este nanossistema pode modular a permeação cutânea do ativo, fazendo com que o mesmo chegue ao seu alvo: melanócitos encontrados na camada basal da epiderme. A associação inovadora do dipalmitato de ácido kójico com o óleo de rosa

mosqueta aliada à nanotecnologia pode levar à obtenção de um sistema com alto potencial de clareamento da pele.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral desenvolver e caracterizar nanoemulsões contendo dipalmitato de ácido kójico e óleo de rosa mosqueta com potencial para tratamento de melasma.

2.2. Objetivos específicos

- a) Revisar a literatura quanto ao ativo principal, dipalmitato de ácido kójico, bem como seu precursor, ácido kójico, e demais derivados, quanto a suas atividades biológicas e informações de segurança tendo em vista o uso humano e procurar elucidar os diferentes mecanismos de ação envolvidos em tais atividades;
- b) Desenvolver nanoemulsões contendo dipalmitato de ácido kójico e óleo de rosa mosqueta;
- c) Caracterizar este nanosistema quanto às características organolépticas, teor e taxa de encapsulação do dipalmitato de ácido kójico, pH, densidade, tamanho e distribuição das gotículas e potencial zeta;
- d) Avaliar a estabilidade físico-química das nanoemulsões desenvolvidas.
- e) Avaliar a permeação cutânea *in vitro* do ativo a partir das nanoemulsões;
- f) Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* das nanoemulsões;
- g) Avaliar a atividade clareadora *in vitro* das nanoemulsões;
- h) Avaliar o perfil de toxicidade *in vitro* das nanoemulsões frente às células de pele (fibroblastos);
- i) Realizar o aumento da escala de produção das formulações desenvolvidas, avaliando sua viabilidade.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Hiperpigmentações e melasma

Hiperpigmentações cutâneas podem ser congênitas ou adquiridas e com diferente impacto de acordo com a região onde o indivíduo reside, sendo mais frequentes em áreas de maior exposição solar. Além da incidência solar, fatores genéticos e hormonais também podem estar envolvidos. Hiperpigmentações podem ser epidérmicas ou dérmicas e resultam do aumento da produção de melanina, alterações no seu transporte e distribuição e/ou aumento do número de melanócitos. A melanina é produzida nos melanócitos, células que se encontram na camada basal da epiderme, e são transportadas para os queratinócitos, as principais células epidérmicas, através dos melanossomas. Entre os diferentes tipos de hiperpigmentação, pode-se citar o melasma, a hiperpigmentação pós-inflamatória, a hiperpigmentação periorbital, as efélides (sardas) e os lentigos solares (CESTARI; DANTAS; BOZA, 2014; PLENSDORF; LIVIERATOS; DADA, 2017; SAEEDI; ESLAMIFAR; KHEZRI, 2019).

O melasma possui aparência de manchas amarronzadas, com bordas irregulares e disposição simétrica e bilateral (PASSERON; PICARDO, 2018). Os melanócitos são as células responsáveis pela produção de melanina e encontram-se na camada basal da epiderme (SAEEDI; ESLAMIFAR; KHEZRI, 2019), caracterizando o melasma como uma hiperpigmentação epidérmica. Porém, é comum que anormalidades como, por exemplo, a elastose solar causada pelo foto-envelhecimento, se estendam para a matriz extracelular da derme (SH *et al.*, 2016). Além disso, aumento em número, tamanho e densidade dos vasos sanguíneos já foi evidenciado em tecido com melanose em comparação à região de tecido não lesionada, mostrando que o componente vascular também é presente na fisiopatologia do melasma (KANG *et al.*, 2010; PASSERON, 2013; SH *et al.*, 2016). Apesar de não apresentar riscos para a vida, essa patologia impacta diretamente na aparência física dos pacientes, afetando sua autoestima e qualidade de vida, podendo levar a impactos negativos na sua vida social e em seu estado emocional (FINLAY; KHAN, 1994; HUERTH; HASSAN; CALLENDER, 2019; R; A; P, 2020).

Devido a suas causas multifatoriais, o tratamento do melasma é difícil e desafiador (PASSERON; PICARDO, 2018; SH *et al.*, 2016), podendo ser agressivo com o uso de peelings químicos e lasers (EPHREM; ELAISSARI; GREIGE-GERGES, 2017). Agentes despigmentantes de uso tópico são utilizados com o

intuito de clarear e diminuir as áreas afetadas, com o mínimo de efeitos adversos possíveis (LAGE; COSTA, 2012). O tratamento padrão-ouro é feito com o uso tópico da fórmula de Kligman, que combina os agentes hidroquinona e ácido retinoico com um corticoide (PASSERON; PICARDO, 2018). Entretanto, sabe-se que a hidroquinona não é a opção mais segura, pois a mesma pode, em longo prazo, causar danos como despigmentação permanente e ocronose exógena (S; E; M, 2003; SH *et al.*, 2016). Embora formulações tópicas possam possuir menos efeitos adversos do que outros tipos de tratamentos, como peelings químicos (EPHREM; ELAISSARI; GREIGE-GERGES, 2017), elas podem não exercer a atividade desejada devido a características anatómicas e fisiológicas da pele, que atuam como barreira cutânea (CONTRI, Renata V. *et al.*, 2011).

3.2. Ácido kójico e dipalmitato de ácido kójico

O ácido kójico, ácido orgânico derivado da fermentação de fungos do gênero *Apergillus* e *Penicillium* (LAGE; COSTA, 2012; SAEEDI; ESLAMIFAR; KHEZRI, 2019), surge como uma alternativa de agente despigmentante para substituir a hidroquinona. Ele age inibindo a tirosinase, enzima responsável pela síntese de melanina, quelando o cobre, que é substrato desta enzima (GOMES; COSTA; ALVES, 2012). Além disso, este ativo também apresenta atividade antibacteriana (Y *et al.*, 2019; ZAID; AL RAMAHI, 2019).

O mecanismo de ação da atividade clareadora do ácido kójico também está envolvido com alterações na secreção de citocinas em queratinócitos, especificamente de interleucina-6, cujo aumento levou a uma diminuição da melanogênese nos melanócitos, sugerindo a existência de uma comunicação entre estas células capaz de modular a resposta farmacológica ao ativo (CHOI *et al.*, 2012). Além de quelar cobre e agir modulando leucócitos, o ácido kójico também inibe a tautomerização de DOPA em 5,6-dihydroxyindol-2-carboxylic acid e possui atividade antioxidante, eliminando radicais livres (ZAID; AL RAMAHI, 2019). Por possuir conhecida atividade inibindo a tirosinase, este ativo também é bastante utilizado como controle positivo em estudos que buscam novos agentes clareadores (BANG *et al.*, 2018; KHONGKARAT *et al.*, 2020; NAMJOYAN *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2012).

Contudo, apesar de seus efeitos clareadores, há relatos de que o ácido kójico pode causar dermatite de contato, sensibilização e eritema (GILLBRO; OLSSON, 2011). Segundo o European Scientific Committee on Consumer Safety concentrações de ácido kójico de até 1% são seguras para uso tópico em pele íntegra (KARIN, 2012).

Apesar de possuir eficácia comprovada, o ácido kójico é um ativo que apresenta baixa estabilidade, sensibilidade à luz e calor e risco de oxidação (BALAGUER; SALVADOR; CHISVERT, 2008; EPHREM; ELAISSARI; GREIGERGES, 2017; GONÇALEZ, Maíra Lima *et al.*, 2015). Portanto, alternativas que alterem a molécula de forma a torná-la mais estável se mostram interessantes.

O dipalmitato de ácido kójico (KDP) (Figura 1) é a forma esterificada do ácido kójico e, por ser um éster, apresenta maior estabilidade, sendo uma alternativa interessante para o ácido kójico. Ele sofre hidrólise por esterases localizadas nas células da pele, liberando ácido kójico *in situ* (BALAGUER; SALVADOR; CHISVERT, 2008), sendo utilizado como agente clareador da pele. Portanto, seu mecanismo de ação é o mesmo que o citado anteriormente para o ácido kójico: inibindo a enzima tirosinase, quelando cobre, modulando leucócitos e agindo como antioxidante. Embora uma das razões para se utilizar o KDP no lugar do ácido kójico seja sua maior estabilidade, estudo comparando ambas as formulações sob condições líquidas de estresse oxidativo concluiu que o derivado esterificado sofre degradação mais rapidamente (TAZESH *et al.*, 2021). Contudo, o uso do derivado esterificado ainda se justifica devido às suas características lipofílicas, que podem conferir maior absorção cutânea. O estudo realizado por Tazesh e colaboradores (2021) observou ainda que o método utilizado para detectar o éster não foi capaz de detectar o ácido kójico, e que mais estudos são necessários para compreender o mecanismo de degradação do KDP. Sugere-se também que formulações com KDP sejam acrescidas de ativo antioxidante e que estratégias como mantê-lo na parte interna de emulsões óleo em água auxiliem a aumentar seu tempo de prateleira (TAZESH *et al.*, 2021).

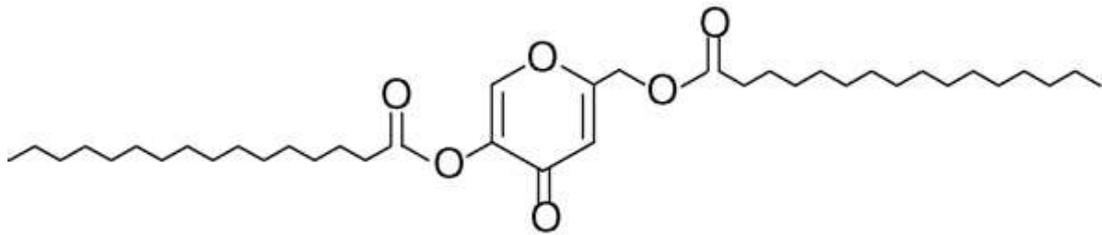


Figura 1. Estrutura molecular do dipalmitato de ácido kójico. Fonte: BALAGUER, SALVADOR e CHISVERT, 2008.

O KDP se apresenta na forma de um pó lipossolúvel, estável frente à luz e ao calor e em ampla faixa de pH (GONÇALEZ, Maíra Lima *et al.*, 2015). Por ser um ativo lipofílico, possuindo um logP de 14,7 (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2022), apresenta difícil solubilização. A solubilidade do KDP foi testada em diferentes solventes, como água, acetato de etila, heptano, acetonitrila, metanol, etanol, diclorometano e tetrahidrofurano, e apenas os dois últimos (diclorometano e tetrahidrofurano) foram capazes de solubilizar o ativo (BALAGUER; SALVADOR; CHISVERT, 2008).

Devido à dificuldade de solubilização, é difícil incorporar o KDP em formulações cosméticas e dermatológicas, sendo necessárias estratégias como o uso de temperaturas elevadas e óleos, como óleos vegetais, por exemplo o óleo de coco (AL-EDRESI; BAIE, 2009) ou óleos minerais, como o petrolato líquido (GONÇALEZ, Maíra Lima *et al.*, 2015). Al-Edresi e Baie (2009) relatam a dificuldade de solubilização do ativo ao precisarem empregar o uso de temperaturas elevadas, 70°C, para obter a solubilização do KDP em óleo de coco virgem (AL-EDRESI; BAIE, 2009). Esta questão dificulta a incorporação do ativo em formulações cosméticas, especialmente as formulações não oleosas, como os géis.

Diferentes estratégias podem ser aplicadas para a incorporação do mesmo em formulações, como por exemplo, um sistema coloidal de emulsão múltipla, que possibilita o carregamento de ativos lipofílicos aumentando sua biodisponibilidade enquanto os protege de degradação biológica e processos de oxidação (GONÇALEZ, Maíra Lima *et al.*, 2015). Em estudo realizado por Gonçalves e colaboradores (2015) com uma emulsão múltipla contendo o ativo, observou-se que não houve alterações com a adição de KDP na formulação quanto à aparência da formulação, tamanho de gotículas, pH, condutividade elétrica, bioadesão, teste de hemólise de eritrócitos e viabilidade celular, o que indicou segurança e biocompatibilidade (GONÇALEZ, Maíra Lima *et al.*, 2015).

Além disso, devido ao elevado peso molecular do ativo (604,9 g/mol) (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2022) quando comparado a outras matérias-primas utilizadas em cosméticos, métodos de cromatografia líquida por exclusão de tamanho se mostram efetivos para separá-la de outros possíveis componentes de cosméticos. Tais métodos são precisos e com boa sensibilidade para análises de teor de KDP em cosméticos (BALAGUER; SALVADOR; CHISVERT, 2008). O método de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV (CLAE-UV) também é um método preciso que permite a quantificação de KDP (TAZESH *et al.*, 2021).

3.3. Óleo de rosa mosqueta

O óleo de rosa mosqueta é obtido através das sementes da planta *Rosa aff rubiginosa* L. (FRANCO *et al.*, 2007), pertencente ao gênero *Rosa*, da família *Rosaceae* (Figura 2). Existem cerca de 70 espécies diferentes do gênero *Rosa* no mundo (SANTOS; VIEIRA; KAMADA, 2009), que podem ser encontradas na região central da Europa e região Andina (FRANCO *et al.*, 2007). O fruto desta planta é rico em ácido ascórbico, betacarotenos e licopenos, além de possuir altas concentrações de vitaminas A, B1, B2, E e K, e minerais como o potássio, cálcio, sódio, ferro e magnésio (SANTOS; VIEIRA; KAMADA, 2009), enquanto o óleo extraído de suas sementes é rico em ácidos graxos, como o linoleico e o alfa-linoleico. Os ácidos linolênico, oleico, palmítico, esteárico e araquidônico também já tiveram sua presença relatada no óleo de rosa mosqueta (AYATI *et al.*, 2018; SANTOS; VIEIRA; KAMADA, 2009).

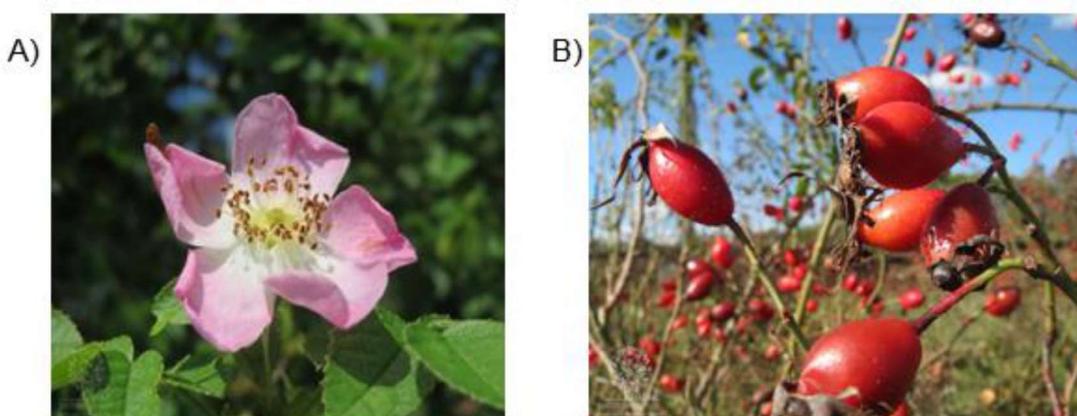


Figura 2. A) Imagem da planta *Rosa aff rubiginosa* L.: A) flor e B) fruto (JARDIM BOTÂNICO DA UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO, [s. d.]

Ácidos graxos são essenciais, pois possuem função estrutural nas membranas dos tecidos, ajudando a formar os fosfolipídeos dessas membranas, além de participarem de processos metabólicos como trocas iônicas e organização celular, o que justifica o uso do óleo de rosa mosqueta como ativo cicatrizante. O óleo proveniente das sementes, além de possuir ácidos graxos, possui, assim como os frutos, ácido ascórbico, ácido trans-retinóico, sais minerais e fenóis (SANTOS; VIEIRA; KAMADA, 2009), o que garante propriedade antioxidante, fazendo com que seu uso tópico auxilie na atenuação do envelhecimento cutâneo. Essa combinação de ativos presentes no óleo de rosa mosqueta o torna uma alternativa para auxiliar no processo de regeneração da pele, auxiliando na atividade cicatrizante, no tratamento de úlceras, na eliminação de radicais livres e também possuindo efeitos despigmentantes (CONTRI, Renata V. *et al.*, 2016; SANTOS; VIEIRA; KAMADA, 2009).

O uso do óleo de rosa mosqueta em cosméticos é indicado em concentrações entre 2% e 30% (CONTRI, Renata V. *et al.*, 2016). Devido aos seus componentes, sua indicação cosmética principal é como cicatrizante e também para prevenção dos efeitos do envelhecimento na pele, agindo na atenuação de rugas. Além disso, também possui ação clareadora, com efeitos inibidores da melanogênese (BINIC *et al.*, 2013). Por ser um óleo vegetal, é possível que o mesmo sofra oxidação, e fazer uso de estratégias que evitem tal acontecimento se mostram benéficas para preservar a integridade do ativo.

O óleo de rosa mosqueta, além da atividade antioxidante, também apresenta atividade anti-inflamatória e foto-protetora (KAYATH; DHAWAN; NANDA, 2019). Ações do óleo em diferentes enzimas também já foram relatadas, com o mesmo possuindo ação anti-elastase, anti-colagenase e anti-hialuronidase, enzimas relacionadas com a pele e o envelhecimento cutâneo, o que demonstra seu potencial para aplicação em formulações cosméticas e dermatológicas. Devido a estas características, o mesmo pode ser aplicado para amenizar efeitos danosos causados pela radiação UV (KAYATH; DHAWAN; NANDA, 2019).

3.4. Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma aplicação da ciência que trabalha em escala nanométrica, com partículas de aproximadamente 100 nanômetros. É uma área

inovadora que permite modificar o desempenho de substâncias ativas, levando a um melhor comportamento das mesmas (CONTRI, Renata V. *et al.*, 2011).

O uso da nanotecnologia em formulações cosméticas e dermatológicas leva a uma melhoria na atuação dos ativos devido à diminuição do tamanho de suas partículas e, conseqüentemente, aumento da área superficial, permitindo um controle da liberação dos ativos na pele bem como a proteção dos mesmos frente aos agentes externos, aumentando sua estabilidade (CONTRI, Renata V. *et al.*, 2011). Entre as vantagens que o uso de sistemas nanotecnológicos atrelados a dermocosméticos podem trazer temos uma melhor distribuição na pele de ativos incorporados a cosméticos; maior retenção dos ativos na pele, com aumento também da bioadesividade; controle de liberação; proteção da substância ativa contra degradações que as mesmas poderiam sofrer no meio; aumento da estabilidade e; melhora de características sensoriais (KÜLKAMP-GUERREIRO *et al.*, 2013; SCHMALTZ; SANTOS; GUTERRES, 2005).

Existem diferentes tipos de nanopartículas aplicadas aos produtos cosméticos e dermatológicos, que podem ser classificadas como solúveis ou permanentes, apresentando diferentes aplicações. Nanopartículas permanentes são aquelas com maior aplicação para fotoproteção, sendo compostas por óxidos metálicos. Já as nanopartículas solúveis são compostas por materiais biodegradáveis, de forma que nem o ser humano nem o meio ambiente sofram com o acúmulo deste material. Exemplos de nanopartículas solúveis são os lipossomas, as nanoesferas (partículas poliméricas matriciais), as nanocápsulas (partículas poliméricas com núcleo oleoso), as nanopartículas lipídicas sólidas e as nanoemulsões (GUTERRES; BECK; POHLMANN, 2012). Estas partículas solúveis apresentam aplicação em diversos produtos cosméticos e dermatológicos, como é o caso dos clareadores de pele (JACOBUS BERLITZ *et al.*, 2019).

Uma nanoemulsão consiste na dispersão de dois líquidos imiscíveis, sendo uma fase oleosa e uma aquosa, acrescidas de tensoativo em uma delas ou em ambas (GONÇALVES, 2014). São dispersões coloidais transparentes, monofásicas, cineticamente estáveis e com tamanho de gotícula normalmente inferior a 100 nanômetros, possuindo baixa polidispersão. Nanoemulsões podem ser preparadas através do uso de métodos de alta ou baixa energia (NASTITI *et al.*, 2017). Métodos de alta energia empregam o uso de equipamentos como ultrassom de ponteira,

Ultra-Turrax[®], ou homogeneizador de alta pressão, enquanto os métodos de baixa energia envolvem a emulsificação espontânea e emulsificação por ponto de inversão (GAZZI *et al.*, 2021). Destacando os métodos de alta energia, eles dependem de equipamentos que criem forças disruptivas capazes de promover diminuição de tamanho (SINGH *et al.*, 2017). O Ultra-Turrax[®] é um equipamento simples de fácil uso. Um aspecto que se deve tomar cuidado ao utilizar este método é com o uso de ativos termolábeis, visto que os equipamentos podem aquecer durante o uso, podendo levar a degradação de ativos sensíveis ao calor; já como vantagens pode-se destacar sua versatilidade, visto que se pode submeter praticamente qualquer óleo à nanoemulsificação (SINGH *et al.*, 2017) e ao fato de que não é necessário o uso de solvente orgânico para sua produção.

As nanoemulsões são sistemas isotrópicos que podem ser categorizados em três diferentes tipos: óleo em água, no qual a fase oleosa se encontra dispersa na fase aquosa; água em óleo, no qual a fase aquosa se encontra dispersa na fase oleosa e; emulsão múltipla, onde ambas as fases são inter-dispersas no sistema (RAI *et al.*, 2018). O tamanho de gotícula destes sistemas ajuda a impedir fenômenos como coalescência e separação de fases, além de contribuírem para redução da perda transepidérmica de água (GONÇALVES, 2014). As nanoemulsões apresentam-se como uma boa escolha para fins de permeação cutânea dos ativos devido ao reduzido tamanho de gotícula (GAZZI *et al.*, 2021; SINGH *et al.*, 2017).

Sistemas nanoestruturados com óleo de rosa mosqueta já foram descritos na literatura (CONTRI, Renata V. *et al.*, 2016; KAYATH; DHAWAN; NANDA, 2019). Através do uso de nanocápsulas foi possível encapsular o óleo de rosa mosqueta protegendo o mesmo da oxidação (CONTRI, Renata V. *et al.*, 2016). Além disso, tal estratégia também permitiu a incorporação do ativo oleoso em formulações hidrofílicas, além de aumentar o tempo de contato do ativo com a pele e consequentemente prolongar seu efeito (CONTRI, Renata V. *et al.*, 2016). Estudos avaliando a atividade antioxidante e a prevenção dos efeitos do envelhecimento na pele do óleo em nanoemulsão demonstraram que essa estratégia permitiu aliviar efeitos do foto-envelhecimento, garantindo ao óleo propriedades antioxidantes muito boas e também permitindo sua incorporação em géis (KAYATH; DHAWAN; NANDA, 2019). O tempo de liberação do ativo do gel contendo a nanoemulsão foi de 7 horas

(KAYATH; DHAWAN; NANDA, 2019), demonstrado que este tipo de nanossistema também garante um controle de liberação do ativo.

Do mesmo modo, a associação de sistemas nanotecnológicos com o ativo KDP também já foi descrita em nanoemulsões (AL-EDRESI; BAIE, 2009, 2010), e em lipossomas (ALEDRESI; ALSHAIBANI; ABOOD, 2020). Em 2009 Al-Edresi e Baie mostraram que foi possível obter uma nanoemulsão estável contendo KDP (AL-EDRESI; BAIE, 2009) e em 2010 os mesmos autores avaliaram a permeação da formulação desenvolvida em nanocrema *in vitro* e *in vivo* e suas descobertas demonstraram que as nanopartículas são carreadores eficientes de KDP no folículo piloso e que podem aumentar o tempo de contato e armazenamento do ativo na pele, prolongando sua atividade em relação a cremes não nanoestruturados contendo o mesmo ativo (AL-EDRESI; BAIE, 2010). Lipossomas são um tipo de nanopartícula vesicular, compostos por bicamadas lipídicas que podem carregar tanto ativos lipofílicos quanto hidrofílicos (GAZZI *et al.*, 2021). Este tipo de nanopartícula pode ser utilizado para aumentar a capacidade de carregamento de substâncias altamente lipofílicas, como é o caso do KDP. Estudo demonstrou que através de um método de carregamento ativo foi possível aumentar o carregamento de KDP em lipossomas, e tal resultado permitiu o desenvolvimento de uma formulação com alta biodisponibilidade do ativo que potencial para uso clínico (ALEDRESI; ALSHAIBANI; ABOOD, 2020). Para o KDP, a principal vantagem do uso da nanotecnologia se dá pela alta lipofilia do ativo, e sistemas nanotecnológicos permitem que o mesmo seja incorporado em veículos aquosos. A associação do KDP com outro ativo que também possua atividade clareadora, como o óleo de rosa mosqueta, em nanoemulsão possui potencial para uma formulação inovadora para tratamento de melasma, aliando às características dos ativos com os benefícios da nanotecnologia.

Sistemas altamente tecnológicos, como os sistemas nanoestruturados, possuem uma dificuldade de aumento da escala de produção, visto que podem ocorrer inconsistências nas características físicoquímicas na hora de transformar uma escala laboratorial em uma escala industrial. Tais inconsistências podem ocorrer devido a erros na hora de aumentar os parâmetros do processo ou devido a dificuldades que os operadores podem ter lidando com volumes maiores (SINGH *et al.*, 2017). Entretanto, é de extrema importância para a viabilidade de mercado que

seja possível escalonar tais formulações, especialmente considerando sua aplicabilidade para uso em formulações cosméticas e farmacêuticas. É importante antes de escalonar formulações como nanoemulsões para lotes em escala industrial, fazer o uso de uma escala intermediária, de forma a ajustar possíveis pontos que possam interferir no processamento de um volume maior (SINGH *et al.*, 2017). Nanoemulsões são dispersões coloidais termodinamicamente instáveis mais cineticamente estáveis (NASTITI *et al.*, 2017); a etapa de mistura da fase orgânica com a aquosa é um ponto crucial para controlar o tamanho de gotícula (MITRI *et al.*, 2012) e manter as características e benefícios trazidos pelo uso da escala nanotecnológica.

4. CAPÍTULO 1

**Biological activities and safety data of kojic acid and its derivatives
– a review**

Apresentação do Capítulo

Este capítulo traz uma revisão da literatura quanto aos usos e atividades do ácido kójico e seus derivados, bem como informações relativas à sua segurança. A busca foi realizada com a palavra “kojic” sendo combinada com as seguintes palavras: “toxicity”, “adverse effect”, “efficacy”, “effect”, “activity” e “safety”. Foram incluídos artigos de 2010 até 2021 que abordassem informações quanto à atividade biológica e segurança do ácido kójico e seus derivados. O artigo intitulado “Biological activities and safety data of kojic acid and its derivatives – a review” foi revisado por pares e encontra-se pronto para submissão.

O ácido kójico e seus derivados possuem variadas aplicações além da sua atividade mais conhecida, como agente clareador da pele. A atividade clareadora se dá pela ligação do ativo (ou de seus derivados) no sítio ativo da enzima tirosinase, pela regulação de fatores da melanogênese, pela modulação de leucócitos e pela eliminação de radicais livres. Além disso, atividades antioxidante, antibacteriana, antifúngica e anti-inflamatória também são encontradas nesta matéria-prima e em seus derivados. A molécula ainda apresenta potencial antitumoral, sendo citotóxica para células cancerígenas enquanto em concentrações seguras para células saudáveis. O uso de derivados apresentou vantagens quanto à estabilidade e à atividade. Mais estudos clínicos devem ser encorajados visto que o ácido kójico e seus derivados possuem imenso potencial para aplicação cosmética, farmacêutica e médica.

5. CAPÍTULO 2

**Nanoemulsion containing kojic dipalmitate and rose hip oil:
characterization, efficacy and cytotoxicity**

Apresentação do Capítulo

Este capítulo traz um artigo experimental original que se encontra pronto para submissão. Considerando a fisiopatologia do melasma, a agressividade e a dificuldade de seu tratamento, utilizou-se a nanotecnologia aliada com o ativo clareador dipalmitato de ácido kójico (KDP) e o óleo de rosa mosqueta.

O KDP é um éster derivado do ácido kójico que apresenta vantagens em relação ao seu precursor por possuir maior estabilidade frente à luz e ao calor e em ampla faixa de pH. Contudo, ele é altamente lipofílico, o que dificulta sua incorporação em veículos aquosos. O uso de óleo vegetal auxilia a solubilizar o ativo, e o óleo de rosa mosqueta especificamente possui atividade antioxidante e regeneradora de pele, mostrando-se como uma excelente opção. A nanotecnologia trabalha com um tamanho reduzido de partículas, o que leva a um aumento da superfície de contato dos ativos, podendo também aumentar sua atividade, estabilidade e permitir maior permeação cutânea. Aliar o KDP ao óleo de rosa mosqueta e a nanotecnologia se mostra como uma estratégia inovadora para possibilitar o desenvolvimento de uma nova formulação com alta atividade para tratamento de melasma.

Foi possível desenvolver nanoemulsões com óleo de rosa mosqueta e diferentes concentrações de KDP (1 e 2 mg/mL). As formulações desenvolvidas se encontraram com características nanotecnológicas adequadas, com diâmetro de gotícula inferior a 130 nanômetros, eficiência de encapsulação superior a 95%, e se mantiveram estáveis por 30 dias sob refrigeração. Atividade antioxidante superior a 70% foi obtida através do ensaio de DPPH e atividade inibidora da enzima tirosinase de cerca de 20% foi obtida através do ensaio de inibição da tirosinase com a utilização da enzima tirosinase proveniente de cogumelos. Não foi observada citotoxicidade em fibroblastos da linhagem celular 3T3 em concentrações variando de 0.06% a 1% das formulações desenvolvidas. Os resultados demonstraram potencial das nanoemulsões desenvolvidas para aplicação em formulações cosméticas para tratamento de melasma.

6. DISCUSSÃO GERAL

O ácido kójico é um ácido orgânico derivado da fermentação de fungos que, apesar de ser estudado desde a década de 1940, segue sendo alvo de pesquisas e recorrente em publicações da última década (figura 1, capítulo 1). O primeiro capítulo desta dissertação teve como objetivo revisar a literatura quanto às atividades biológicas e informações de segurança do ácido kójico e seus derivados, elucidando mecanismos de ação.

A principal atividade do ácido kójico é a atividade clareadora, que ocorre através da inibição da enzima chave para produção de melanina, a tirosinase. O ácido kójico age quelando o cobre, substrato dessa enzima e também suprimindo a tautomerização de DOPA em 5,6-dihydroxyindol-2-carboxylic acid (GILLBRO; OLSSON, 2011; ZAID; AL RAMAHI, 2019). Como radicais livres induzem a síntese de melanina, atividade antioxidante também está envolvida no mecanismo de ação (LAJIS; HAMID; ARIFF, 2012). A modulação de leucócitos também está envolvida na atividade clareadora, e mecanismos que não envolvem a enzima tirosinase já foram relatados, como a regulação positiva da produção de interleucina-6 em queratinócitos levando a uma queda da melanogênese em melanócitos, o que sugere uma comunicação cruzada entre estas células (CHOI *et al.*, 2012).

Além da atividade clareadora significativa e conhecida, a molécula do ácido kójico, bem como seus derivados, possuem diversas outras atividades, como antisenescência de células da córnea (WEI *et al.*, 2019, 2020), processo que está também relacionado ao envelhecimento; atividade anticonvulsivante (AYTEMIR; ÇALIŞ, 2010); e como agente de manejo da obesidade, inibindo a enzima lipase pancreática (EL-KORANY *et al.*, 2020). Contudo, entre as atividades do ácido kójico e seus derivados que não a atividade clareadora, as atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória merecem destaque, visto que podem estar atuando sinergicamente com um efeito clareador, além de trazerem outros benefícios para formulações de uso cosmético e dermatológico. A atividade antimicrobiana se destaca principalmente por ter sido testada contra patógenos de pele, como o *Staphylococcus aureus* (BRACARENSE; TAKAHASHI, 2014; NURUNNABI *et al.*, 2018; RAJAMANIKYAM *et al.*, 2017; SIDDHARDHA *et al.*, 2010).

O primeiro capítulo desta dissertação evidenciou a importância farmacêutica e cosmética da molécula do ácido kójico, possibilitando um maior entendimento de

seus mecanismos e achando potencial para seu uso, principalmente do uso de seus derivados. Derivados esterificados, como o dipalmitato de ácido kójico (KDP), possui estabilidade superior ao ácido kójico (GONÇALEZ, Maíra Lima *et al.*, 2015), e o uso da nanotecnologia se mostrou repetidamente benéfico quando aliado às moléculas estudadas (AFIFAH *et al.*, 2018; EZZAT *et al.*, 2021; GONÇALEZ, M. L.; CORRÊA; CHORILLI, 2013; KHEZRI *et al.*, 2020; ROSELAN *et al.*, 2021; SYED AZHAR *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2012).

Encontrou-se, no derivado KDP, potencial para desenvolver uma nova formulação de base nanotecnológica. Este derivado esterificado possui maior estabilidade do que o ácido kójico (GONÇALEZ, Maíra Lima *et al.*, 2015) e ao aliá-lo com as características antioxidante e regeneradora do óleo de rosa mosqueta (SANTOS; VIEIRA; KAMADA, 2009) em nanoemulsões, trazendo para esta formulação os diversos benefícios que a nanotecnologia possui, foi observado o desenvolvimento de uma formulação inovadora de potencial atividade visando ao tratamento de melasma.

Foi possível incorporar até 0,2% de KDP processando as nanoemulsões desenvolvidas numa temperatura de 60°C fazendo uso de um método de alta energia, utilizando o equipamento Ultra-Turrax® (IKA® T10 basic), sem o uso de solventes orgânicos. As formulações desenvolvidas apresentaram aspecto homogêneo, com uma coloração opaca esbranquiçada e com brilho azulado. O teor das nanoemulsões, determinado a partir de método HPLC-UV previamente validado, foi de $101,29 \pm 1,62\%$ e $96,67 \pm 4,96\%$ para 1 mg/mL e 2 mg/mL de KDP respectivamente, indicando que não houve perdas durante o processo de produção. A eficiência de encapsulação foi superior a 95%, indicando alta afinidade do ativo com o óleo de rosa mosqueta.

Duas técnicas diferentes foram utilizadas para medir o diâmetro das gotículas: difração de laser e espalhamento de luz dinâmico. Foram observadas diferenças nos diâmetros médios dependendo da técnica empregada. O diâmetro médio, para a técnica de difração de laser, foi de aproximadamente 120 nanômetros, enquanto que, para a técnica de espalhamento de luz dinâmico, foi de aproximadamente 73 nanômetros. A diferença entre as técnicas pode explicar essa diferença de tamanho. Enquanto a técnica de difração de laser mede o tamanho de uma partícula

espalhando luz de forma similar ao das partículas sendo investigadas, a técnica de espalhamento de luz dinâmico determina o raio hidrodinâmico de uma partícula hipotética espalhando luz na mesma intensidade das partículas sendo investigadas enquanto difundem na dispersão, e estas diferenças podem levar a diferenças entre resultados (BHATTACHARJEE, 2016). Contudo, ambas as análises levaram a diâmetro de gotícula e distribuição de tamanho adequado para nanoemulsões (RAI *et al.*, 2018), e similares aos diâmetros descritos em trabalhos prévios da literatura com outro derivado esterificado de ácido kójico, o kójico monooleato (AFIFAH *et al.*, 2018; ROSELAN *et al.*, 2020).

O valor de potencial zeta foi próximo a -10 mV para todas as nanoemulsões desenvolvidas, indicando que a estabilidade do sistema se dá principalmente devido a efeito estérico (BARRADAS *et al.*, 2015). A densidade das formulações foi próxima a 1 mg/mL, próxima à densidade da água, e os valores de pH ficaram levemente ácidos, o que se mostra adequado para formulações previstas para uso tópico, que se recomenda que o pH fique entre 4 e 7 (MARTÍNEZ-PLA *et al.*, 2004).

Quanto à estabilidade, foi possível observar que as características de tamanho e distribuição de gotículas, potencial zeta, pH e densidade se mantiveram ao longo dos 30 dias estudo. Já para o teor, tanto para as nanoemulsões de KDP quanto para as dispersões do ativo foi possível observar uma queda no teor em 30 dias, dependente da temperatura. Sabe-se que o KDP é hidrolisado por esterases localizadas na pele (BALAGUER; SALVADOR; CHISVERT, 2008), e que a hidrólise não é uma reação espontânea, mas é catalisada pelo calor (DINCER; ZAMFIRESCU, 2016), logo isso explica o porquê da refrigeração (8°C) ter mantido o teor das formulações estável enquanto que temperatura ambiente (25°C) e estufa (40°C) levaram a uma queda de aproximadamente 30% e 75% do teor, respectivamente (figura 1, capítulo2). Contudo, como o KDP é hidrolisado para ácido kójico na pele para exercer sua atividade, perdas no teor não necessariamente significam perdas na atividade. Além disso, devido à alta lipofilia do ativo, é esperada a possibilidade de formação de cristais visto que o mesmo se encontra num meio aquoso. Comparando as nanoemulsões com as dispersões de KDP foi possível observar que o sistema nanotecnológico ajudou a manter a estabilidade do sistema, formando uma menor quantidade de cristais; já comparando as duas

concentrações do ativo utilizadas, foi possível concluir que quando usado na concentração de 1 mg/mL o ativo formou menos cristais, sugerindo uma superioridade da formulação quando utilizada a concentração de 0,1% do ativo (figura 2, capítulo 2).

Estudos de permeação *in vitro* foram realizados utilizando a membrana sintética Strat-M® (Transdermal Diffusion Test Model, Millipore, Merck, Co. Cork, Ireland). O meio receptor utilizado (92,5% água purificada, 3,75% polissorbato 80 e 3,75% oleato de sorbitano) foi escolhido com o intuito de manter o ativo disperso no meio após sua passagem pela membrana. As nanoemulsões (1 e 2 mg/mL) foram comparadas com as dispersões (1 e 2 mg/mL), as últimas contendo apenas o ativo e os tensoativos. Como as nanoemulsões desenvolvidas são previstas para uso tópico e os melanócitos encontram-se na camada basal da epiderme (SAEEDI; ESLAMIFAR; KHEZRI, 2019), é importante que o ativo chegue até ela. Embora os resultados obtidos (figura 3, capítulo 2) possam indicar uma tendência a uma maior permeação do ativo quando em nanoemulsões em relação às dispersões, não houve diferenças estatísticas significantes. As nanoemulsões desenvolvidas não impediram a penetração do KDP através da pele.

O ensaio foi realizado com uma membrana sintética, que pode proporcionar estimativas sobre a permeação cutânea de forma rápida e ser adequada para testes iniciais; contudo, ela não exclui a necessidade de outros modelos mais biologicamente semelhantes à pele humana (KARADZOVSKA; RIVIERE, 2013). Pele de orelha de porco é uma opção mais biologicamente semelhante à pele humana, com estruturas foliculares e permeação semelhantes, além de ser de fácil obtenção (MACHADO *et al.*, 2017). Além disso, é um modelo que permite a separação das camadas da pele, possibilitando quantificar os ativos em cada uma delas.

As nanoemulsões de KDP (1 e 2 mg/mL), bem como a nanoemulsão sem o ativo e as dispersões do ativo (1 e 2 mg/mL) foram analisadas quanto às atividades antioxidante e de inibição da enzima tirosinase. Não foram observadas diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) nestes ensaios entre as duas concentrações testadas, nem para as nanoemulsões nem para as dispersões.

Para a atividade antioxidante, foi possível observar atividade tanto para as nanoemulsões quanto para as dispersões, com maior atividade para as nanoemulsões. Tal resultado está de acordo com resultados previamente descritos na literatura para carreadores lipídicos nanoestruturados com ácido kójico, onde as nanopartículas obtiveram maior atividade do que ácido kójico não encapsulado (KHEZRI *et al.*, 2021) e para emulsões múltiplas com KDP, onde observou-se que, apesar da ausência de diferenças entre formulações no dia 0, ao longo do período de teste o uso da nanotecnologia garantiu uma maior atividade para o ativo (GONÇALEZ, Maíra Lima *et al.*, 2015). Além disso, a nanoemulsão desenvolvida sem o ativo também apresentou atividade antioxidante, o que indicou que o óleo de rosa mosqueta, óleo escolhido para o desenvolvimento da nanoemulsão, está de fato envolvido com as propriedades antioxidantes da nanoemulsão. O uso de nanotecnologia com o óleo de rosa mosqueta em nanocápsulas já foi descrito, e foi mostrado que o uso da nanotecnologia aumenta a estabilidade de óleos vegetais e previne perdas na sua atividade (CONTRI, Renata V. *et al.*, 2016). Além disso, nanoemulsões com óleo de rosa mosqueta já foram descritas também, com atividade antioxidante, anti-inflamatória e foto-protetora relatadas (KAYATH; DHAWAN; NANDA, 2019). Isso demonstra o potencial do óleo escolhido e que é possível que ocorra um efeito sinérgico com o KDP quanto à atividade antioxidante.

Quanto à atividade inibidora da enzima tirosinase, as nanoemulsões com KDP inibiram a enzima em torno de 20%, mostrando potencial das nanoemulsões desenvolvidas para aplicação como agentes despigmentantes. Já as dispersões inibiram cerca de 80%, superior à inibição das nanoemulsões. Isso pode ser devido ao fato de que nas nanoemulsões o KDP está protegido dentro da gotícula em escala nanométrica, dificultando o contato da mesma com a enzima. Para exercer sua atividade, o ativo precisa, provavelmente, ser liberado da nanoestrutura, o que, devido ao curto tempo de experimento, pode não ter acontecido. Este resultado vai de acordo com o encontrado por Roselan e colaboradores para kójico monooleato e nanoemulsões de kójico monooleato, de forma que, em concentrações de 50 a 500 µg/mL, o kójico monooleato apresentou uma inibição da enzima superior à nanoemulsão contendo o ativo (ROSELAN *et al.*, 2021).

A nanoemulsão sem o ativo não apresentou atividade inibindo a enzima tirosinase, indicando que, apesar do óleo de rosa mosqueta ser rico em ácido ascórbico (SANTOS; VIEIRA; KAMADA, 2009) e possuir atividade antioxidante, ele não inibiu a enzima tirosinase. Tal atividade era esperada visto que a atividade antioxidante também atua inibindo a enzima tirosinase (ZAID; AL RAMAHI, 2019). Contudo, assim como para as nanoemulsões com KDP, o óleo pode não ter sido liberado da nanoestrutura, impedindo seu contato direto com a enzima.

A toxicidade das nanoemulsões com KDP (1 e 2 mg/mL), bem como a da nanoemulsão sem o ativo, foram avaliadas com ensaio de viabilidade celular utilizando a linhagem celular de fibroblastos 3T3-L1. As amostras foram seguras nas concentrações testadas (de 0,06 a 1%). Outro estudo testou a segurança de emulsões múltiplas de KDP em células J-774, que também se mostraram seguras. Já foi demonstrado que partículas poliméricas de cerca de 150 nanômetros podem penetrar pele lesionada (CONTRI, R. V. *et al.*, 2016). Portanto, as nanoemulsões desenvolvidas neste estudo, que têm tamanho de gotícula inferior a 150 nanômetros, poderiam penetrar a pele, especialmente se a mesma estiver lesionada. Isto demonstra a importância dos estudos de viabilidade celular para novas formulações.

Passar uma escala laboratorial para uma escala industrial requer atenção e cuidado. Muitos interferentes, como dificuldade de operadores para lidar com lotes maiores, equipamentos apropriados para o aumento da escala de produção e inconsistências físicoquímicas podem surgir (SINGH *et al.*, 2017). Foi possível aumentar a escala de produção da nanoemulsão proposta em um lote dez vezes maior (passando de 35 mL para 350 mL). Para tal, foi necessário alterar o equipamento homogeneizador. A formulação escalonada apresentou características físicoquímicas iguais as da formulação laboratorial, mantendo características de pH, densidade, diâmetro de gotícula e distribuição de tamanho e potencial zeta. O teor da formulação contendo 1 mg/mL do ativo se manteve, contudo, ocorreram perdas significativas no teor da formulação com 2 mg/mL de KDP, sugerindo que alterações no método são necessárias de forma a garantir a solubilização do ativo e sua incorporação na formação da emulsão primária. Acredita-se que podem ter ocorrido perdas de KDP no momento da preparação da emulsão primária, com uma falta de

agitação adequada para a incorporação das fases da emulsão, levando à precipitação do ativo nas paredes do recipiente. Existe potencial para o aumento de escala de produção da nanoemulsão proposta, mas é essencial garantir a solubilização e incorporação do ativo, o que é um fator chave para se garantir o teor na formulação final.

7. CONCLUSÃO GERAL

Em conclusão, o ácido kójico e seus derivados possuem atividade clareadora que se dá pela ligação do ativo com a enzima tirosinase, regulação de fatores da melanogênese, modulação de leucócitos e pela atividade antioxidante. Além disso, possuem também atividade antioxidante, antibacteriana, antifúngica e anti-inflamatória e também potencial para serem usados como agentes antitumorais. São substâncias relativamente seguras, considerando uso humano. Os derivados do ácido kójico apresentam vantagens em relação a ele por serem mais estáveis e permitirem melhorias na atividade. Foi possível desenvolver nanoemulsões com um derivado do ácido kójico, o dipalmitato de ácido kójico. O uso da nanotecnologia permitiu a incorporação de até 0,2% do ativo altamente lipofílico em um veículo aquoso, com propriedades adequadas para aplicação tópica, podendo facilitar a incorporação deste ativo em formulações cosméticas. As formulações desenvolvidas apresentaram características nanotecnológicas e estabilidade em refrigeração. Apresentaram atividade antioxidante e inibidora da tirosinase além de não ter comprometido a viabilidade celular, se mostrando seguras. Portanto, foi possível associar dipalmitato de ácido kójico e óleo de rosa mosqueta em nanoemulsões com potencial para uso no tratamento do melasma.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFIFAH, Sharifah Nurfadhlin *et al.* Development of a kojic monooleate-enriched oil-in-water nanoemulsion as a potential carrier for hyperpigmentation treatment. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 13, p. 6465–6479, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IJN.S171532>

AL-EDRESI, Sarmad; BAIE, Saringat. Formulation and stability of whitening VCO-in-water nano-cream. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 373, n. 1–2, p. 174–178, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.02.011>.

AL-EDRESI, Sarmad; BAIE, Saringat. In-vitro and in-vivo evaluation of a photo-protective kojic dipalmitate loaded into nano-creams. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 251–265, 2010.

ALEDRESI, Sarmad Sabah; ALSHAIBANI, Abulfadhel Jaber; ABOOD, Ahmed Najim. Enhancing the Loading Capacity of Kojic Acid Dipalmitate in Liposomes. **Latin American Journal of Pharmacy**, [s. l.], v. 39, n. 7, 2020.

ANVISA. Resolução Da Diretoria Colegiada - RDC Nº 529, de 4 de agosto de 2021. **DOU nº 151, de 11 de agosto de 2021**, [s. l.], p. 1–94, 2021.

AYATI, Zahra *et al.* Phytochemistry, Traditional Uses and Pharmacological Profile of Rose Hip: A Review. **Current pharmaceutical design**, [s. l.], v. 24, n. 35, p. 4101–4124, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1381612824666181010151849>.

AYTEMIR, Mutlu Dilsiz; ÇALIŞ, Ünsal. Anticonvulsant and neurotoxicity evaluation of some novel kojic acids and allomaltol derivatives. **Archiv der Pharmazie**, [s. l.], v. 343, n. 3, p. 173–181, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ardp.200900236>.

BALAGUER, A.; SALVADOR, A.; CHISVERT, A. A rapid and reliable size-exclusion chromatographic method for determination of kojic dipalmitate in skin-whitening cosmetic products. **Talanta**, [s. l.], v. 75, n. 2, p. 407–411, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2007.11.021>.

BANG, Eun Jin *et al.* Evaluation of the Novel Synthetic Tyrosinase Inhibitor (Z)-3-(3-bromo-4-hydroxybenzylidene)thiochroman-4-one (MHY1498) In Vitro and In Silico. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23123307>.

BARRADAS, Thaís Nogueira *et al.* Development and characterization of promising o/w nanoemulsions containing sweet fennel essential oil and non-ionic surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 480, p. 214–221, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2014.12.001>

BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 235, p. 337–351, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.06.017>

BINIC, Ivana *et al.* Skin ageing: Natural weapons and strategies. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2013, 2013. Disponível em:

<https://doi.org/10.1155/2013/827248>

BRACARENSE, Adriana A.P.; TAKAHASHI, Jacqueline A. Modulation of antimicrobial metabolites production by the fungus *Aspergillus parasiticus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 313–321, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000100045>.

CESTARI, Tania Ferreira; DANTAS, Lia Pinheiro; BOZA, Juliana Catucci. Acquired hyperpigmentations. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 89, n. 1, p. 11–25, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/ABD1806-4841.20142353>.

CHOI, Hyunjung *et al.* Kojic acid-induced IL-6 production in human keratinocytes plays a role in its anti-melanogenic activity in skin. **Journal of Dermatological Science**, [s. l.], v. 66, n. 3, p. 207–215, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.03.002>

CONTRI, R. V. *et al.* Skin penetration and dermal tolerability of acrylic nanocapsules: Influence of the surface charge and a chitosan gel used as vehicle. **International journal of pharmaceutics**, [s. l.], v. 507, n. 1–2, p. 12–20, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2016.03.046>.

CONTRI, Renata V. *et al.* Nanoencapsulation of Rose-Hip Oil Prevents Oil Oxidation and Allows Obtainment of Gel and Film Topical Formulations. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 863–871, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/S12249-015-0379-9>.

CONTRI, Renata V. *et al.* Transport of substances and nanoparticles across the skin and in vitro models to evaluate skin permeation and/or penetration. *In*: BECK, Ruy; GUTERRES, Silvia; POHLMANN, Adriana (org.). **Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 3–36. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-19792-5>

DINCER, Ibrahim; ZAMFIRESCU, Calin. Hydrogen Production by Thermal Energy. *In*: **SUSTAINABLE HYDROGEN PRODUCTION**. [S. l.]: Elsevier, 2016. p. 163–308. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801563-6.00004-2>

EL-KORANY, Sarah Mohamed *et al.* Kojic acid repurposing as a pancreatic lipase inhibitor and the optimization of its production from a local *Aspergillus oryzae* soil isolate. **BMC Biotechnology**, [s. l.], v. 20, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00644-9>.

EPHREM, Elissa; ELAISSARI, Hamid; GREIGE-GERGES, Hélène. Improvement of skin whitening agents efficiency through encapsulation: Current state of knowledge. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 526, n. 1–2, p. 50–68, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2017.04.020>

EZZAT, Habiba *et al.* Enhanced anti-bacterial effect of kojic acid using gelatinized core liposomes: A potential approach to combat antibiotic resistance. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 64, p. 102625, 2021. Disponível em:

em: <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2021.102625>

FINLAY, A. Y.; KHAN, G. K. Dermatology Life Quality Index (DLQI)--a simple practical measure for routine clinical use. **Clinical and experimental dermatology**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 210–216, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.1365-2230.1994.TB01167.X>.

FRANCO, Daniel *et al.* Processing of *Rosa rubiginosa*: extraction of oil and antioxidant substances. **Bioresource technology**, [s. l.], v. 98, n. 18, p. 3506–3512, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2006.11.012>.

GAZZI, Rafaela P. *et al.* Pharmaceutical Nanocarriers. **The ADME Encyclopedia**, [s. l.], p. 1–16, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-51519-5_17-1.

GILLBRO, JM; OLSSON, MJ. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents--existing and new approaches. **International journal of cosmetic science**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 210–221, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.1468-2494.2010.00616.X>.

GOMES, Ciro Martins; COSTA, Adilson; ALVES, Gilvan Ferreira. Gravidez. *In*: COSTA, Adilson (org.). **Tratado Internacional de Cosmecêuticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 591–598.

GONÇALEZ, M. L.; CORRÊA, M. A.; CHORILLI, M. Skin delivery of kojic acid-loaded nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of skin aging. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2013, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/271276>.

GONÇALEZ, Maíra Lima *et al.* Structural characterization and in vitro antioxidant activity of kojic dipalmitate loaded W/O/W multiple emulsions intended for skin disorders. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2015, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/304591>.

GONÇALVES, Joana Carrapiço. **Nanotecnologia Aplicada à Pele**. 2014. - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, [s. l.], 2014.

GUTERRES, Silvia Stanisçuaski; BECK, Ruy C.R.; POHLMANN, Adriana R. Nanocosmecêuticos. *In*: COSTA, Adilson (org.). **Tratado Internacional de Cosmecêuticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 427–435.

HUERTEH, Kimberly A.; HASSAN, Shahzeb; CALLENDER, Valerie D. Therapeutic Insights in Melasma and Hyperpigmentation Management. **Journal of Drugs in Dermatology**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 718–729, 2019.

JACOBUS BERLITZ, Simone *et al.* Azelaic acid-loaded nanoemulsion with hyaluronic acid - a new strategy to treat hyperpigmentary skin disorders. **Drug development and industrial pharmacy**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 642–650, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1569032>.

JARDIM BOTÂNICO DA UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO.

Jardim Botânico UTAD | Rosa rubiginosa. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: https://jb.utad.pt/especie/Rosa_rubiginosa. Acesso em: 8 mar. 2022.

KANG, Hee Young *et al.* In vivo reflectance confocal microscopy detects pigmentary changes in melasma at a cellular level resolution. **Experimental Dermatology**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. e228–e233, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.1600-0625.2009.01057.X>.

KARADZOVSKA, Daniela; RIVIERE, Jim E. Assessing vehicle effects on skin absorption using artificial membrane assays. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 569–576, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2013.02.020>

KARIN, Kilian. Scientific Committee on Consumer Safety, opinion on kojic acid; **Scientific Committee on Consumer Safety, opinion on kojic acid.** [s. l.], 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2772/8334>.

KAYATH, Himangi; DHAWAN, Surbhi; NANDA, Sanju. In-vitro Estimation of Photo-Protective Potential of Rosehip Seed Oil and QbD Based Development of a Nanoformulation. **Current Nanomedicine**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 216–231, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/2468187309666190126112141>

KHEZRI, Khadijeh *et al.* A promising and effective platform for delivering hydrophilic depigmenting agents in the treatment of cutaneous hyperpigmentation: kojic acid nanostructured lipid carrier. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 38–47, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21691401.2020.1865993>.

KHEZRI, Khadijeh *et al.* An emerging technology in lipid research for targeting hydrophilic drugs to the skin in the treatment of hyperpigmentation disorders: kojic acid-solid lipid nanoparticles. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 841–853, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21691401.2020.1770271>.

KHONGKARAT, Phanthiwa *et al.* Safflospemidines from the bee pollen of *Helianthus annuus* L. exhibit a higher in vitro antityrosinase activity than kojic acid. **Heliyon**, [s. l.], v. 6, n. 3, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2020.E03638>.

KÜLKAMP-GUERREIRO, IC *et al.* Influence of nanoencapsulation on the sensory properties of cosmetic formulations containing lipoic acid. **International journal of cosmetic science**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 105–111, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ICS.12013>.

LAGE, Denise; COSTA, Adilson. Melasma. In: COSTA, Adilson (org.). **Tratado Internacional de Cosmecêuticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 533–540.

LAJIS, Ahmad Firdaus B.; HAMID, Muhajir; ARIFF, Arbakariya B. Depigmenting effect of kojic acid esters in hyperpigmented B16F1 melanoma cells. **Journal of**

Biomedicine and Biotechnology, [s. l.], v. 2012, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/952452>.

MACHADO, A. C.H.R. *et al.* Skin Penetration. **Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications**, [s. l.], p. 741–755, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802005-0.00046-X>

MARTÍNEZ-PLA, J. J. *et al.* Evaluation of the pH effect of formulations on the skin permeability of drugs by biopartitioning micellar chromatography. **Journal of chromatography. A**, [s. l.], v. 1047, n. 2, p. 255–262, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2004.07.011>.

MITRI, Khalil *et al.* Scale-up of Nanoemulsion Produced by Emulsification and Solvent Diffusion. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 101, n. 11, p. 4240–4247, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/JPS.23291>

NAMJOYAN, Foroogh *et al.* The Anti-melanogenesis Activities of Some Selected Red Macroalgae from Northern Coasts of the Persian Gulf. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 383, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.2364>.

NASTITI, Christofori M.R.R. *et al.* Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 9, n. 4, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS9040037>.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Summary for CID 71587292, Kojic dipalmitate**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71587292#section=Computed-Properties>.

NURUNNABI, Tauhidur *et al.* Antimicrobial activity of kojic acid from endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Sonneratia apetala*, a mangrove plant of the Sundarbans. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 350–354, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/1995-7645.233183>

PASSERON, Thierry. Long-lasting effect of vascular targeted therapy of melasma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s. l.], v. 69, n. 3, p. e141–e142, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JAAD.2013.02.022>.

PASSERON, Thierry; PICARDO, Mauro. Melasma, a photoaging disorder. **Pigment Cell & Melanoma Research**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 461–465, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/pcmr.12684>.

PLENSDORF, Scott; LIVIERATOS, Maria; DADA, Nabil. Pigmentation Disorders: Diagnosis and Management. **American Family Physician**, [s. l.], v. 96, n. 12, p. 797–804, 2017. Disponível em: www.aafp.org/afp.

R, Sarkar; A, Bansal; P, Ailawadi. Future therapies in melasma: What lies ahead? **Indian journal of dermatology, venereology and leprology**, [s. l.], v. 86, n. 1, p. 8–

17, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.4103/IJDVL.IJDVL_633_18.

RAI, Vineet Kumar *et al.* Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 270, p. 203–225, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2017.11.049>

RAJAMANIKYAM, Maheshwari *et al.* Biophysical and biochemical characterization of active secondary metabolites from *Aspergillus allahabadii*. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 56, p. 45–56, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2017.02.010>

ROSELAN, Muhammad Azimuddin *et al.* An Improved Nanoemulsion Formulation Containing Kojic Monooleate: Optimization, Characterization and In Vitro Studies. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 25, n. 11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25112616>.

ROSELAN, Muhammad Azimuddin *et al.* In vitro cytotoxicity assay, mushroom tyrosinase inhibitory activity and release analysis of kojic monooleate nanodelivery system and in silico molecular docking study against 2Y9X target enzyme. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 66, p. 102764, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2021.102764>

S, Briganti; E, Camera; M, Picardo. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. **Pigment cell research**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 101–110, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1034/J.1600-0749.2003.00029.X>.

SAEEDI, M; ESLAMIFAR, M; KHEZRI, K. Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, [s. l.], v. 110, p. 582–593, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2018.12.006>.

SANTOS, Joyce Silva dos; VIEIRA, Ana Beatriz Duarte; KAMADA, Ivone. A Rosa Mosqueta no tratamento de feridas abertas: uma revisão. **Revista Brasileira de Enfermagem**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 457–462, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0034-71672009000300020>.

SBD. **Hiperpigmentação**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.sbd.org.br/tratamentos/hiperpigmentacao/>. Acesso em: 15 fev. 2022.

SCHMALTZ, Clarissa; SANTOS, Jucimary Vieira dos; GUTERRES, Sílvia Stanisçuaski. NANOCÁPSULAS COMO UMA TENDÊNCIA PROMISSORA NA ÁREA COSMÉTICA: A IMENSA POTENCIALIDADE DESTES PEQUENOS GRANDES RECURSOS. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, [s. l.], v. 16, n. 13/14, p. 80–85, 2005. Disponível em: <http://revistas.cff.org.br/?journal=infarma&page=article&op=view&path%5B%5D=292>

SH, Kwon *et al.* Heterogeneous Pathology of Melasma and Its Clinical Implications. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 17, n. 6, 2016. Disponível

em: <https://doi.org/10.3390/IJMS17060824>.

SIDDHARDHA, B. *et al.* Isolation, Characterization and Biological evaluation of secondary metabolite from *Aspergillus funiculosus*. **Indian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 225–228, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12088-010-0044-7>.

SINGH, Yuvraj *et al.* Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 252, p. 28–49, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2017.03.008>.

SOUZA, Paula Monteiro *et al.* Plants from Brazilian Cerrado with Potent Tyrosinase Inhibitory Activity. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 48589, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0048589>.

SYED AZHAR, Sharifah Nurfadhlin Afifah *et al.* *In vitro* kinetic release study, antimicrobial activity and *in vivo* toxicity profile of a kojic acid ester-based nanoemulsion for topical application. **RSC Advances**, [s. l.], v. 10, n. 71, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D0RA04807K>

TAZESH, Sahar *et al.* Comparative Stability of Two Anti-Hyperpigmentation Agents: Kojic Acid as a Natural Metabolite and Its Di-Palmitate Ester, Under Oxidative Stress; Application to Pharmaceutical Formulation Design. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.34172/APB.2022.031>.

WANG, Yang Wei *et al.* Cellular fusion and whitening effect of a chitosan derivative coated liposome. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 90, n. 1, p. 169–176, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.10.024>

WEI, Xi *et al.* Kojic acid enhances the proliferation of human corneal epithelial cells via p38 and p21 signaling pathways. **European Journal of Ophthalmology**, [s. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1120672120962065>.

WEI, Xi *et al.* Kojic acid inhibits senescence of human corneal endothelial cells via NF- κ B and p21 signaling pathways. **Experimental Eye Research**, [s. l.], v. 180, p. 174–183, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.12.020>

Y, Wu *et al.* Evaluation of antibacterial and anti-biofilm properties of kojic acid against five food-related bacteria and related subcellular mechanisms of bacterial inactivation. **Food science and technology international = Ciencia y tecnología de los alimentos internacional**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 3–15, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1082013218793075>.

ZAID, AN; AL RAMAHI, R. Depigmentation and Anti-aging Treatment by Natural Molecules. **Current pharmaceutical design**, [s. l.], v. 25, n. 20, p. 2292–2312, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1381612825666190703153730>.