

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ENVELHECIMENTO HUMANO

CLÁUDIO FERNANDO GOELZER NETO

ESTUDOS DA CASCA DE  
JABUTICABA: EXTRATO, EMULSÃO  
E POTENCIAL ANTIMELANOGÊNICO

Passo Fundo

2024



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
INSTITUTO DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENVELHECIMENTO HUMANO

CLÁUDIO FERNANDO GOELZER NETO

ESTUDOS DA CASCA DE JABUTICABA: EXTRATO, EMULSÃO E  
POTENCIAL ANTIMELANOGÊNICO

Tese apresentada como requisito para  
obtenção do título de Doutor em  
Envelhecimento Humano, do Instituto da  
Saúde, da Universidade de Passo Fundo.

Orientador(a): Dra. Charise Dallazem Bertol  
Coorientador(a): Dr. Adriano Pasqualotti

Passo Fundo

2024

# TERMO DE APROVAÇÃO



## ATA DE DEFESA DE TESE

### “ESTUDOS DA CASCA DE JABUTICABA: EXTRATO, EMULSÃO E POTENCIAL ANTIMELANOGÊNICO”

Elaborada por

**CLÁUDIO FERNANDO GOELZER NETO**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
“Doutor em Envelhecimento Humano”

Aprovado em: 27/02/2024  
Pela Banca Examinadora

**Profa. Dra. Charise Dallazem Bertol**  
Universidade de Passo Fundo – UPF/PPGEH  
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

**Prof. Dr. Adriano Pasqualotti**  
Universidade de Passo Fundo – UPF/PPGEH  
Coorientador

**Profa. Dra. Ana Carolina Bertoleffi De Marchi**  
Universidade de Passo Fundo – UPF/PPGEH  
Avaliadora Interna

**Profa. Dra. Graciela Carlos**  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS  
Avaliadora Externa

**Profa. Dra. Isabela Fanelli Barreto Biscaia**  
Universidade Estadual do Centro Oeste do Paraná - UNICENTRO  
Avaliador Externo

**Profa. Dra. Ana Luisa Sant’Anna Alves**  
Universidade de Passo Fundo – UPF/PPGEH  
Coordenadora do PPGEH

## 2.ATA de DEFESA DE TESE - Claudio.doc

Documento número #e8389c1e-f8f9-4de6-afe5-8f8c0f865aca

Hash do documento original (SHA256): 47f3b79fd5159600f0f5cdc5b05280d6c5c478f93d1a3078b54ea5b882182c1e

### Assinaturas

-  **Charise Dallazem Bertol**  
CPF: 002.242.840-29  
Assinou em 28 fev 2024 às 08:59:16
-  **Adriano Pasqualotti**  
CPF: 583.657.100-72  
Assinou em 29 fev 2024 às 10:16:22
-  **Ana Carolina Bertoletti De Marchi**  
CPF: 737.502.200-34  
Assinou em 29 fev 2024 às 08:59:35
-  **GRACIELA CARLOS**  
CPF: 903.605.590-34  
Assinou em 28 fev 2024 às 10:04:53
-  **Isabela Fanelli Barreto Biscaia**  
CPF: 080.924.889-16  
Assinou em 28 fev 2024 às 16:20:26
-  **Ana Luisa Sant'Anna Alves**  
CPF: 983.767.720-15  
Assinou em 29 fev 2024 às 09:21:31

### Log

- 28 fev 2024, 08:54:59      Operador com email dionice@upf.br na Conta c44b96f0-ca8e-4abe-b87d-0aed928844cd criou este documento número e8389c1e-f8f9-4de6-afe5-8f8c0f865aca. Data limite para assinatura do documento: 07 de março de 2024 (08:50). Finalização automática após a última assinatura: habilitada. Idioma: Português brasileiro.

28 fev 2024, 08:55:00	Operador com email dionice@upf.br na Conta c44b96f0-ca8e-4abe-b87d-0aed928844cd adicionou à Lista de Assinatura: charise@upf.br para assinar, via E-mail, com os pontos de autenticação: Token via E-mail; Nome Completo; CPF; endereço de IP. Dados informados pelo Operador para validação do signatário: nome completo Charise Dallazem Bertol.
28 fev 2024, 08:55:00	Operador com email dionice@upf.br na Conta c44b96f0-ca8e-4abe-b87d-0aed928844cd adicionou à Lista de Assinatura: pasqualotti@upf.br para assinar, via E-mail, com os pontos de autenticação: Token via E-mail; Nome Completo; CPF; endereço de IP. Dados informados pelo Operador para validação do signatário: nome completo Adriano Pasqualotti.
28 fev 2024, 08:55:00	Operador com email dionice@upf.br na Conta c44b96f0-ca8e-4abe-b87d-0aed928844cd adicionou à Lista de Assinatura: carolina@upf.br para assinar, via E-mail, com os pontos de autenticação: Token via E-mail; Nome Completo; CPF; endereço de IP. Dados informados pelo Operador para validação do signatário: nome completo Ana Carolina Bertoletti De Marchi.
28 fev 2024, 08:55:00	Operador com email dionice@upf.br na Conta c44b96f0-ca8e-4abe-b87d-0aed928844cd adicionou à Lista de Assinatura: graciela.carlos.vieira@gmail.com para assinar, via E-mail, com os pontos de autenticação: Token via E-mail; Nome Completo; CPF; endereço de IP. Dados informados pelo Operador para validação do signatário: nome completo GRACIELA CARLOS.
28 fev 2024, 08:55:00	Operador com email dionice@upf.br na Conta c44b96f0-ca8e-4abe-b87d-0aed928844cd adicionou à Lista de Assinatura: isabelafbarreto@hotmail.com para assinar, via E-mail, com os pontos de autenticação: Token via E-mail; Nome Completo; CPF; endereço de IP. Dados informados pelo Operador para validação do signatário: nome completo Isabela Fanelli Barreto Biscaia.
28 fev 2024, 08:55:00	Operador com email dionice@upf.br na Conta c44b96f0-ca8e-4abe-b87d-0aed928844cd adicionou à Lista de Assinatura: alves.als@upf.br para assinar, via E-mail, com os pontos de autenticação: Token via E-mail; Nome Completo; CPF; endereço de IP. Dados informados pelo Operador para validação do signatário: nome completo Ana Luisa Sant'Anna Alves.
28 fev 2024, 08:59:17	Charise Dallazem Bertol assinou. Pontos de autenticação: Token via E-mail charise@upf.br. CPF informado: 002.242.840-29. IP: 177.34.254.60. Componente de assinatura versão 1.766.0 disponibilizado em <a href="https://app.clicksign.com">https://app.clicksign.com</a> .
28 fev 2024, 10:04:53	GRACIELA CARLOS assinou. Pontos de autenticação: Token via E-mail graciela.carlos.vieira@gmail.com. CPF informado: 903.605.590-34. IP: 189.6.242.212. Componente de assinatura versão 1.766.0 disponibilizado em <a href="https://app.clicksign.com">https://app.clicksign.com</a> .
28 fev 2024, 16:20:27	Isabela Fanelli Barreto Biscaia assinou. Pontos de autenticação: Token via E-mail isabelafbarreto@hotmail.com. CPF informado: 080.924.889-16. IP: 200.201.10.173. Componente de assinatura versão 1.766.0 disponibilizado em <a href="https://app.clicksign.com">https://app.clicksign.com</a> .
29 fev 2024, 08:59:35	Ana Carolina Bertoletti De Marchi assinou. Pontos de autenticação: Token via E-mail carolina@upf.br. CPF informado: 737.502.200-34. IP: 177.10.218.166. Localização compartilhada pelo dispositivo eletrônico: latitude -28.0854528 e longitude -52.6188544. URL para abrir a localização no mapa: <a href="https://app.clicksign.com/location">https://app.clicksign.com/location</a> . Componente de assinatura versão 1.766.0 disponibilizado em <a href="https://app.clicksign.com">https://app.clicksign.com</a> .
29 fev 2024, 09:21:31	Ana Luisa Sant'Anna Alves assinou. Pontos de autenticação: Token via E-mail alves.als@upf.br. CPF informado: 983.767.720-15. IP: 177.82.171.239. Localização compartilhada pelo dispositivo eletrônico: latitude -28.2454736 e longitude -52.3891489. URL para abrir a localização no mapa: <a href="https://app.clicksign.com/location">https://app.clicksign.com/location</a> . Componente de assinatura versão 1.766.0 disponibilizado em <a href="https://app.clicksign.com">https://app.clicksign.com</a> .

- 
- 29 fev 2024, 10:16:22 Adriano Pasqualotti assinou. Pontos de autenticação: Token via E-mail pasqualotti@upf.br. CPF informado: 583.657.100-72. IP: 177.57.157.78. Localização compartilhada pelo dispositivo eletrônico: latitude -28.2588609 e longitude -52.4094929. URL para abrir a localização no mapa: <https://app.clicksign.com/location>. Componente de assinatura versão 1.766.0 disponibilizado em <https://app.clicksign.com>.
- 29 fev 2024, 10:16:23 Processo de assinatura finalizado automaticamente. Motivo: finalização automática após a última assinatura habilitada. Processo de assinatura concluído para o documento número e8389c1e-f8f9-4de6-afe5-8f8c0f865aca.
- 

**Documento assinado com validade jurídica.**

Para conferir a validade, acesse <https://validador.clicksign.com> e utilize a senha gerada pelos signatários ou envie este arquivo em PDF.

As assinaturas digitais e eletrônicas têm validade jurídica prevista na Medida Provisória nº. 2200-2 / 2001

Este Log é exclusivo e deve ser considerado parte do documento nº e8389c1e-f8f9-4de6-afe5-8f8c0f865aca, com os efeitos prescritos nos Termos de Uso da Clicksign, disponível em [www.clicksign.com](http://www.clicksign.com).

CIP – Catalogação na Publicação

---

- G595e Goelzer Neto, Cláudio Fernando  
Estudos da casca de jabuticaba [recurso eletrônico] : extrato, emulsão e potencial antimelanogênico / Cláudio Fernando Goelzer Neto. – 2024.  
2.5 MB ; PDF.
- Orientadora: Dra. Charise Dallazem Bertol.  
Coorientador: Prof. Dr. Adriano Pasqualotti.  
Tese (Doutorado em Envelhecimento Humano) – Universidade de Passo Fundo, 2024.
1. Pele - Envelhecimento. 2. Melasma - Tratamento. 3. Casca de jabuticaba – Cosmético. 4. Distúrbios de pigmentação da pele. I. Bertol, Charise Dallazem, orientadora. II. Pasqualotti, Adriano, coorientador. III. Título.

CDU: 687.552.2

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus amados pais e exímios médicos Cláudio Fernando Goelzer Filho e Maria Edelmi Bona Goelzer e, a todos aqueles corajosos que se arriscaram e escolheram pesquisar, trabalhar e ensinar com o único objetivo de melhorar a vida dos seres humanos.



## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e proteção.

À minha família pelo incentivo, apoio e amor incondicional.

Aos meus alunos pela compreensão de algumas ausências e pela torcida e amizade.

À minha orientadora, Dra. Charise Dallazem Bertol, pelos ensinamentos, carinho, compreensão, valioso auxílio em todas as etapas desta tese e pelo seu exemplo de ser humano e pesquisadora ética e apaixonada pelo que faz.

Ao meu coorientador, Dr. Adriano Pasqualotti, pelo valioso auxílio nas análises estatísticas desta tese.

Às acadêmicas da Iniciação Científica do Curso de Farmácia da Universidade de Passo Fundo, em especial à Micheila Alana Fagundes, Pâmela do Nascimento, Verônica Cristina da Silveira e Diênifer Tramontina que foram fundamentais nas principais etapas experimentais desta tese.

À professora Dra. Larissa Sakis Bernardi, do Curso de Farmácia da UNICENTRO do Paraná, pelo valioso auxílio nos ensaios de caracterização das formulações semissólidas desenvolvidas nesta tese. E, à professora Graciela Carlos, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pelas contribuições valiosas no decorrer da construção do projeto de pesquisa que resultou nesta tese.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Envelhecimento Humano (PPGEH) da Universidade de Passo Fundo por todos os conhecimentos transmitidos, apoio e amor com o qual conduziram todos os nossos encontros.

## **EPÍGRAFE**

"O indivíduo com discromia pode apresentar dificuldades de interação social em diversos contextos, em virtude da reação negativa dos outros à aparência inestética da pele. Avaliar e tratar corretamente é fundamental, pois somente dessa forma os resultados clínicos se farão presentes e a nossa dedicação a essa área será devidamente justificada".

Dr. João Tassinary

## RESUMO

GOELZER NETO, Cláudio Fernando. **Estudos da casca de jabuticaba: extrato, emulsão e potencial antimelanogênico**. 132 f. Tese (Doutorado em Envelhecimento Humano) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2024.

O melasma é uma hiperpigmentação crônica da pele que afeta a estética e a qualidade de vida das pessoas. Os ativos de tratamento conhecidos não são totalmente eficazes, pois há recorrência das lesões. Assim, extratos vegetais capazes de inibir a ação da tirosinase, enzima responsável pela melanogênese, podem ser uma nova alternativa. As cascas da jabuticaba (*Plynia sp.*) são ricas em compostos fenólicos, como antocianinas, ácido elágico (AE) e outros, que desencadeiam atividade anti tirosinase. O objetivo geral foi produzir e avaliar *in vitro* emulsões contendo extrato da casca da jabuticaba e ácido azeláico (AA) quanto ao seu potencial antimelanogênico. Os frutos da jabuticaba foram colhidos, a casca separada, seca, moída e congelada. Com as cascas se produziu o extrato da jabuticaba liofilizado. Foram realizados os ensaios para determinação de polifenóis, antocianinas, flavonoides, quantidade de AE, atividade antioxidante, solubilidade e viabilidade celular/citotoxicidade da casca e do extrato da casca da jabuticaba liofilizado. Após o preparo e a caracterização fitoquímica do extrato, quatro emulsões óleo em água (NAAJ: extrato da jabuticaba e AA + turbo agitação; FAAJ: extrato da jabuticaba e AA, sem turbo agitação; NAAAE: AA e AE isolados, sem turbo agitação; NAAA: AA isolado, sem turbo agitação), foram preparadas e caracterizadas quanto ao tamanho médio das partículas, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta. Todas as amostras foram submetidas aos ensaios de inibição da tirosinase de cogumelo, quelação dos íons cobre, atividade antioxidante e potencial clareador em células de melanoma B16F10 para avaliação do potencial antimelanogênico. Os dados foram avaliados estatisticamente. O extrato da casca da jabuticaba liofilizado apresentou os maiores teores de polifenóis (817,65 mg Eq. AG/100 g ES), antocianinas (22,82 mg Eq. Cianidina/100 g ES), flavonoides (420,94 mg Eq. Quercetina/100 g ES) e AE (61,50 g/100 g ES) quando comparado com a casca da jabuticaba, além de ter apresentado uma solubilidade em água 15 vezes maior que a casca (125,8 mg/mL). A atividade antioxidante do extrato liofilizado (2031,44 mg Eq. Vit C/100 g ES) foi menor que a da casca, devido principalmente o tempo decorrido entre a colheita da fruta até o preparo do extrato e sua análise. Pelo ensaio de viabilidade celular/citotoxicidade se determinou que as concentrações do extrato da casca da jabuticaba liofilizado utilizadas em formulações cosméticas devem ser inferiores a 2 mg/mL. Os tamanhos médios de partículas das formulações variaram de 295,20 a 630,50 nm, mantendo-se na faixa nanométrica, o que favorece a ação e permeação tecidual. O PDI variou de 0,1 a 1,0. O potencial zeta variou de -6,82 a +2,02 mV. O extrato da casca da jabuticaba destacou-se nos ensaios de inibição da tirosinase de cogumelo e atividade antioxidante, superando os ativos inibitórios clássicos. A formulação NAAA mostrou-se mais eficaz, com o maior percentual de inibição da tirosinase, menor IC50 e maior percentual de redução da síntese da melanina nas células B16F10. As formulações NAAJ e FAAJ destacaram-se no ensaio de quelação dos íons de cobre. Todas as formulações demonstraram algum potencial antimelanogênico, mas em níveis variados. Apesar das propriedades antimelanogênicas observadas para as emulsões, essas foram inferiores ao

extrato da jabuticaba isolado, o que reforça a ideia de ativos naturais como fonte de agentes clareadores. O extrato da casca da jabuticaba, proveniente de resíduo agroindustrial, destaca-se como uma alternativa eficaz e sustentável para tratar hiperpigmentação cutânea. Este estudo contribui para avanços em formulações cosméticas, explorando o potencial terapêutico de recursos naturais.

Palavras-chave: Melasma; Extrato de Jabuticaba; Ácido azeláico; Emulsões; Tirosinase.

