UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da atividade fotoquimiopreventiva do extrato de
calêndula**

Yris Maria Fonseca

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da atividade fotoquimiopreventiva do extrato de
calêndula**

Tese de doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

Orientada: Yris Maria Fonseca

Orientadora: Prof^a. Dr^a Maria José Vieira
Fonseca

Ribeirão Preto
2010

Resumo

RESUMO

FONSECA, Y. M. **Avaliação da atividade fotoquimiopreventiva do extrato de Calêndula**. 2010. 165f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Tem sido reportado que os danos induzidos pela radiação ultravioleta (RUV) são devidos principalmente pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Assim, compostos capazes de inibir a ação e a formação destas EROs, são capazes de proteger a pele dos danos induzidos pela RUV. O objetivo deste trabalho foi obter o extrato padronizado de calêndula (*calendula officinalis*), avaliar sua toxicidade em cultura de células e sua eficácia antioxidante. Além disso, formulações tópicas contendo este extrato foram desenvolvidas e sua capacidade de penetração na pele foi avaliada. Foi avaliado também, o efeito protetor do extrato de calêndula e de formulações tópicas adicionadas deste extrato contra os danos induzidos pela radiação UVB na pele, em camundongos sem pêlos irradiados com radiação UVB. O conteúdo de polifenóis, flavonóides, rutina e narcissina encontrado no extrato de calêndula foram 0,46%, 0,29%, 239 µg/mL e 1,83 mg/mL, respectivamente. A avaliação da eficácia antioxidante demonstrou o efeito dose-dependente do extrato de calêndula contra diferentes radicais. O experimento de citotoxicidade demonstrou que o extrato de calêndula não foi tóxico para fibroblastos de camundongo (L929), células de hepatoma humano (HepG2) e células de melanoma de camundongo (B16F10) em concentrações abaixo ou iguais a 100 µL/mL. Entretanto, em concentrações maiores ou iguais a 200 µL/mL foi observado efeito tóxico. Todas as formulações foram estáveis fisicamente e funcionalmente. A formulação tipo gel foi mais eficiente para reter o extrato de calêndula na pele, uma vez que foram detectados 0,21 µg/cm² de narcissina e 0,07 µg/cm² de rutina na epiderme viável. O extrato de calêndula e a formulação gel foram capazes de manter os níveis de GSH próximos aos níveis de animais não irradiados. Entretanto, o extrato de calêndula e a formulação gel não foram capazes de inibir a atividade de metaloproteinasas e mieloperoxidases aumentadas pela irradiação UVB. Além disso, a formulação gel adicionada de extrato de calêndula reduziu modificações histológicas induzidas pela radiação UVB na pele, como modificações das fibras de colágeno. A aplicação tópica de extrato de calêndula em formulações tipo gel promoveu efeito fotoprotetor em camundongos sem pêlo, provavelmente devido a uma possível melhoria da síntese de colágeno no tecido conjuntivo subepidermal. Estes resultados dão boas perspectivas para utilizar o extrato de calêndula topicamente ou oralmente para prevenir e/ou tratar os danos induzidos pela radiação UV na pele.

Palavras chave: atividade antioxidante, *Calendula officinalis*, formulação tópica, fotoquimioprevenção, permeação e retenção.

Abstract

ABSTRACT

FONSECA, Y. M. **Evaluation of photochemopreventive activity of marigold extract.** 2010. 165f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

It has been reported that UV-induced damage is due mainly to the generation of reactive oxygen species (ROS). Then, compounds able to inhibit the action and the formation of these ROS, will be able to protect the skin from UV-induced damage. Thus, the purpose of this work was to obtain standardized marigold extract (*calendula officinalis*), to evaluate their toxicity in cell culture and their antioxidant efficacy. In addition, topical formulations added with this extract were developed and their penetration skin capacity was evaluated. It was also investigated, the protective effect of the marigold extract and of the topical formulations added with this extract against UVB-induced damages in skin, in ultraviolet-irradiated hairless mice. The polyphenols, flavonoids, rutin and narcissin contents found in marigold extract were 0.46%, 0.29%, 239 µg/mL and 1.83 mg/mL, respectively. The evaluation of antioxidant efficacy demonstrated the dose-dependent effect of marigold extract against different radicals. Cytotoxicity experiments demonstrated that marigold extract was not cytotoxic for mice fibroblasts (L929), human hepatoma cells (HepG2) and mouse melanoma cells (B16F10) at concentrations less than or equal to 100 µL/mL. However, at concentrations greater than or equal to 200 µL/mL were observed toxic effects. All formulations were physical and functionally stable. Gel formulation was the most effective for delivery of marigold extract in skin, since it was detected 0.21 µg/cm² of narcissin and 0.07 µg/cm² of rutin in the viable epidermis. Marigold extract and gel formulation were able to maintain glutathione reduced levels close to non-irradiated animals. However, marigold extract and gel formulation were not able to inhibit the gelatinase-9 and myeloperoxidase activities increased by UVB irradiation. In addition, gel formulation added to marigold extract reduced the histological skin changes induced by UVB-irradiation, as modifications of collagen fibrils. Topical application of marigold extract in gel formulation provided photoprotective effect in hairless mice, probably related to a possible improvement of the collagen synthesis in the subepidermal connective tissue. These results give good perspectives to apply marigold extract topically and orally in order to prevent and/or treat UV-damaged skin.

Key words: antioxidant activity, *Calendula officinalis*, topical formulation, photochemoprevention, permeation and retention.

*Introdução e Revisão da
Literatura*

1 Introdução

1.1 Radiação solar e os danos causados à pele

A pele está exposta a um elevado estresse oxidativo em que poucos tecidos estão sujeitos ao longo da vida. Existem diferentes fontes exógenas de estresse que agem com efeitos prejudiciais às células, dentre elas estão a radiação ultravioleta - RUV e a poluição (MELONI; NICOLAY, 2003).

A fotolesão da pele refere-se às alterações do tecido cutâneo, causadas pela exposição aguda ou crônica a RUV (PAGNONI, 2003). Tais alterações incluem, a curto e médio prazo, perda de água, perda da elasticidade, eritema, queimadura, descamação e manchas. Pode ocorrer ainda, fotoimunossupressão, fotossensibilidade e fotoalergia. A longo prazo a RUV leva ao fotoenvelhecimento, elastose, danos oculares e câncer de pele (OLIVEIRA et al., 2004).

A radiação UV se divide em três regiões espectrais, UVA (320-400 nm), UVB (320-290 nm) e UVC (290-100 nm). As principais regiões espectrais envolvidas na fotolesão são as radiações UVA e UVB, pois a radiação UVC é quase totalmente absorvida pela camada de ozônio. As radiações UVA e UVB diferem em seus sítios de ação na geração de lesões. A radiação UVA é menos energética que a UVB, mas possui maior poder de penetração, sendo que o seu principal modo de ação se dá pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (VIOUX-CHAGNOLEAU et al., 2006). Fotossensibilizantes endógenos, como DNA, porfirinas, ácido urocânico e aminoácidos aromáticos, excitados, pela captura de fótons da radiação UVA, transferem a energia para o oxigênio molecular conduzindo a geração de EROs.

No entanto, os raios UVB possuem energia suficiente para induzirem, diretamente, lesões às moléculas de DNA, e podem também gerar EROs. Os danos diretos ao DNA são, principalmente, dirigidos aos sítios dipirimidínicos, onde as bases pirimidínicas tornam-se dimerizadas por um anel ciclobutano nas posições 5 e 6 de bases vizinhas, formando um dímero ciclobutano pirimidino (CPD), ou pela ligação da sexta posição de uma base à quarta posição da próxima base, formando o fotoproduto 6-4 pirimidino-pirimidona (6-4PP) (Figura 1) (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004).

Figura 1: Fotoprodutos gerados pela exposição do DNA à radiação UVB. Onde, (a) Dímero ciclobutano pirimidino (CPD) e (b) Fotoproducto 6-4 pirimidino-pirimidona (6-4PP). Reproduzido de Ichihashi e colaboradores (2003).

As EROs formadas pela RUV incluem tanto espécies radiculares como não radiculares. As espécies radiculares mais importantes nos organismos vivos incluem hidroxil ($\bullet\text{OH}$), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), óxido nítrico ($\text{NO}^{\bullet}$) e peroxil ($\text{RO}_2^{\bullet}$) e compostos não radiculares podem ser representados por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio no estado singleto ($^1\text{O}_2$) (ARUOMA, 1998).

A epiderme contém defesas antioxidantes incluindo enzimas, como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase, sequestradores de radicais livres, como vitamina C e E, carotenóides e glutathione reduzida (GSH), as quais removem as EROs da pele. As EROs são formadas continuamente nas células como consequência de reações bioquímicas oxidativas e de fatores externos. Diante de condições anormais, como inflamação, isquemia, presença de íons ferro catalíticos e exposição à RUV, ocorre aumento na produção de EROs e pode ocorrer depleção das defesas antioxidantes naturais, deixando a pele vulnerável ao ataque destas (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005).

Das principais classes de biomoléculas (açúcares, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios), que podem ser atacadas pelas EROs, os lipídios são, provavelmente, os mais susceptíveis (INAL; KANBAK; SUNAL, 2001), pois as membranas biológicas contém

consideráveis quantidades de lipídios altamente insaturados e são banhadas por fluídos ricos em oxigênio e metal (BUEGE; AUST, 1978).

A peroxidação lipídica induzida por radiação UV pode conduzir a desorganização da membrana celular com liberação de fosfolipídios. Estes fosfolipídeos, associados a um aumento das atividades da fosfolipase A₂ (PLA₂) e da ciclooxigenase-2 (COX-2) induzidas, também, pela RUV, resultam em níveis maiores de produção de prostaglandinas (PG), incluindo a prostaglandina E₂ (PGE₂), que causa inflamação na pele (HRUZA; PENATLAND, 1993; KANGROTONDO et al., 1993; LIU et al., 2003; WILGUS et al., 2003). Rijken e colaboradores (2006) relatam que as funções presumíveis do processo inflamatório instalado após RUV na pele é de remover e reparar os tecidos e as células danificadas.

As células inflamatórias irão produzir EROs e causar danos aos lipídios, proteínas e DNA (HALLIDAY, 2005). O fator nuclear-kappa B (NF-kB) é sensível ao estresse oxidativo e capaz de ativar genes envolvidos na produção de substâncias pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas (IL-1 α , IL-1 β e IL-6) que promovem a reação de outras células efetoras como leucócitos e células endoteliais (CARINI et al., 2000; FUCHS, 1998).

Citocinas liberadas pela exposição à radiação UV poderiam atuar de modo autócrino e parácrino sobre células epidermais e leucócitos infiltrados, estimulando a sinalização intracelular e alterando a expressão gênica. A exemplo disto, a interleucina-1 (IL-1), liberada de células epidermais expostas à luz UV e de células inflamatórias, pode prontamente induzir a sinalização intracelular de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAP quinases) (JANSSENS; BEYAERT, 2003). Estas MAP quinases compreendem um grande número de proteínas serina/treonina quinases envolvidas na regulação de diferentes processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, adaptação ao estresse e apoptose.

As subfamílias multi-membros das MAP quinases, quinase regulada por sinal extracelular (ERK), a quinase c-Jun N-terminal (JNK) e as quinases p38 são ativadas em queratinócitos, em resposta ao dano oxidativo causado pela RUV e por citocinas inflamatórias, e podem, potencialmente, influenciar a sobrevivência celular (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005). A ativação destas subfamílias resulta no aumento da expressão do fator de transcrição c-Jun na pele humana, que juntamente com o fator de transcrição constitutivamente expresso c-Fos, formam o complexo AP-1, um fator de transcrição altamente ativo.

A atividade aumentada de AP-1 é necessária para a indução de membros chave da família das metaloproteinases (MMPs), as quais são responsáveis pela degradação de colágeno e fibras elásticas na pele (KIM et al., 2005; XU; FISHER, 2005). Baseado em similaridades estruturais e especificidade ao substrato, as MMPs são divididas em sub-classes, incluindo collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinases e outras não classificadas (MOON; CHUNG, 2006). Em humanos há três collagenases distintas: MMP-1 (colagenase 1 ou colagenase intersticial), MMP-8 (colagenase 2 ou colagenase de neutrófilos) e MMP-13 (colagenase 3) (FISHER et al., 2001).

MMP-1 é expressa por queratinócitos e fibroblastos no “turnover” normal do colágeno e remodelamento da matriz durante a cicatrização de feridas. MMP-1, dentre as enzimas capazes de degradar o colágeno presente na pele, é a que apresenta maior atividade enzimática, além de ser extensivamente induzida pela exposição à radiação ultravioleta (BRENNAN et al., 2003). MMP-8 é expressa, predominantemente por neutrófilos e liberada durante processo inflamatório. MMP-13 é expressa em vários cânceres epiteliais e por fibroblastos em úlceras cutâneas crônicas, mas diferentemente de MMP-1, não é expressa por queratinócitos ou fibroblastos durante a cicatrização (FISHER et al., 2001).

Sob condições fisiológicas normais, as MMPs ativadas são controladas por inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) e são geralmente expressas em baixos níveis. No entanto, os níveis de algumas destas MMPs podem ser elevados rapidamente quando o tecido é submetido à radiação UV (FISHER et al., 1996; FISHER et al., 1997), durante a inflamação, a cicatrização de feridas e câncer no estágio de progressão (STEENVOORDEN et al., 2001; ZUCKER et al., 2003).

A radiação UV induz aumento nos níveis de RNAm, de proteína e atividade enzimática de pelo menos três MMPs. São elas: MMP-1, que degrada fibras de colágeno tipo I e III, MMP-3 (estromelisinase-1) que degrada colágeno tipo IV e MMP-9 (gelatinase-B) que degrada fragmentos de colágeno gerados por MMP-1. Juntas, estas MMPs têm a capacidade de degradar a maior parte das proteínas estruturais que compõem o tecido conjuntivo dérmico. Inicialmente, MMP-1 cliva as moléculas tripla hélice de colágeno em fragmentos de $\frac{1}{4}$ e $\frac{3}{4}$ de comprimento e estes são então clivados em fragmentos menores pelas MMPs 3 e 9 (FISHER et al., 2001; XU; FISHER, 2005). Estes fragmentos menores não inibem a síntese de pró-colágeno, mas os fragmentos maiores do colágeno tipo I regulam negativamente a sua síntese (VARANI et al., 2001).

Na pele fotoenvelhecida, as fibrilas de colágeno são encurtadas, adelgadas e desorganizadas. Além disso, ocorre uma extensiva fragmentação do colágeno, acúmulo de fragmentos e a interação de fibroblastos com a matriz danificada (VARANI et al., 2001). Schwartz e colaboradores (1993) relatam que o conteúdo de colágeno total na pele danificada pelo sol é 20% menor que na pele não exposta ao sol. Esta redução pode resultar do aumento da degradação pelas metaloproteinases e/ou da redução da síntese de pró-colágeno (TZAPHLIDOU, 2004).

Estudos clínicos recentes indicam que a relação entre MMPs e alguns processos patológicos não é simples. Por exemplo, o aumento na atividade de MMPs pode promover a progressão de um tumor ou inibi-la. Esta complexa relação entre expressão de MMPs e câncer tem aumentado o interesse para o entendimento da função das MMPs *in vivo*, mas também tem atraído a atenção para MMPs e patologias, e relativamente menos atenção tem sido dada nos papéis normais destas enzimas (PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007).

O desenvolvimento de câncer é um fenômeno complexo envolvendo três estágios distintos: iniciação, promoção e progressão, que são mediados por várias mudanças celulares, bioquímicas e moleculares.

A radiação UV causa mutações, aumenta a proliferação celular, e é considerada um carcinógeno completo, pois pode causar câncer de pele sem exigir a presença adicional de iniciadores ou promotores. A carcinogênese por UV, frequentemente, envolve a inativação de um ou mais genes supressores de tumores ou a superativação de protooncogenes (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004).

O processo carcinogênico gerado pela RUV é iniciado por danos ao DNA. No caso da radiação UVB, ocorre dano ao DNA pela formação direta de dímeros de pirimidina ou ciclobutanos e fotoprodutos 6-4. Os danos são causados por ligação errônea de duas pirimidinas na mesma fita de DNA. Em vez de ocorrer o pareamento clássico AT ou GC, as bases podem ligar-se por meio de CC, TT ou CT. No caso da radiação UVA, a principal causa do dano genético é a formação de EROs, as quais podem causar lesões nas bases que compõem a molécula de DNA causando pareamentos errôneos e dessa maneira podem levar ao câncer (BACHELOR; BOWDEN, 2004; HECK et al., 2004; MARTINEZ et al., 2006).

1.2 Extratos vegetais como agentes fotoquimiopreventivos

Em decorrência da destruição da camada de ozônio pela poluição, a incidência de RUV sobre a terra tem aumentado, e conseqüentemente, o número de casos de câncer de pele tem elevado cada vez mais. Kiguti e colaboradores (2009) destacam que durante vários meses do ano o território brasileiro apresenta, em condições de céu claro, índice ultravioleta (IUV) considerados extremos pela Organização Mundial da Saúde, por serem maiores que 9. A exemplo disto, na cidade de São Paulo – Brasil, uma das mais populosas do mundo, o IUV apresentou valores considerados extremos pela OMS durante a maior parte do ano ($IUV > 10$). A média obtida foi de 10,1 ($\pm 3,1$), com máximo de 16,1, no verão, e mínimo de 4,6, no inverno (CORRÊA, 2003).

No Brasil, o câncer de pele continua sendo o tipo mais incidente para ambos os sexos. O número de casos novos de câncer de pele não melanoma para 2008 foi de 55.890 casos em homens e de 59.120 em mulheres, de acordo com a estimativa de incidência de câncer publicada pelo INCA. Estes valores correspondem a um risco estimado de 62 casos novos a cada 100 mil homens e 60 para cada 100 mil mulheres. Quanto ao melanoma, sua letalidade é elevada, porém sua incidência é baixa (2.950 casos novos em homens e 2.970 casos novos em mulheres).

Diferentes trabalhos descrevem que os danos causados pela radiação solar podem ser devido à geração de radicais livres. Desta forma, substâncias capazes de inibir a ação ou geração destes radicais livres podem ser capazes de evitar ou minimizar os danos causados pela radiação solar, como exemplo o câncer de pele.

Fotoquimioprevenção é o termo que defini o uso de agentes capazes de melhorar os efeitos adversos da RUV na pele (F'GUYER; AFAQ; MUKHTAR, 2003). A fotoquimioprevenção tem sido apreciada como um modo viável de reduzir a ocorrência de câncer de pele. Nos últimos anos, o uso de agentes, especialmente antioxidantes botânicos, presentes na dieta comum e em bebidas consumidas pela população, tem recebido considerável atenção como agentes fotoquimiopreventivos para uso humano. Muitos destes agentes também têm encontrado um lugar nos produtos de cuidado para pele (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005).

Casagrande e colaboradores (2006) relatam que a administração tópica de antioxidantes é um eficiente modo para enriquecer o sistema protetor cutâneo endógeno, e assim uma estratégia de sucesso para reduzir os danos oxidativos à pele causados pela RUV. F'guyer, Afaq e Mukhtar (2003) também concluem que o uso de produtos para

cuidados da pele, suplementados com substâncias antioxidantes de origem natural, pode ser um modo efetivo de reduzir os danos causados pelas EROs gerados pela RUV.

Atualmente, há um grande interesse no uso de extratos vegetais visando reduzir o risco de cânceres melanoma e não melanoma na pele. Alguns trabalhos já demonstram a eficácia fotoquimioprotetora de extratos vegetais e de substâncias isoladas de plantas, a qual tem sido atribuída à sua capacidade antioxidante e/ou antiinflamatória.

A exemplo disto, o chá verde (*Camelia sinensis*) demonstrou ser capaz de reduzir a produção de EROs induzida pela RUV, como peróxidos lipídicos e de hidrogênio, assim como de óxido nítrico, na pele humana (KATIYAR; AFAQ; MUKTAR, 2001). Tem sido demonstrado também, que os polifenóis do chá verde e a epigallocatequina-3-galato (EGCG) previnem a depleção de enzimas antioxidante, como glutathione peroxidase, catalase e glutathione na pele de camundongos irradiados com radiação UVB (VAYALIL; ELMETS; KATIYAR, 2003). O resveratrol demonstrou-se capaz de reduzir o edema, a geração de peróxido de hidrogênio, a infiltração de leucócitos e a incidência de tumor em camundongos irradiados com radiação UVB (GONZÁLEZ; FERNANDEZ-LORENTE; GILABERTE-CALZADA, 2008).

Da mesma forma, muitas outras substâncias de origem natural, como ácido ascórbico (DARR et al., 1992; MANELA-AZULAY et al., 2003), quercetina (CASAGRANDE et al., 2006) e isoflavonóides da soja (GEORGETTI et al., 2008) têm demonstrado comprovada eficácia na fotoquimioproteção.

Muitos extratos de origem natural, que contêm grande quantidade de compostos fenólicos, vêm sendo estudados e têm demonstrado uma pronunciada atividade antioxidante e antiinflamatória, tais como a calêndula (HAMBURGEER et al., 2003; ZITTERL-EGLESEER et al., 1997), dentre vários outros. Sugere-se que estes extratos de origem natural, com propriedade antioxidante e antiinflamatória, podem ser eficazes na prevenção dos danos solares.

1.3 *Calendula officinalis* e suas propriedades

A calêndula (*Calendula officinalis*) é um dos poucos remédios naturais que tem mantido sua popularidade ao longo dos anos. Trata-se de uma planta herbácea pertencente à família *Asteraceae*. Apresenta flores dispostas em capítulos com 3 a 7 cm, linguadas na periferia, com corolas amarelas ou alaranjadas (Figura 2). É originária do Mediterrâneo e adaptada no Brasil, onde pode ser denominada como maravilha. Nos

Estados Unidos é denominada Marigold (DUMENIL et al., 1980; FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2001).

Figura 2: Flor de *Calendula officinalis*.

Reproduzido de <http://www.wamigadasflores.blogspot.com/2008_05_15_archive.html> Site visitado em: 21/11/2008.

Trata-se de uma planta medicinal e cosmética muito utilizada no Brasil, Europa e Estados Unidos. Diversas farmacopéias, como a brasileira (IV edição, 2001) e europeia (suplemento de 1999) descrevem as características desta planta. Com as flores de Calêndula são feitos extratos, tinturas, bálsamos e pomadas, os quais são aplicados diretamente à pele para curar feridas e inflamações da pele (BROWN; DATNER, 1998; CARVALHO, 2004).

Apresenta em sua composição fitoquímica: saponinas triterpênicas (calendulosídeos A, D, D₂ e F), álcoois triterpênicos (arnidiol, faradiol, ácido faradiol-3-mirístico, lupeol, taraxasterol e ácido faradiol-3-palmítico) (KASPRZYK; PYREK, 1968), ésters triterpênicos (faradiol-3-O-laurato, faradiol-3-O-miristato, faradiol-3-O-palmitato, maniladiol-3-O-laurato, maniladiol-3-O-miristato, ψ -taraxasterol, β -amirina, entre outros) (NEUKIRCH et al., 2004), carotenóides (α , β e Z β -caroteno, licopeno, rubixantina, anteraxantina, mutatoxantina e luteína) (BAKÓ; DELI; TÓTH, 2002; KISHIMOTO et al., 2005), flavonóides (derivados do quercetol e do isorramnetol: quercetina, rutina, isorhamnetina, kaempferol, entre outros) (PIETTA; MAURI; RAVA, 1992), cumarinas, óleo essencial (mono e sesquiterpênicos: carvona, geranilacetona, mentona, isomentona, cariofileno, α e β -iononas, penduculatina e dihidroactinidiólido), ácido málico, mucilagem, resina, goma (calendulina), substância amarga (calendeno e

calendina), tanino, poliacetilenos, ácidos graxos, sitoesteróis, estigmasterol, isofucoesterol, campesterol, metil-(enecolesterol e colesterol), ácido salicílico, inulina e tocoferol (ALONSO, 1998; HAMBURGUER et al., 2003).

Muitas propriedades farmacológicas vêm sendo descritas às flores desta planta, dentre elas: antiinflamatória (DELLA-LOGGIA et al., 1994; ZITTERL-EGLESEER et al., 1997), imunomoduladora (AMIRGHOFRAH; AZADBAKH; KARIMI, 2000), antioxidante (ĆETKOVIĆ et al., 2004; CORDOVA et al., 2002; KATALINIC et al., 2006), anti-genotóxica (PÉREZ-CARREÓN et al., 2002), anti-HIV (KALVATCHEV; WALDER; GARZARO, 1997), anti-tumoral (JIMÉNEZ-MEDINA et al., 2006) e antimicrobiana (VOLPATO et al., 2001).

Estudos demonstram que carotenóides, como luteína, presente nas flores de calêndula, são capazes de reverter o dano oxidativo em membranas de lipossomas de lecitina de ovo induzido por radiação UVA (SUJAK, et al., 1999). Substâncias triterpênicas, como lupeol também presentes nesta planta, demonstram pronunciada atividade antiinflamatória (AKIHISA et al., 1996). Tem sido demonstrado, também, que a calêndula foi eficaz na prevenção de dermatite aguda gerada por radioterapia em paciente com câncer de mama. Estes pacientes puderam receber a radioterapia com maior frequência e demonstraram redução da dor induzida pela radiação (POMMIER et al., 2004).

O extrato de calêndula além de possuir uso popular consagrado, está na lista de registro simplificado de fitoterápicos, publicada pela ANVISA em 2004 (BRASIL. ANVISA. RE nº 89, 2004), nesta resolução foi estabelecido o uso da calêndula como agente cicatrizante e antiinflamatório de uso tópico.

Devido às diversas propriedades relatadas para o extrato de calêndula, deduz-se que este poderia ser utilizado em formulações tópicas, visando à prevenção dos danos causados pela radiação solar.

1.4 Formulações cosméticas e sua estabilidade

Dentre as preparações semi-sólidas, os sistemas emulsionados são amplamente utilizados em formulações destinadas à aplicação tópica, pois são muitas as vantagens que as emulsões oferecem sob o ponto de vista farmacêutico (LACHMAN; IEBERMAN; ANING, 2001). Cremes aquosos e loções tendem a serem mais aceitáveis

pelo paciente, pois são fáceis de aplicação e espalhamento na pele, e possuem efeito refrescante (SMITH; MAIBACH; SURBER, 2000).

Emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis de dois líquidos imiscíveis. Devido a esta natureza dinâmica, seus constituintes são afetados pela temperatura e tempo de armazenamento. A estrutura gel que forma depois da manipulação para estabilizar a emulsão pode enrijecer e contrair em temperaturas frias ou amolecer e expandir em altas temperaturas (KALLIOINEN; HELENIUS; YLIRUUSI, 1994). O mesmo pode acontecer em preparações do tipo gel.

Gel é um sólido aparentemente, de material gelatinoso formado de uma dispersão coloidal, em que o meio disperso apresenta-se no estado líquido e o meio dispersante no estado sólido. A maior parte dos géis é formada por agregação de um colóide, sendo que o sistema sólido ou semi-sólido assim formado encontra-se interpenetrado por um líquido. As partículas estão conectadas entre si formando uma rede entrelaçada, o que confere rigidez à estrutura (ATTWOOD, 2005).

Os géis são utilizados em sistemas de liberação para administração oral, tópica, nas mucosas ou nos olhos e em injetáveis intramusculares ou implantes subcutâneos para liberação controlada. Cosmeticamente, os géis são empregados em uma grande variedade de produtos, incluindo xampus, fragrâncias, dentifrícios e preparações para cuidado da pele e cabelos (ZATZ; KUSHLA, 1996).

Uma formulação tipo gel instável, sob circunstâncias normais, exhibe algumas mudanças irreversíveis em suas propriedades reológicas, as quais causam a não aceitabilidade no seu uso final (ZATZ; KUSHLA, 1996).

Muitos fatores contribuem para desestabilização das formulações durante o processo de produção, transporte e armazenamento, inclusive os tipos de componentes presentes e o modo que a formulação foi produzida (MUN; DECKER; McCLEMENTS, 2006).

A estabilidade cinética de emulsões normalmente é aumentada usando emulsificantes, que são componentes que agem na interface óleo/água, facilitando a geração de pequenas gotículas durante homogeneização. Eles reduzem a tensão interfacial e melhoram a estabilidade da emulsão formando membranas protetoras ao redor das gotículas ou gerando forças repulsivas entre as gotículas (GU; REGNIER; McCLEMENTS, 2005).

Predizer a estabilidade destes sistemas tão complexos é muitas vezes arriscado se apenas condições de estresse são avaliadas. Métodos rápidos para prever a

estabilidade das formulações são usualmente baseados na avaliação de características físico-químicas (KALLIOINEN; HELENIUS; YLIRUUSI, 1994).

Segundo a IFSCC (International Federation of Societies of Cosmetic Chemists) o teste de estabilidade é considerado um procedimento preditivo, baseado em dados obtidos de produtos armazenados em condições que visam acelerar alterações passíveis de ocorrer nas condições de mercado. Como em todo procedimento preditivo os resultados não são absolutos, mas têm probabilidade de sucesso.

O estudo da estabilidade de produtos cosméticos fornece informações que indicam o grau de estabilidade relativa de um produto nas várias condições a que possa estar sujeito desde sua fabricação até o término de sua validade.

Segundo o guia de estabilidade de produtos cosméticos, publicado pela ANVISA em 2005, o produto deve permanecer estável e qualquer sinal de instabilidade indica a necessidade de reformulação. Os testes de estabilidade podem ser classificados em três tipos descritos a seguir:

✓ Estabilidade preliminar: este teste também é conhecido como teste de triagem ou de curto prazo, tem como objetivo auxiliar e orientar a escolha das formulações. O estudo de estabilidade preliminar consiste na realização do teste na fase inicial do desenvolvimento do produto, utilizando-se diferentes formulações de laboratório e com duração reduzida. Emprega condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais que devem ser observados e analisados conforme as características específicas de cada tipo de produto. Devido às condições em que é conduzido, este estudo não tem a finalidade de estimar a vida útil do produto, mas sim de auxiliar na triagem das formulações. Este tipo de estudo de estabilidade foi o empregado no presente trabalho;

✓ Estabilidade acelerada: também conhecida como estabilidade normal ou exploratória tem como objetivo fornecer dados para prever a estabilidade do produto, tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento. Este teste é empregado também na fase de desenvolvimento do produto utilizando-se lotes produzidos em escala laboratorial e piloto de fabricação, podendo estender-se às primeiras produções. Emprega geralmente condições menos extremas que o teste anterior. Auxilia na determinação da estabilidade da formulação. Pode ser realizado, ainda, quando houver mudanças significativas em excipientes do produto e ou do processo de fabricação, em material e acondicionamento que entra em contato com o produto, ou para validar novos equipamentos ou fabricação por terceiros;

✓ Teste de prateleira: também conhecido como estabilidade de longa duração ou *Shelf life*, tem como objetivo validar os limites de estabilidade do produto e comprovar o prazo de validade estimada no teste de estabilidade acelerada. É um estudo realizado no período de tempo equivalente ao prazo de validade estimado durante os estudos de estabilidade relacionados anteriormente. É utilizado para avaliar o comportamento do produto em condições normais de armazenamento. A frequência das análises deve ser determinada conforme o produto, o número de lotes produzidos e o prazo de validade estimado. Recomendam-se avaliações periódicas até o término do prazo de validade e, se a intenção é ampliá-lo, pode-se continuar o acompanhamento do produto.

O prazo de validade é caracterizado como o período de vida útil, durante o qual o produto mantém suas características originais. Antes de ser um requisito legal, é, sobretudo, um requisito técnico de qualidade, pois um produto instável do ponto de vista físico-químico, microbiológico ou toxicológico, além da perda de eficácia poderá também causar algum dano e comprometer a confiabilidade frente ao consumidor (BRASIL. ANVISA. RE nº 1, 2005).

As emulsões e géis são sistemas instáveis, as quais são altamente susceptíveis à desestabilização durante o processo de armazenamento e transporte. A desestabilização das emulsões pode acontecer por uma variedade de mecanismos físico-químicos, incluindo separação gravitacional, floculação e coalescência (GU; REGNIER; McCLEMENTS, 2005).

O teste de centrifugação fornece informações rápidas sobre a estabilidade das emulsões, pois se estabelece um aceleração dos mecanismos físico-químicos naturais que poderiam ocorrer como a força gravitacional.

Outro teste utilizado em ensaios de estabilidade é a avaliação das características organolépticas, que são características das substâncias e produtos referentes ao perfil sensorial identificado por: aspecto, cor, odor e sabor. As características organolépticas determinam os parâmetros de aceitação do produto pelo consumidor. Fornece parâmetros que permitem avaliar, de imediato, o estado em que se encontra sua amostra em estudo por meio de análises comparativas, com o objetivo de verificar alterações como: separação de fases, precipitação e turvação, permitindo o reconhecimento primário do produto. Deve-se utilizar uma amostra de referência, recentemente elaborada, ou uma amostra do produto, armazenada a temperatura adequada, para evitar modificações nas propriedades organolépticas (BRASIL. ANVISA. RE nº 1, 2005).

Alterações do pH e alterações do tamanho mediano das partículas ou da distribuição de tamanho das gotículas são parâmetros importantes na avaliação da estabilidade. O rápido aumento no tamanho dos glóbulos indica baixa estabilidade.

A avaliação da estabilidade da atividade funcional pode trazer informações importantes sobre modificações ou perda desta atividade em função do tempo e das diferentes condições de armazenamento. A perda da atividade funcional implica diretamente na perda de eficácia do produto desenvolvido.

1.5 Estudo de permeação e retenção cutânea

O sucesso do desenvolvimento de formulações requer não somente otimização da atividade farmacológica, mas também a liberação eficiente para o sítio alvo (PAGLIARA et al., 1999). A popularidade da pele como sítio de liberação de fármacos tem sido exemplificado pelo aumento de produtos tópicos que estão disponíveis no mercado. Embora as formulações tópicas sejam comumente destinadas a liberar o fármaco localmente, atualmente tem-se utilizado esta via para liberação sistêmica de fármacos, a qual demonstra alguns benefícios biofarmacêuticos, como a eliminação do efeito de primeira passagem hepática (ABRAHAM; CHADHA; MITCHELL, 1995; SMITH; MAIBACH; SURBER, 2000).

A principal função da pele é separar e proteger o interior do corpo do ambiente externo, além de receber estímulo sensorial, ajudar a regular a temperatura do corpo e excretar substâncias não desejadas. A pele também previne a entrada de microorganismos, substâncias químicas e várias formas de radiação, além de proteger os fluidos e tecidos corporais (BARRY, 2002).

Estruturalmente a pele possui uma série de camadas, há três grandes divisões: epiderme (estrato córneo e epiderme viável), derme e hipoderme (Figura 3).

Figura 3: Camadas da pele e seus apêndices.

Reproduzido de <<http://www.saudetotal.com.br/prevencao/topicos/histologia.asp>> Site visitado em: 18/11/2009.

O estrato córneo funciona como uma proteção física e barreira química. É formado por uma camada compacta de células (corneócitos) alongadas, mortas e desidratadas, as quais são o produto final da diferenciação das células produzidas na epiderme viável. Dentro dos corneócitos são encontradas substâncias hidrofílicas de baixa massa molecular, como aminoácidos, açúcares e a queratina, que fornece resistência a estas células. Entre estes corneócitos está presente a maioria do material lipídico na forma de lipídios neutros (BOUWSTRA et al., 2003; ZATZ, 1993).

O estrato córneo pode ser descrito como uma “parede de tijolos”, onde as células queratinizadas são embebidas em uma matriz lipídica, organizada em bicamadas e composta por ceramidas (45-50%), colesterol (25%), ácidos graxos (10-15%) e uma pequena fração de lipídios (5%) (MADISON, 2003). Cada corneócito do estrato córneo é envolto por um envelope protéico. Sua superfície interior é ligada aos filamentos de queratina que preenchem os corneócitos, enquanto que a superfície externa é covalentemente ligada a uma camada de hidroxiceramidas denominada envelope lipídico (MADISON, 2003).

Dessa forma, a composição do estrato córneo e a disposição das células e lipídios no estrato córneo criam um caminho tortuoso e fazem dele uma importante barreira que controla a saída de compostos e água do organismo. Controla também a

entrada de compostos acidental ou deliberadamente na pele, representando assim, o principal obstáculo à penetração cutânea de fármacos (MADISON, 2003). A resistência ao transporte através do estrato córneo depende das propriedades e arranjos das suas camadas hidrofílicas e lipídicas, como também de sua espessura, a qual varia de espécie para espécie e de local para local no mesmo indivíduo (BARRY, 2002; SMITH; MAIBACH; SURBER, 2000).

Abaixo do estrato córneo está a epiderme viável, que é enzimaticamente ativa e formada por células em vários estágios de diferenciação bioquímica. Na epiderme há um constante movimento das células recém formadas partindo da camada basal em direção ao estrato córneo, sendo que a taxa de renovação celular é igual à taxa de desprendimento das células mais externas do estrato córneo. Os folículos pilosos e as glândulas sebáceas são estruturalmente partes da epiderme, porém neste tecido não existem vasos sanguíneos, e os nutrientes precisam se difundir partindo da derme (BARRY, 2002; BOUWSTRA et al., 2003; SMITH; MAIBACH; SURBER, 2000; ZATZ, 1993).

A derme, localizada imediatamente sob a epiderme, é um tecido conjuntivo que contém fibras protéicas, vasos sanguíneos, terminações nervosas, órgãos sensoriais e glândulas. A derme é responsável pela maioria da força mecânica e das sensações da pele. As principais células da derme são os fibroblastos, responsáveis pela produção de fibras e de uma substância gelatinosa, a substância amorfa, na qual os elementos dérmicos estão mergulhados. Sob a pele, há uma camada de tecido conjuntivo frouxo, o tecido subcutâneo, rico em fibras e em células que armazenam gordura (células adiposas ou adipócitos). A camada subcutânea, denominada hipoderme, atua como reserva energética, proteção contra choques mecânico e isolante térmico (BARRY, 2002; MAIBACH; SURBER, 2000; ZATZ, 1993).

Três mecanismos possíveis têm sido sugeridos para permeação de solutos através do estrato córneo (Figura 4). O primeiro é através dos folículos pilosos e por glândulas sudoríparas, o segundo e terceiro são rotas inter e transcelulares (ABRAHAM; CHADHA; MITCHELL, 1995; BARRY, 1988). O caminho intercelular envolve a passagem somente pelos domínios lipídicos intercelulares, já o caminho transcelular atravessa as células e os espaços intercelulares (ZATZ, 1993).

Figura 4: Mecanismos de penetração na pele. Reproduzido de Moghimi, Williams e Barry (1999).

A rota de penetração tem sido muito debatida nas últimas décadas, mas evidências experimentais sugerem que em condições normais, a rota predominante é através de espaços intercelulares. O espaço intercelular possui lipídios estruturados e a molécula em difusão tem que passar por uma variedade de domínios lipofílicos e hidrofílicos antes de atingir a junção entre o estrato córneo e a epiderme viável (ABRAHAM; CHADHA; MITCHELL, 1995; HADGRAFT, 2004).

O objetivo do tratamento tópico é produzir concentrações adequadas da substância no tecido alvo, enquanto produz baixas concentrações sanguíneas, não só devido a efeitos sistêmicos não desejados, mas também devido à rápida remoção pelo sangue, o que pode limitar a baixa concentração da substância no tecido. Desta forma, para uma substância que deve exercer sua atividade nos tecidos da pele, como corticóides, anestésicos, vitamina A e antioxidantes, a situação ideal seria que ela tivesse uma boa penetração e retenção na pele com uma mínima permeação para os vasos sanguíneos (ZATZ, 1993). Entretanto, os produtos que têm objetivo de ação na superfície da pele, como agentes de limpeza e protetores (repelentes e protetores solares), devem ter absorção mínima (MARQUELE-OLIVEIRA, 2007).

Predizer o transporte químico através da pele é importante tanto para otimização da liberação tópica quanto transdermal. Para facilitar a estimativa da absorção percutânea, sistemas *in vitro* têm sido desenvolvidos (PLAGLIARA et al., 1999).

Estudos de liberação *in vitro* podem servir como uma importante ferramenta para uma avaliação inicial de formulações experimentais na área de desenvolvimento de produto. A substância ativa deve ser liberada do veículo, e depois deve estar disponível para penetração no estrato córneo e nas camadas inferiores da pele (GETIE et al., 2002). Os estudos de liberação são normalmente realizados com membranas sintéticas, que são barreiras porosas funcionando como barreiras de difusão passiva onde a taxa de difusão é determinada pela concentração do soluto (PAGLIARA et al., 1999).

Após estudos de liberação é necessário avaliar a penetração de substâncias ativas na ou através da pele. Estes estudos são normalmente realizados utilizando pele de camundongo, pele humana proveniente de cirurgia ou pele de orelha de porco, que é considerado o melhor modelo de pele, pois além de sua maior disponibilidade, esta tem demonstrado propriedades histológicas e fisiológicas similares à da pele humana (PAGLIARA et al., 1999).

Na área cosmética, estudos de absorção na ou através da pele são de grande importância, pois em geral, os componentes cosméticos não devem ter absorção através da pele (absorção sistêmica) (BRONAUGH; COLLIER, 1993). Porém, as substâncias ativas de produtos anti-envelhecimento e hidratantes devem atingir o estrato córneo e a epiderme para exercerem seu efeito (SEQUEIRA, 1993). Portanto, estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro* são úteis para avaliar a biodisponibilidade de substâncias ativas e comparar formulações. Em muitos casos, somente resultados comparativos são necessários (WESTER; MAIBACH, 1990).

Conclusão

4. Conclusão

Diante dos resultados anteriormente apresentados pode-se concluir que:

O processo de obtenção do extrato concentrado de calêndula (ECC) foi padronizado e obteve-se boa reprodutibilidade do processo de extração, em relação ao teor de sólidos totais, atividade antioxidante e teor de polifenóis.

Na caracterização físico-química do ECC observou-se que o mesmo apresentou teor de polifenóis totais considerado inferior ao encontrado na literatura. No entanto, o teor de flavonóides corrobora com o teor descrito pela literatura. O ECC demonstrou também, ampla diversidade química na avaliação do perfil cromatográfico por CLAE e o teor de rutina obtido foi 5 vezes maior que o descrito para outros extratos de calêndula.

O método cromatográfico de determinação do teor de rutina e narcissina demonstrou-se válido para análise de rutina e narcissina no extrato de calêndula e formulações, pois foi observada ampla faixa de linearidade, boa precisão e exatidão.

No ensaio de citotoxicidade do ECC foi observado que em pequenas concentrações, este extrato é capaz de estimular a proliferação celular de fibroblastos, mas não foi capaz de estimular a proliferação de células cancerosas. Entretanto, em concentrações mais elevadas este extrato pode ser tóxico. No entanto, demonstrou-se mais tóxico às células de carcinoma hepatocelular e melanoma.

Com relação à citotoxicidade celular frente à radiação UV foi observado que não houve redução significativa da sobrevivência celular de fibroblastos frente às doses de radiação utilizadas. Além disso, o ECC não causou nenhum efeito na sobrevivência celular no tratamento após irradiação. Entretanto, o pré-tratamento com ECC por diferentes períodos de tempo antes da irradiação das células revela que ECC causou redução significativa da viabilidade celular quando comparado às culturas não expostas à irradiação e expostas ECC.

O ECC não demonstrou recuperar significativamente os níveis de GSH depletados em cultura de células de fibroblastos expostos à irradiação UV.

O referido extrato concentrado demonstrou atividade doadora de H^+ ao radical DPPH $\bullet$, atividade inibidora da peroxidação lipídica e sequestradora de radicais superóxido de modo concentração dependente.

Observou-se que a atividade antioxidante do ECC foi mantida em todas as formulações desenvolvidas.

Em relação ao estudo de estabilidade das formulações, observou-se que todas as formulações desenvolvidas foram estáveis física, química e funcionalmente em testes preliminares quando armazenados a 5°C. Porém, quando armazenados a 30°C /75%UR e 40°C /75%UR todas as formulações desenvolvidas apresentaram sinais de instabilidade após 180 dias.

As formulações tipo creme e gel-creme demonstraram menor retenção dos compostos antioxidantes presentes ECC, e por isso, têm grande probabilidade de apresentar efeito reduzido em estudos *in vivo* de ação fotoquimiopreventiva. Entretanto, a formulação tipo gel demonstrou boa retenção destes compostos e, portanto, tem grande probabilidade de exercer efeito fotoquimiopreventivo em estudos *in vivo*. Desta forma, foi avaliada a atividade funcional *in vivo* apenas da formulação gel.

Quanto à eficácia fotoquimioprotetora *in vivo* o EEC, administrado por via oral e tópica (formulação gel), apresentou eficiente atividade inibidora da depleção de GSH frente à RUV. Entretanto, não foi capaz de inibir a atividade/secreção de metaloproteinases e a migração de células polimorfonucleares na pele de camundongos após irradiação. Por outro lado, a aplicação tópica de ECC reduziu modificações histológicas induzidas pela radiação UVB na pele, como a melhora na síntese de colágeno na camada subepidermal.

Neste estudo foi observado que o extrato de calêndula pode ser eficaz na prevenção aos danos causados pela RUV por apresentar alta porcentagem de flavonóides, ampla diversidade química e atividade antioxidante frente a diferentes EROs. Além disso, este extrato teve boa eficácia em estudos de atividade funcional *in vivo*, fotoquimioprotetora, tanto na administração por via oral quanto topicamente, demonstrando atividade similar a outros compostos com atividade comprovada, como a quercetina e polifenóis do chá verde.

Apesar das fortes evidências do efeito fotoquimioprotetor do extrato de calêndula, estudos adicionais são necessários para melhor esclarecer a natureza deste efeito.

Referências Bibliográficas

Referências bibliográficas

ABRAHAM, M.H.; CHADHA, H.S.; MITCHELL, R.C. The factors that influence skin penetration of solutes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 47, p. 8-16, 1995.

ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. Dissertação de mestrado - Faculdade de ciências farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

AFAQ, F.; ADHAMI, V.M.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 571, p. 153-173, 2005.

AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; YAMANOUCHI, S.; TAKIDO, M.; KUMAKI, K.; TAMURA, T. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. **Phytochemistry**, Oxford, v. 43, n. 6, p. 1255-1260, 1996.

ALONSO, J.R. **Tratado de Fitomedicina: Bases clínicas y Farmacológicas**. Buenos Aires: Isis Ediciones, p. 327-331, 1998.

AMIRGHOFRA, Z.; AZADBAKHT, M.; KARIMI, M. H. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 72, p. 167-172, 2000.

ARUOMA, O.I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and diseases. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 75, n. 2, p. 199-211, 1998.

ATTWOOD, D. Sistemas dispersos. In: AULTON, M.E. **Deliaemento de formas Farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, p. 98, 2005

BACHELOR, M.; BOWDEN, G.T. UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression. **Seminars in Cancer Biology**, London, v. 14, p. 131-138, 2004.

BAILEY, A.J. Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. **Mechanisms of Ageing and Development**, Clare, v. 122, p. 735-755, 2001.

BAKÓ, E.; DELI, J.; TÓTH, G. HPLC study on the carotenoid composition of Calendula products. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, Amsterdam, v. 53, p. 241-250, 2002.

BARRY, B. Transdermal drug delivery. In: ALTON, M.E. **Pharmaceutics the Science of Dosage Form Design**. London: Churchill Livingstone, p. 499-533, 2002.

BILIA, A.R.; SALVINI, D.; MAZZI, G.; VINCIERI, F.F. Characterization of calêndula flower, milk-thistle, and passion flower tinctures by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 53, p. 210-215, 2001.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, London, v. 26, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BOWSTRA, J.A.; HONEYWELL-NGUYEN, P.L.; GOORIS, G.S.; PONEC, M. Struture of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progress in lipid Research**, Oxford, v. 42, p. 1-36, 2003.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, New York, v. 78, p. 206–209, 1982.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 15 mar. 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Guia para realização de estudos de estabilidade**. RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 10 dez. 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Lista de registro simplificado de fitoterápicos**. RE nº 89, de 16 de março de 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20 mar. 2007.

BRENNAN, M.; BHATTI, H.; NERUSU, K.C.; BHAGAVATHULA, N.; KANG, S.; FISHER, G.J.; VARANI, J.; VOORHEES, J.J. Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 78, n. 1, p. 43-48, 2003.

BRONAUGH, R.L., COLLIER, S.W. In vitro methods for measuring skin permeation. In: ZATZ, J.L. **Skin Permeation – Fundamentals and Application**. Wheaton: Allured Publishing Corporation, p. 93-111, 1993.

BRONAUGH, R.L.; HOOD, H.L.; KRAELING, M.E.K.; YOURICK, J.J. Determination of percutaneous absorption by in vitro techniques. In: BRONAUGH, R.L., MAIBACH, H.I. **Percutaneous absorption – Drugs, Cosmetics, Mechanisms and Methodology**, 3^o ed., Marcel Dekker, New York, p. 229-234, 1999.

BROWN, D.J.; DATTFNER, A.M. Phytotherapeutic Approaches to common dermatologic conditions. **Archives of Dermatology**, Chicago, v. 134, p. 1401-1404, 1998.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 52c, p. 302-310, 1978.

CARINI, M., ALDINI, G., PICCONE, M., FACINO, R.M. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. **II Farmaco**. v. 55, p. 526-534, 2000.

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Tecmedd, Ribeirão Preto, São Paulo, 2004.

CARVALHO, P.S.P; TAGLIAVINI, D.G.; TAGLIAVINI, R.L. Cutaneous cicatrization after topic application of calendula's cream and confrey, propolis and honey association's in infected wound of skin. Clinic and histologic study in rats. **Revista de Ciências Biomédicas**, São Paulo, v. 12, p. 39-50, 1991.

CASAGRANDE, R. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo quercetina: controle físico-químico e avaliação da eficácia in vivo**. Tese de doutorado - Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI Jr, W.A.; DORTA, D.J.; DOS SANTOS, A.C.; FONSECA, M.J.V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, Lausanne, v. 84, p. 21-27, 2006.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI Jr., W.A.; BORIN, M.F.; LOPEZ, R. F.V.; FONSECA, M.J.V. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 328, p. 183-190, 2007.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. **Journal of chromatography B**, Amsterdam, v. 689, p. 175-180, 1997.

CERVANTES-LAUREAN, D.; SCHRAMM, D.D.; JACOBSON, E.L.; HALAWEISH, I.; BRUCKNER, G.G.; BOISSONNEAULT, G.A. Inhibition of advanced glycation end product formation on collagen by rutin and its metabolites. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 17, p. 531-540, 2006.

ĆETKOVIĆ, G.S.; DJILAS, S.M.; ČANADANOVIĆ-BRUNET, J.M.; TUMBAS, V.T. Antioxidant properties of marigold extracts. **Food Research International**, Amsterdam, v. 37, p. 643-650, 2004.

CHANG, C.C., YANG, M.H., WEN, H.M., CHERN, J.C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, Taipei, v. 10, p. 178-182, 2002.

CHEN, C.W.; HO, C.T. Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black teas. **Journal of Food Lipids**, Malden, v. 2, p. 35-46, 1995.

CORDOVA, C.A.S.; SIQUEIRA, I.R.; NETTO, C.A.; YUNES, R.A.; VOLPATO, A.M.; FILHO, V.C.; CURI-PREDROSA, R.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Protective properties of butanolic extract of the *Calendula officinalis* L. (marigold) against lipid peroxidation of rat liver microsomes and action as free radical scavenger. **Redox Report**, Leeds, v. 7, p. 95-102, 2002.

CORRÊA, M.P. **Índice ultravioleta: Avaliações e aplicações**. Tese de doutorado. Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

DARR, D.; COMBS, S.; DUNSTON, S.; MANNING, T.; PINNELL, S. Topical vitamin C protects porcine skin from ultraviolet radiation-induced damage. **British Journal of Dermatology**, Malden, v. 127, p. 247-253, 1992.

DEGROOT, J.; VERZIIL, N.; BUDDE, M.; BIJLSMA, J.W.J.; LAFEVER, F.P.J.G.; TEKOPPELE, J.M. Accumulation of advanced glycation end products decreases collagen turnover by bovine chondrocytes. **Experimental Cell Research**, San Diego, v. 266, p. 303-310, 2001.

DELLA-LOGGIA, R.; TUBARO, A.; SOSA, S.; BECKER, H.; SAAR, S.; ISAAC, O. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 60, p. 516-520, 1994.

DEMACQ, C.; METZGER, I.F.; GERLACH, R.F.; TANUS-SANTOS, J.E. Inverse relationship between markers of nitric oxide formation and plasma matrix metalloproteinase-9 levels in healthy volunteers. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 394, p. 72-76, 2008.

DI MAMBRO, V.M.; FONSECA, M.J.V. Assay of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **Journal of Pharmaceutics and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 37, p. 287-295, 2005.

DUMENIL, G.; CHEMLI, R.; BALANSARD, G.; GUIRAUD, H.; LALLEMAND, M. Étude des propriétés antibactériennes des fleurs de souci *Calendula officinalis* L. et des teintures mères homéopathiques de *C. officinalis* L. et *C. arvensis*. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, Paris, v. 38, p. 493-499, 1980.

ESPARZA, J.; KRUSE, M.; LEE, J.; MICHAUD, M.; MADRI, J.A. MMP-2 null mice exhibit an early onset and severe experimental autoimmune encephalomyelitis due to an increase in MMP-9 expression and activity. **Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v. 18, p. 1682-1691, 2004.

F'GUYER, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatology Photoimmunology Photomedicine**, Malden, v. 19, p. 56-72, 2003.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2001.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43(1), p. 61-81, 1997.

FISHER, G.J., DATTA, S.C., TALWAR, H.S., WANG, Z.Q., VARANI, J., KANG, S., VOORHEES, J.J. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. **Nature**, London, n. 379, p. 335-339, 1996.

FISHER, G.J.; CHOI, H.C.; BATA-CSORGO, Z.; SHAO, Y.; DATTA, S.; WANG, Z.Q.; KANG, S.; VOORHEES, J.J. Ultraviolet irradiation increases matrix metalloproteinase-8 protein in human skin *in vivo*. **The Journal of Investigative Dermatology**, New York, v. 117, n. 2, p. 219-226, 2001.

FISHER, G.J.; KANG, S.; VARANI, J.; BATA-CSORGO, Z.; WAN, Y., DATTA, S.; VOORHEES, J.J. Mechanisms of Photoaging and Chronological Skin Aging. **Archives of Dermatology**, Chicago, v. 138, p. 1462-1470, 2002.

FISHER, G.J.; WANG, Z-Q.; DATTA, S.C.; VARANI, J.; KANG, S.; VOORHEES, J.J. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 337, p. 1419-1428, 1997.

FONSECA, Y. M. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea**. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

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

FUCHS, J.; HUFLEJT, M.E.; ROTHFUSS, L.M.; WILSON, D.S.; CARCAMO, G.; PACKER, L. Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation. **Journal of Investigative Dermatology**, Cambridge, v. 93, p. 769-773, 1989.

GEORGETTI, S.R.; CASAGRANDE, R.; VERRI JR., W.A.; LOPEZ, R.F.V.; FONSECA, M.J.V. Evaluation of in vivo efficacy of topical formulations containing soybean extract. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 352, p. 189-196, 2008.

GERLACH, R.F.; DEMACQ, C; JUNG, K.; TANUSSANTOS, J.E. Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. **Clinical Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 119-123, 2007.

GETIE, M.; GEBRE-MARIAM, T.; RIETZ, R.; NEUBERT, R.H.H. Evaluation of the release profiles of flavonoids from topical formulations of the crude extract of the leaves of *Dodonaea viscosa* (Sapindaceae). **Pharmazie**, Eschborn, v. 57, p. 320-322, 2002.

GILL, S.E.; PARKS, W.C. Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Amsterdam, v. 40, p. 1334-1347, 2008.

GIROTTI, S.; FINI, F.; FERRI, E.; BUDINI, R.; PIAZZI, S.; CANTAGALLI, D. Determination of superoxide dismutase in erythrocytes by a chemiluminescent assay. **Talanta**, Amsterdam, v. 51, p. 685-692, 2000.

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. **Clinics in Dermatology**, New York, v. 26, p. 614-626, 2008.

GU, Y.S.; REGNIER, L.; McCLEMENTS, J. Influence of environmental stresses on stability of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by β -lactoglobulin-t-carageenan. **Journal of Colloid and Interface Science**, San Diego, v. 286, p. 551-558, 2005.

HADGRAFT, J. Skin deep. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 58, p. 291-299, 2004.

HALLIDAY, G.M. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 571, p. 107-120, 2005.

HALLIWELL, B.; AESHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**, New York: Pergamon Press, 3^{ed.}, p. 1-104, 1990.

HAMBURGEER, M.; ADLER, S.; BAUMANN, D.; FORG, A.; WEINREICH, B. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*). **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 74, n. 4, p. 328-338, 2003.

HAZANE, F.; SAUVAIGO, S.; DOUKI, T.; FAVIER, A.; BEANI, J.C. Age-dependent DNA repair and cell cycle distribution of human skin fibroblasts in response to UVA irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 82, p. 214-223, 2006.

HEBBEL, R.P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, New York, v. 107, p. 401-405, 1986.

HECK, D.E.; GEREEKE, D.R.; VETRANO, A.M.; LASKIN, J.D. Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 195, p. 288-297, 2004.

HIRAYAMA, O.; TAKAGI, M.; HUKUMOTO, K.; KATOH, S. Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 247, p. 237-241, 1997.

HISSIN, P.J., HILF, R. A fluometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 74, p. 214-226, 1976.

HRUZA, L.L.; PENTLAND, A.P. Mechanisms of UV-induced inflammation. **Journal of Investigative Dermatology**, New York, v. 100, p. 35S-41S, 1993.

ICHIHASHI, M.; UEDA, M.; BUDIYANTO, A.; BITO, T.; OKA, M.; FUKUNAGA, M.; TSURU, K.; HORIKAWA, T. UV-induced skin damage. **Toxicology**, Amsterdam, v. 189, p. 21-39, 2003.

INAL, M.E.; KANBAK, G.; SUNAL, E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 305, p. 75-80, 2001.

INCA – **Instituto Nacional do Câncer**. Incidência de câncer no Brasil – Estimativa -2006. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 07/10/2009.

International Conference on Harmonization (ICH), ICH Harmonized tripartite guideline, Topic Q2B , **Note for guidelines on Validation of Analytical Procedures: Methodology**, 1996.

JANSSENS, S.; BEYAERT, R. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 11, p. 293-302, 2003.

JATO, J.L. **Tecnologia farmacêutica**. Madrid: Síntesis, p. 292-294, 1997.

JIMÉNEZ-MEDINA, E.; GARCIA-LORA, A.; PACO, L.; ALGARRA, I.; COLLADO, A.; GARRIDO, F. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual *in vitro* effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. **BMC cancer**, London, v. 6, n. 119, p. 1-14, 2006.

JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGMOLAS, G.; BRENTANI, R. Picrossírius staining plus polarization microscopy, specific methods of collagen detection in tissue section. **Histochemical journal**, London, v. 11, p. 447-55, 1979.

KÄHÄRI, V.M.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in skin. **Experimental Dermatology**, Copenhagen, v. 6, p. 199-213, 1997.

KALLIOINEN, S.; HELENIUS, K.; YLIRUUSI, J. Influence of storage time and temperature on the stability of some emulsion creams. **Pharmazie**, Eschborn, n. 49, p. 500-505, 1994.

KALVATCHEV, Z.; WALDER, R.; GARZARO, D. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 51, p. 176-180, 1997.

KANGROTONDO, C.H.; MILLER, C.C.; MORRISON, A.R.; PENTLAND, A.P. Enhanced keratinocyte prostaglandin synthesis after UV injury is due to increased phospholipase activity. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 264, p. C396-C401, 1993.

KASPRZYK, Z.; PYREK, J. Triterpenic alcohols of *Calêndula officinalis* L. flowers. **Phytochemistry**, Oxford, v. 7, p. 1631-1639, 1968.

KATALINIC, V.; MILOS, M.; KULISIC, T.; JUKIC, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chemistry**, Oxford, v. 94, p. 550-557, 2006.

KATIIYAR, S.K.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 2, p. 287-294, 2001.

KIM, H.H.; LEE, M.J.; LEE, S.R.; KIM, K.H.; CHO, K.H.; EUN, H.C.; CHUNG, J.H. Augmentation of UV-induced skin wrinkling by infrared irradiation in hairless mice. **Mechanisms of Ageing and Development**, Clare, v. 126, p. 1170-1177, 2005.

KISHIMOTO, S.; MAOKA, T.; SIMITOMO, K.; OHMIYA, A. Analysis of carotenoid composition in petals of calêndula (*Calendula officinalis* L.). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 69, p. 2121-2128, 2005.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food chemistry**, Oxford, v. 84, p. 329-339, 2004.

LACHMAN, L.; IEBERMAN, H.A.; ANING, J.L. Semi-Sólidos in: **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 907-953, 2001.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LELONGT, B.; BENGATTA, S.; DELAUCHE, M.; LUND, L.R.; WERB, Z.; RONCO, P.M. Matrix metalloproteinase 9 protects mice from anti-glomerular basement membrane nephritis through its fibrinolytic activity. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 193, p. 793-802, 2001.

LEONARDI, G.R.; GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 5, p. 1-8, 2002.

LIU, G.; MA, W.Y.; BODE, A.M.; ZHANG, Y.; DONG, Z. NS-398 and piroxicam suppress UVB-induced activator protein I activity by mechanisms independent of cyclooxygenase-2. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, p. 2124-2130, 2003.

LOPES, L.B.; BENTLEY, M.V.L.B. Cyclosporina A in skin samples from in vitro penetration studies may be assayed by a simple HPLC method. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 4, p. 477-482, 2005.

LOWRY, O.H.; OSEBROUGH, N.J.; ARR, A.L.; ANDALL, R.J. rotein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, p. 265-275, 1951.

LYONS, N.M.; O' BRIEN, N.M. Modulatory effects of na algal extract containing astaxanthin on UVA-irradiated cells in culture. **Journal of Dermatological Science**, Clare, v. 30, p. 73-84, 2002.

MADISON, K.C. Barrier function of the skin: "La Raison d'être" of the epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, New York, p. 231-241, 2003.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; BADRA, M.U.L. Estudo da estabilidade física de bases dermocosméticas contendo ésteres fosfóricos. **Aerosol & Cosméticos**, São Paulo, v. 79, p. 8-11, 1992.

MANELA-AZULAY, M.; FILGUEIRA, A.L.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A.; CUZZI, T.; PEREZ, M.A. Vitamina C. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, p. 265-274, 2003.

MANICONE, A.M.; MCGUIRE, J.K. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, London, v. 19, p. 34-41, 2008.
MARKHAM, K.R. Techniques of flavonoid identification. **Academic Press**, London, v. 1, p. 113, 1982.

MARQUELE, F.D.; DI MAMBRO, V.M.; GEORGETTI, S.R.; CASAGRANDE, R.; VALIM, Y.M.L.; FONSECA, M.J.V. Assessment of the antioxidant activities of brazillian extracts of própolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 39, p. 455-462, 2005.

MARQUELE-OLIVEIRA, F. **Desenvolvimento de formulações tópicos fotoquimioprotetoras contendo extrato de própolis: estudos de estabilidade, permeação e retenção cutânea *in vitro* e de eficácia *in vivo***. Tese de doutorado - Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

MARTIN, A. **Physical pharmacy**, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 4^oed., p. 430-436, 1993.

MARTINEZ, M.A.R.; FRANCISCO, G.; CABRAL, L.S.; RUIZ, I.R.G.; NETO, C.F. Genética molecular aplicada ao câncer cutâneo não melanoma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 5, p. 405-419, 2006.

MASAKI, H.; OKANO, Y.; SAKURAI, H. Generation of active oxygen species from AGEs during UVA irradiation and a possible mechanism of cell damage. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1428, p. 44-56, 1999.

MASMOUDI, H.; LE DRÉAU, Y.; PICCERELLE, P.; KISTER, J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 289, p. 117-131, 2005.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H.N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v.195, n. 3, p. 298-308, 2004.

MATYSIK, G.; WÓJCIAK-KOSIOR, M.; PADUCH, R. The influence of Calendula officinalis flos extracts on cell cultures, and the chromatographic analysis of extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 38, p. 285-292, 2005.

MELONI, M.; NICOLAY, J.F. Dynamic monitoring of glutathione redox status in UV-B irradiated reconstituted epidermis: effect of antioxidant activity on skin homeostasis. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 17, p. 609-613, 2003.

MOGHIMI, H.R.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Stratum corneum and barrier performance: a model lamellar structural approach. In: BRONAUGH, R.L.; MAIBACH, H.I. (Eds.) **Percutaneous Absorption**. New York: Marcel Dekker, p. 515-553, 1999.

MOON, H.I.; CHUNG, J.H.; The effect of 2', 4', 7-trihydroxyisoflavone on ultraviolet-induced matrix metalloproteinases-1 expression in human skin fibroblasts. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 580, p. 769-774, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUN, S.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Effect of molecular weight and degree of deacetylation of chitosan on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant-chitosan membranes. **Journal of Colloid and Interface Science**, San Diego, v. 296, n. 2, p. 581-590, 2006.

NEUKIRCH, H.; D'AMBROSIO, M.; DALLA VIA, J. GUERREIRO, A. Simultaneous quantitative determination of eight triterpenoid monoesters from flowers of 10 varieties of *Calendula officinalis* L. and characterization of a new triterpenoid monoester. **Phytochemical Analysis**, Sussex, v. 15, p. 30-35, 2004.

NOORLANDER, M.L.; MELIS, P.; JONKER, A.; VAN NOORDEN, C.J.F. A Quantitative Method to Determine the Orientation of Collagen Fibers in the Dermis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, New York, v. 50, p. 1469-1474, 2002.

OHKAWA, H.; OSHINI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 95, p. 351-388, 1979.

OLIVEIRA, D.A.G.C.; DUTRA, E.A.; SANTORO, M.I.R.M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Protetores Solares, Radiações e Pele. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v.16, p.68-72, 2004.

ONOUÉ, S.; KOBAYASHI, T.; TAKEMOTO, Y.; SASAKI, I.; SHINKAI, H. Induction of metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation. **Journal of Dermatological Science**, Clare, v. 33, n. 2, p. 105-111, 2003.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A.J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 8, p. 221-233, 2007.

PAGLIARA, A.; REIST, M.; GEINOZ, S.; CARRUPT, P.A.; TESTA, B. Evaluation and prediction of drug permeation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 51, p. 1339-1357, 1999.

PAGNONI, A. Fotoenvelhecimento e Fotodocumentação. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 15, p. 70-82, 2003.

PASCUAL, C.; GONZALEZ, R.; TORRICELLA, R.G. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 41, p. 9-13, 1994.

PÉREZ-CARREÓN, J.I.; CRUZ-JIMÉNEZ, G.; LICEA-VEGA, J.A.; POPOCA, E.A.; FATTEL FAZENDA, S.; VILLA-TREVIÑO, S. Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. **Toxicology**, Clare, v. 16, p. 253-258, 2002.

PIETTA, P.; MAURI, P.; RAVA, A. Separation of flavonol-2-*O*-glycosides from *Calendula officinalis* and *Sambucus nigra* by high-performance liquid and micellar electrokinetic capillary chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 593, p. 165-170, 1992.

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

PODDA, M.; TRABER, M.G.; WEBER, C.; YAN, L.J.; PACKER, L. UV-Irradiation Depletes antioxidants and Causes Oxidative Damage in a Model of Human Skin. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.24, p. 55-65, 1998.

POMMIER, P.; GOMEZ, F.; SUNYACH, M.P.; D'HOMBRES, A.; CARRIE, C.; MONTBARBON, X. Phase III randomized trial of *Calendula officinalis* compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 22, p. 1447-1453, 2004.

RICH, L.; WHITTAKER, P. Collagen and picosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, São Paulo, v. 22, p. 97-104, 2005.

RIJKEN, F.; BRUIJNZEE, P.L.B. The Pathogenesis of Photoaging: The Role of Neutrophils and Neutrophil-Derived Enzymes. **Journal of investigative dermatology. Symposium proceedings**, New York, v. 14, 2009.

RODRIGUES, P.O.; GONÇALVES, T.C.; SILVA, W.B. Influência de diferentes sistemas de solventes no processo de extração de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, La Plata, v. 23, p. 27-31, 2004.

RODRIGUES, T.; SANTOS, A.C.; PIGOSO, A.A.; MINGATTO, F.E.; UYEMURA, A.S.; CURTI, C. Thioridazine interacts with the membrana of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis – potentially implicated mechanisms. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 136, n. 1, p. 136-142, 2002.

ROSA, F.S. **Influência de protetor de absorção cutânea e derivados ésteres do ácido 5-aminolevulínico na terapia fotodinâmica do câncer de pele.** 2002. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

SCHWARTZ, E.; CRUICKSHANK, F.A.; CHRISTENSEN, C.C.; PERLISH, J.S.; LEBWOHL, M. Collagen alterations in chronically sun-damaged human skin. **Photochemistry & Photobiology**, Oxford, v. 58, p. 841-844, 1993.

SEQUEIRA, J.A., Optimization of the skin availability of topical drugs In: ZATZ, J.L. **Skin Permeation – Fundamentals and application.** Wheaton: Allured Publishing Corporation, p. 163-176, 1993.

SHINDO, Y.; WITT, E.; HAN, D.; PACKER, L. Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. **Journal of Investigative Dermatology**, New York, v. 102, p. 469-475, 1994.

SHINDO, Y.; WITT, E.; PACKER, L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to UV light. **Journal of Investigative Dermatology**, New York, v. 100, n. 3, p. 260-265, 1993.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 299, p. 152-172, 1999.

SIWIK, D.A.; PAGANO, P.J.; COLUCCI, W.S. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix Metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, Bethesda, v. 280, p. C53–C60, 2001.

SMITH, E.W.; MAIBACH, H.I.; SURBER, C. Use of emulsions as topical drug delivery systems. In: NIELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, G. **Pharmaceutical emulsions and suspensions**, New York: Marcel Dekker, p.259-269, 2000.

STEENVOORDEN, D.P.T.; BEIJERSBERGEN, V.; HANEGOUWEN, G.M.J. STERNLICHT, M.D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 17, p. 463-516, 2001.

SUJAK, A.; GABRIELSKA, J.; GRUDZINSKI, W.; BORC, R.; MAZUREK, P.; GRUSZECKI, W.I. Lutein and zeaxanthin as protectors of lipid membranes against oxidative damage: The structural aspects. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 371, p. 301-307, 1999.

SURBER, C.; SCHWARB, F.; SMITH, E. Tape-stripping technique. In: BRONAUGH, R.L., MAIBACH, H.I. **Percutaneous absorption – Drugs, