UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação *in vitro* do potencial de uso da apigenina, da crisina e do beta-caroteno na proteção contra a radiação UVA e luz visível

Juliana Vescovi de Freitas

Ribeirão Preto
2016

RESUMO

FREITAS, J. V. **Avaliação *in vitro* do potencial de uso da apigenina, da crisina e do beta-caroteno na proteção contra a radiação UVA e luz visível.** 2016. 104f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Tendo em vista que a radiação ultravioleta A (UVA) e a luz visível (VIS) apresentam alto potencial para gerar oxigênio singleto ($^1O_2$) e provocar estresse oxidativo, é importante buscar substâncias capazes de prevenir ou minimizar o impacto desse evento sobre a pele, já que atualmente, há poucos filtros solares orgânicos no mercado que oferecem ampla proteção contra a UVA I e não há filtros orgânicos que ofereçam proteção contra a luz VIS. Estudos da literatura indicam que alguns antioxidantes, tais como a apigenina (API), a crisina (CRI) e o beta-caroteno (BTC), podem neutralizar o $^1O_2$ e apresentam potencial de uso na fotoproteção. Deste modo, o objetivo do presente projeto foi avaliar a segurança da API, da CRI e do BTC, por meio dos ensaios de fotoestabilidade, fotorreatividade e fototoxicidade, e também sua eficácia, através de ensaios para determinar a proteção contra a morte celular induzida pela fotossensibilização da melanina, que gera $^1O_2$, e a proteção de membrana contra danos fotooxidativos. Inicialmente, foi avaliada a fotoestabilidade da API, da CRI e do BTC quando submetidos à radiação UVA e luz VIS, por meio de CLAE. A fototoxicidade das substâncias em estudo frente à radiação UVA e luz VIS, empregando-se cultura de fibroblastos (Balb 3T3 clone A31), de melanócitos (Melan-a) e de melanoma (B16F10) também foi realizada. Para avaliar a eficácia, o efeito da API, da CRI e do BTC sobre a viabilidade das células B16F10 com níveis basais de melanina e após indução da melanogênese, bem como seu efeito sobre a proteção de membrana em modelo mimético de lipossomas, foram avaliados frente à luz VIS. Os resultados do estudo de fotoestabilidade mostraram que os antioxidantes, isolados ou em associação, foram considerados fotoestáveis em ambas as faixas de radiação avaliadas (UVA/VIS e VIS). No estudo de fotorreatividade, a API, a CRI e a associação (API+CRI+BTC) se mostraram fracamente fotorreativas após exposição ao UVA/VIS. No entanto, na presença de VIS, nenhum dos compostos apresentou fotorreatividade. No estudo de fototoxicidade, foi observado potencial fototóxico após irradiação por UVA/VIS para a CRI, BTC e a associação (API+CRI+BTC) nas três linhagens celulares avaliadas. Já a API, não apresentou potencial fototóxico apenas no ensaio realizado com fibroblastos. Na faixa da luz VIS, o BTC apresentou potencial fototóxico nas três linhagens celulares avaliadas; entretanto, para os demais antioxidantes (API e CRI) e sua associação (API+CRI+BTC) houve variação na resposta entre as diferentes linhagens. Os resultados dos estudos para avaliação da eficácia mostraram que os antioxidantes foram capazes de proteger as células contra morte induzida pela fotossensibilização da melanina, sendo que o efeito da API foi superior ao da CRI e do BTC. No estudo de proteção de membrana apenas a API foi capaz de conferir proteção contra os danos fotooxidativos induzidos pela luz VIS. A investigação do potencial de uso da API, da CRI e do BTC na proteção contra a radiação UVA e luz VIS mostrou que o uso de tais antioxidantes e da sua combinação visando a fotoproteção da pele é mais seguro na faixa da luz VIS. Além disso, concluiu-se que API é o mais promissor entre os antioxidantes estudados em relação à segurança e à eficácia, e apresenta elevado potencial de uso na proteção contra a luz VIS.

Palavras-chave: 1. Antioxidantes. 2. Proteção *in vitro*. 3. Radiação UVA. 4. Luz visível.

1 Introdução

A radiação solar compreende os espectros do infravermelho, do ultravioleta (UV) e da luz visível (VIS). Sendo que cerca de 56%, 39% e 5% da radiação solar correspondem, respectivamente, aos raios infravermelhos (800nm-1mm), à luz VIS (400-760 nm), e à radiação UV (280-400nm) (GONZÁLEZ et al., 2008; ROMANHOLE et al., 2015).

Os danos fotoinduzidos pela radiação UV se iniciam após absorção da radiação por cromóforos endógenos, tais como o DNA, a melanina, o ácido urocânico, e aminoácidos aromáticos (ROMANHOLE et al., 2015). Esses danos podem ocorrer por meio da reação direta entre os cromóforos excitados e o DNA (reação tipo I), ou por transferência de energia para o oxigênio molecular (reação tipo II), o que leva à formação de radicais superóxido ($O_2^{-\bullet}$) e de oxigênio singleto ($^1O_2$) (UMLAS et al., 1985; MORI et al., 1988). O $^1O_2$ é uma molécula altamente eletrofílica capaz de reagir com duplas ligações de lipídios, ácidos nucleicos e proteínas (MICHAELI; FEITELSON, 1994).

Os raios UVA são capazes de penetrar profundamente a derme, sendo que a exposição a esses raios induz à geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), como o $^1O_2$ por meio da fotossensibilização de cromóforos endógenos (TYRREL, 1994), o que pode causar danos às macromoléculas celulares, incluindo proteínas, lipídios e DNA (NICHOLS; KATIYAR, 2010). A UVA possui potencial genotóxico, ou seja, é capaz de produzir mutações em células humanas normais e, por isso, pode induzir à carcinogênese. Além disso, a radiação UVA está relacionada ao fotoenvelhecimento e à diminuição da hidratação e elasticidade da pele (LAVKER et al., 1995).

A luz VIS, assim como a radiação UV, pode ser absorvida por cromóforos, tais como a protoporfirina, a bilirrubina, a hemoglobina e a melanina, que iniciam reações químicas que podem provocar danos às células (MAHMOUD et al., 2008). O espectro de absorção da melanina abrange comprimentos de onda entre 200 e 900 nm (ZONIOS et al., 2008) e, por isso, possibilita a proteção da pele contra os danos fotoinduzidos pela radiação solar e luz VIS. Por outro lado, a melanina também pode apresentar propriedades tóxicas e atuar como pró-oxidante na presença da luz, uma vez que essa molécula pode sofrer fotossensibilização e gerar EROS, em especial o $^1O_2$ (SUZUKAWA et al., 2012).

A incidência de radiação UV e luz VIS sobre a melanina pode levar à formação de $^1O_2$ ou $O_2^{-\bullet}$ devido à fotossensibilização (CHIARELLI-NETO et al., 2011; TAKEUCHI et al., 2004; TOFFOLETTI et al., 2009). Apesar de melanina poder atuar como antioxidante sequestrando essas espécies reativas, essa ação pode ser suprimida (TAKEUCHI et al., 2004). Dessa forma, a melanina pode ter efeitos opostos no organismo, ou seja, pode desencadear mecanismos de proteção e também de danos à pele quando exposta à radiação solar.

Durante muito tempo pouca importância foi dada ao potencial da luz VIS em causar efeitos biológicos sobre a pele. No entanto, estudos *in vivo* têm mostrado que a luz VIS é capaz de causar danos cutâneos, tais como eritema (PARRISH et al., 1982), pigmentação (KOLLIAS; BAQER, 1984; MAHMOUD et al., 2010) e, sobretudo, estresse oxidativo devido à geração de EROS (LIEBEL et al., 2012).

Baptista et al. (2012) observaram em estudo *in vitro* que a luz VIS pode induzir à fototoxicidade em macrófagos, queratinócitos e melanócitos, e que esse processo é dependente do tipo e da quantidade de melanina intracelular. Além disso, também foi observado que nas células com grande quantidade de melanina houve aumento de 30 % da produção de $^1O_2$ comparado com as células controle.

Os efeitos da luz VIS sobre a pele humana também foram estudados por Zastrow et al. (2009) que, em estudo *ex vivo*, mostraram que ocorre excesso de produção de radicais livres na pele irradiada pela luz VIS. Altos níveis de radicais livres após exposição à luz VIS também foram observados em modelos clínicos (LIEBEL et al., 2012). Além disso, os resultados dos estudos *in vitro* mostraram que a luz VIS induziu à expressão de metaloproteinase (MMP)-I e à produção de EROS e citocinas pró-inflamatórias (LIEBEL et al., 2012). Esses resultados sugerem que a luz VIS também pode contribuir para o fotoenvelhecimento prematuro da pele.

Atualmente, há na literatura uma grande carência de estudos que envolvam a luz VIS, sendo que a maioria dos estudos sobre os efeitos biológicos e também químicos da radiação solar são voltados para a radiação UV.

O conhecimento sobre os diversos efeitos deletérios que os raios UV e a luz VIS podem provocar na pele, bem como a crescente incidência de casos de câncer de pele na população mundial, tem gerado preocupação em relação à proteção contra a radiação solar (JOU et al., 2012). Por muito tempo, o delineamento de protetores solares restringiu-se a obter formulações que conferissem proteção UVA e UVB. É fato conhecido que no desenvolvimento de formulações fotoprotetoras é importante utilizar combinações de filtros solares que proporcionem proteção adequada na faixa da UVA e da UVB (JOU et al., 2012). Entretanto, os avanços das pesquisas na área de fotoproteção (LIEBEL et al., 2012; VANDERSEE et al., 2015) mostraram a necessidade de estender o espectro de proteção para a faixa da luz VIS (400-760 nm). Atualmente, não há no mercado filtros solares orgânicos que apresentem proteção nessa faixa de radiação. Assim, o uso de antioxidantes nas formulações fotoprotetoras torna-se a melhor alternativa para conseguir a referida proteção, uma vez que os danos provocados à pele pela luz VIS são causados principalmente por EROS.

Diversos antioxidantes naturais têm sido empregados em protetores solares devido às suas propriedades fotoprotetoras e antioxidantes, tais como vitaminas, flavonoides e carotenoides (GILABERTE; GONZÁLEZ, 2010; GONZÁLEZ et al., 2008, 2010). Estudos da literatura indicam que alguns antioxidantes, tais como a apigenina, a crisina e o beta-caroteno podem neutralizar o $^1O_2$ (BOHM et al., 1993; NAGAI et al., 2005). Considerando que a radiação UVA e a luz VIS apresentam alto potencial para gerar $^1O_2$ e provocar estresse oxidativo, a apigenina, a crisina e beta-caroteno se tornam antioxidantes em potencial para prevenir ou minimizar o impacto desses eventos sobre a pele.

A apigenina é um flavonoide pertencente à classe das flavonas, encontrada em plantas e frutas (MCKAY; BLUMBERG, 2006). A apigenina apresenta atividade antioxidante (BEGUM et al., 2012), anti-inflamatória (JEONG et al., 2009) e anti-câncer (SILVAN et al., 2011). Ye et al. (2010) também sugerem que essa flavona exerce potente atividade melanogênica, já que provocou aumento da expressão de três enzimas envolvidas na síntese de melanina.

De acordo com Das et al. (2013) a apigenina foi capaz de proteger queratinócitos humanos e a pele de camundongos contra os efeitos deletérios da radiação UVB, uma vez que proporcionou proteção do DNA através da redução da formação de dímeros de pirimidina ciclobutano, da inibição da geração de EROS, e da redução da expressão do fator nuclear kappa-B e da proteína quinase ativada por mitógeno p38.

A crisina é uma flavona presente em extratos de plantas, própolis e mel (PICHICHERO et al., 2010). Assim como outros flavonoides, a crisina apresenta atividades biológicas, tais como ações anti-inflamatória (CHO et al., 2004), anti-câncer (KHAN et al., 2011; PICHICHERO et al., 2010) e antioxidante (BORS et al., 1997). Além disso, os resultados do estudo de KIM et al. (2011) sugerem que a crisina pode ser usada como inibidor da hiperpigmentação, uma vez que foi capaz de inibir a melanogênese *in vitro*.

O potencial de uso da crisina na fotoproteção da pele foi sugerido por Wu et al. (2011) após verificarem que a mesma pode atenuar a apoptose, a produção de EROS e a expressão da ciclooxigenase-2 induzidas pela radiação UV; além disso, observou-se que a crisina foi capaz de reverter a redução da expressão de aquaporina-3 induzida pela UVB, tal proteção é considerada importante, uma vez que os canais de aquaporina-3 regulam o transporte de água e glicerol da derme para epiderme e assim melhoram a hidratação do estrato córneo (WU et al., 2011).

Adicionalmente, a apigenina e a crisina mostraram-se efetivas no seqüestro de espécies reativas e na inibição da MMP-1, a qual regula o processo de fotoenvelhecimento da

pele induzido por espécies reativas geradas pela exposição à UVA (SIM et al., 2007). Os resultados desse estudo sugerem que esses flavonoides podem ser úteis na prevenção do fotoenvelhecimento.

O beta-caroteno é o mais abundante e eficiente precursor da vitamina A, e apresenta elevada ação antioxidante (DARVIN et al., 2011; O'CONNOR; O'BRIEN, 1998), devida principalmente à sua habilidade em suprimir o $^1O_2$ (BOHM et al., 1993), e também atividades anti-câncer (GURUVAYOORAPPAN; KUTTAN, 2007) e antiinflamatória (BAI et al., 2005; OBERMULLER-JEVIC et al., 2001).

A ação antioxidante do beta-caroteno está baseada na sua capacidade de atuar como *quencher* do $^1O_2$ e de substâncias no estado tripleto, dissipando a energia do estado excitado (MORTENSEN, 2001; NIELSEN et al., 1998). A estrutura molecular do beta-caroteno, caracterizada pela presença de numerosas duplas ligações conjugadas, é responsável por sua excelente habilidade em atuar como *quencher* do singleto sem sofrer degradação, e também por sua reatividade química frente a radicais livres (BRITTON, 1995; KRINSKY, 1994). Outro mecanismo pelo qual o beta-caroteno atua como antioxidante consiste na inibição da oxidação provocada por radicais peroxil ($ROO^{\bullet}$) (YANISHLIEVA et al., 1998) e $O_2^{-\bullet}$ (CONN et al., 1992) por meio da transferência de elétrons para essas espécies reativas.

Diversos estudos relataram a proteção oferecida pelo beta-caroteno contra a radiação UV e também infravermelha (BANDO et al., 2004; DARVIN et al., 2011; O'CONNOR; O'BRIEN, 1998). No estudo realizado por Darvin et al. (2011), a aplicação tópica de uma formulação contendo beta-caroteno conferiu proteção à pele humana contra a ação de radicais livres, formados em consequência da exposição à radiação infravermelha. Outros estudos *in vivo* também mostraram que a aplicação tópica de beta-caroteno conferiu proteção contra o estresse oxidativo induzido pela radiação UVA (EVELSON et al., 1997; YASUI; SAKURAI, 2000).

O uso de moléculas antioxidantes eficazes e seguras é fundamental para o desenvolvimento de fotoprotetores visando uma proteção de amplo espectro, ou seja, na faixa da UVA/UVB e da luz VIS. Além da atividade antioxidante, a apigenina e a crisina absorvem radiação UV e o beta-caroteno absorve na região do UV e VIS. Após a excitação pela luz, compostos fotoinstáveis podem facilmente passar por reações fotoquímicas, que podem ocorrer tanto no estado excitado singleto quanto no estado excitado tripleto, que levam à geração de radicais livres e fotoprodutos (EPE, 2012; SHAATH, 2010). A produção de EROS, tais como o $^1O_2$ e o $O^{2-\bullet}$, pode estar envolvida em respostas fototóxicas, incluindo a fotoirritação, a fotogenotoxicidade e a fotoalergia (ONOUE; TSUDA, 2006).

Dessa forma, estudos envolvendo a avaliação de características importantes para eficácia e segurança como, por exemplo, a fotoestabilidade, a fotorreatividade, a fototoxicidade, a proteção contra a geração de $^1O_2$ e a proteção de membrana, são fundamentais para direcionar a busca de novas substâncias fotoprotetoras. Além disso, uma vez que alguns estudos indicam que a luz VIS também gera radicais livres e causa danos à pele, há uma busca por novas moléculas que apresentem proteção nessa faixa da radiação solar.

Atualmente, há uma forte tendência na Europa e também no Brasil em banir o uso de animais de experimentação para avaliação da eficácia e segurança de matérias-primas e produtos cosméticos. Entre os métodos *in vitro* utilizados na avaliação da segurança na presença da luz estão os propostos pelo guia *Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals S10* (ICH, 2013), incluindo a determinação do Coeficiente de Extinção Molar dentro da faixa da luz solar (290-700 nm), da fotorreatividade e da fototoxicidade. Além disso, o estudo de fotoestabilidade também pode contribuir para avaliação da segurança (ICH, 2013). Com relação à eficácia *in vitro* de matérias-primas, diversas metodologias podem ser empregadas para tal avaliação dependendo do tipo de efeito ou característica que se pretende avaliar.

Considerando que a radiação UVA e a luz VIS apresentam alto potencial para gerar $^1O_2$ e provocar estresse oxidativo, a apigenina, a crisina e o beta-caroteno se tornam potenciais alvos para investigação quanto a viabilidade de uso em fotoprotetores visando proteção UVA e VIS. Assim, a investigação do potencial de uso da apigenina, da crisina e do beta-caroteno na proteção contra radiação UVA e luz VIS requer uma avaliação prévia da sua segurança e eficácia. Nesse contexto, o presente estudo é de grande importância, uma vez que propôs a avaliação da segurança, por meio dos ensaios de fotoestabilidade, fotorreatividade e fototoxicidade de moléculas antioxidantes com potencial para protegerem a pele e contra os danos induzidos pela radiação UVA e luz VIS. Além disso, propõe a avaliação da eficácia por meio de ensaios para determinar a proteção contra a morte celular induzida pela fotossensibilização da melanina e a proteção de membrana contra os danos fotooxidativos após exposição à luz VIS. Finalizando, em consonância com a legislação atual sobre o uso de animais em pesquisa, optou-se por empregar apenas metodologias alternativas à experimentação animal para avaliar a performance dos antioxidantes com relação à eficácia e segurança.

7 Conclusões

7.1 Conclusão geral

A investigação do potencial de uso da API, da CRI e do BTC na proteção contra a radiação UVA e luz VIS através de ensaios *in vitro* conduzidos para avaliar características relacionadas à sua segurança mostrou que o uso de tais antioxidantes e da sua CMB visando a fotoproteção da pele é mais seguro na faixa da luz VIS. Em relação à eficácia frente à luz VIS, os antioxidantes foram capazes de proteger as células contra morte induzida pela fotossensibilização da melanina, sendo que o efeito da API foi superior ao da CRI e do BTC. Além disso, no estudo de proteção de membrana, apenas a API foi capaz de conferir proteção contra os danos fotooxidativos induzidos pela luz VIS. Finalizando, a API é o mais promissor entre os antioxidantes estudados em relação à segurança e à eficácia, e apresenta elevado potencial de uso na proteção contra a luz VIS.

7.2 Conclusões específicas

- O método de CLAE foi validado por meio da determinação da seletividade, linearidade, LD, LIQ, precisão e exatidão intra- e inter-ensaio; e é apropriado para a determinação quali e quantitativa da API, da CRI e do BTC.
- O estudo de fotoestabilidade mostrou que a API, a CRI e o BTC, isolados e em combinação (CMB) não sofreram degradação após exposição à radiação UVA/VIS e VIS. A API e a CRI, isoladas ou na combinação, exibiram valores de recuperação em torno de 100% em ambas a faixas de radiação avaliadas. Entretanto, na presença da radiação UVA/VIS o BTC apresentou degradação quando usado isoladamente (~12%) e quando associado à API e CRI (~8%).
- No ensaio de fotorreatividade, a API, a CRI e a CMB se mostraram fracamente fotorreativas após irradiação por UVA/VIS devido à habilidade em gerar $O_2^{-\bullet}$. Na presença da luz VIS os antioxidantes não foram fotorreativos.
- No ensaio de fototoxicidade em que foram utilizados os fibroblastos, a CRI, o BTC e a CMB apresentaram potencial fototóxico na presença de UVA/VIS. No entanto, após exposição à luz VIS, apenas o BTC e a CMB apresentaram potencial fototóxico. Nos melanócitos normais e nas células de melanoma, foi observada fototoxicidade para todos os antioxidantes e a CMB na faixa do UVA/VIS. Após exposição à luz VIS as células Melan-a apresentaram fototoxicidade à API e ao BTC, enquanto que as da linhagem B16F10 exibiram fototoxicidade à CRI e à CMB.

- No ensaio para quantificar a geração de $^1O_2$, as células B16F10 controle (nível basal de melanina) apresentaram sinal basal de emissão de $^1O_2$, enquanto as que receberam tratamento para indução de melanogênese com NH_4Cl 2,5 mM e L-tirosina 1 mM exibiram um espectro de emissão que evidenciou a geração de $^1O_2$.
- Nas células que receberam tratamento para indução de melanogênese, a API proporcionou aumento da viabilidade celular em todas as concentrações avaliadas, após irradiação por luz VIS em relação às células não tratadas. A CRI conferiu proteção às células contra fotossensibilização da melanina apenas quando utilizada na concentração de 6,8 $\mu g.mL^{-1}$. O tratamento com BTC nas concentrações 6,8, 46,4, 68,1 e 100 $\mu g.mL^{-1}$, por sua vez, levou ao aumento da sobrevida celular após irradiação por luz VIS .
- No ensaio para avaliar a proteção de membrana contra os danos induzidos pela luz VIS em modelo mimético de lipossomas, a API foi capaz de proteger eficientemente a membrana contra os danos provocados pelo DMMB em todas as concentrações avaliadas; entretanto, a CRI e o BTC não conferiram proteção, uma vez que houve danos significativos à membrana. Além disso, o tratamento com API (6,8 $\mu g.mL^{-1}$) resultou em uma porcentagem de liberação de CF de, em média 12%, ao final de 40 minutos de irradiação, sendo equivalente à proteção oferecida pela ácido gálico, que corresponde ao controle positivo do ensaio.

8 Referências

AMAT, A.; CLEMENTI, C.; DE ANGELIS, F.; SGAMELLOTTI, A; FANTACCI, S. Absorption and Emission of the Apigenin and Luteolin Flavonoids: A TDDFT Investigation. **Journal of Physical Chemistry A,** v. 113, n. 52, p. 15118-15126, 2009.

ASNAASHARI, M.; FARHOOSH, R.; SHARIF, A. Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion. **Food Chemistry,** v. 159, p. 439-444, 2014.

BACELLAR, I. O. L.; PAVANI, C.; SALES, E. M.; ITRI, R.; WAINWRIGHT, M.; BAPTISTA, M. S. Membrane Damage Efficiency of Phenothiazinium Photosensitizers. **Photochemistry and Photobiology,** v. 90, n. 4, p. 801-813, 2014.

BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Advances,** v. 5, n. 35, p. 27540-27557, 2015.

BAI, S. K.; LEE, S .J.; NA, H. J.; HA, K. S.; HAN, J. A.; LEE, H.; KWON, Y. G.; CHUNG, C. K.; KIM, Y. M. Beta-Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF-kappaB activation. **Experimental & Molecular Medicine**, v.37, n.4, p.323-334, 2005.

BANDO, N.; HAYASHI, H.; WAKAMATSU, S.; INAKUMA, T.; MIYOSHI, M.; NAGAO, A.; YAMAUCHI, R.; TERAO, J. Participation of singlet oxygen in ultraviolet-A-induced lipid peroxidation in mouse skin and its inhibition by dietary β-carotene:an *ex vivo* study. **Free Radical Biology & Medicine**, v.37, p.1854–1863, 2004.

BAPTISTA, M. S.; CHIARELLI-NETO, O.; PAVANI, C.; FERREIRA, A. S.; SEVERINO, D. **Photosensitization of melanin and generation of singlet oxygen: effect of visible light in hairs and skin**. In: 27th IFSCC Congress, Johannesburg 2012.

BARBA, A. I. O.; HURTADO, M. C.; MATA, M. C. S.; RUIZ, V. F.; TEJADA, M. L. S. Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β-carotene in vegetables. **Food Chemistry,** v. 95, p. 328-336, 2006.

BARIYA, S. H.; GOHEL, M. C.; MEHTA, T. A.; SHARMA, O. P. Microneedles: an emerging transdermal drug delivery system. **Journal of Pharmacy and Pharmacology,** v. 64, n. 1, p. 11-29, 2012.

BEGUM, N.; PRASAD, N. R.; KANIMOZHI, G.; HASAN, A. Q. Apigenin ameliorates gamma radiation-induced cytogenetic alterations in cultured human blood lymphocytes. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,** v. 747, n. 1, p. 71-76, 2012.

BERETTA, G.; FACINO, R. M. Recent advances in the assessment of the antioxidant capacity of pharmaceutical drugs: from *in vitro* to *in vivo* evidence. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** v. 398, n. 1, p. 67-75, 2010.

BLACK, H. S.; LENGER, W.; MCCANN, V.; THORNBY, J. I. Relation of UV dose to antioxidant modification of photocarcinogenesis. **Journal of the American College of Toxicology,** v. 2, n. 2, p. 201-207, 1983.

BOHM, F.; HALEY, J.; TRUSCOTT, T. G.; SCHALCH, W. Cellular bound beta-carotene quenches singlet oxygen in man. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology,** v. 21, n. 2-3, p. 219-221, 1993.

BOLIGON, A. A.; MACHADO, M. M.; ATHAYDE, M. L. Technical Evaluation of Antioxidant Activity. **Medicinal chemistry,** v. 4, n. 7, p. 517-522, 2014.

BONDA, C.; ZHANG, J.; PAVLOVIC, A. The photostability and photostabilization of *trans*- resveratrol. **Cosmetic&Toiletries,** v. 126, n. 9, p. 652-660, 2011.

BORS, W.; MICHEL, C.; STETTMAIER, K. Antioxidant effects of flavonoids. **Biofactors,** v. 6, n. 4, p. 399-402, 1997.

BOTTA, C.; DI GIORGIO, C.; SABATIER, A.-S.; DE MEO, M. Genotoxicity of visible light (400-800 nm) and photoprotection assessment of ectoin, L-ergothioneine and mannitol and four sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology,** v. 91, n. 1, p. 24-34, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos.** 2. ed. Brasília, DF: ANVISA, 2012. 2012a. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/92f15c004e219a73a96dbbc09d49251b/Guia_cosmeticos_grafica_final.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 10 jun. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 30, de 1 de junho de 2012. Fica aprovado o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos nos termos desta Resolução. **Diário Oficial da União**, Brasília, 04 jun. 2012b.

BRENNER, M.; HEARING, V. J. The protective role of melanin against UV damage in human skin. **Photochemistry and Photobiology,** v. 84, n. 3, p. 539-549, 2008.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **Faseb Journal,** v. 9, n. 15, p. 1551-1558, 1995.

CAI, H.; RAYNAUD, D.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J. A simple HPLC method for the determination of apigenin in mouse tissues. **Biomedical Chromatography,** v. 20, n. 10, p. 1038-1042, 2006.

CAMPOS, A.; GUTERRES, Y.; BAUER, E.B.; MOREIRA, M.C. High Brightness LEDs Supplied by Electronics Converters Used in Tissue Healing and Cell Rejuvenation. In: SERRA, P.A. **Advances in Bioengineering.** 2015. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-bioengineering/high-brightness-leds-supplied-by-electronics-converters-used-in-tissue-healing-and-cell-rejuvenation >. Acesso em 12 maio 2016.

CASTANEDO-CAZARES, J. P.; J., HERNANDEZ-BLANCO, D.; CARLOS-ORTEGA, B.; FUENTES-AHUMADA, C.; TORRES-ALVAREZ, B. Near-visible light and UV photoprotection in the treatment of melasma: a double-blind randomized trial. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine,** v. 30, n. 1, p. 35-42, 2014.

CASTRO, G. T.; FERRETTI, F. H.; BLANCO, S. E. Determination of the overlapping pK(a) values of chrysin using UV-vis spectroscopy and ab initio methods. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy,** v. 62, n. 1-3, p. 657-665, 2005.

CHEDEKEL, M. R.; SMITH, S. K.; POST, P. W.; POKORA, A.; VESSELL, D. L. Photodestruction of pheomelanin - role of oxygen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 75, n. 11, p. 5395-5399, 1978.

CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F. An introduction to free-radical biochemistry. **British Medical Bulletin,** v. 49, n. 3, p. 481-493, 1993.

CHIARELLI-NETO, O.; FERREIRA, A. S.; MARTINS, W. K.; PAVANI, C.; SEVERINO, D.; FAIAO-FLORES, F.; MARIA-ENGLER, S. S. et al. Melanin Photosensitization and the Effect of Visible Light on Epithelial Cells. **Plos One,** v. 9, n. 11, 2014.

CHIARELLI-NETO, O.; PAVANI, C.; FERREIRA, A. S.; UCHOA, A. F.; SEVERINO, D.; BAPTISTA, M. S. Generation and suppression of singlet oxygen in hair by photosensitization of melanin. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 51, n. 6, p. 1195-1202, 2011.

CHO, H. Y.; YUN, C. W.; PARK, W. K.; KONG, J. Y.; KIM, Y. S.; PARK, Y. M.; LEE, S. Y. et al. Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and iNOS, by chrysin derivatives. **Pharmacological Research,** v. 49, n. 1, p. 37-43, 2004.

CHOQUENET, B.; COTEAU, C.; PAPARIS, E.; COIFFARD, L. J. M. Flavonoids and Polyphenols, Molecular Families with Sunscreen Potential: Determining Effectiveness with an *in vitro* Method. **Natural Product Communications,** v. 4, n. 2, p. 227-230, 2009.

CHUONG, C. M.; NICKOLOFF, B. J.; ELIAS, P. M.; GOLDSMITH, L. A.; MACHER, E.; MADERSON, P. A.; SUNDBERG, J. P. et al. What is the 'true' function of skin? Viewpoint 1. **Experimental Dermatology,** v. 11, n. 2, p. 159-163, 2002.

CICHOREK, M.; WACHULSKA, M.; STASIEWICZ, A. Heterogeneity of neural crest-derived melanocytes. **Central European Journal of Biology,** v. 8, n. 4, p. 315-330, 2013.

CICHOREK, M.; WACHULSKA, M.; STASIEWICZ, A.; TYMINSKA, A. Skin melanocytes: biology and development. **Postepy Dermatologii I Alergologii,** v. 30, n. 1, p. 30-41, 2013.

CONN, P. F.; LAMBERT, C.; LAND, E. J.; SCHALCH, W.; TRUSCOTT, T. G. Carotene oxygen radical interactions. **Free Radical Research Communications,** v. 16, n. 6, p. 401-408, 1992.

COSTIN, G. E.; HEARING, V. J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. **Faseb Journal,** v. 21, n. 4, p. 976-994, 2007.

CUNHA, E. S.; KAWAHARA, R.; KADOWAKI, M. K.; AMSTALDEN, H. G.; NOLETO, G. R.; CADENA, S. M. S. C.; WINNISCHOFER, S. M. B. et al. Melanogenesis stimulation in B16-F10 melanoma cells induces cell cycle alterations, increased ROS levels and a differential expression of proteins as revealed by proteomic analysis. **Experimental Cell Research,** v. 318, n. 15, p. 1913-1925, 2012.

DALY, C. H. Biomechanical properties of dermis. **Journal of Investigative Dermatology,** v. 79, p. S17-S20, 1982.

DAMIANI, E.; BASCHONG, W.; GRECI, L. UV-Filter combinations under UV-A exposure: Concomitant quantification of over-all spectral stability and molecular integrity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology,** v. 87, n. 2, p. 95-104, 2007.

DAMIANI, E.; ROSATI, L.; CASTAGNA, R.; CARLONI, P.; GRECI, L. Changes in ultraviolet absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreens after UVA irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology,** v. 82, n. 3, p. 204-213, 2006.

DARVIN, M. E.; FLUHR, J. W.; MEINKE, M. C.; ZASTROW, L.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Topical beta-carotene protects against infra-red-light-induced free radicals. **Experimental Dermatology,** v. 20, n. 2, p. 125-129, 2011.

DAS, S.; DAS, J.; PAUL, A.; SAMADDER, A.; KHUDA-BUKHSH A. R. Apigenin, a Bioactive Flavonoid from Lycopodium clavatum, Stimulates Nucleotide Excision Repair Genes to Protect Skin Keratinocytes from Ultraviolet B-Induced Reactive Oxygen Species and DNA Damage. **Journal of Acupuncture & Meridian Studies,** v. 6, n. 5, p. 252-262, 2013.

DIFFEY, B. L. A method for broad spectrum classification of sunscreens. **International Journal of Cosmetic Science,** v. 16, p. 47-52, 1994.

DIFFEY, B. L.; TANNER, P. R.; MATTS, P. J.; NASH, J. F. *In vitro* assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products. **Journal of the American Academy of Dermatology,** v. 43, n. 6, p. 1024-1035, 2000.

EBANKS, J. P.; WICKETT, R. R.; BOISSY, R. E. Mechanisms Regulating Skin Pigmentation: The Rise and Fall of Complexion Coloration. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 10, n. 9, p. 4066-4087, 2009.

EDWARDS, C.; MARKS, R. Evaluation of biomechanical properties of human skin. **Clinics in Dermatology,** v. 13, n. 4, p. 375-380, 1995.

EPE, B. DNA damage spectra induced by photosensitization. **Photochemical & Photobiological Sciences,** v. 11, n. 1, p. 98-106, 2012.

EPSTEIN, H. A. The next frontier of sunscreen protection: beyond sunscreens. **Skinmed,** v. 9, n. 4, p. 247-250, 2011.

EVELSON, P.; ORDONEZ, C. P.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Oxidative stress and *in vivo* chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology,** v. 38, n. 2-3, p. 215-219, 1997.

FERREIRA, R. D.; GRECO, S. J.; DELARMELINA, M.; WEBER, K. C. Electrochemical quantification of the structure/antioxidant activity relationship of flavonoids. **Electrochimica Acta,** v. 163, p. 161-166, 2015.

FREITAS, J. V.; LOPES, N. P.; GASPAR, L. R. Photostability evaluation of five UV-filters, trans-resveratrol and beta-carotene in sunscreens. **European Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 78, p. 79-89, 2015.

FREITAS, J. V.; GASPAR, L. R. *In vitro* photosafety and efficacy screening of apigenin, chrysin and beta-carotene for UVA and VIS protection. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, p. 146-153, 2016.

FUCHS, J. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol, L-ascorbic acid and beta-carotene in cutaneous photoprotection. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 25, n. 7, p. 848-873, 1998.

FUCHS, J.; HUFLEJT, M. E.; ROTHFUSS, L. M.; WILSON, D. S.; CARCAMO, G.; PACKER, L. Acute effects of near ultraviolet and visible-light on the cutaneous antioxidant defense system. **Photochemistry and Photobiology,** v. 50, n. 6, p. 739-744, 1989.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Evaluation of the photostability of different UV filter combinations in a sunscreen. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 307, n. 2, p. 123-128, 2006.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Photostability and efficacy studies of topical formulations containing UV-filters combination and vitamins A, C and E. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 343, n. 1-2, p. 181-189, 2007.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. A HPLC method to evaluate the influence of photostabilizers on cosmetic formulations containing UV-filters and vitamins A and E. **Talanta,** v. 82, n. 4, p. 1490-1494, 2010.

GASPAR, L. R.; THARMANN, J.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; LIEBSCH, M. Skin phototoxicity of cosmetic formulations containing photounstable and photostable UV-filters and vitamin A palmitate. **Toxicology in Vitro,** v. 27, n. 1, p. 418-425, 2013.

GILABERTE, Y.; GONZÁLEZ, S. Update on Photoprotection. **Actas Dermo-Sifiliográficas,** v. 101, p. 659-672, 2010.

GOH, M.-J.; LEE, H.-K.; CHENG, L., KONG, D.-Y.; YEON, J.-H.; HE, Q.-Q.; CHO, J.-C. et al. Depigmentation Effect of Kadsuralignan F on Melan-A Murine Melanocytes and Human Skin Equivalents. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 14, n. 1, p. 1655-1666, 2013.

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. **Clin Dermatol,** v. 26, n. 6, p. 614-26, 2008.

GONZALEZ, S.; PHILIPS, N.; GILABERTE, Y. Photoprotection: update in UV-filter molecules, the "new wave" of sunscreens. **Giornale Italiano Di Dermatologia E Venereologia,** v. 145, n. 4, p. 515-523, 2010.

GRETHER-BECK, S.; MARINI, A.; JAENICKE, T.; KRUTMANN, J. Photoprotection of human skin beyond ultraviolet radiation. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine,** v. 30, n. 2-3, p. 167-174, 2014.

GURUVAYOORAPPAN, C.; KUTTAN, G. Beta-carotene inhibits tumor-specific angiogenesis by altering the cytokine profile and inhibits the nuclear translocation of transcription factors in B16F-10 melanoma cells. **Integrative Cancer Therapies,** v. 6, n. 3, p. 258-270, 2007.

HAAG, S. F.; TSCHERCH, K.; ARNDT, S.; KLEEMANN, A.; GERSONDE, I.; LADEMANN, J.; ROHN, S. et al. Enhancement of skin radical scavenging activity and stratum corneum lipids after the application of a hyperforin-rich cream. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 86, n. 2, p. 227-233, 2014.

HAYWOOD, R.; WARDMAN, P.; SANDERS, R.; LINGE, C. Sunscreens inadequately protect against ultraviolet-A-induced free radicals in skin: Implications for skin aging and melanoma? **Journal of Investigative Dermatology,** v. 121, n. 4, p. 862-868, 2003.

HENRY, B.; FOTI, C.; ALSANTE, K. Can light absorption and photostability data be used to assess the photosafety risks in patients for a new drug molecule? **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology,** v. 96, n. 1, p. 57-62, 2009.

HOFFMANN-DORR, S.; GREINERT, R.; VOLKMER, B.; EPE, B. Visible light (> 395 nm) causes micronuclei formation in mammalian cells without generation of cyclobutane pyrimidine dimers. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis,** v. 572, n. 1-2, p. 142-149, 2005.

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). **ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1).** 2005. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf>. Acesso em 01 jun 2016.

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). **ICH Harmonised Tripartite Guideline: Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals S10.** 2013. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S10/S10_Step_4.pdf>. Acesso em 01 jun 2016.

JACVAM. ROS assay Validation Management Team. **Reactive oxygen species (ROS) assay to examine photoreactivity of chemicals. ROS Assay Protocol**, Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan, 2013. 2013a. Disponível em: <http://www.jacvam.jp/files/news/ROS_protocol_v3.1_130920_clean.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2016.

JACVAM. ROS assay validation management team. **Validation report for the international validation study on ROS (Reactive Oxygen Species) assay as a test evaluating phototoxic potential of chemicals (Seric version)**, 2013. 2013b. Disponível em: <http://www.jacvam.jp/files/news/ROS_Assay_full 20131009Seric fourth.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2016.

JACVAM. ROS assay validation management team. **Validation report for the international validation study on ROS (Reactive Oxygen Species) assay as a test evaluating phototoxic potential of chemicals (Atlas Suntest version)**, 2013. 2013c. Disponível em: <http://www.jacvam.jp/files/news/ROS_Assay_full 20130920 atlas_fourth data.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2016.

JEONG, G.-S.; LEE, S.-H.; JEONG, S.-N.; KIM, Y.-C.; KIM, E.-C. Anti-inflammatory effects of apigenin on nicotine- and lipopolysaccharide-stimulated human periodontal ligament cells via heme oxygenase-1. **International Immunopharmacology,** v. 9, n. 12, p. 1374-1380, 2009.

JOU, P. C.; FELDMAN, R. J.; TOMECKI, K. J. UV protection and sunscreens: What to tell patients. **Cleveland Clinic Journal of Medicine,** v. 79, n. 6, p. 427-436, 2012.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology-Mysore,** v. 48, n. 4, p. 412-422, 2011.

KHAN, M. S.; DEVARAJ, H.; DEVARAJ, N. Chrysin abrogates early hepatocarcinogenesis and induces apoptosis in N-nitrosodiethylamine-induced preneoplastic nodules in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology,** v. 251, n. 1, p. 85-94, 2011.

KIM, D.-C.; RHO, S.-H.; SHIN, J.-C.; PARK, H. H.; KIM, D. Inhibition of melanogenesis by 5,7-dihydroxyflavone (chrysin) via blocking adenylyl cyclase activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 411, n. 1, p. 121-125, 2011.

KOCKLER, J.; OELGEMÖLLER, M.; ROBERTSON, S.; GLASS, B. D. Photostability of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology,** v. 13, p. 91-110, 2012.

KOLBE, L. How Much Sun Protection Is Needed?: Are We on the Way To Full-Spectrum Protection? **Journal of Investigative Dermatology,** v. 132, n. 7, p. 1756-1757, 2012.

KOLLIAS, N.; BAQER, A. An experimental-study of the changes in pigmentation in human-skin *invivo* with visible and near-infrared light. **Photochemistry and Photobiology,** v. 39, n. 5, p. 651-659, 1984.

KONGSHOJ, B.; MIKKELSEN, N. D.; KOBAYASI, T.; LERCHE, C. M.; WULF, H. C. Ammonium chloride and L-tyrosine enhance melanogenesis *in vitro* but not *in vivo* even in combination with ultraviolet radiation. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine,** v. 23, n. 5, p. 197-202, 2007.

KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry,** v. 66, n. 5, p. 1003-1010, 1994.

LAVKER, R. M.; VERES, D. A.; IRWIN, C. J.; KAIDBEY, K. H. Quantitative assessment of cumulative damage from repetitive exposures to suberythemogenic doses of UVA in human skin. **Photochemistry and Photobiology,** v. 62, n. 2, p. 348-352, 1995.

LEOPOLDINI, M.; PITARCH, I. P.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. Structure, conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidants. A first principle theoretical study. **Journal of Physical Chemistry A,** v. 108, n. 1, p. 92-96, 2004.

LEVINE, M.; RAMSEY, S. C.; DARUWARA, R. Criteria and recommendation for Vitamin C intake. **JAMA,** v. 281, n. 15, p. 1415-1423, 1991.

LI, L. P.; JIANG, H. D.; WU, H. H.; ZENG, S. Simultaneous determination of luteolin and apigenin in dog plasma by RP-HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 37, n. 3, p. 615-620, 2005.

LIEBEL, F.; KAUR, S.; RUVOLO, E.; KOLLIAS, N.; SOUTHALL, M. D. Irradiation of Skin with Visible Light Induces Reactive Oxygen Species and Matrix-Degrading Enzymes. **Journal of Investigative Dermatology,** v. 132, n. 7, p. 1901-1907, 2012.

LIEBSCH, M.; SPIELMANN, H. INVITTOX Protocol No. 78: 3T3 NRU Phototoxicity Assay. European Commission DG-JRC, ECVAM, SIS Database, 1998. Last update October 2002. <http://ecvamsis.jrc.it/invittox/static/index.html>.

LIEBSCH, M.; SPIELMANN, H.; PAPE, W.; KRUL, C.; DEGUERCY, A.; ESKES, C. UV-induced effects. **Alternatives to Laboratory Animals,** v. 33, Suppl 1, p. 131-146, 2005.

LIM, H. W.; DRAELOS, Z. D. **Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection.** Inform Health Care USA, Inc. New York. 332 p., 2009.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews,** v. 4, n. 8, p. 118-126, 2010.

LUE, J.-M.; LIN, P. H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine,** v. 14, n. 4, p. 840-860, 2010.

MAHMOUD, B. H.; HEXSEL, C. L.; HAMZAVI, T. H.; LIM, H. W. Effects of visible light on the skin. **Photochemistry and Photobiology,** v. 84, n. 2, p. 450-462, 2008.

MAHMOUD, B.H.; RUVOLO, E.; HEXSEL, C.L.; LIU, Y. OWEN, M.R.; KOLLIAS, N.; LIM, H.W. et al. Impact of long-wavelenght UVA and visible light on melanocompetent skin. **Journal of Investigative Dermatology,** v.130, p.2092-2097, 2010.

MAIER, H.; SCHAUBERGER, G.; BRUNNHOFER, K.; HONIGSMANN, H. Change of ultraviolet absorbance of sunscreens by exposure to solar-simulated radiation. **Journal of Investigative Dermatology,** v. 117, n. 2, p. 256-262, 2001.

MAIER, H.; SCHAUBERGER, G.; MARTINCIGH, B. S.; BRUNNHOFER, K.; HONIGSMANN, H. Ultraviolet protective performance of photoprotective lipsticks: change of spectral transmittance because of ultraviolet exposure. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 21, p. 84-92, 2005.

MANSUR, J. S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M. C. A.; AZULAY, R. D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais de Dermatologia,** v. 61, n. 3, p. 121-124, 1986.

MARROT, L.; BELAIDI, J. P.; LEJEUNE, F.; MEUNIER, J. R.; ASSELINEAU, D.; BERNERD, F. Photostability of sunscreen products influences the efficiency of protection with regard to UV-induced genotoxic or photoageing-related endpoints. **British Journal of Dermatology,** v. 151, n. 6, p. 1234-1244, 2004.

MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (Matricaria recutita L.). **Phytotherapy Research,** v. 20, n. 7, p. 519-530, 2006.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 3-17, 2002. Supplement 1.

MICHAELI, A.; FEITELSON, J. Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides. **Photochemistry and Photobiology,** v. 59, p. 284-289, 1994.

MILLER, N. J.; RICEEVANS, C. A. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS (center dot+) radical cation assay. **Free Radical Research,** v. 26, n. 3, p. 195-199, 1997.

MORI, T.; MATSUNAGA, T.; HIROSE, T.; NIKAIDO, O. Establishment of a monoclonal-antibody recognizing ultraviolet light-induced (6-4) photoproducts. **Mutation Research,** v. 194, n. 3, p. 263-270, 1988.

MORTENSEN, A. Scavenging of acetylperoxyl radicals and quenching of triplet diacetyl by beta-carotene: mechanisms and kinetics. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology,** v. 61, n. 1-2, p. 62-67, 2001.

NAGAI, S.; OHARA, K.; MUKAI, K. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by flavonoids in ethanol solution. **Journal of Physical Chemistry B,** v. 109, n. 9, p. 4234-4240, 2005.

NASH, J. F.; TANNER, P. R. Relevance of UV filter/ sunscreen product photostability to human safety. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine,** v. 30, n. 2-3, p. 88-95, 2014.

NICHOLS, J. A.; KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of Dermatological Research,** v. 302, n. 2, p. 71-83, 2010.

NIELSEN, B. R.; JORGENSEN, K.; SKIBSTED, L. H. Triplet-triplet extinction coefficients, rate constants of triplet decay and rate constants of anthracene triplet sensitization by laser flash photolysis of astaxanthin, beta-carotene, canthaxanthin and zeaxanthin in deaerated toluene at 298 K. **Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry,** v. 112, n. 2-3, p. 127-133, 1998.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances,** v. 5, n. 35, p. 27986-28006, 2015.

OBA-SHINJO, S. M.; CORREA, M.; RICCA, T. I.; MOLOGNONI, F.; PINHAL, M. A.; NEVES, I. A.; MARIE, S. K. et al. Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. **Neoplasia,** v. 8, n. 3, p. 231-241, 2006.

OBERMULLER-JEVIC, U. C.; SCHLEGEL, B.; FLACCUS, A.; BIESALSKI, H. K. The effect of beta-carotene on the expression of interleukin-6 and heme oxygenase-1 in UV-irradiated human skin fibroblasts *in vitro*. **Febs Letters,** v. 509, n. 2, p. 186-190, 2001.

O'CONNOR, I.; O'BRIEN, N. Modulation of UVA light-induced oxidative stress by beta-carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. **Journal of Dermatological Science,** v. 16, n. 3, p. 226-230, 1998.

OECD. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test** (Original Guideline, adopted 13th April 2004). Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9743201e.pdf?expires=1466628972&id=id&accname=guest&checksum=D5FEB4E02B9ECBD98629087285DE907F>. Acesso em 01 jun. 2016.

ONOUE, S.; HOSOI, K.; TODA, T.; TAKAGI, H.; OSAKI, N.; MATSUMOTO, Y.; KAWAKAMI, S. et al. Intra-/inter-laboratory validation study on reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation using two different solar simulators. **Toxicology in Vitro,** v. 28, n. 4, p. 515-523, 2014.

ONOUE, S.; KAWAMURA, K.; IGARASHI, N.; ZHOU, Y.; FUJIKAWA, M.; YAMADA, H.; TSUDA, Y. et al. Reactive oxygen species assay-based risk assessment of drug-induced phototoxicity: Classification criteria and application to drug candidates. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 47, n. 4-5, p. 967-972, 2008.

ONOUE, S.; TSUDA, Y. Analytical studies on the prediction of photosensitive/phototoxic potential of pharmaceutical substances. **Pharmaceutical Research,** v. 23, n. 1, p. 156-164, 2006.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International,** v. 74, p. 10-36, 2015.

PARRISH, J. A.; JAENICKE, K. F.; ANDERSON, R. R. Erythema and melanogenesis action spectra of normal human-skin. **Photochemistry and Photobiology,** v. 36, n. 2, p. 187-191, 1982.

PATHAK, M. A.; FITZPATRICK, T. B. Preventive treatment of sunburn, dermatoheliosis, and skin cancer with sun-protective agents. In: FITZPATRICK, T. B.; EISEN, A. Z.; WOLFF, K.; FREEDBERG, I. M.; AUSTEN, K. F. 4. ed. **Dermatology in general medicine**. v. 1: New York: McGraw Hill, Inc., 1993, cap. 137, p. 1689–1716.

PELLATI, F.; PRENCIPE, F. P.; BERTELLI, D.; BENVENUTI, S. An efficient chemical analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by microwave-assisted extraction combined with high-performance liquid chromatography using the fused-core technology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 81-82, p. 126-132, 2013.

PETERS, B.; HOLZHUTTER, H. G. *In vitro* phototoxicity testing: Development and validation of a new concentration response analysis software and biostatistical analyses related to the use of various prediction models. **Atla-Alternatives to Laboratory Animals,** v. 30, n. 4, p. 415-432, 2002.

PICHICHERO, E.; CICCONI, R.; MATTEI, M.; MUZI, M. G.; CANINI, A. Acacia honey and chrysin reduce proliferation of melanoma cells through alterations in cell cycle progression. **International Journal of Oncology,** v. 37, n. 4, p. 973-981, 2010.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products,** v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PINNELL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of the American Academy of Dermatology,** v. 48, n. 1, p. 1-19, 2003.

PLONKA, P. M. Electron paramagnetic resonance as a unique tool for skin and hair research. **Experimental Dermatology,** v. 18, n. 5, p. 472-484, 2009.

RANDHAWA, M.; SEO, I.; LIEBEL, F.; SOUTHALL, M. D.; KOLLIAS, N.; RUVOLO, E. Visible Light Induces Melanogenesis in Human Skin through a Photoadaptive Response. **Plos One,** v. 10, n. 6, 2015.

REHDER, J.; SOUTO, L. R. M.; ISSA, C. M. B. M.; PUZZI, M. B. Model of human epidermis reconstructed *in vitro* with keratinocytes and melanocytes on dead de-epidermized human dermis. **Sao Paulo Medical Journal,** v. 122, n. 1, p. 22-25, 2004.

ROBERTS, W. G.; GORDON, M. H. Determination of the total antioxidant activity of fruits and vegetables by a liposome assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 51, n. 5, p. 1486-1493, 2003.

RODRIGUES, D.; VIOTTO, A. C.; CHECCHIA, R.; GOMIDE, A.; SEVERINO, D.; ITRI, R.; BAPTISTA, M. S. et al. Mechanism of Aloe Vera extract protection against UVA: shelter of lysosomal membrane avoids photodamage. **Photochemical & Photobiological Sciences,** v. 15, n. 3, p. 334-350, 2016.

RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; MERCADANTE, A. Z. Scavenging Capacity of Marine Carotenoids against Reactive Oxygen and Nitrogen Species in a Membrane-Mimicking System. **Marine Drugs,** v. 10, n. 8, p. 1784-1798, 2012.

ROMANHOLE, R. C.; ATAIDE, J. A.; MORIEL, P.; MAZZOLA, P. G. Update on ultraviolet A and B radiation generated by the sun and artificial lamps and their effects on skin. **International Journal of Cosmetic Science,** v. 37, n. 4, p. 366-370, 2015.

ROTTIER, P. B.; VANDERLEUN, J. C. Hyperaemia of the deeper cutaneous vessels after irradiation of human skin with large doses of ultra-violet and visible light. **British Journal of Dermatology,** v. 72, n. 7, p. 256-260, 1960.

SACHDEVA, S. Fitzpatrick skin typing: Applications in dermatology. **Indian Journal of Dermatology Venereology & Leprology,** v. 75, n. 1, p. 93-96, 2009.

SAINT-LEGER, D. The colour of the human skin: fruitful science, unsuitable wordings. **International Journal of Cosmetic Science,** v. 37, n. 3, p. 259-265, 2015.

SERPONE, N.; SALINARO, A.; EMELINE, A. V.; HORIKOSHI, S.; HIDAKA, H.; ZHAO, J. C. An *in vitro* systematic spectroscopic examination of the photostabilities of a random set of commercial sunscreen lotions and their chemical UVB/UVA active agents. **Photochemical & Photobiological Sciences,** v. 1, n. 12, p. 970-981, 2002.

SHAATH, N. A. Ultraviolet filters. **Photochemical & Photobiological Sciences,** v. 9, n. 4, p. 464-469, 2010.

SHI, H. L.; NOGUCHI, N.; NIKI, E. Comparative study on dynamics of antioxidative action of alpha-tocopheryl hydroquinone, ubiquinol, and alpha-tocopherol, against lipid peroxidation. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 27, n. 3-4, p. 334-346, 1999.

SIES, H.; MENCK, C. F. M. Singlet oxygen induced DNA damage. **Mutation Research,** v. 275, n. 3-6, p. 367-375, 1992.

SILVAN, S.; MANOHARAN, S.; BASKARAN, N.; ANUSUYA, C.; KARTHIKEYAN, S.; PRABHAKAR, M. M. Chemopreventive potential of apigenin in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced experimental oral carcinogenesis. **European Journal of Pharmacology,** v. 670, n. 2-3, p. 571-577, 2011.

SIM, G.-S.; LEE, B.-C.; CHO, H.S.; LEE, J.W.; KIM, J.-H.; LEE, D.-H.; KIM, J.-H.; PYO, H.-B.; MOON, D.C.; OH, K.-W.; YUN, Y.P.; HONG, J.T. Structure activity relationship of antioxidative property of flavonoids and inhibitory effect on matrix metalloproteinase activity in UVA-irradiated human dermal fibroblast. **Archives of Pharmacal Research,** v. 30, n. 3, p. 290-298, 2007.

SIMIS, T.; SIMIS, D. R. C. Doenças da Pele Relacionadas à Radiação Solar. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 8, n.1, p.1-8, 2006.

SIMON, J. D.; PELES, D. N. The Red and the Black. **Accounts of Chemical Research,** v. 43, n. 11, p. 1452-1460, 2010.

SIMON, J. D.; PELES, D.; WAKAMATSU, K.; ITO, S. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. **Pigment Cell & Melanoma Research,** v. 22, n. 5, p. 563-579, 2009.

SKLAR, L. R.; ALMUTAWA, F.; LIM, H. W.; HAMZAVI, I. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review. **Photochemical & Photobiological Sciences,** v. 12, n. 1, p. 54-64, 2013.

STEENVOORDEN, D. P. T.; VAN HENEGOUWEN, G. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology,** v. 41, n. 1-2, p. 1-10, 1997.

SUWANNATEEP, N.; WANICHWECHARUNGRUANG, S.; HAAG, S. F.; DEVAHASTIN, S.; GROTH, N.; FLUHR, J. W.; LADEMANN, J. et al. Encapsulated curcumin results in prolonged curcumin activity *in vitro* and radical scavenging activity *ex vivo* on skin after UVB-irradiation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 82, n. 3, p. 485-490, 2012.

SUZUKAWA, A. A.; VIEIRA, A.; BROCHADO WINNISCHOFER, S. M.; SCALFO, A. C.; DI MASCIO, P.; DA COSTA FERREIRA, A. M.; RAVANAT, J.-L. et al. Novel properties of melanins include promotion of DNA strand breaks, impairment of repair, and reduced ability to damage DNA after quenching of singlet oxygen. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 52, n. 9, p. 1945-1953, 2012.

TADA, M.; KOHNO, M.; NIWANO, Y. Scavenging or Quenching Effect of Melanin on Superoxide Anion and Singlet Oxygen. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition,** v. 46, n. 3, p. 224-228, 2010.

TADOKORO, T.; KOBAYASHI, N.; ZMUDZKA, B. Z.; ITO, S.; WAKAMATSU, K.; YAMAGUCHI, Y.; KOROSSY, K. S. et al. UV-induced DNA damage and melanin content in human skin differing in racial/ethnic origin. **Faseb Journal,** v. 17, n. 6, p. 1177-1179, 2003.

TAKEUCHI, S.; ZHANG, W. G.; WAKAMATSU, K.; ITO, S.; HEARING, V. J.; KRAEMER, K. H.; BRASH, D. E. Melanin acts as a cause an atypical potent UVB photosensitizer to mode of cell death in murine skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 101, n. 42, p. 15076-15081, 2004.

TEDESCO, A. C.; MARTINEZ, L.; GONZALEZ, S. Photochemistry and photobiology of actinic erythema: Defensive and reparative cutaneous mechanisms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** v. 30, n. 5, p. 561-575, 1997.

TERAO, J.; MINAMI, Y.; BANDO, N. Singlet molecular oxygen-quenching activity of carotenoids: relevance to protection of the skin from photoaging. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition,** v. 48, n. 1, p. 57-62, 2011.

TOFFOLETTI, A.; CONTI, F.; SANDRON, T.; NAPOLITANO, A.; PANZELLA, L.; D'ISCHIA, M. Time-resolved EPR observation of synthetic eumelanin-superoxide radical pairs. **Chemical Communications**, n. 33, p. 4977-4979, 2009.

TSUJI, P.A.; WALLE, T. Cytotoxic effects of the dietary flavones chrysin and apigenin in a normal trout liver cell line. **Chemico-Biological Interactions**, v. 171, p. 37–44, 2008.

TYRREL, R. M. The molecular and cellular pathology of solar ultraviolet radiation. **Molecular Aspects of Medicine,** v. 15, n. 1, p. 1-77, 1994.

UCHOA, A. F.; KNOX, P. P.; TURCHIELLE, R.; SEIFULLINA, N. K.; BAPTISTA, M. S. Singlet oxygen generation in the reaction centers of Rhodobacter sphaeroides. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters,** v. 37, n. 6, p. 843-850, 2008.

UMLAS, M. E.; FRANKLIN, W. A.; CHAN, G. L.; HASELTINE, W. A. Ultraviolet-light irradiation of defined-sequence DNA under conditions of chemical photosensitization. **Photochemistry and Photobiology,** v. 42, n. 3, p. 265-273, 1985.

UYEN, L. D. P.; NGUYEN, D. H.; KIM, E.-K. Mechanism of skin pigmentation. **Biotechnology and Bioprocess Engineering,** v. 13, n. 4, p. 383-395, 2008.

VANDERSEE, S.; BEYER, M.; LADEMANN, J.; DARVIN, M. E. Blue-Violet Light Irradiation Dose Dependently Decreases Carotenoids in Human Skin, Which Indicates the Generation of Free Radicals. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2015.

VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A. S. O.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (*in vitro*) – revisão. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 27-34, 2011.

VILLELA, A.; VAN DER KLIFT, E. J. C.; MATTHEUSSENS, E. S. G. M.; DERKSEN, G. C. H.; ZUILHOF, H.; VAN BEEK, T. A. Fast chromatographic separation for the quantitation of the main flavone dyes in Reseda luteola (weld). **Journal of Chromatography A,** v. 1218, n. 47, p. 8544-8550, 2011.

WEINSTEIN, J. N.; YOSHIKAMI, S.; HENKART, P.; BLUMENTHAL, R.; HAGINS, W. A. Liposome-cell interaction - transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker. **Science,** v. 195, n. 4277, p. 489-492, 1977.

WERTZ, P. W. Lipids and barrier function of the skin. **Acta Dermato-Venereologica**, p. 7-11, 2000.

WLASCHEK, M.; TANTCHEVA-POOR, I.; NADERI, L.; MA, W. J.; SCHNEIDER, A.; RAZI-WOLF, Z.; SCHULLER, J. et al. Solar UV irradiation and dermal photoaging. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology,** v. 63, n. 1-3, p. 41-51, 2001.

WU, N.-L.; FANG, J.-Y.; CHEN, M.; WU, C.-J.; HUANG, C.-C.; HUNG, C.-F. Chrysin Protects Epidermal Keratinocytes from UVA- and UVB-Induced Damage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 59, n. 15, p. 8391-8400, 2011.

YADAV, A. K.; MANIKA, N.; BAGCHI, G. D.; GUPTA, M. M. Simultaneous determination of flavonoids in Oroxylum indicum by RP-HPLC. **Medicinal Chemistry Research,** v. 22, n. 5, p. 2222-2227, 2013.

YANISHLIEVA, N. V.; AITZETMULLER, K.; RANEVA, V. G. Beta-carotene and lipid oxidation. **Fett-Lipid,** v. 100, n. 10, p. 444-462, 1998.

YASUI, H.; SAKURAI, H. Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 269, n. 1, p. 131-136, 2000.

YE, Y.; CHOU, G.-X.; WANG, H.; CHU, J.-H.; YU, Z.-L. Flavonoids, apigenin and icariin exert potent melanogenic activities in murine B16 melanoma cells. **Phytomedicine,** v. 18, n. 1, p. 32-35, 2010.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology,** v. 54, n. 3, p. 176-186, 2001.

ZASTROW, L.; GROTH, N.; KLEIN, F.; KOCKOTT, D.; LADEMANN, J.; RENNEBERG, R.; FERRERO, L. The Missing Link - Light-Induced (280-1,600 nm) Free Radical Formation in Human Skin. **Skin Pharmacology and Physiology,** v. 22, n. 1, p. 31-44, 2009.

ZONIOS, G.; DIMOU, A.; BASSUKAS, I.; GALARIS, D.; TSOLAKIDIS, A.; KAXIRAS, E. Melanin absorption spectroscopy: new method for noninvasive skin investigation and melanoma detection. **Journal of Biomedical Optics,** v. 13, n. 1, 2008.

ZUNINI, M. P.; ROJAS, C.; DE PAULA, S.; ELINGOLD, I.; MIGLIARO, E. A.; CASANOVA, M. B.; RESTUCCIA, F. I. et al. Phenolic contents and antioxidant activity in central-southern uruguayan propolis extracts. **Journal of the Chilean Chemical Society,** v. 55, n. 1, p. 141-146, 2010.