## ABSTRACT

GOELZER NETO, Cláudio Fernando. **Studies of jaboticaba bark: extract, emulsion and antimelanogenic potential.** 132 f. Thesis (Doctorate in Human Aging) – University of Passo Fundo, Passo Fundo, 2024

Melasma is a chronic hyperpigmentation of the skin that affects people's aesthetics and quality of life. The known treatment assets are not completely effective, as the lesions recur. Therefore, plant extracts capable of inhibiting the action of tyrosinase, the enzyme responsible for melanogenesis, may be a new alternative. Jaboticaba (*Plynia* sp.) peels are rich in phenolic compounds, such as anthocyanins, ellagic acid (EA) and others, which trigger anti-tyrosinase activity. The general objective was to produce and evaluate in vitro emulsions containing jaboticaba bark extract and azelaic acid (AA) for their anti-melanogenic potential. The jaboticaba fruits were harvested, the skin separated, dried, ground and frozen. The freeze-dried jaboticaba extract was produced with the peels. Assays were carried out to determine polyphenols, anthocyanins, flavonoids, amount of AE, antioxidant activity, solubility and cell viability/cytotoxicity of the bark and freeze-dried jaboticaba bark extract. After preparation and phytochemical characterization of the extract, four oil-in-water emulsions (NAAJ: jaboticaba extract and AA + turbo agitation; FAAJ: jaboticaba extract and AA, without turbo agitation; NAAAE: AA and AE alone, without turbo agitation; NAAA: isolated AA, without turbo agitation), were prepared and characterized in terms of average particle size, polydispersity index (PDI) and zeta potential. All samples were subjected to mushroom tyrosinase inhibition, copper ion chelation, antioxidant activity and whitening potential tests on B16F10 melanoma cells to evaluate the anti-melanogenic potential. The data were statistically evaluated. The freeze-dried jaboticaba peel extract presented the highest levels of polyphenols (817.65 mg Eq. AG/100 g ES), anthocyanins (22.82 mg Eq. Cyanidin/100 g ES), flavonoids (420.94 mg Eq. Quercetin/100 g ES) and AE (61.50 g/100 g ES) when compared to the jaboticaba peel, in addition to having a solubility in water 15 times greater than the peel (125.8 mg/mL). The antioxidant activity of the freeze-dried extract (2031.44 mg Eq. Vit C/100 g ES) was lower than that of the peel, mainly due to the time elapsed between harvesting the fruit and preparing the extract and analyzing it. The cell viability/cytotoxicity test determined that the concentrations of lyophilized jaboticaba bark extract used in cosmetic formulations should be less than 2 mg/mL. The average particle sizes of the formulations ranged from 295.20 to 630.50 nm, remaining in the nanometric range, which favors tissue action and permeation. The PDI ranged from 0.1 to 1.0. The zeta potential ranged from -6.82 to +2.02 mV. The jaboticaba bark extract stood out in the mushroom tyrosinase inhibition and antioxidant activity tests, surpassing the classic inhibitory active ingredients. The NAAA formulation proved to be more effective, with the highest percentage of tyrosinase inhibition, lowest IC<sub>50</sub> and highest percentage of reduction in melanin synthesis in B16F10 cells. The NAAJ and FAAJ formulations stood out in the copper ion chelation test. All formulations demonstrated some anti-melanogenic potential, but to varying degrees. Despite the anti-melanogenic properties observed for the emulsions, these were inferior to the isolated jaboticaba extract, which reinforces the idea of natural active ingredients as a source of whitening agents. Jaboticaba bark extract, from agro-industrial waste,

stands out as an effective and sustainable alternative to treat skin hyperpigmentation. This study contributes to advances in cosmetic formulations, exploring the therapeutic potential of natural resources.

Keywords: Melasma; Jabuticaba Extract; Azelaic acid; Emulsions; Tyrosinase.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Unidade epidérmico-melânica.....	30
<b>Figura 2</b> - Rota da biossíntese de melanina. ....	32
<b>Figura 3</b> - Principais topografias faciais do melasma. ....	33
<b>Figura 4</b> - Esquema da sinalização do $\alpha$ -MSH via MC1-R resultando na formação de eumelanina e feomelanina. ....	35
<b>Figura 5</b> - Mecanismo de ação do extrato etanólico de <i>Leathesia difformis</i> na melanogênese induzida por $\alpha$ -MSH. ....	38
<b>Figura 6</b> - Estrutura química do ácido azeláico.....	40
<b>Figura 7</b> - Estrutura química do ácido elágico livre (A) e glicosilado (B).....	44
<b>Figura 8</b> - Selection of studies included in the systematic review using Prisma flowchart.....	53

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Famílias, nomes científicos e comuns de frutas rastreadas quanto a presença de ácido elágico.....	42
---	----



## LISTA DE TABELAS

<b>Table 1</b> - Summary of the studies included in this review emphasizing the methodology, results, and conclusions (continues) .....	54
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido azeláico
AC	Enzima adenilato ciclase
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AE	Ácido elágico
AG	Ácido gálico
AH	Ácido hialurônico
ANOVA	Análise de variância unilateral
AT	Antocianinas totais
BHT	Butilhidroxitolueno
cAMP	AMP cíclico
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta à cAMP
DCT	Dopa-cromo tautomerase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
Eq	Equivalente
EUA	Estados Unidos da América
FAAJ	Nanoemulsão com AA e extrato de jabuticaba em sua forma livre
FBS	Soro fetal bovino
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HQ	Hidroquinona

IMCAS	<i>International Master Course on Aging Science</i>
LC-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector UV
MC1-R	Receptor de melanocortina tipo 1
MEM	Meio mínimo essencial
MITF	Fator de transcrição associado à microftalmia
MS	Matéria seca
NAAA	AA isolado, sem turbo agitação
NAAAE	Formulação contendo ácido elágico e AA nanoencapsulado sem a adição do extrato de jabuticaba
NAAJ	Nanoemulsão com AA e extrato de jabuticaba nanoencapsulado
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDI	Índice de polidispersão
pH	Potencial hidrogeniônico
PKA	Proteína quinase A
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RUV	Radiações ultravioletas
SQR	Soluções da substância química de referência
TRP-1	Tirosinase relacionada à proteína 1
TRP-2	Tirosinase relacionada à proteína 2
TYR	Tirosinase
UPF	Universidade de Passo Fundo
UR	Umidade relativa
UVA	Radiação ultravioleta A
UVB	Radiação ultravioleta B
WHO	World Health Organization

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$ -MSH      Hormônio estimulador de melanócitos

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
1.1	JUSTIFICATIVA DA TESE.....	24
1.2	CONSIDERAÇÕES SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA TESE.....	26
1.3	ORGANIZAÇÃO DO TEXTO.....	26
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	29
2.1	ENVELHECIMENTO CUTÂNEO.....	29
2.2	MELANOGÊNESE.....	30
2.3	MELASMA.....	32
2.3.1	PERSPECTIVAS DE TRATAMENTO DO MELASMA.....	35
2.3.2	POTENCIAL DA JABUTICABA NO TRATAMENTO DO MELASMA.....	40
2.4	ÁCIDO ELÁGICO.....	43
2.5	BIOTECNOLOGIA COSMÉTICA.....	45
3	PRODUÇÃO CIENTÍFICA I: NATURAL SOURCES OF MELANOGENIC INHIBITORS: A SYSTEMATIC REVIEW.....	49
3.1	ABSTRACT.....	49
3.2	INTRODUCTION.....	50
3.3	METHODS.....	52
3.4	RESULTS.....	52
3.5	DISCUSSION.....	58
3.6	CONCLUSIONS.....	63
3.7	REFERENCES.....	64
4	PRODUÇÃO CIENTÍFICA II.....	67
5	PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA III.....	68
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
	REFERÊNCIAS.....	71

## 1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento humano é um fenômeno natural do processo da vida, caracterizado pela ocorrência de mudanças biopsicossociais associadas à passagem do tempo, não necessariamente decorrentes de alguma doença. Neste contexto, pode ser conceituado como um processo dinâmico e progressivo, acompanhado de importantes modificações morfológicas, funcionais, psicológicas e sociais no corpo e na vida dos indivíduos (Schneider; Irigaray, 2008).

De acordo com a *World Health Organization* (WHO), o número de brasileiros acima dos 60 anos crescerá 16 vezes entre os anos de 1950 e 2025, enquanto a população geral aumentará cerca de cinco vezes (WHO, 2005). A elevação da expectativa de vida, por consequência, estimula novas pesquisas na área do envelhecimento humano, especialmente em relação ao sistema tegumentar, uma vez que a pele é um dos órgãos mais acometidos pela ação do tempo, sofrendo influências diretas de fatores intrínsecos (cronológicos) e extrínsecos (radiações ultravioletas - RUV, tabagismo, abuso de bebida alcoólica, dieta inadequada, entre outros) (Tassinary; Goelzer Neto, 2018).

Com o envelhecimento, além das alterações estruturais que incluem atrofia, enrugamento, ptose e lassidão, as alterações de coloração da pele aumentam de forma significativa, especialmente as hiperpigmentações cutâneas. A hiperpigmentação cutânea pode ser caracterizada pelo aparecimento de manchas escuras na pele, que afetam amplamente a satisfação estética e a autoestima das pessoas, principalmente quando há apresentação clínica crônica, a exemplo do melasma (Tassinary; Goelzer Neto, 2018).

O melasma pode ser definido como uma afecção cutânea crônica e refratária caracterizada por hiperpigmentação localizada em regiões da pele frequentemente expostas ao sol ou outras radiações. Na face ocorre principalmente na fronte, têmporas, malaras e região perioral. As alterações manifestam-se clinicamente como manchas acastanhadas simétricas, de bordas irregulares, porém com limites bem definidos (Miot *et al.*, 2009).

Apesar de existirem tratamentos convencionais elucidados cientificamente, o combate e o controle do melasma são tarefas árduas e com um alto grau de insucesso clínico, especialmente pela grande recorrência das lesões e ausência de uma alternativa de clareamento definitivo das áreas hiperpigmentadas (Lima; Milhomem; Branco, 2022).

Assim, interferir na atividade dos principais reguladores do processo da melanogênese, a exemplo do hormônio estimulador de melanócitos ( $\alpha$ -MSH), receptor de melanocortina tipo 1 (MC1-R), proteína de ligação ao elemento de resposta à cAMP (CREB), fator de transcrição associado à microftalmia (MITF), tirosinase (TYR), tirosinase relacionada à proteína 1 (TRP-1), tirosinase relacionada à proteína 2 (TRP-2) e a dopa-cromo tautomerase (DCT) torna-se indispensável ao se pensar em formulações dermocosméticas realmente eficazes contra as desordens pigmentares. Nesse contexto, se conheceram ao longo dos anos os adventos de vários agentes inibitórios, tais como arbutin, ácido kójico e a hidroquinona. No entanto, pesquisadores já demonstraram desvantagens relacionadas a esses agentes, como instabilidade química, toxicidade celular, toxicidade sistêmica, fotossensibilização e insolubilidade (Gupta *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2014; Pillaiyar; Manickam; Namasivayam, 2017; Victor; Gelber; Rao, 2004).

Dessa forma, o desenvolvimento, a caracterização e a avaliação da eficácia de novas formulações inibidoras tornam-se necessários, buscando a associação entre ativos clareadores, despigmentantes, anti-inflamatórios e antioxidantes, na forma de pequenas partículas, a fim de alcançar um efeito mais prolongado e profundo (Tassinary; Goelzer Neto, 2018). Para isso, fontes naturais de inibidores da melanogênese têm sido estudadas nos últimos anos com o objetivo de produzir formulações dermocosméticas eficazes e mais seguras (Calazans *et al.*, 2019).

Alguns estudos já demonstraram a utilização de compostos fenólicos, extraídos de frutos tropicais em formulações tópicas, com possíveis efeitos clareador, anti-inflamatório, antioxidante e antienvelhecimento, o que parece ser uma nova alternativa clínica para o tratamento do melasma (Abe, 2007; Ayres *et*

*al.*, 2016; Dahl *et al.*, 2013). Exemplos desses compostos são as antocianinas, os polifenóis, os flavonoides e o ácido elágico (AE), cuja obtenção pode ser efetuada, por exemplo, a partir das cascas de frutos como a jabuticaba, um resíduo agroindustrial, renovável e com maior valor agregado e apelo à sustentabilidade.

A jabuticaba, importante fruto tropical brasileiro, apresenta grande quantidade de antocianinas e benefícios à saúde graças às suas propriedades anti-inflamatória, antimutagênica, anticarcinogênica e alta capacidade antioxidante (Março; Poppi; Scarminio, 2008; Efraim *et al.*, 2010; Volp *et al.*, 2008). Além das antocianinas, especialmente nas suas cascas, são encontrados ácido ascórbico (vitamina C), potássio, magnésio, fibras e ácidos fenólicos como o AE, o qual é capaz de aumentar o efeito do antioxidante endógeno L-Glutationa, que age protegendo as células dos efeitos nocivos das RUV e inibindo a tirosinase através da quelação dos íons cobre (Plagemann *et al.*, 2012; Reynertson *et al.*, 2006; Wiraguna; Hari; Praharsini, 2020).

Outro ativo que vem se destacando em formulações dermocosméticas para o clareamento da pele é o ácido azeláico (AA), que atua como um inibidor competitivo da tirosinase, interferindo diretamente na biossíntese da melanina. Também possui um efeito antiproliferativo e citotóxico no melanócito, desempenhando ação anti-inflamatória, antibiótica e anti-queratinizante (Bandyopadhyay, 2009; Gupta *et al.*, 2006).

Assim, parte-se do conhecimento de que a inibição da melanogênese pode ser obtida por substâncias que apresentam estrutura fenólica que incluem flavonoides, polifenóis, antocianinas e ácidos fenólicos, além de atividade antioxidante (Kubo; Kinst-Hori, 1999).

### 1.1 *Justificativa da Tese*

De acordo com Weber (2020), em artigo publicado pela Forbes, o Brasil é o quarto maior mercado consumidor global de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos, com 6,2% de participação, o país foi responsável por um total de 30 bilhões de dólares em vendas ao consumidor em 2018, segundo



estudo da Euromonitor. O Brasil está atrás apenas dos Estados Unidos da América (EUA – 18,3% com US\$ 89,5 bilhões), China (12,7% com US\$ 62 bilhões) e Japão (7,7% com US\$ 37,5 bilhões). O crescimento nacional da área foi de 567% nos últimos cinco anos, mesmo em frente à crise econômica nacional. O *International Master Course on Aging Science* (IMCAS) relatou que o mercado da estética e cosmética vai alcançar 9,3 bilhões de euros em pouco tempo (Azevedo, 2017; Setor [...], 2018).

No entanto, mesmo neste cenário promissor, as taxas de insucesso nos tratamentos cosméticos de algumas afecções cutâneas, em especial do melasma, são altas. O melasma afeta a estética facial, podendo gerar estigmatização social e depressão. Há alta prevalência (76%) de transtornos depressivos e de estresse em pacientes com melasma, comprovando o alto impacto negativo que essa discromia tem sobre a estética, o bem-estar e a qualidade de vida das pessoas (Deshpande *et al.*, 2018). Assim, tratamentos clínicos de sucesso estão linearmente relacionados à alta autoestima e melhora dos quadros de depressão, fazendo com que as pessoas voltem a sentirem-se bem consigo mesmas, o que é extremamente importante para uma vida mais longa e saudável (Deshpande *et al.*, 2018).

Neste contexto, justificam-se a necessidade e a importância do desenvolvimento, da caracterização e da avaliação de novas formulações dermocosméticas, que consigam permear mais profundamente nas camadas cutâneas, desencadeando um efeito alvo mais eficaz no tratamento e no controle do melasma. A escolha da jabuticaba como objeto de estudo desta tese refere-se ao fato dessa ser um fruto tropical brasileiro, rico em compostos fenólicos, com potencial promissor sobre a inibição da enzima tirosinase (melanogênese) e possíveis efeitos antioxidante e antienvhecimento. O uso do extrato da casca da jabuticaba, um resíduo da agroindústria, mostra-se uma opção sustentável para a obtenção de formulações cosméticas contendo ativos com potencial antioxidante, reforçando nossa contribuição à sustentabilidade e preservação da biodiversidade.

Dessa forma, pelas evidências emergentes de que a inibição da melanogênese pode ser obtida por substâncias vegetais que apresentam estrutura fenólica, desenvolveu-se nesta tese um extrato da casca da jabuticaba liofilizado e, a partir desse, quatro emulsões óleo em água avaliadas *in vitro* quanto ao seu potencial antimelanogênico. A partir dos resultados obtidos, foi possível verificar a superioridade desse extrato em relação a ativos inibitórios clássicos, como o AA, o AE e o ácido kójico, tornando esse extrato uma alternativa mais eficaz e segura para o desenvolvimento de formulações cosméticas para o clareamento da pele. Isso traz importantes impactos nos âmbitos social, econômico e ambiental, uma vez que através do desenvolvimento de formulações vegetais com potencial terapêutico, conseguimos garantir padrões de produção e consumo sustentáveis, preservando a biodiversidade, sem abrir mão do progresso da indústria de cosméticos nacional. Além disso, oferecer formulações de base vegetal para o tratamento do melasma, uma hiperpigmentação crônica e refratária, pode representar uma redução significativa de custos para o consumidor final, que está acostumado a investir em tratamentos caros e com pouco resultado, a exemplo do laser. A partir disso, podemos colaborar para uma mudança de cultura, fazendo com que as pessoas passem a buscar e a valorizar alternativas terapêuticas sustentáveis e, talvez, com melhor custo benefício, sem perder sua segurança e eficácia clínica.

## 1.2 *Considerações sobre o desenvolvimento da Tese*

Este estudo está vinculado à linha de pesquisa de Gerontecnologia do Programa de Pós-Graduação em Envelhecimento Humano da Universidade de Passo Fundo (PPGEH-UPF) e, foi desenvolvido em parceria com o Curso de Farmácia da Universidade de Passo Fundo, no Laboratório Interdisciplinar de Produção e Análise Biológica de Compostos (LAPROBIC) desse curso. A equipe executora dos ensaios experimentais apresentados nesta tese também contou com a efetiva participação de discentes da iniciação científica do referido curso.

## 1.3 *Organização do texto*

A tese está organizada em seis Capítulos.

O Capítulo 1 apresenta a introdução desta Tese.

O Capítulo 2 apresenta a revisão da literatura científica dos temas abordados, em especial com conceitos do envelhecimento cutâneo, melanogênese, melasma e suas estratégias de tratamento dermocosmético, ácido elágico e biotecnologia cosmética.

O Capítulo 3 apresenta o artigo de revisão sistemática da literatura científica, que norteou a construção do projeto de pesquisa que resultou nesta tese, intitulado “Natural sources of melanogenic inhibitors: A systematic review”, publicado no periódico “International Journal of Cosmetic Science” (doi:10.1111/ics.12763).

Os resultados dos objetivos geral e específicos da tese se encontram nos Capítulos 4 e 5, organizados na forma de outras duas produções científicas, intituladas “Caracterização fitoquímica e citotoxicidade da casca e do extrato da casca da jabuticaba [*Plynia Peruviana* (Poir.) Govaerts]” (Capítulo 4) e “Potencial antimelanogênico de emulsões contendo extrato da casca da jabuticaba [*Plynia Peruviana* (Poir.) Govaerts] (Capítulo 5).

Por fim, o Capítulo 6 apresenta as considerações finais desta tese.

#### 1.4 Objetivos

Essa tese teve como objetivo geral produzir e avaliar *in vitro* emulsões contendo extrato da casca da jabuticaba e ácido azeláico quanto ao seu potencial antimelanogênico.

Os objetivos específicos foram:

- I. Preparar e caracterizar o extrato da casca da jabuticaba quanto as quantidades de polifenóis, antocianinas, flavonoides e AE total, bem como a sua atividade antioxidante.

- II. Avaliar a citotoxicidade do extrato da casca da jabuticaba em células da linhagem VERO.
- III. Desenvolver um método analítico cromatográfico para determinar a quantidade de ácido elágico presente no extrato da casca da jabuticaba.
- IV. Desenvolver formulações semissólidas contendo e não contendo o extrato da casca da jabuticaba e AA.
- V. Verificar se o procedimento de turbo agitação promove benefícios durante o preparo das formulações semissólidas.
- VI. Caracterizar as formulações semissólidas desenvolvidas quanto ao tamanho médio de partícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta.
- VII. Avaliar o potencial antimelanogênico *in vitro* das formulações semissólidas desenvolvidas, bem como a do extrato da casca da jabuticaba, por meio dos ensaios de inibição da tirosinase de cogumelo, quelação dos íons cobre, atividade antioxidante e potencial clareador/despigmentante em células de melanoma B16F10.
- VIII. Comparar os resultados entre as diferentes formulações semissólidas desenvolvidas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Envelhecimento cutâneo*

O envelhecimento humano, processo dinâmico e progressivo, acompanhado de modificações morfológicas, bioquímicas, funcionais, psicológicas e sociais na face, no corpo e na vida dos indivíduos, vem sendo amplamente estudado e discutido na última década, sobretudo pelo significativo crescimento populacional (Tassinary; Goelzer Neto, 2018).

Nesse processo, influenciado por fatores intrínsecos e extrínsecos como as RUV, tabagismo, alcoolismo, má alimentação, estresse e outros, os tecidos sofrem mudanças graduais, que na pele e nos seus anexos, são caracterizados especialmente pela atrofia, lassidão, enrugamento e alterações de pigmentação (Bagatini, 2008).

À medida que a pele envelhece, também ocorre uma diminuição gradual do número de melanócitos que, no entanto, possuem uma atividade melanogênica irregularmente aumentada, resultando em uma mistura desigual de hipo e hiperpigmentações cutâneas (Boo, 2019).

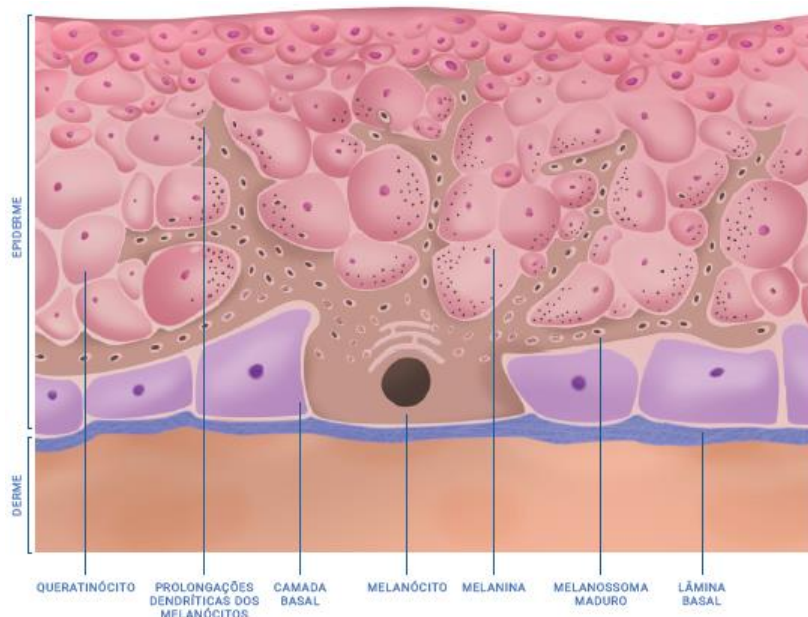
Visualmente, o processo de envelhecimento leva ao aparecimento de várias alterações estéticas na pele, principalmente associadas à sua sustentação, elasticidade, firmeza, grau de hidratação e pigmentação, podendo-se observar na sua superfície rugas finas, sulcos, fragilidade, desidratação e discromias (Majeed *et al.*, 2020).

Das discromias cutâneas relacionadas ao envelhecimento, destacam-se as hiperpigmentações que se caracterizam pelo aparecimento de manchas escuras na pele, que afetam amplamente a satisfação estética e a autoestima das pessoas, principalmente quando há apresentação clínica crônica e refratária, a exemplo do melasma (Tassinary; Goelzer Neto, 2018).

## 2.2 Melanogênese

A melanogênese é o processo de biossíntese da melanina, pigmento responsável por promover a pigmentação da pele, olhos e cabelos nos mamíferos. Esse processo ocorre no interior do citoplasma dos melanócitos, que são células dendríticas específicas localizadas na camada basal da epiderme humana. Os melanócitos hospedam no seu interior organelas chamadas melanossomas, as quais são as responsáveis pela síntese e pelo armazenamento da melanina, produzida a partir do aminoácido essencial L-tirosina. Os melanócitos possuem prolongamentos que se projetam em direção à superfície da epiderme, adentrando nos queratinócitos e introduzindo os melanossomas em seu interior (Tassinary; Goelzer Neto, 2018). A associação de melanócitos e queratinócitos formam a unidade epidérmico-melânica, na relação de 1:36, respectivamente (Figura 1).

**Figura 1** - Unidade epidérmico-melânica.



Fonte: TASSINARY, J.; GOELZER NETO, C. F. Peelings químicos magistras e abordagens terapêuticas. Lajeado: Editora Experts, 2018.

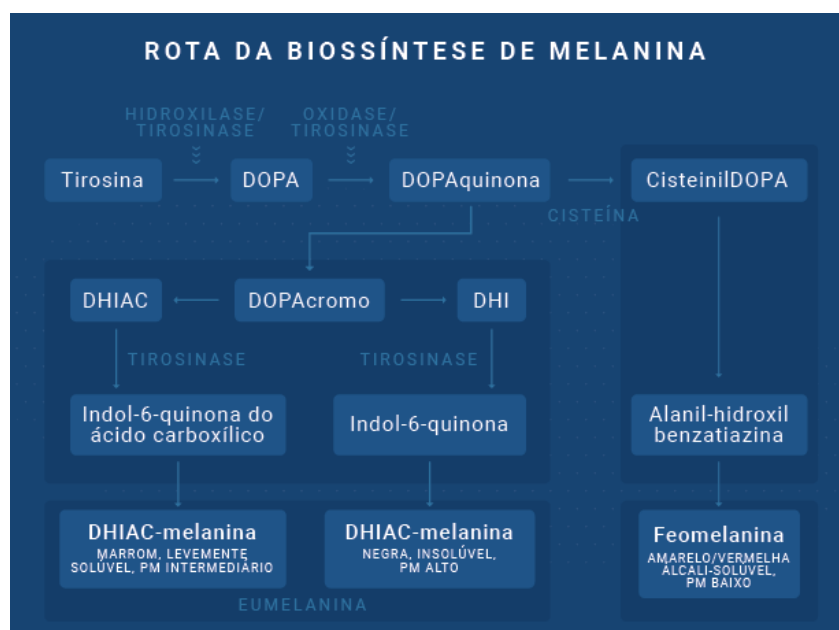
A biossíntese da melanina é crucial para melhorar a defesa do corpo contra os efeitos nocivos das RUV, em especial ao ácido desoxirribonucleico (DNA) das células da pele. No entanto, a sua produção excessiva pode causar hiperpigmentações cutâneas, na forma de manchas escuras. Normalmente, a

regulação da melanogênese é realizada por fatores de crescimento, hormônios, citocinas, enzimas e pela própria RUV (Seo *et al.*, 2019).

Ao absorver as RUV, os queratinócitos epidermais secretam o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o  $\alpha$ -MSH e a endotelina – 1, que indiretamente colaboram para aumentar a síntese de melanina. Posteriormente, o  $\alpha$ -MSH se liga ao MC1-R, um receptor de membrana acoplado à proteína G, expresso apenas nos melanócitos e secretado pela glândula hipófise para ativar a enzima adenilato ciclase (AC). Esse processo resulta no aumento dos níveis intracelulares de AMP cíclico (cAMP), da proteína quinase A (PKA) e da CREB. A CREB ativada por fosforilação, aumenta a expressão do MITF ou simplesmente fator de transcrição de tirosinas, responsável pela ativação direta da enzima tirosinase, das enzimas TRP-1 e TRP-2 (Seo *et al.*, 2019).

A enzima tirosinase é a responsável pela catálise das duas primeiras etapas da reação bioquímica de formação da melanina, oxidando o substrato L-tirosina em 3,4-diidroxifenilalanina (DOPA) e essa em DOPA-quinona. A partir daí, a presença ou a ausência do aminoácido não essencial cisteína determina o rumo da reação para a formação da eumelanina ou feomelanina. Na presença da cisteína, a DOPA-quinona é convertida em DOPA-cisteína resultando na síntese da feomelanina (melanina de coloração amarelada à avermelhada, solúvel e de baixo peso molecular). Já, na ausência da cisteína, a DOPA-quinona é convertida em ciclo-DOPA e essa em DOPA-cromo, que é convertido em DHI (dopa,5,6-diidroxiindol) em maior proporção e DHICA (5,6-diidroxiindol-2-ácido carboxílico) em menor quantidade, que são os responsáveis pela síntese da eumelanina (melanina de coloração amarronzada à enegrecida, insolúvel e de alto peso molecular) (Figura 2) (Tassinary; Goelzer Neto, 2018).

**Figura 2 - Rota da biossíntese de melanina.**



Fonte: TASSINARY, J.; GOELZER NETO, C. F. Peelings químicos magistrais e abordagens terapêuticas. Lajeado: Editora Experts, 2018.

A produção excessiva de melanina resulta na formação de hiperpigmentações cutâneas, na forma de manchas escurecidas na pele. Essas manchas afetam a estética facial, podendo estar relacionadas com a baixa autoestima e sintomas de depressão (Deshpande *et al.*, 2018), como é o exemplo do melasma.

### 2.3 Melasma

O melasma caracteriza-se como uma hiperpigmentação adquirida, multifatorial, de coloração acastanhada à enegrecida, contornos irregulares e bordas bem definidas que, acomete principalmente a região central da face. Não há consenso na literatura sobre a classificação clínica dessa afecção, sendo reconhecidos dois padrões mais comuns na face: melasma centrofacial (acomete a região central da fronte, região supralabial, região oral e região mentoniana) e o melasma malar (acomete as regiões zigomáticas) (Miot *et al.*, 2009).



**Figura 3 - Principais topografias faciais do melasma.**

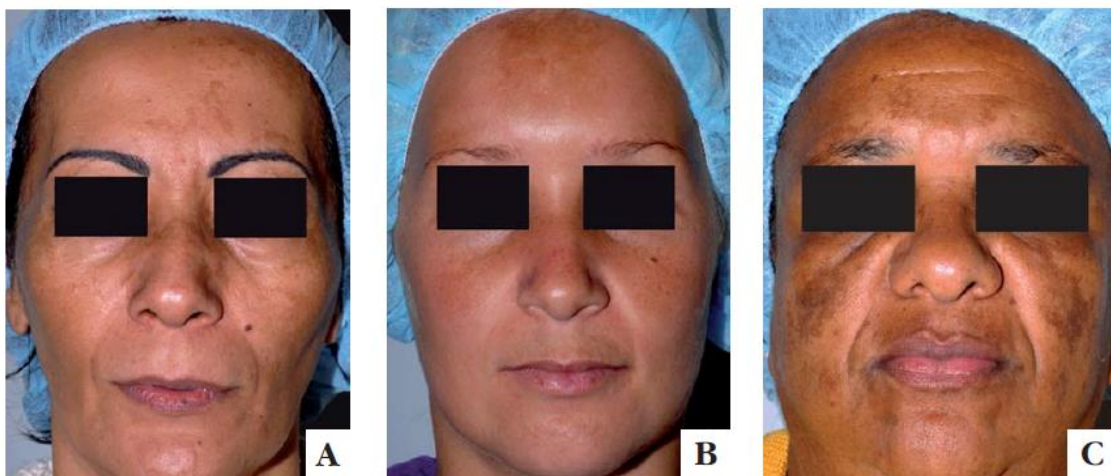


FIGURA 7: Fotos clínicas de pacientes com melasma, demonstrando as principais topografias acometidas.  
A. Glabellar, zigomático e nasal. B. Frontal e zigomático. C. Glabellar, zigomático, labial superior e mentoniano

Fonte: MIOT, L. D. B. *et al.* Fisiopatologia do melasma. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Rio de Janeiro, v. 84, n. 6, p. 623-635, dez. 2009.

Essa hiperpigmentação tem natureza recorrente e refratária, além de ser uma dermatose crônica que pode afetar ambos os sexos, com maior incidência em mulheres, especialmente gestantes. Vale ressaltar que a enorme miscigenação populacional do Brasil e a situação geográfica tropical favorecem o desenvolvimento desta afecção cutânea no país. Embora inúmeros fatores estejam relacionados ao surgimento do melasma e sua etiopatogenia não seja inteiramente conhecida, pesquisas científicas mostram que a predisposição genética e a exposição às RUV configuram os fatores mais importantes para o seu desenvolvimento. Há, porém, outros agentes com associação positiva ao desenvolvimento desta afecção cutânea, como as terapias hormonais, contraceptivos orais, fármacos fototóxicos, endocrinopatias, estresse emocional e inflamações na pele. A hipótese mais aceita é de que o melasma é causado tanto pelo incremento do número de melanócitos quanto pelo aumento da atividade das enzimas melanogênicas, em especial a tirosinase, subjacentes às alterações dérmicas causadas principalmente pela radiação solar (Tassinary; Goelzer Neto, 2018).

A íntima relação existente entre a exposição às RUV e o aparecimento do melasma está consagrada na literatura. Sabe-se que os efeitos agudos da exposição às RUV podem ser, basicamente, a queimadura solar e/ou a pigmentação cutânea (bronzamento). Após uma única exposição às RUV, são

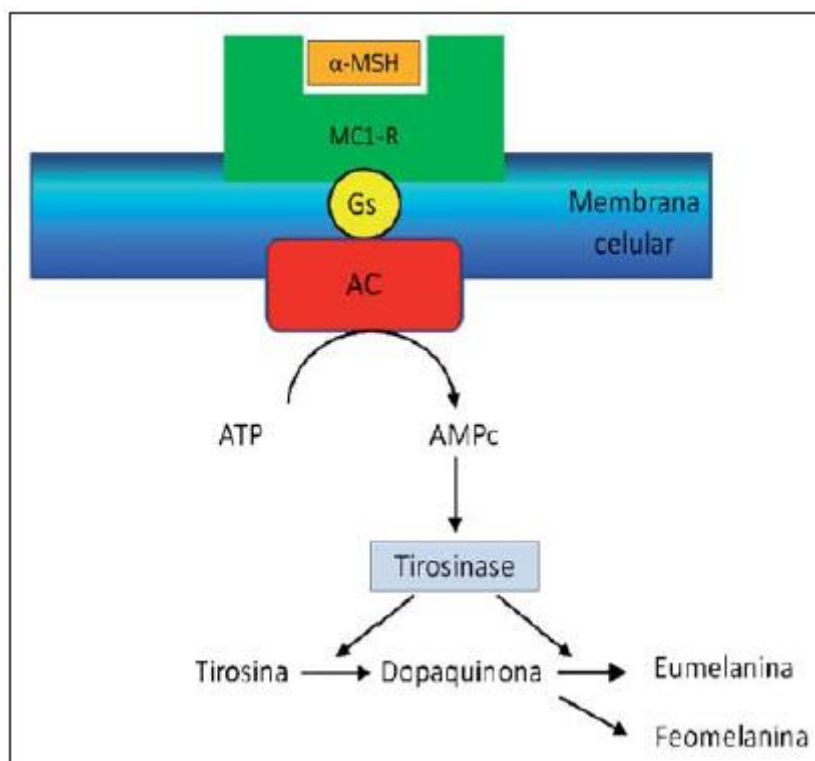
observados aumentos no tamanho dos melanócitos e na atividade da tirosinase. Exposições repetidas causam aumento no número de melanosomas transferidos aos queratinócitos epidérmicos, bem como um aumento no número de melanócitos ativos, contribuindo ainda mais para o incremento da melanogênese e o aparecimento das manchas (Miot *et al.*, 2009).

De acordo com Miot *et al.* (2009),

A radiação ultravioleta B (UVB), na pele humana, induz a produção de  $\alpha$ -MSH e ACTH nos melanócitos e queratinócitos. O  $\alpha$ -MSH estimula a atividade da tirosinase e a síntese de melanina *in vivo* e em cultura de melanócitos, via MC1-R. Outros relatos indicam que a irradiação de melanocitos com RUV aumenta os níveis de RNAm de MC1-R. Além disso, a síntese de muitos fatores epidérmicos, incluindo  $\alpha$ -MSH, ACTH e endotelina-1, é aumentada pela exposição a RUV, sugerindo uma importante influência desses mediadores na resposta dos melanócitos a luz solar. (Miot *et al.*, 2009, p. 630).

O UVB é o principal responsável pelas queimaduras solares, com a ocorrência de eritemas, após um período de latência de cerca de 2 a 7 horas. Já a radiação ultravioleta A (UVA), promove um eritema que surge mais tardiamente e, pode tornar-se gradualmente mais intenso. A interação dos hormônios e RUV pode ser ilustrada no melasma. A RUV estimula a produção de melanocortina dentro dos melanócitos e dos queratinócitos, o que explica o envolvimento desse hormônio na patogênese dessa hiperpigmentação, que se caracteriza por uma melanização epidérmica aumentada, sem proliferação melanocítica (Figura 4) (Miot *et al.*, 2009).

**Figura 4** - Esquema da sinalização do  $\alpha$ -MSH via MC1-R resultando na formação de eumelanina e feomelanina.



Fonte: MIOT, L. D. B. *et al.* Fisiopatologia do melasma. Anais Brasileiros de Dermatologia, Rio de Janeiro, v. 84, n. 6, p. 623-635, dez. 2009.

O melasma afeta a estética facial, podendo gerar estigmatização social e quadros de depressão. Foi detectada uma prevalência de 76% de transtornos depressivos e de estresse em pacientes com melasma, comprovando o alto impacto negativo que esta discromia tem sobre a estética, o bem-estar e a qualidade de vida das pessoas (Deshpande *et al.*, 2018).

### 2.3.1 Perspectivas de tratamento do melasma

Devido a etiologia multifatorial e a cronicidade do melasma, o seu combate e controle tornam-se tarefas árduas. Tratamentos convencionais bem elucidados, baseados na utilização de formulações clareadoras, despigmentantes, anti-inflamatórias e antioxidantes, apresentam desvantagens como instabilidade química, insolubilidade, toxicidade celular e fotossensibilização, contribuindo para aumentar as taxas de insucesso dos tratamentos (Pillaiyar; Manickam; Namasivayam, 2017). Genotoxicidade relacionada ao arbutin e dermatite de contato pigmentada relacionada ao ácido

kójico (um caso reportado) já foram relatados e, estes ativos estão comumente presentes nas formulações para o tratamento do melasma (Huang *et al.*, 2014).

A hidroquinona (HQ) é o agente clareador mais utilizado, para o tratamento do melasma, sendo considerado o “padrão ouro”. HQ é um fenol diídrico que inibe a tirosinase, inibindo a conversão do dopa em melanina. É utilizado puro, em concentrações de 2% à 4% ou em tripla combinação (fórmula de Kligman) com outros agentes clareadores como tretinoína, dexametasona, acetato de hidrocortisona, N-acetilcisteína, triancinolona acetona, ácido glicólico, ácido kójico, em que se tem um agente despigmentante, um anti-idade e um corticosteroide, todos em baixas concentrações (Kothapalli *et al.*, 2021; Sarkar *et al.*, 2014). No entanto, a HQ possui diversos efeitos adversos, podendo ocasionar hiperpigmentação assintomática da face, lados e costas do pescoço, costas e superfícies extensoras, irritação cutânea leve e sensibilização caracterizada por coceira, queimação, ardência e dermatite alérgica, ocronose exógena e colóide milium (Gupta *et al.*, 2006; Victor; Gelber; Rao, 2004). Seu uso prolongado pode acumular metabólitos (formados no fígado) que geram danos ao DNA e carcinogênese. Uma parte da HQ é convertida em P-benzoquinona, a HQ não metabolizada e a P-benzoquinona se conjugam com a L-glutationa e os conjugados formados prejudicam a função mitocondrial, geram espécies reativas de oxigênio (ROS) e esgotamento do antioxidante endógeno L-glutationa, que induzem a oxidação do DNA, favorecendo o desenvolvimento do câncer, como a leucemia (Luo *et al.*, 2008; Westerhof; Kooyers, 2005; Wiraguna; Hari; Praharsini, 2020).

Por estes motivos, tem-se buscado cada vez mais por fontes naturais de inibidores da melanogênese, que possibilitem o desenvolvimento de novas formulações eficazes e com menores efeitos colaterais. Nas últimas décadas se observa um aumento nos estudos e na exploração de plantas e frutos com potenciais terapêuticos, especialmente impulsionados pelas novas tecnologias aplicadas à descoberta de novos compostos farmacobotânicos (Calazans *et al.*, 2019). Há muitos anos, países orientais como a China, Coréia e Japão, por exemplo, adotaram a coloração clara e homogênea da face como um padrão de

beleza, investindo muitos recursos na indústria cosmética de clareadores naturais da pele (Alam *et al.*, 2016).

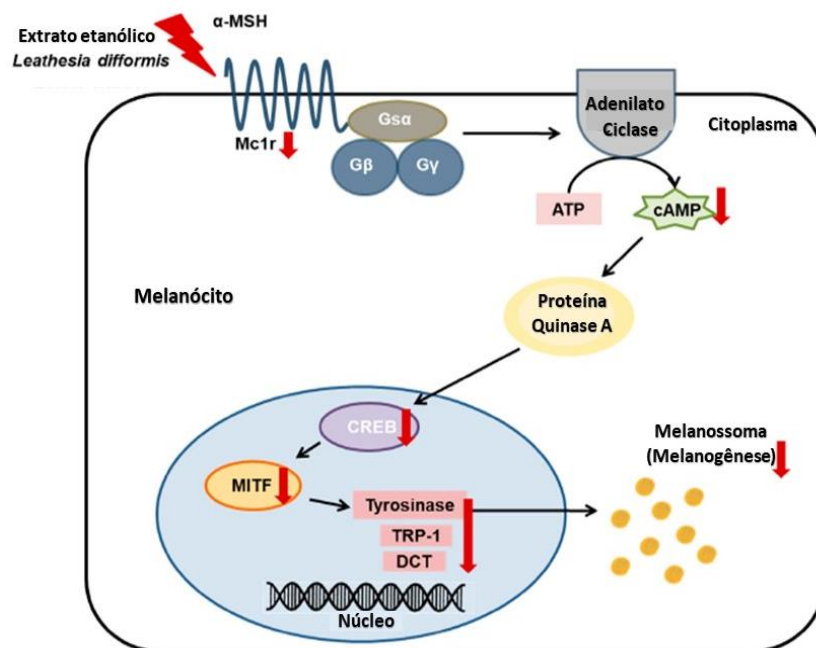
Considera-se clareador o ativo capaz de tornar ineficiente ou bloquear totalmente o processo da melanogênese, principalmente por meio da inibição da ação de um ou mais dos seus principais reguladores ( $\alpha$ -MSH, MC1-R, cAMP, CREB, MITF, TYR, TRP-1, TRP-2, DCT, entre outros) (Goelzer Neto *et al.*, 2022).

Diversos extratos botânicos estão sendo utilizados para o tratamento do melasma, como o extrato da semente de uva (possui proantocianidina – antioxidante), da babosa (possui aloin – agregação da melanina), de orquídea (contém flavonoides – antioxidantes), picnogenol (possui procianidinas, monômeros polifenólicos e ácido cinâmico – antioxidantes e anti-inflamatórios), extrato de alga marinha (inibição da tirosinase), extrato de chá verde (possui epigallocatequina-3-galato – antioxidante, inibição da tirosinase), extrato da baga de café (possui ácido clorogênico – antioxidante), extrato metanólico de amora (contém compostos fenólicos, como ácido elágico, flavonas, uralenol, quercetina, brousoflavonol – inibição da dopa-oxidase da tirosinase, não converte o dopa em melanina), extrato de soja (contém fosfolipídios e óleos graxos essenciais que inibem a transferência do melanossomo), extrato de alcaçuz (possui liquiritina e isoliquiritina – inibe a tirosinase e inibe a ação da radiação UVB), extrato de umbeliferona (contém 7-hidroxicumarina – absorve a luz ultravioleta), extrato de *boswellia* (ácido boswélico – anti-inflamatório) (Abe; Lajolo; Genovese, 2012; Gupta *et al.*, 2006; Sarkar *et al.*, 2014; Sheth *et al.*, 2011).

Em estudos com clareadores naturais a fração acetato de etila do extrato etanólico (80%) de *Leathesia difformis* (alga marinha marrom com propriedades antivirais e antioxidantes) mostrou maior atividade clareadora que o arbutin (clareador cutâneo tradicional) ao diminuir significativamente a síntese de melanina (extrato: 15 $\mu$ g/ml – redução de 135,6% do teor de melanina versus arbutin – redução de 96,2%) e, a atividade celular da tirosinase (extrato: 15 $\mu$ g/ml – redução da atividade celular de 113,2% versus arbutin – redução de 80,3%), em células de melanoma B16F10 estimuladas por  $\alpha$ -MSH, de maneira dose

dependente. A significativa ação inibitória do extrato natural foi relacionada a sua capacidade de diminuir as expressões de MC1-R, cAMP, CREB, MITF, TYR, TRP-1 e DCT. Os possíveis mecanismos de ação dos agentes clareadores podem ser observados na Figura 5 (Seo *et al.*, 2019).

**Figura 5** - Mecanismo de ação do extrato etanólico de *Leathesia difformis* na melanogênese induzida por  $\alpha$ -MSH.



Fonte: adaptado de SEO, G. Y. *et al.* *Leathesia difformis* Extract Inhibits  $\alpha$ -MSH-Induced Melanogenesis in B16F10 Cells via Down-Regulation of CREB Signaling Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 20, n. 3, p. 536, Feb. 2019.

No mesmo contexto, a fração acetato de etila do extrato etanólico (70%) de *Morus alba* (amoreira branca, nativa da Ásia, África e América do Norte) também mostrou superioridade ao arbutin ao reduzir de forma significativa a produção de melanina, a atividade intracelular da tirosinase e as expressões de MITF, TYR, TRP-1 E TRP-2 em células de melanoma murino B16F10 estimuladas por  $\alpha$ -MSH, de maneira dependente da dose. A significativa ação inibitória do extrato natural de *M. alba* foi relacionada com a presença do composto isolado moracin J, o qual foi capaz de inibir as vias de sinalização CREB e p38, bloqueando o processo da melanogênese nas células (Li *et al.*, 2018).

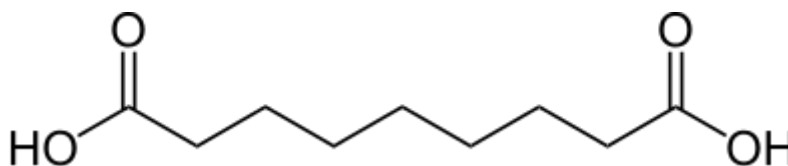
Há uma relação linear entre a estrutura fenólica e a capacidade antioxidante de alguns compostos naturais com a inibição da melanogênese. Neste contexto, Pedrosa *et al.* (2016) avaliaram os efeitos dos extratos hidroalcoólicos da casca do tronco e da vagem de *Libidía ferrea* (jucá – árvore nativa da América do Sul – Brasil e Bolívia) sobre a síntese da melanina e a atividade celular da tirosinase em células de melanoma B16F10 estimuladas por IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine). Sobre a quantidade de melanina, os extratos naturais apresentaram similaridade de ação ao ácido gálico (ácido fenólico, antioxidante e inibidor natural da tirosinase) (extratos: extratos: 25µg/ml – redução de  $41,25 \pm 2,80\%$  do teor de melanina versus ácido gálico: 5µg/ml – redução de  $43,5 \pm 2,39\%$ ). Já, em relação a atividade celular da tirosinase, a capacidade de inibição dos extratos foi superior à do ácido gálico (extratos: 25µg/ml – inibição de  $98,0 \pm 4,94\%$  versus ácido gálico: 5µg/ml – inibição de  $89,5 \pm 1,39\%$ ). Os autores sugeriram que a capacidade inibitória e antioxidante dos extratos naturais de *L. ferrea* está diretamente relacionada à presença de compostos fenólicos, como os flavonoides (Kaempferol, catequina e epicatequina) e ácidos fenólicos (AE, ácido gálico, ácido cafeico) na sua composição. O AE foi detectado no extrato de vagem de *L. férrea* (Pedrosa *et al.*, 2016).

Frente a estas informações, torna-se importante destacar que os compostos fenólicos representam uma grande classe de metabólitos secundários, que vem sendo alvo de muitos estudos devido às comprovações de suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e anticarcinogênicas (Cai *et al.*, 2004; Faria *et al.*, 2006; Whitley; Sweet; Walle, 2006). Os três maiores grupos de fenólicos são os flavonoides, os ácidos fenólicos e os taninos (King; Young, 1999). Os flavonoides são substâncias de baixo peso molecular e são classificados de acordo com a sua estrutura química, sendo os mais comuns: flavonóis, flavonas, flavanonas, antocianidinas e isoflavonas. Os ácidos fenólicos, por sua vez, compreendem os ácidos benzóicos e derivados (hidroxibenzóico, vanílico, gálico, AE, etc.) e os ácidos cinâmicos e seus derivados (cumárico, cafeico, ferúlico, clorogênico, etc.). Os taninos são polímeros de alto peso molecular divididos em duas principais classes (taninos hidrossolúveis – são os polímeros do ácido gálico (galotaninos)

e do ácido elágico (elagitaninos), encontrados em frutos como o morango, a framboesa e as nozes; e, os taninos condensados – são os polímeros de catequina ou epicatequina (Cai *et al.*, 2004; Faria *et al.*, 2006; Whitley; Sweet; Walle, 2006).

Outro ativo conhecido para o tratamento do melasma é o AA, que é um ácido dicarboxílico saturado de cadeia linear (Figura 6) que atua como um inibidor competitivo reversível da tirosinase, interferindo diretamente na biossíntese da melanina. Também possui um efeito antiproliferativo e citotóxico no melanócito, desempenhando ação anti-inflamatória, antibiótica e anti-queratinizante. Por apresentar especificidade em melanócitos anormais, esse ativo não tem ação despigmentante em peles normalmente pigmentadas. A aplicação tópica pode causar prurido, eritema, descamação, reações normalmente esperadas do uso tópico de ácidos orgânicos na pele (Bandyopadhyay, 2009; Gupta *et al.*, 2006). Comercialmente, está disponível como um creme ou gel nas concentrações de 15% a 20% (Rendon *et al.*, 2006).

**Figura 6** - Estrutura química do ácido azelaico.



Fonte: OLIVEIRA, E. L. Planejamento e otimização da síntese da polianilina dopada com ácido azelaico e sua aplicação em fotodegradação. 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) – Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2016.

Algumas investigações demonstram que a associação do AA com outros ativos, a exemplo da tretinoína tópica e do ácido glicólico, resulta em clareamento e despigmentação da pele de forma mais eficiente e precoce (Berlitz *et al.*, 2019; Tassinary; Goelzer Neto, 2018).

### 2.3.2 Potencial da jaboticaba no tratamento do melasma

A jaboticabeira, árvore frutífera brasileira, se caracteriza como um arbusto nativo do Estado de Minas Gerais, podendo ser encontrada desde o Pará até o Rio Grande do Sul em diferentes espécies. Os seus frutos, a jaboticaba (gêneros



*Myrciaria* ou *Plynia*), têm coloração arroxeadada quando maduros e são muito apreciados pelo seu sabor doce e sub ácido. Suas cascas são ricas em antocianinas, apresentando também valores significativos de ácido ascórbico (vitamina C), potássio, magnésio, fibras e ácidos fenólicos como o AE. Componente, este, que é capaz de aumentar o efeito do antioxidante endógeno L-glutationa que age protegendo as células dos efeitos nocivos das RUV e inibindo a tirosinase através da quelação dos íons cobre. O AE também possui ação comprovada sobre a inibição da tirosinase, bloqueando o processo da melanogênese (Plagemann *et al.*, 2012; Reynertson *et al.*, 2006; Wiraguna; Hari; Praharsini, 2020).

A jabuticaba tem alta capacidade antioxidante e apresenta benefícios à saúde graças as suas propriedades anti-inflamatória, anti-mutagênica e anti-carcinogênica (Março; Poppi; Scarminio, 2008; Efraim *et al.*, 2010; Volp *et al.*, 2008). O AE, substância principalmente encontrada nas suas cascas, tem comprovadas ações antiviral, antibacteriana (frente a *Escherichia coli*, *Pseudomas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*), gastroprotetora e cardioprotetora (Galano *et al.*, 2016), anti-aterosclerótica, anti hepatotóxica e anti-replicação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Landete, 2011).

Abe, Lajolo e Genovese (2012) realizaram um estudo para avaliar o teor de AE em frutas (inclusive nativas) consumidas por brasileiros (Quadro 1). Para analisar o conteúdo de AE livre e seus derivados foi utilizado cromatografia líquida de alta eficiência. Os autores, detectaram o AE em 10 de um total de 35 frutas analisadas; o conteúdo de AE livre nas frutas variou de 0,0028 a 0,085 g/Kg-1 e de AE total variou de 0,215 a 3,11 g/Kg-1, sendo que todas as setes frutas pertencentes a família *Myrtaceae* apresentaram elevados teores de elagitaninos em sua composição. A jabuticaba mostrou-se a mais popular entre todas as frutas ricas em AE, demonstrando seu potencial como fonte dietética desse componente e para o uso no tratamento do melasma (Abe, Lajolo e Genovese, 2012).

**Quadro 1** - Famílias, nomes científicos e comuns de frutas rastreadas quanto a presença de ácido elágico.

<b>Família</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Nome popular</b>
<b>Actinidiaceae</b>	<i>Actinidia chinensis</i>	Kiwi
<b>Anacardiaceae</b>	<i>Anacardium occidentale</i>	Caju
	<i>Mangifera indica</i>	Manga
<b>Annonaceae</b>	<i>Annona muricata</i>	Graviola
<b>Arecaceae</b>	<i>Mauritia flexuosa</i>	Buriti
	<i>Astrocaryum aculeatum</i>	Tucumã
<b>Bromeliaceae</b>	<i>Ananas comosus</i>	Abacaxi
<b>Leguminosae</b>	<i>Tamarindus indica</i>	Tamarindo
<b>Clusiaceae</b>	<i>Platonia insignis</i>	Bacuri
<b>Cucurbitaceae</b>	<i>Cucumis metuliferus</i>	Kino/pepino-africano
<b>Ebenaceae</b>	<i>Diospyros kaki</i>	Caqui
<b>Humiriaceae</b>	<i>Endopleura uchi</i>	Uxi/uxipuçu
<b>Myrtaceae</b>	<i>Campomanesia feia</i>	Cambuci
	<i>Psidium guajava</i>	Goiaba vermelha
	<b><i>Myrciaria jaboticaba</i></b>	<b>Jaboticaba</b>
	<i>Myrciaria dúbia</i>	Camu-camu
	<i>Eugenia brasiliensis</i>	Grumixama
<b>Moraceae</b>	<i>Ficus carica</i>	Figo
	<i>Morus nigra</i>	Amora silvestre
<b>Oxalidaceae</b>	<i>Averrhoa carambola</i>	Carambola
<b>Passifloraceae</b>	<i>Passiflora alata</i>	Maracujá doce
	<i>Passiflora ligularis</i>	Granadilha
<b>Punicaceae</b>	<i>Punica granatum</i>	Romã
<b>Rosaceae</b>	<i>Prunus domestica</i>	Ameixa
	<i>Prunus pérsica</i>	Pessêgo
	<i>Prunus avium</i>	Cereja
	<i>Rubus fruticosus</i>	Amora
	<i>Fragaria ananassa</i>	Morango

(continua)

**Quadro 1** - Famílias, nomes científicos e comuns de frutas rastreadas quanto a presença de ácido elágico (continuação).

Família	Nome científico	Nome popular
<b>Sapindaceae</b>	<i>Litchi chinensis</i>	Lichia
<b>Solanaceae</b>	<i>Solanum sessiflorum</i>	Mana cubiu/Tomate de índio
<b>Sterculiaceae</b>	<i>Theobroma grandiflorum</i>	Cupuaçu
<b>Vitaceae</b>	<i>Vitis vinífera</i>	Uva vinífera
	<i>Vitis labrusca</i>	Uva americana

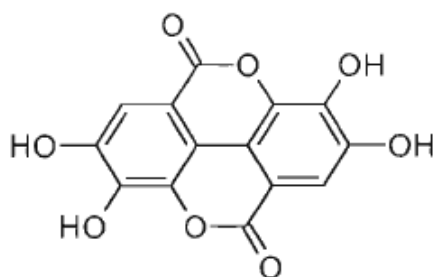
Fonte: ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). *Journal of The Science of Food and Agriculture*, London, v. 92, n. 8, p. 1679-1687, June 2012.

Dois estudos avaliaram as atividades antioxidantes e anticancerígena do extrato metanólico de jaboticaba. O primeiro demonstrou forte atividade antioxidante no ensaio DPPH (2,2 -difênil -1-picrilhidrazil, IC<sub>50</sub> = 35 µg/mL) (Reynertson *et al.*, 2006) e, o segundo estudo, no mesmo ensaio, IC<sub>50</sub> = 19,4 µg/mL (Reynertson *et al.*, 2008). A composição fenólica e a atividade antioxidante da jaboticaba, provavelmente, associam-se de forma significativa com os seus possíveis efeitos antimelanogênicos, fazendo desta fruta um alvo potencial no estudo de combate às hiperpigmentações cutâneas. Neste contexto, o tratamento do melasma continua sendo um grande desafio na dermatologia, fazendo-se necessário o delineamento de novos estudos que demonstrem a efetividade e a eficácia terapêutica, bem como o perfil de segurança dessas novas substâncias (Ayres *et al.*, 2016).

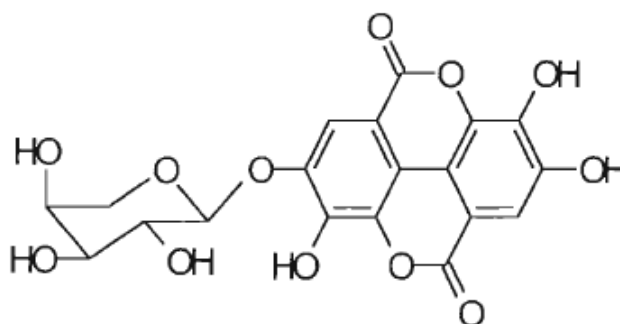
#### 2.4 Ácido elágico

O AE é um composto fenólico presente em algumas frutas e castanhas. Normalmente pode ser encontrado nas formas livre, glicosilada (Figura 7) e na forma de elagitaninos (Abe, 2007).

**Figura 7** - Estrutura química do ácido elágico livre (A) e glicosilado (B).



(A) Ácido elágico livre



(B) Ácido elágico 4-arabinosídeo

Fonte: ABE, L. T. Ácido elágico em alimentos regionais brasileiros. 2007. 106 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Os elagitaninos são ésteres do ácido hexahidroxi-difênico. Quando são expostos à ácidos ou bases, a sua porção éster é hidrolisada e o ácido hexahidroxi-difênico se reorganiza espontaneamente dando origem ao AE, substância insolúvel em água (Clifford; Scalbert, 2000).

O AE possui propriedades antioxidante, antimicrobiana, antimutagênica, anticarcinogênica e antiviral (Cruz-Antonio *et al.*, 2010). Neste contexto, Whitley *et al.* (2003), descreveu a prevenção do câncer do trato gastrointestinal atribuída ao acúmulo seletivo de AE em células epiteliais de rato; Puupponen-Pimiä *et al.* (2005), a atividade antimicrobiana seletiva em microrganismos patogênicos humanos; e, Mullen *et al.* (2002) e Bushman *et al.* (2004), demonstraram a alta capacidade antioxidante *in vitro*. Essas propriedades justificam a importância de se estudarem as fontes de obtenção e formas de extração deste composto.

O AE também é inibidor da produção da melanina e, em seres humanos, o ativo apresenta ação antioxidante e anti-inflamatória (Draelos *et al.*, 2013). Um

estudo randomizado com 54 pacientes mostrou, após 12 semanas, que o tratamento com associação de AE a 0,5% e ácido salicílico a 0,1% é tão eficaz quanto a HQ a 4% (Dahl *et al.*, 2013).

O extrato de romã (*Punica granatum*), que contém cerca de 90% de AE foi testado, via oral, em cobaias, demonstrando o clareamento da pele das mesmas, devido a inibição da pigmentação induzida pela RUV e a diminuição do número de melanócitos DOPA-positivos. O resultado foi relacionado à inibição da proliferação dos melanócitos e da síntese da melanina pela enzima tirosinase, considerando o extrato de romã efetivo no clareamento da pele, quando administrado por via oral (Yoshimura *et al.*, 2005).

Mo *et al.* (2013) demonstraram efeitos anti-inflamatórios e analgésicos do extrato de romã administrado por via tópica, também associando esses efeitos à presença do AE na sua composição.

Em outro estudo, realizado com modelo animal (porco castanho-avermelhado), foi observado que o AE tem a capacidade de clarear a pele de forma eficaz, suprimindo a pigmentação cutânea. O ativo mostrou superioridade ao arbutim e ao ácido kójico quando utilizados na mesma dose (1%). Para os autores, os efeitos do AE são semelhantes aos da HQ, no entanto, este composto atua sem prejudicar os melanócitos, impedindo que haja acúmulo de pigmentação da pele após queimaduras solares (comum nas hiperpigmentações do tipo melasma, efélides e pós inflamatória) melhorando a aparência geral da pele pigmentada (Junyaprasert *et al.*, 2012).

## 2.5 Biotecnologia cosmética

A Biotecnologia Cosmética envolve processos tecnológicos de obtenção, encapsulamento, liberação e otimização de dermocosméticos. Nos últimos anos observou-se um aumento bastante significativo no estudo do potencial biotecnológico de plantas e frutos com propriedades terapêuticas, especialmente impulsionados pelas novas tecnologias aplicadas à descoberta de novos compostos farmacobotânicos (Calazans *et al.*, 2019).

No desenvolvimento de formulações terapêuticas, o encapsulamento dos ativos permite a sua proteção e, em algumas técnicas, a sua liberação de forma mais lenta, prolongando o tempo de exposição no tecido alvo. Duas das técnicas mais utilizadas são a microencapsulação e a nanoencapsulação de ativos. Essas podem ser definidas como o processo pelo qual minúsculas partículas de ingredientes ativos são empacotadas no interior de um segundo material. O material a ser micro ou nanoencapsulado pode ser chamado de núcleo, material ativo ou fase interna (Fávaro-Trindade; Pinho; Rocha, 2008).

O micro e o nanoencapsulamento de ativos estão relacionados às estruturas, propriedades e processos envolvendo materiais com dimensões em escala micrométrica e nanométrica. As micropartículas ou nanopartículas vêm sendo intensamente investigadas por apresentarem vantagens em relação às formulações tradicionais. Neste contexto, o micro e o nanoencapsulamento de dermatocósméticos refere-se ao emprego de pequenas partículas contendo ativos capazes de permearem mais profundamente nas camadas cutâneas, promovendo e possibilitando efeitos alvos (*target effects*) mais eficazes e duradouros (Baril *et al.*, 2012).

As microemulsões são sistemas coloidais transparentes e termodinamicamente estáveis. Elas têm sido utilizadas devido ao seu potencial como veículos de entrega na pele para uma ampla gama de moléculas. O tamanho da partícula em microescala e a especificidade dos componentes da microemulsão são as principais características que determinam o processo de permeação da pele (Szumata; Macierzanka, 2022).

As nanoemulsões são dispersões muito finas, formadas pela conjugação de duas fases imiscíveis, normalmente água e óleo, estabilizadas por um tensoativo, em que um dos líquidos é distribuído pelo outro e o tamanho das gotículas é em escala nanométrica (20-500 nm) (Souza *et al.*, 2018).

A entrega de ativos farmacológicos utilizados por via tópica é um desafio devido à barreira mecânica representada pela pele, sendo difícil os ativos alcançarem maiores profundidades, uma vez que as especificidades de entrega

são decisivas para o grau de eficácia dos tratamentos. Neste contexto, as nanoemulsões surgem como um sistema potencial para a incorporação de substâncias ativas nas células e para a liberação controlada de princípios ativos. O tamanho nanométrico das partículas em nanoemulsões aumentam a área superficial, resultando em maior eficácia, segurança, permeabilidade, perfil e biodisponibilidade dos ativos. As nanoemulsões tem baixa irritação da pele e alta capacidade de transportar substâncias ativas quando comparada com outras nanoestruturas (Souza *et al.*, 2018). Formulações nanotecnológicas devem apresentar boa estabilidade, baixa toxicidade, apresentando um perfil clínico sensorial adequado para garantir a adesão do paciente ao tratamento (Berlitz *et al.*, 2019).

Berlitz *et al.* (2019) realizaram um estudo com o objetivo de desenvolver uma nanoemulsão contendo AA e ácido hialurônico (AH) como uma dupla estratégia para aumentar a retenção do medicamento na pele e a atividade de inibição da tirosinase. Essa estratégia se faz necessária devido ao fato de que o melasma dérmico é uma doença recalcitrante, necessitando de tecnologias que permitam uma permeação mais profunda na pele e que ao mesmo tempo aumente a eficácia de um ativo dermatológico. A partir do desenvolvimento e da caracterização da nanoemulsão, os autores realizaram um ensaio de inibição da tirosinase de cogumelo *in vitro*, ensaio de citotoxicidade, permeação e avaliação sensorial. O conteúdo dos fármacos foi de 10 mg/mL, o tamanho de partícula de  $419 \pm 23$  nm com distribuição monomodal, a eficiência de encapsulação de 84,65%, potencial zeta de  $-10,9 \pm 0,44$  mV e pH 5,01. A nanoemulsão foi estável por 30 dias a 30 °C (65% de umidade relativa [UR]), diminuiu a atividade da tirosinase, não apresentou sinais de citotoxicidade e apresentou boa espalhabilidade. A nanoemulsão apresentou gotículas nanométricas e foi capaz de superar a barreira da pele e atingir suas camadas mais profundas, melhorando a eficácia do AA como um agente despigmentante. A formulação demonstrou um alto potencial para tratar hiperpigmentações da pele, como o melasma.

Uma nanoemulsão em gel de extrato do ramo de *Phyllanthus emblica L.* (Euphorbiaceae) que possui ácido gálico como principal composto fenólico, foi

testado por Sripanidkulchai, Chaiittianan e Suttanut (2020) quanto à sua segurança e eficácia em um ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo. Os indivíduos que receberam emblica nanogel (gel contendo nanoemulsão do extrato do ramo de *P. emblica*) tiveram um índice de melanina nas bochechas significativamente menor nas semanas 2, 4, 6 e 8, da testa nas semanas 4, 6 e 8, e do antebraço na semana 8 em comparação com o grupo placebo. O extrato de ramo da *P. emblica* exibiu potente efeitos de inibição da atividade da tirosinase de cogumelo. Entre os constituintes químicos presentes no extrato destacaram-se ácido gálico, ácido vanílico, epigallocatequina, epigalato de galocatequina e AE, sendo o ácido gálico e o AE os principais componentes com atividade antimelanogênicas. A aplicação de *Phyllanthus emblica L* resultou em clareamento cutâneo significativo durante oito semanas de aplicação, sem efeitos colaterais ou efeitos de irritação da pele (Sripanidkulchai, Chaiittianan e Suttanut, 2020).



### 3 PRODUÇÃO CIENTÍFICA I: NATURAL SOURCES OF MELANOGENIC INHIBITORS: A SYSTEMATIC REVIEW<sup>1</sup>

#### 3.1 Abstract

**Objective:** Melanin gives some natural protection against the harmful effects of ultraviolet radiation; however, excessive production of melanin causes skin hyperpigmentation. Depigmenting cosmetics can be used to control this process; however, depigmenting agents commonly used have some disadvantages, such as low bioavailability, photosensitization, cellular toxicity, and insolubility. Natural sources of melanogenic inhibitors have become important alternatives to synthetic ones. The objective of this review was to summarize the results of studies on natural extracts that have been reported in the literature to inhibit the process of melanogenesis, giving a view on their suitability for potential use in new cosmetic formulations for skin-lightening. **Data sources:** A systematic literature search was carried out using the descriptors: “melanogenesis”, “tyrosinase”, “tyrosinase inhibition”, and “natural agents”. **Study selection:** Publications were selected based on our designated inclusion and exclusion criteria, and a total of 15 studies met these criteria. **Data extraction:** The following were used in the review of each paper which met the criteria: the name of the plant (all of the natural extracts turned out to be from plants), the method used to obtain the plant extract, the method for evaluating anti-tyrosinase activity, the main results, and the conclusions. **Data synthesis:** All evaluated natural agents demonstrated anti-tyrosinase effect. The species *Leathesia difformis*, *Morus alba*, *Orostachys japonicus*, *Heracleum moellendorffii*, *Coix lacryma-jobi (adlay)*, *Inula brittanica*, and *Gailardia aristata* stood out from the others due to their application as potential inhibitors of more than three proteins related to melanogenesis, including the cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein, microphthalmia-associated transcription factor, tyrosinase, tyrosinase-related protein-1, tyrosinase-related protein-2, and dopachrome tautomerase. **Conclusion:** The plants present an anti-tyrosinase effect that must be better explored in the new cosmetic

---

<sup>1</sup> GOELZER NETO, C. F. *et al.* Natural sources of melanogenic inhibitors: A systematic review. *International Journal of Cosmetic Science*, Oxford, v. 44, n. 2, p. 143-153, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/ics.12763>.

formulations. The anti-melanogenic effects of the plant are mainly related to the presence of phenolic and antioxidant compounds.

Keywords: Melanogenesis; Melanogenic inhibitors; Natural agents; Phenolic compounds; Tyrosinase; Tyrosinase inhibition.

### 3.2 *Introduction*

Melanogenesis involves the biosynthesis of melanin, an endogenous pigment that gives colour to the skin, eyes, and hair, through a series of enzymatic chemical reactions [1]. The essential amino acid L-tyrosine serves as its substrate. In humans, this process occurs in the cytoplasm of dendritic cells, called melanocytes, located in the basal layer of the epidermis. Melanocytes are pigmented cells that house the organelles melanosomes which produce and store melanin [2]. Melanocytes have extensions that protrude toward the surface of the epidermis and enter keratinocytes to pigment the skin. The association between melanocytes and keratinocytes forms the epidermal-melanin unit at a 1:36 ratio.

Melanin biosynthesis is crucial for improving the body's defence against the harmful effects of ultraviolet (UV) radiation, especially on the DNA of skin cells. However, its excessive production can cause skin hyperpigmentation in the form of dark spots [3]. These spots affect facial aesthetics and are usually associated with low self-esteem and symptoms of depression [4]. The regulation of melanogenesis is usually carried out by growth factors, hormones, cytokines, enzymes, and UV radiation. The skin absorbs UV radiation and the keratinocytes produce the adrenocorticotrophic hormone,  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH), and endothelin-1, which increase the synthesis of melanin indirectly [3]. The  $\alpha$ -MSH subsequently binds to the melanocortin-1 receptor (MC1-R), a membrane receptor coupled to the G protein, expressed only in melanocytes and secreted by the pituitary gland to activate the enzyme, adenylate cyclase. This process results in an increase in the intracellular levels of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), protein kinase A, and the cAMP response element-binding protein (CREB). Phosphorylation-activated CREB increases the expression of the microphthalmia-associated transcription factor (MITF), a

tyrosine transcription factor responsible for the direct activation of the tyrosinase (TYR) enzyme as well as the tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) and tyrosinase-related protein-2 (TRP-2) enzymes [3], which are the three key enzymes involved in melanogenesis.

Enzymatic regulation of melanogenesis is carried out mainly by the TYR, TRP-1, and dopachrome tautomerase (DCT) [3]. TYR is the enzyme responsible for the catalysis of the first two stages of the biochemical reaction of melanin synthesis, oxidizing L-tyrosine to 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) to DOPA-quinone. The presence or absence of the non-essential amino acid cysteine determines the course of the synthesis reaction of eumelanin or pheomelanin. In the absence of cysteine, DOPA-quinone is converted to cyclo-DOPA and later to DOPA-chromium, which is again converted to 5,6-dihydroxyindole (DHI) by the enzyme, DCT, in greater proportion and to 5,6-dihydroxyindol-2-carboxylic acid (DHICA) by the TRP-1 enzyme in a smaller proportion, which is further oxidized to indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid by the TRP-2 enzyme which is responsible for the formation of eumelanin (brown to black melanin of high molecular weight). In the presence of cysteine, DOPA-quinone is converted to DOPA-cysteine, resulting in the formation of pheomelanin (yellow to red melanin of low molecular weight) [2].

Controlling the activity of the regulators of the melanogenesis process, such as  $\alpha$ -MSH, MC1-R, CREB, MITF, TYR, TRP-1, TRP-2, and DCT, among others, becomes indispensable in the creation of cosmetic formulations that are effective against pigmentary disorders, especially hyperpigmentation. In this context, the advent of depigmenter agents, such as arbutin, kojic acid, and hydroquinone, has been showing benefits against these disorders. However, some disadvantages are related to the use of these agents, such as chemical instability, cell toxicity, photosensitization, insolubility, and low bioavailability [5].

Thus, natural sources of melanogenic inhibitors have been studied to produce effective dermocosmetic formulations without any major side effects. In this context, the present systematic review summarizes the results of studies on plant extracts that have been reported in the literature to inhibit the process of

melanogenesis and gives a view on their suitability for potential use in new cosmetic formulations for skin-lightening.

### 3.3 *Methods*

The research for this review was carried out at the Virtual Health Library of Brazil (VHL) and CAPES Journal Portal (these databases include over 500 databases such as PubMed, Scopus, Embase, Cochrane, Web of Science, among others), using the descriptors “melanogenesis”, “tyrosinase”, “tyrosinase inhibition”, and “natural agents”. All available studies were considered for this review, which included the following:

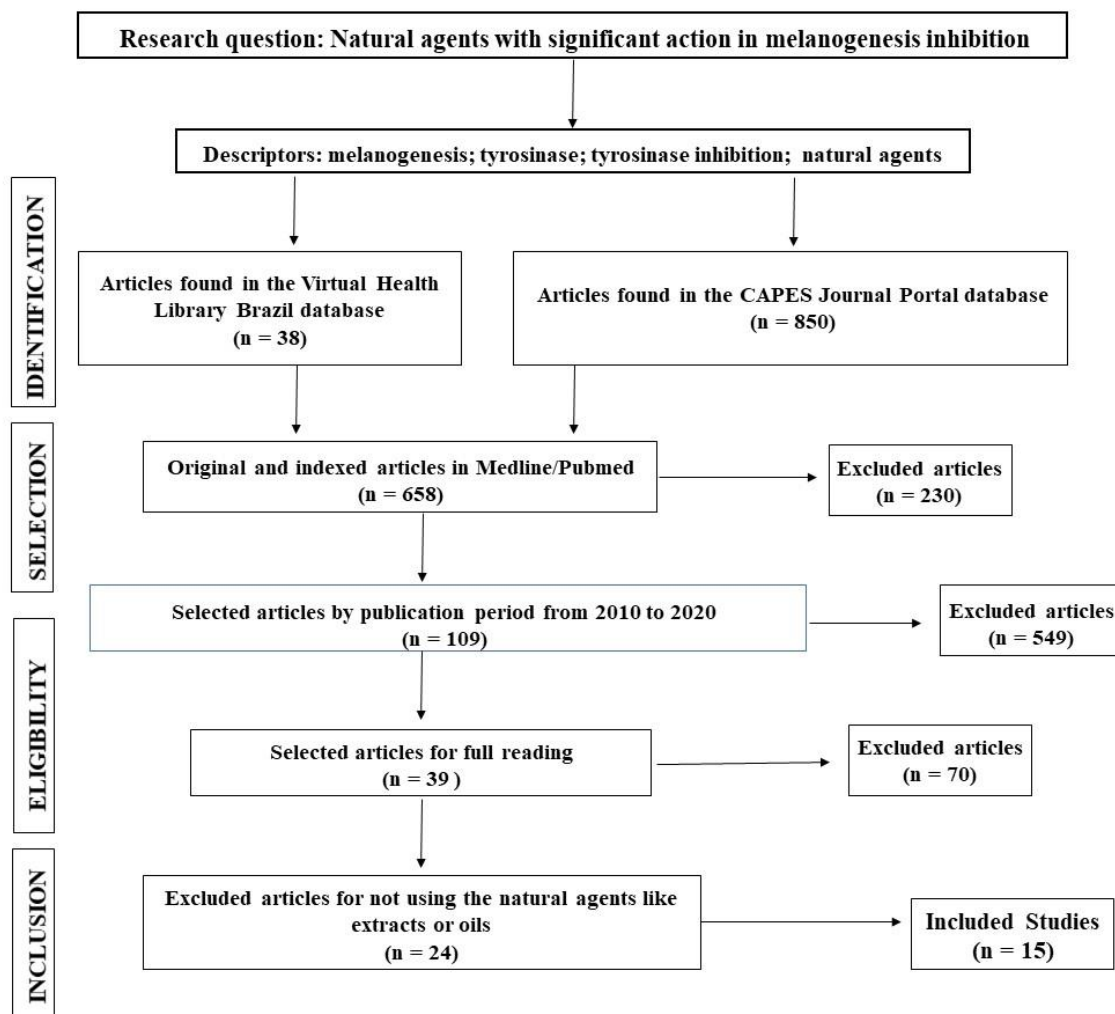
- Original works.
- Works indexed in Medline and PubMed databases.
- Works published between 2010 and 2020.
- Works that evaluated natural agents in the form of extracts or oils.

The exclusion criteria adopted meant that not only were titles and/or abstracts that did not include any of the descriptors were excluded from the search, but studies that involved the evaluation of natural preparations not in extracts nor oils were also excluded.

### 3.4 *Results*

Of the 109 potentially eligible studies in the VHL and CAPES Journal Portal that were indexed in Medline and PubMed (descriptors: melanogenesis AND natural agents; tyrosinase inhibition AND natural agents; melanogenesis AND tyrosinase inhibition), 70 studies were excluded as they had titles and/or abstracts that did not include the descriptors used to search for the relevant studies. In addition, 24 studies were excluded because they evaluated natural agents in preparations that were not extracts or oils. Thus, only 15 studies met all the inclusion criteria for this systematic literature review (Figure 8).

**Figura 8** - Selection of studies included in the systematic review using Prisma flowchart



The information collected from all studies included and evaluated in this review is presented in Table 1.

**Table 1** - Summary of the studies included in this review emphasizing the methodology, results, and conclusions (continues)

Author and year	Natural agent	Methodology	Results	Conclusions
Seo <i>et al.</i> [3]	<i>Leathesia difformis</i>	Natural agent preparation: 80% ethanol extract. Study design: Experimental (in vitro). Evaluated parameters: Melanin content and cellular tyrosinase activity in $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)-stimulated B16F10 murine melanoma cells.	The <i>Leathesia difformis</i> extract significantly decreased melanin content and the expression of melanocortin-1 receptor (MC1-R), cAMP response element binding protein (CREB) pathways, microphthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase, tyrosinase-related protein-1 (TRP-1), and dopachrome tautomerase (DCT) enzyme in $\alpha$ -MSH-stimulated B16F10 cells.	The <i>L. difformis</i> extract is an effective inhibitor of tyrosinase activity via inhibition of the CREB pathways and may be considered a potential therapeutic agent for hyperpigmentation disorders.
Kang <i>et al.</i> [10]	<i>Euphorbia supina</i>	Natural agent preparation: 70% ethanol extract. Study design: Experimental (in vitro). Evaluated parameters: Melanin content and cellular tyrosinase activity in B16F10 murine melanoma cells.	The <i>Euphorbia supina</i> extract significantly decreased the $\alpha$ -MSH levels and the expression of MITF. In addition, it reduced tyrosinase activity and melanin content in a dose-dependent manner.	The <i>E. supina</i> extract attenuated $\alpha$ -MSH-stimulated melanin synthesis by modulating the expression of tyrosinase and MITF. Therefore, the ES extract could be a promising therapeutic agent for the treatment of hyperpigmentation disorders.
Li <i>et al.</i> [9]	<i>Morus alba</i>	Natural agent preparation: 70% ethanol extract. Study design: Experimental (in vitro). Evaluated parameters: Anti-melanogenic constituents from <i>Morus alba</i> leaves and anti-melanogenic effects of the isolated compounds in B16F10 murine melanoma cells.	Twelve compounds were isolated from <i>M. alba</i> leaf extract (moracin J was the most significant). Moracin J significantly decreased the expression levels of CREB pathways, MITF, tyrosinase, and TRP-1 enzymes in $\alpha$ -MSH-induced B16F10 cells in a dose-dependent manner.	Moracin J decreased melanin production and intracellular tyrosinase activity by modulating the CREB pathways in $\alpha$ -MSH-activated B16F10 cells. <i>M. alba</i> leaves could be an excellent natural source of skin-whitening agents.
Setyawati <i>et al.</i> [11]	<i>Syzygium polyanthum</i>	Natural agent preparation: Methanol extract (unreported concentration). Study design: Experimental (in vitro). Evaluated parameters: Melanin content and tyrosinase activity in B16F10 murine melanoma cells.	The <i>Syzygium polyanthum</i> extract significantly decreased the formation of extracellular melanin in B16F10 cells (>80%) with high cell viability.	Additional investigation is required to elucidate the mechanism of action of <i>S. polyanthum</i> compounds. This is the first study to report the potential melanogenic inhibitory activity of this methanol extract.

**Table 1** – Summary of the studies included in this review emphasizing the methodology, results, and conclusions (continued)

Author and year	Natural agent	Methodology	Results	Conclusions
Im <i>et al.</i> [12]	<i>Orostachys japonicus</i>	Natural agent preparation: 70% ethanol extract. Study design: Experimental (in vitro). Evaluated parameters: Melanin content and tyrosinase activity in B16F10 murine melanoma cells.	The <i>Orostachys japonicus</i> extract strongly inhibited melanin synthesis in B16F10 cells by decreasing MITF protein levels and activating the extracellular signal-regulated kinase (Erk) and serine-threonine kinase (Akt) signaling pathways.	Although further studies are required to elucidate the detailed relationship between several components from <i>O. japonicus</i> and the specific signaling pathways in melanogenesis, this study provides valuable information that could aid in the development of new cosmetic and pharmaceutical substances based on the <i>O. japonicus</i> extract.
Pedrosa <i>et al.</i> [13]	<i>Libidibia ferrea</i> (jucá)	Natural agent preparation: Ethanol: water extract (1:1) (unreported concentration). Study design: Experimental (in vitro). Evaluated parameters: Melanin content and tyrosinase activity in B16F10 murine melanoma cells.	The <i>Libidibia ferrea</i> extract decreased the melanin content in B16F10 cells due to the inhibitory activity of tyrosinase.	The <i>L. ferrea</i> extract has shown great capacity for inhibitory action on melanogenesis, mainly due to presence of active agents, such as kaempferol, ellagic acid, catechin, and epicatechin content. Hence, it can be used as a promising agent in skin-whitening cosmetic ingredients.
Alam <i>et al.</i> [8]	<i>Heracleum moellendorffii</i>	Natural agent preparation: 100% ethanol and water extracts. Study design: Experimental (in vitro). Evaluated parameters: Anti-melanogenic effects and the underlying mechanisms of inhibition in melan-a cells.	The <i>Heracleum moellendorffii</i> extract markedly inhibited melanin production and intracellular tyrosinase activity. By suppressing the expression of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF, the extract antagonized melanin production in melan-a cells.	The <i>H. moellendorffii</i> extract can stimulate Erk1/2 phosphorylation and subsequent degradation of MITF, resulting in the suppression of melanogenic enzymes and inhibition of melanin production, possibly due to the presence of polyphenolic compounds.

**Table 1** – Summary of the studies included in this review emphasizing the methodology, results, and conclusions (continued)

Author and year	Natural agent	Methodology	Results	Conclusions
Kim <i>et al.</i> [21]	<i>Gaillardia aristata</i>	Natural agent preparation: 70% ethanol extract. Study design: Experimental (in vitro) and human skin primary irritation test – 48 h (in vivo). Evaluated parameters: Melanin content, cellular tyrosinase activity, and anti-melanogenic activity in B16F10 murine melanoma cells.	The <i>Gaillardia aristata</i> extract significantly decreased the expression levels of MITF, tyrosinase, TRP-1, and DCT enzymes. The extract also reduced the amount of melanin in B16F10 cells and normal human epidermal melanocyte cells and suppressed the intracellular tyrosinase activity in a dose-dependent manner. In the human skin model, the extract increased the degree of skin lightening within two weeks of treatment.	The results indicate the potential of the <i>G. aristata</i> extract for suppressing skin pigmentation. The authors proposed the <i>G. aristata</i> extract as a new candidate anti-melanogenic agent that could be used as a cosmetic skin care product.
Huang <i>et al.</i> [15]	<i>Coix lacryma-jobi (Adlay)</i>	Natural agent preparation: 10% co-solvent of ethanol in supercritical CO <sub>2</sub> fluid. Study design: Experimental (in vitro). Evaluated parameters: Intracellular tyrosinase activity and the expression of melanogenesis-related proteins in B16F10 murine melanoma cells.	The adlay extract reduced the expression levels of MITF, tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 enzymes, decreasing the amount of melanin in B16F10 cells in a dose-dependent manner.	The adlay extract can be applied as a melanogenic inhibitor in cosmetic skin care products.
Choo <i>et al.</i> [16]	<i>Inula britannica</i>	Natural agent preparation: Methanol extract (unreported concentration). Study design: Experimental (in vitro). Evaluated parameters: Cellular melanin content and intracellular tyrosinase activity in B16F10 murine melanoma cells.	The <i>Inula britannica</i> extract decreased the expression levels of cAMP, tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 in B16F10 cells. These findings were related to sesquiterpene isolated from the extract (1-O-acetylbritannilactone).	<i>I. britannica</i> extract exhibited anti-melanogenic activity by suppressing tyrosinase expression via the Erk and Akt signaling pathways. The results suggest that the extract may act as a potent natural skin-lightening agent.
Chou <i>et al.</i> [18]	<i>Cinnamomum cassia</i>	Natural agent preparation: Essential oil (distillation from the stem bark) (unreported concentration). Study design: Experimental (in vitro). Evaluated parameters: Melanin content and cellular tyrosinase activity in murine $\alpha$ -MSH-stimulated B16F10 murine melanoma cells.	Cinnamaldehyde isolated from the <i>Cinnamomum cassia</i> essential oil reduced melanin content and tyrosinase activity in B16F10 cells.	The <i>C. cassia</i> essential oil (cinnamaldehyde) possesses potent anti-tyrosinase and anti-melanogenic activities and may be a good source of skin-whitening agents.



**Table 1** – Summary of the studies included in this review emphasizing the methodology, results, and conclusions (continued)

Author and year	Natural agent	Methodology	Results	Conclusions
Chang; Chao; Ding, [17]	<i>Caesalpinia sappan</i>	Natural agent preparation: 95% ethanol extract. Study design: Experimental (in vitro). Evaluated parameters: Melanin content and cellular tyrosinase activity in the B16F10 murine melanoma cells.	Homoisoflavanone sappanone A was isolated from the <i>Caesalpinia sappan</i> extract and proven to dose-dependently inhibit both melanogenesis and cellular tyrosinase activity by repressing the tyrosinase gene expression in the B16F10 cells.	The results not only demonstrate that sappanone A is the first homoisoflavanone to be discovered with melanogenic inhibitory activity, but also give a new impetus for the future search for other homoisoflavanone melanogenic inhibitors.
Huang <i>et al.</i> [20]	<i>Vitex negundo</i>	Natural agent preparation: Essential oil (hydrodistillation of the fresh leaves) (unreported concentration). Study design: Experimental (in vitro). Evaluated parameters: Tyrosinase activity and intracellular melanin content in B16F10 murine melanoma cells.	The <i>Vitex negundo</i> essential oil effectively suppressed the murine B16F10 tyrosinase activity and decreased the amount of melanin in a dose-dependent manner.	The <i>V. negundo</i> essential oil decreased melanin production in B16F10 cells and can thereby serve as an inhibitor of melanin synthesis.
Huang <i>et al.</i> [19]	<i>Artemisia argyi</i>	Natural agent preparation: Essential oil (hydrodistillation in a clevenger-type apparatus) (unreported concentration). Study design: Experimental (in vitro). Evaluated parameters: Tyrosinase activity and intracellular melanin content in B16F10 murine melanoma cells.	The <i>Artemisia argyi</i> essential oil significantly inhibited tyrosinase activity, downregulated B16F10 intracellular tyrosinase activity, and decreased the amount of melanin content in a dose-dependent manner.	The <i>A. argyi</i> essential oil can be applied as an inhibitor of melanogenesis in cosmetic skin care products.
Souza <i>et al.</i> [14]	<i>Pouteria torta</i> (a) <i>Eugenia dysenterica</i> (b)	Natural agent preparation: (a) Aqueous extract; (b) Ethanol extract (unreported concentrations). Study design: Experimental (in vitro). Evaluated parameters: Tyrosinase activity was evaluated by spectrophotometry.	The <i>Pouteria torta</i> and <i>Eugenia dysenterica</i> extracts presented potent in vitro tyrosinase inhibition compared to the positive control, kojic acid.	The <i>P. torta</i> and <i>E. dysenterica</i> extracts and their isolated constituents are promising agents for skin-whitening or anti-melanogenic formulations.

### 3.5 Discussion

The colouring of human skin is the result of the interaction of pigments, such as carotenoids, haemoglobin, and melanin, with melanin being the main contributor to pigmentation [2]. Melanin is synthesized in epidermal melanocytes through enzymatic reactions in a process regulated by growth factors, hormones, cytokines, enzymes, and UV radiation, called melanogenesis [3]. When this synthesis occurs excessively, skin hyperpigmentation occurs. This is usually characterized by the appearance of dark spots on the skin that, according to studies, mainly affects people's facial aesthetics and self-esteem and is positively related to depressive symptoms [4], especially when there is a chronic clinical presentation, such as melasma. Melasma is common and acquired hyperpigmentation, characterized by brownish to blackish spots with irregular contours but well-defined limits in photoexposed areas, especially on the face, forehead, temples, cheeks, and more rarely, on the nose, eyelids, chin, and upper limbs [6]. The condition has a characteristic chronicity, with frequent recurrences, great refractoriness to existing treatments, and unknown pathophysiological aspects. It is more common in adult women of childbearing age, but it can start its clinical manifestation in the post-menopausal period. The age of onset is usually between 30 and 55 years, with the male sex representing only 10% of the total cases [6].

Although there are scientifically elucidated conventional treatments, combating and controlling melasma are arduous tasks that are associated with a high degree of clinical failure. Thus, inhibiting the activity of the main regulators and stimulators of melanogenesis has been the main strategy of the cosmetic industry when producing cosmetic formulations that are effective against this type of pigmentary disorder. Some of the disadvantages related to established synthetic therapeutic agents include their physical-chemical instability, insolubility, cellular and/or systemic toxicity, photosensitization, low bioavailability [5]. If these are replaced by melanogenic inhibitors from natural sources, it would enable the development of more effective skin-lightening formulations that potentially do not cause any major side effects.

In this way, there has been a significant increase in the study and exploration of plants with therapeutic potential [7]. Many years ago, eastern countries such as China, Korea, and Japan, for example, adopted the light and homogeneous colouring of the face as a beauty standard, investing many resources in the cosmetic industry of natural skin lighteners [8]. An asset capable of rendering inefficient or complete blocking of the process of melanogenesis is considered to be whitening, mainly by inhibiting the action of one or more of its regulators (MC1-R, cAMP, CREB, MITF, TYR, TRP-1, TRP-2, DCT, among others).

Of the 15 articles included in this systematic review, all showed significant effects of natural agents on the inhibition of melanogenesis, with actions similar or superior to those already established in the scientific literature. The extract of *Leathesia difformis* (brown kelp with known antiviral and antioxidant properties) showed superiority in relation to the positive arbutin standard (glycosylated hydroquinone with high inhibitory activity of TYR) by significantly decreasing melanin synthesis (extract: 15 µg/ml, reduction of 135.6% of the content of melanin vs. Arbutin reduction of 96.2%), and the cellular activity of TYR (extract: 15 µg/ml – reduction of cell activity of 113.2% vs. arbutin – 80.3% reduction) in murine melanoma cells (B16F10) stimulated by α-MSH in a dose-dependent manner [3].

Similarly, the extract of *Morus alba* (white mulberry, native to Asia, Africa, and North America) also showed superiority to arbutin by significantly reducing melanin production, the activity of TYR intracellular function, and MITF, TYR, TRP-1, and TRP-2 expression. The significant inhibitory action of the natural extract of *M. alba* was related to the presence of the isolated compound, moracin J, which could inhibit the CREB and p38 signalling pathways, blocking the process of melanogenesis in the test cells [9].

The extract of *Euphorbia supina* (weeds of African origin) significantly decreases the amount of melanin and the TYR cell activity in B16F10 cells stimulated by α-MSH, in a dose-dependent manner, with an action similar to arbutin (amount of melanin: extract: 200 µg/ml, reduction of 76.95 ± 0.39% vs.

arbutin – reduction of  $84.82 \pm 1.28\%$ ). The inhibitory action of the natural extract was explained by its ability to attenuate the action of  $\alpha$ -MSH and reduce TYR and MITF expression [10].

The anti-melanogenic effects of the methanolic extract of the leaves of *Syzygium polyanthum* (plant native to Indochina and Malaysia) were evaluated. The maximum concentration of the extract (200  $\mu\text{g/ml}$ ) displayed the ability to decrease the extracellular synthesis of melanina by  $>80\%$ , like arbutin. The main compound isolated from the extract ((E) – 1 – (2,3,5-trihydroxy-4-methylphen yl) dec-4-en-1-one) demonstrated superiority of action in relation to another positive pattern, kojic acid by inhibiting TYR activity (extract: 200  $\mu\text{g/ml}$ , 83.98% inhibition vs. kojic acid, 64.58% inhibition). The compound isolated from the natural extract suppressed the expression of TYR and MITF in a dose-dependent manner [11].

The extract of *Orostachys japonicus* (a plant native to East Asia) strongly inhibits melanin synthesis and TYR cell activity in B16F10 cells in a dose-dependent manner. The inhibitory effect of the natural extract is due to the presence of isoquercitrin flavonoids in its composition. The extract (500  $\mu\text{g/ml}$ ) showed similar activity to kojic acid by inhibiting TYR activity by 70% and significantly reduced the level of p-CREB and the expression of MITF, TYR, TRP-1, and TRP-2 [12].

The effects of extracts from the trunk bark and pod of *Libidibia ferrea* (Jucá – tree native to South America, Brazil, and Bolivia) on melanin synthesis and TYR cell activity in stimulated B16F10 cells by IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) were evaluated. The extracts showed similar action to the positive gallic acid standard (extracts: 25  $\mu\text{g/ml}$ , reduction of  $41.25\% \pm 2.80\%$  of the melanin content vs. gallic acid: 5  $\mu\text{g/ml}$ , reduction of  $43.5 \pm 2.39\%$ ). Regarding TYR cell activity, the extract inhibition capacity was higher than gallic acid (extracts: 25  $\mu\text{g/ml}$  –  $98.0 \pm 4.94\%$  inhibition vs. gallic acid: 5  $\mu\text{g/ml}$  -  $89.5 \pm 1.39\%$  inhibition). The inhibitory and antioxidant capacities of *L. ferrea* are directly related to the presence of flavonoids (kaempferol, catechin, and epicatechin) and phenolic acids (ellagic acid) in their composition [13].

Further emphasizing the relationship between flavonoids, phenolic acids, antioxidant potential, and inhibition of melanogenesis, Alam et al. [8] demonstrated that the aqueous extract of *Heracleum moellendorffii* (edible wild herb found in Korea, China, and Japan), which is rich in flavonoids (myricetin and quercetin) and phenolic acids (ferulic acid and caffeic acid), significantly reduced melanin synthesis, TYR activity, and MITF, TYR, TRP-1, and TRP-2 expression in a dose-dependent manner (100 µg/ml) in Melan-A cells. The extract showed an anti-tyrosinase action similar to arbutin (extract: 100 µg/ml, reduction of 73.96% ± 2.06% vs. arbutin: reduction of 83.79 ± 2.01%).

In this context, Souza et al. [14] investigated plants in the Brazilian cerrado with potential for inhibiting TYR, demonstrated the significant effects of the aqueous extract of *Pouteria torta* (found in Brazil from the Amazon to Paraná) and the ethanolic extract of *Eugenia dysenterica* (small fruit of the Brazilian cerrado – Bahia, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Tocantins, and São Paulo) on mushroom TYR. Flavonoids (catechins, myricitrin) and polyphenols (derived from gallic acid) were isolated from the extracts, which were responsible for the superior activity of the extracts compared to kojic acid, by inhibiting TYR activity in the range of 79.0%–100%.

*Coix lacryma-jobi-adlay* extract (native plant in Southeast Asia), which showed a higher antioxidant potential than vitamins C and E on B16F10 cells, in a dose-dependent manner (250 µg/ml), could also significantly inhibit melanin synthesis and TYR activity in the same cells. The extract demonstrated superiority of action over arbutin by decreasing the synthesis of melanin and over kojic acid by inhibiting TYR activity by 61.15% (kojic acid inhibited the activity by 50.0%) and by reducing the expression of MITF, TYR, TRP-1, and TRP-2. The authors suggested a linear relationship between antioxidant capacity and the anti-melanogenic effects of the extract [15]. Sesquiterpene compounds, antioxidant triterpenes, and flavonoids were isolated from the extract of *Inula britannica* (a common plant in Great Britain, central and southern Europe, and the Middle East), demonstrating the ability to significantly decrease melanin synthesis (87.3%) in B16F10 cells in a dose-dependent manner. The inhibitory activity of *I. britannica* in this study had no direct relationship with the inhibition of the TYR

enzyme, but with its ability to prevent phosphorylation of CREB, reducing the expression of MITF, TRP-1, and TRP-2 [16].

Sappanone A, an isoflavone with a structure similar to that of isoflavonoids, was isolated from the ethanolic extract (95%) of *Caesalpinia sappan* (flowering tree native to tropical Asia). Sappanone A has antioxidant properties and in B16F10 cells, inhibits melanin synthesis, TYR cell activity, and TYR expression. The authors positively related the antioxidant and anti-melanogenic activities of this natural extract [17].

Cinnamaldehyde was isolated from the essential oil of *Cinnamomum cassia* (a small tree native to southeastern China). When used in  $\alpha$ -MSH-stimulated B16F10 cells, this oil significantly reduced melanin synthesis, TYR cell activity, and TYR expression. The authors related the anti-melanogenic effects of the essential oil to the strong antioxidant activity of cinnamaldehyde, which decreased the activities of substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS), glutathione, and catalase [18].

The anti-melanogenic and antioxidant effects of the essential oil of *Artemisia argyi* (a perennial herbaceous plant native to China, Korea, Mongolia, and Japan) on B16F10 cells were searched. The oil demonstrated a strong superiority of arbutin at inhibiting melanin synthesis and intracellular TYR activity (oil: 2 mg/ml – 75.0% inhibition vs. arbutin: 0.545 mg/ml – 30.0% inhibition). The oil also demonstrated high antioxidant potential, and the authors suggested that its mechanism of inhibition of melanogenesis is related to the reduction of TYR activity and oxidative stress [19].

Similar results were detected when the anti-melanogenic and antioxidant effects of the essential oil of *Vitex negundo* (aromatic shrub native to South and Southeast Asia) in B16F10 cells were studied. The oil was significantly superior to arbutin at inhibiting melanin synthesis and TYR cell activity (oil: 1.0 mg/ml – 52.0% inhibition vs. arbutin: 0.545 mg/ml – 20.0% inhibition), in a dose-dependent manner. The oil also triggered strong antioxidant activity on the test

cells, and the authors positively related the antioxidant and anti-melanogenic effects [20].

Finally, to approximate the assessment of the anti-melanogenic effects of natural agents on human skin, Kim et al. [21] developed a study using the extract of *Gaillardia aristata* (plant commonly found in Portugal) in an experimental model of human epidermal melanocytes (HEMa-DP cells). HEMa-DP cells were treated with concentrations of 5–20 µg/ml of the extract, which demonstrated a significant capacity to inhibit melanin synthesis and similarity of action to kojic acid by 75%, inhibiting the TYR cell activity (kojic acid presented 80.0% of inhibition), in a dose-dependent manner. In HEMa-DP cells, the extract significantly decreased the expression of MITF, TYR, TRP-1, and DCT in a dose-dependent manner. The authors suggested that 200 µg/ml of the natural extract of *G. aristata* has the same efficacy as 2% kojic acid, which is already established in the literature as a skin-whitening cosmetic agent.

Based on the results, it was possible to observe the strong melanogenic inhibitory potential of all natural agents searched. It was observed the close association between the phenolic composition, antioxidant activities, and anti-melanogenic effects of these compounds. A dose-dependent relationship was observed between the natural agents and their ability to inhibit melanogenesis (higher concentrations higher inhibitory effects).

### 3.6 Conclusions

The natural agents evaluated in this review significantly inhibited melanin synthesis, TYR cell activity, and the expression of the main proteins related to melanogenesis in a dose-dependent manner, thereby showing similar or superior effects to the positive standard agents, which further supports their use in new dermocosmetic formulations for skin-whitening. The plants *L. difformis*, *M. alba*, *O. japonicus*, *H. moellendorffii*, *C. lacryma-jobi (adlay)*, *I. brittanica*, and *G. aristata* stood out from the others due to their application as potential inhibitors of more than three proteins related to melanogenesis, including CREB, MITF, TYR, TRP-1, TRP-2, and DCT. The phenolic composition and antioxidant activity of natural agents favoured their anti-melanogenic effects, which suggests that the

inhibition of melanogenesis can be achieved by substances that contain phenolic compounds. Further *in vivo* studies should be conducted with these natural agents to assess their safety profiles and effectiveness as skin-lightening agents for human use.

### 3.7 References

1. Kim YJ, Kim MJ, Kweon DK, Lim ST, Lee SJ. Quantification of hypopigmentation activity *in vitro*. *J vis Exp*. 2019;145:e58185.
2. Tassinari JA, Goelzer Neto CF. Peelings químicos magistrais e abordagens terapêuticas. Lajeado: *Editores Experts*; 2018.
3. Seo GY, Ha Y, Park AH, Kwon OW, Kim YJ. *Leathesia difformis* extract inhibits  $\alpha$ -MSH-induced melanogenesis in B16F10 cells via down-regulation of CREB signaling pathway. *Int J Mol Sci*. 2019; 20:536.
4. Deshpande SS, Khatu SS, Pardeshi GS, Gokhale NR. Cross-sectional study of psychiatric morbidity in patients with melasma. *Indian J Psychiatry*. 2018;60(3):324–8.
5. Pillaiyar T, Manickam M, Namasivayam V. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2017;32(1):403–25.
6. Miot LDB, Miot HA, Silva MG, Marques MEA. Fisiopatologia do melasma. *An Bras Dermatol*. Rio De Janeiro. 2009;623–35.
7. Calazans RP, Bulian AS, Alves LA, Costa KA, Salvi JO. Estudo fitoquímico e avaliação da citotoxicidade aguda frente à *Artemia salina* (Leach) de plantas comercializadas em feira livre. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*. 2019;17(1):1.
8. Alam MB, Seo BJ, Zhao P, Lee SH. Anti-melanogenic activities of *Heracleum moellendorffii* via ERK1/2-mediated MITF down-regulation. *Int J Mol Sci*. 2016; 17:1844.
9. Li HX, Park JU, Su XD, Kim KT, Kang JS, Kim YR, et al. Identification of anti-melanogenesis constituents from *Morus alba* L. leaves. *Molecules*. 2018; 23:2559.
10. Kang S, Jeon Y, Cha J, Hwang S-W, Lee H-Y, Park M, et al. Antioxidant and skin-whitening effects of aerial part of *Euphorbia supina* Raf. extract. *BMC Complement Altern Med*. 2018; 18:256.



11. Setyawati A, Hirabayashi K, Yamauchi K, Hattori H, Mitsunaga T, Batubara I, et al. Melanogenesis inhibitory activity of components from Salam leaf (*Syzygium polyanthum*) extract. *J Nat Med*. 2018; 72:474–80.
12. Sig ID, Lee J-M, Lee J, Shin HJ, No KT, Park S-H, et al. Inhibition of collagenase and melanogenesis by ethanol extracts of *Orostachys japonicus* A. In: Berger: possible involvement of Erk and Akt signaling pathways in melanoma cells. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2017;49(10):945–53.
13. Pedrosa T, Barros AO, Nogueira JR, Fruet AC, Rodrigues IC, Calcagno DQ, et al. Anti-wrinkle and anti-whitening effects of jucá (*Libidibia ferrea* Mart.) extracts. *Arch Dermatol Res*. 2016; 308:643–54.
14. Souza PM, Elias ST, Simeoni LA, de Paula JE, Gomes SM, Guerra ENS, et al. Plants from Brazilian Cerrado with potent tyrosinase inhibitory activity. *PLoS One*. 2012;7(11):e48589.
15. Huang HC, Hsieh WY, Niu YL, Chang TM. Inhibitory effects of adlay extract on melanin production and cellular oxygen stress in B16F10 melanoma cells. *Int J Mol Sci*. 2014; 15:16665–79.
16. Choo S, Ryoo I, Kim KC, Na M, Jang J, Yoo JSAE. Hypopigmenting effect of sesquiterpenes from *Inula britannica* in B16 melanoma cells. *Arch Pharm Res*. 2014; 37:567–74.
17. Chang TS, Chao SY, Ding HY. Melanogenesis inhibition by homoisoflavavone sappanone A from *Caesalpinia sappan*. *Int J Mol Sci*. 2012; 13:10359–67.
18. Chou ST, Chang WL, Chang CT, Hsu SL, Lin YC, Shih Y. *Cinnamomum cassia* essential oil inhibits  $\alpha$ -MSH-induced melanin production and oxidative stress in murine B16 melanoma cells. *Int J Mol Sci*. 2013; 14:19186–201.
19. Huang HC, Wang HF, Yih KH, Chang LZ, Chang TM. Dual bioactivities of essential oil extracted from the leaves of *Artemisia argyi* as an antimelanogenic versus antioxidant agent and chemical composition analysis by GC/MS. *Int J Mol Sci*. 2012; 13:14679–97.
20. Huang HC, Chang TY, Chang LZ, Wang H-F, Yih K-H, Hsieh W- Y, et al. Inhibition of melanogenesis versus antioxidant properties of essential oil extracted from leaves of *Vitex negundo* Linn and chemical composition analysis by GC-MS. *Molecules*. 2012; 17:3902–16.

21. Kim M, Shin S, Lee J, Deokhoon P, Lee J, Jung E. Inhibition of melanogenesis by *Gaillardia aristata* flower extract. *BMC Complement Altern Med.* 2015; 15:449.

#### **4 PRODUÇÃO CIENTÍFICA II**

Capítulo omitido por questões de originalidade de produção científica.

## **5 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA III**

Capítulo omitido por questões de originalidade de produção científica.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de envelhecimento humano envolve alterações cutâneas importantes como atrofia, lassidão, enrugamento e ocorrência de lesões hiperpigmentares na pele. Essas últimas, em especial o melasma, uma hiperpigmentação crônica e refratária, afetam diretamente a estética e a qualidade de vida dos seus portadores. Na busca incessante por alternativas de clareamento da pele mais eficazes e seguras, os extratos vegetais vêm ganhando destaque.

Os resultados desta tese demonstraram que o extrato da casca da jabuticaba liofilizado, um subproduto da agroindústria, apresenta altos teores de polifenóis, antocianinas, flavonoides, AE, atividade antioxidante e anti tirosinase, o que justifica o uso desse extrato como uma opção sustentável para a obtenção de formulações cosméticas para promover o clareamento da pele. Isso vem de encontro com os objetivos do desenvolvimento sustentável de assegurar padrões de produção e consumo sustentáveis, reforçando a importância da sustentabilidade ambiental e a conservação da biodiversidade, sem abrir mão do progresso da indústria cosmética nacional.

As formulações cosméticas desenvolvidas com este extrato também apresentaram algum potencial antimelanogênico, no entanto, inferiores ao extrato isolado, o que reforça ainda mais a sua superioridade. O fato de não termos adicionado a essas formulações mais algum antioxidante, como as vitaminas C ou E, fazendo com que a ação antioxidante do extrato permanecesse mais pronunciada, pode ser caracterizado como uma importante limitação do estudo.

Assim, nossos resultados corroboram o potencial antimelanogênico do extrato da jabuticaba como uma alternativa realmente eficaz e sustentável para tratar lesões hiperpigmentares e, o estudo contribuiu para avanços em formulações cosméticas, explorando o potencial terapêutico de recursos naturais. Como perspectivas futuras, ressalta-se a necessidade da otimização das formulações para promover características melhores de desempenho, da avaliação da estabilidade das formulações e, da realização de análises de

permeação e eficácia *in vivo* do extrato da casca da jabuticaba e das formulações desenvolvidas a partir deste, para que possamos transcender esses resultados para utilização *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- ABE, L. T. *Ácido elágico em alimentos regionais brasileiros*. 2007. 106 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-06102017-180612/pt-br.php>. Acesso em: 28 set. 2021.
- ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). *Journal of The Science of Food and Agriculture*, London, v. 92, n. 8, p. 1679-1687, June 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.5531>.
- ALAM, M. B. *et al.* Anti-Melanogenic Activities of *Heracleum moellendorffii* via ERK1/2-Mediated MITF Downregulation. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 17, n. 11, p. 1844, nov. 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms17111844>.
- AYRES, E. L. *et al.* Monocentric prospective study for assessing the efficacy and tolerability of a cosmeceutical formulation in patients with melasma. *Surgical & Cosmetic Dermatology*, Rio de Janeiro, v. 8, n. 3, p. 232-240, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5935/scd1984-8773.201683832>.
- AZEVEDO, E. Mercado de estética cresce nos últimos anos, a despeito da crise. *Administradores.com*, [São Paulo], 19 jan. 2017. Disponível em: <https://administradores.com.br/artigos/mercado-de-estetica-cresce-nos-ultimos-anos-a-despeito-da-crise>. Acesso em: 29 set. 2021.
- BAGATINI, E. Envelhecimento cutâneo. *Boletim Dermatológico UNIFESP*, Ano V, n. 17, jan/fev., 2008.
- BANDYOPADHYAY, D. Topical treatment of melasma. *Indian Journal of Dermatology*, Calcutta, v. 54, n. 4, p. 303-309, Oct. 2009. DOI: <https://doi.org/10.4103/0019-5154.57602>.
- BARIL, M. B. *et al.* Nanotecnologia aplicada aos cosméticos. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 13, n. 1, p. 45-54, jan. / mar. 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/acd.v13i1.30018>.
- BERLITZ, S. J. *et al.* Azelaic acid-loaded nanoemulsion with hyaluronic acid: a new strategy to treat hyperpigmentary skin disorders. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, New York, v. 45, n. 4, p. 642-650, Apr. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/03639045.2019.1569032>.
- BOO Y. C. Human skin lightening efficacy of Resveratrol and its analogs: From in vitro studies to cosmetic applications. *Antioxidants (Basel)* 8: 332, 2019.

- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, Zürich, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- BURIOL, L. *et al.* Chemical composition and biological activity of oil propolis extract: an alternative to ethanolic extract. *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 296-302, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000200006>.
- BUSHMAN, B. S. *et al.* Chemical composition of Caneberry (*Rubus spp.*) seeds and oil and their antioxidant potential. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, DC, v. 52, n. 26, p. 7982-7987, Dec. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf049149a>.
- CAI, Y. *et al.* Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, Oxford, v. 74, n. 17, p. 2157-2184, Mar. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.047>.
- CALAZANS, R. P. *et al.* Estudo fitoquímico e avaliação da citotoxicidade aguda frente à *Artemia salina* (Leach) de plantas comercializadas em feira livre. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, Betim, v. 17, n. 1, p. 1-10, jan. / jul. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.5892/ruvrd.v17i1.5035>.
- CLIFFORD, M. N.; SCALBERT, A. Ellagitannins: nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Chichester, v. 80, n. 7, p. 1118-1125, May 2000. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1118:AID-JSFA570>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1118:AID-JSFA570>3.0.CO;2-9).
- CRUZ-ANTONIO, F. V. *et al.* Propriedades químicas e industriais del ácido eláxico. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, Saltillo, v. 2, n. 3, p. 67-79, 2010.
- DAHL, A. *et al.* Tolerance and efficacy of a product containing ellagic and salicylic acid in reducing hyperpigmentation and dark spots in comparison with 4% hydroquinone. *Journal of Drugs in Dermatology*, New York, v. 12, n. 1, p. 52-58, jan. 2013.
- DESHPANDE, S. S. *et al.* Cross-sectional study of psychiatric morbidity in patients with melasma. *Indian Journal of Psychiatry*, Mumbai, v. 60, n. 3, p. 324-328, July/Sept. 2018. DOI: [https://doi.org/10.4103/psychiatry.IndianJPsychiatry\\_115\\_16](https://doi.org/10.4103/psychiatry.IndianJPsychiatry_115_16).
- DRAELOS, Z. *et al.* Dyspigmentation, skin physiology, and a novel approach to skin lightening. *Journal of Cosmetic Dermatology*, Oxford, v. 12, n. 4, p. 247-253, Dec. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/jocd.12066>.
- EFRAIM, P. *et al.* Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. *Food Science and*



*Technology*, Campinas, v. 30, supl. 1, p. 142-150, maio 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000500022>.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). *ICH Topic Q 2 (R1): validation of analytical procedures: text and methodology*. Geneva: EMA, 1995. Disponível em: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf). Acesso em: 28 set. 2021.

FALCÃO, A. P. *et al.* Índice de polifenóis, antocianinas totais e atividade antioxidante de um sistema modelo de geléia de uvas. *Food Science and Technology*, Campinas, v. 27, n. 3, p. 637-642, set. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000300032>.

FARIA, A. *et al.* Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, DC, v. 54, n. 6, p. 2392-2397, Mar. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0526487>.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v. 11, n. 2, p. 103-112, abr./jun. 2008.

GALANO, A. *et al.* Food antioxidants: Chemical insights at the molecular level. *Annual Review of Food Science and Technology*, Palo Alto, v. 7, p. 335-352, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033206>.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Hoboken, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>.

GOELZER NETO, C. F. *et al.* Natural sources of melanogenic inhibitors: A systematic review. *Int J Cosmet Sci*, [s. l.], v. 44, p. 143-153, 2022.

GUPTA, A. K. *et al.* The treatment of melasma: a review of clinical trials. *Journal of the American Academy of Dermatology*, St. Louis, v. 55, n. 6, p. 1048-1065, Dec. 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2006.02.009>.

GUPTA, R. *et al.* Review on Antityrosinase Activity of Some Indian Medicinal Plants and their Phytoconstituents. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, Greater Noida, v. 10, n. 5-s, p. 199- 204, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.22270/jddt.v10i5-s.4330>.

HUANG, H. C. *et al.* Inhibitory Effects of Adlay Extract on Melanin Production and Cellular Oxygen Stress in B16F10 Melanoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 15, n. 9, p. 16665-16679, Sept. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms150916665>.

JUNYAPRASERT, V. B. *et al.* Physicochemical properties and skin permeation os Span60/Tween60 niosomes of ellagic acid. *International Journal of*

*Pharmaceutics*, Amsterdam, v. 423, n. 2, p. 303-311, Feb. 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.11.032>.

KHATIB, S. *et al.* Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the importance of a 2, 4-substituted resorcinol moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Oxford, v. 13, n. 2, p. 433-441, jan. 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2004.10.010>.

KIM, D. O. *et al.* Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, DC, v. 50, n. 13, p. 3713-3717, June 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf020071c>.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, Chicago, v. 99, n. 2, p. 213-218, Feb. 1999. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-8223\(99\)00051-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-8223(99)00051-6).

KOTHAPALLI, L. *et al.* Understanding the Molecular Mechanism of Phytoconstituents as Tyrosinase Inhibitors for Treatment of Hyperpigmentation. *Saudi Journal of Medical And Pharmaceutical Sciences*, Dubai, v. 7, n. 2, p. 135-144, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.36348/sjimps.2021.v07i02.010>.

KUBO, I.; KINST-HORI, I. Flavonols from Saffron Flower: Tyrosinase Inhibitory Activity and Inhibition Mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, DC, v. 47, n. 10, p. 4121-4125, Oct. 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf990201q>.

LANDETE, J. M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, Ottawa, v. 44, n. 5, p. 1150-1160, June 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.027>.

LEE, S. H. *et al.* Mulberroside F Isolated from the Leaves of *Morus alba* Inhibits Melanin Biosynthesis. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, v. 25, n. 8, p. 1045-1048, Aug. 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.25.1045>.

LI, H. X. *et al.* Identification of Anti-Melanogenesis Constituents from *Morus alba* L. Leaves. *Molecules*, Basel, v. 23, n. 10, p. 2559, Oct. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23102559>.

LIMA, J. M. de., MILHOMEM, W. G., & BRANCO, N. C. Melasma: Proposta de Tratamento com Tretinoína e Medidas de Prevenção: Uma Revisão Bibliográfica. *E-Acadêmica*, 3(2), e3032172. 2022. <https://doi.org/10.52076/eacad-v3i2.172>

LIMBERGER, T. N. J. *Uma abordagem sobre a hidroquinona no tratamento de hiperpigmentação*. 2015. 27 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Educação e Meio Ambiente, Ariquemes, 2015.

Disponível em: [https://oasisbr.ibict.br/vufind/Record/FAEMA-1\\_6ea6dc51d7ce0957019a01ba3c0575b9](https://oasisbr.ibict.br/vufind/Record/FAEMA-1_6ea6dc51d7ce0957019a01ba3c0575b9). Acesso em: 9 abr. 2021.

LUO, L. *et al.* Hydroquinone-induced genotoxicity and oxidative DNA damage in HepG2 cells. *Chemico-Biological Interactions*, Amsterdam, v. 173, n. 1, p. 1-8, May 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2008.02.002>.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. *Química Nova*, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500051>.

MAJEED M, MAJEED S, JAIN R, MUNDKUR L, RAJALAKSHMI HR, LAD PS, NEUPANE P. An open-label single-arm, monocentric study assessing the efficacy and safety of natural Pterostilbene (*Pterocarpus marsupium*) for skin brightening and antiaging effects. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 13: 105-116, 2020.

MEDEIROS, Janielle Kelly Guimarães *et al.* Combinação terapêutica no tratamento do melasma. *CuidArte, Enferm*, v. 10, n. 2, p. 180-187, 2016.

MIOT, L. D. B. *et al.* Fisiopatologia do melasma. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Rio de Janeiro, v. 84, n. 6, p. 623-635, dez. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962009000600008>.

MIRANDA, A. R.; CASTRO, C. F. S.; SILVÉRIO, M. D. O. Avaliação da atividade antioxidante e inibição da tirosinase do extrato das folhas do jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Paulínia, v. 16, n. 3, supl. 1, p. 693-699, 2014. DOI: [http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/12\\_035](http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/12_035).

MO, J. *et al.* Topical anti-inflammatory and analgesic activities of standardized pomegranate rind extract in comparison with its marker compound ellagic acid in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 148, n. 3, p. 901-908, July 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.05.040>.

MOTA C.I.P. *Preparações semissólidas cutâneas obtidas a partir de microemulsões contendo hidroquinona*. 2018. 78 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, 2018. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/117445/2/302664.pdf>. Acessado em: 13 de maio de 2023.

MULLEN, W. *et al.* A. Ellagitannins, flavonoids and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, DC, v. 50, n. 18, p. 5191-5196, Aug. 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf020140n>.

OLIVEIRA, E. L. *Planejamento e otimização da síntese da polianilina dopada com ácido azelaico e sua aplicação em fotodegradação*. 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) – Universidade Estadual de

Goiás, Anápolis, 2016. Disponível em: <http://www.bdttd.ueg.br/handle/tede/285>. Acesso em: 28 set. 2021.

OLIVEIRA et al. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 1, 131-138, 2004.

PEDROSA, T. et al. Anti-wrinkle and anti-whitening effects of jucá (*Libidibia ferrea* Mart.) extracts. *Archives of Dermatological Research*, Berlin, v. 308, n. 9, p. 643-654, Nov. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00403-016-1685-0>.

PILLAIYAR, T.; MANICKAM, M.; NAMASIVAYAM, V. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, Basingstoke, v. 32, n. 1, p. 403-425, Dec. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/14756366.2016.1256882>.

PLAGEMANN, I. et al. Volatile constituents of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg) fruits. *Journal of Essential Oil Research*, Wheaton, v. 24, n. 1, p. 45-51, Feb. 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2012.645651>.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R. et al. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 98, n. 4, p. 991-1000, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02547.x>.

RENDON, M. et al. Treatment of melasma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, St. Louis, v. 54, n. 5, p. 272-281, May 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2005.12.039>.

REYNERTSON, K. A. et al. Bioactive Depsides and Anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *Journal of Natural Products*, Cincinnati, v. 69, n. 8, p. 1228-1230, Aug. 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/np0600999>.

REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry*, Barking, v. 109, n. 4, p. 883-890, Aug. 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.021>.

SARKAR, R. et al. Melasma update. *Indian Dermatology Online Journal*, Mumbai, v. 5, n. 4, p. 426-435, Oct. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/2229-5178.142484>.

SCHNEIDER, R. H.; IRIGARAY, T. Q. O envelhecimento na atualidade: aspectos cronológicos, biológicos, psicológicos e sociais. *Estudos de Psicologia*, v. 25, n. 4, p. 585-593, 2008.

SEO, G. Y. et al. *Leathesia difformis* Extract Inhibits  $\alpha$ -MSH-Induced Melanogenesis in B16F10 Cells via Down-Regulation of CREB Signaling Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 20, n. 3, p. 536, Feb. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20030536>.

SETOR da cirurgia estética cresce 8% no mundo. *Isto é*, São Paulo, 1 fev. 2018. Disponível em: <https://istoe.com.br/setor-da-cirurgia-estetica-cresce-8-no-mundo/>. Acesso em: 29 set. 2021.

SHETH, V. M. *et al.* Melasma: a comprehensive update. *Journal of the American Academy of Dermatology*, St. Louis, v. 65, n. 4, p. 699-714, Oct. 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2011.06.001>.

SOUSA, C. M. M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, abr. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>.

SOUZA, M. L. *et al.* Nanoemulsions and dermatological diseases: contributions and therapeutic advances. *International Journal of Dermatology*, Philadelphia, v. 57, n. 8, p. 894-900, Aug. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijd.14028>.

SRIPANIDKULCHAI, B.; CHAIITTIANAN, R.; SUTTANUT, K. Safety and efficacy assessment of skin gel containing nanoemulsion of *Phyllanthus emblica* extract: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, Hāt Yai, v. 42, n. 2, p. 305-313, Apr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.14456/sjst-psu.2020.40>.

SZUMATA, P.; MACIERZANKA, A. Topical delivery of pharmaceutical and cosmetic macromolecules using microemulsion systems. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 615, March 2022, 121488.

TASSINARY, J.; GOELZER NETO, C. F. *Peelings químicos magistrais e abordagens terapêuticas*. Lajeado: Editora Experts, 2018.

VICTOR, F.; GELBER, J.; RAO, B. Melasma: a review. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, Hamilton, v. 8, n. 2, p. 97-102, Mar./Apr. 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10227-004-0158-9>.

VOLP, A. C. P. *et al.* Flavonoides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 141-149, 2008.

WEBER, M. Brasil é o quarto maior mercado de beleza e cuidados pessoais do mundo. *Forbes*, São Paulo, 4 jul. 2020. Disponível em: <https://forbes.com.br/principal/2020/07/brasil-e-o-quarto-maior-mercado-de-beleza-e-cuidados-pessoais-do-mundo/>. Acesso em: 29 set. 2021.

WESTERHOF, W.; KOOYERS, T. J. Hydroquinone and its analogues in Dermatology: a potential health risk. *Journal of Cosmetic Dermatology*, Oxford, v. 4, n. 2, p. 55-59, June 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2005.40202.x>.

WHITLEY, A. C. *et al.* Intestinal epithelial cell accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic acid: extensive binding to protein DNA. *Biochemical Pharmacology*, Oxford, v. 66, n. 6, p. 907-915, Sept. 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(03\)00413-1](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(03)00413-1).

WHITLEY, A. C.; SWEET, D. H.; WALLE, T. Site specific accumulation of the cancer preventive dietary polyphenol ellagic acid in epithelial cells of the aerodigestive tract. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, London, v. 58, n. 9, p. 1201-1209, Sept. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1211/jpp.58.9.0006>.

WHO – *World Health Organization*. Envelhecimento ativo: uma política de saúde; tradução Suzana Gontijo – Brasília. Organização Pan-Americana da Saúde, 2005.

WIRAGUNA, A. A. G. P.; HARI, E. D.; PRAHARSINI, G. A. A. Correlation between glutathione plasma with degree severity of Melasma in Balinese women. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, Auckland, v. 13, n. 45, p. 455-459, July 2020. DOI: <https://doi.org/10.2147/CCID.S258834>.

YOSHIMURA, M. *et al.* Inhibitory Effect of an Ellagic Acid-Rich Pomegranate Extract on Tyrosinase Activity and Ultraviolet-Induced Pigmentation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Tokyo, v. 69, n. 12, p. 2368-2373, Dec. 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.69.2368>.



# UPF

UNIVERSIDADE  
DE PASSO FUNDO

UPF Campus I - BR 285, São José  
Passo Fundo - RS - CEP: 99052-900  
(54) 3316 7000 - [www.upf.br](http://www.upf.br)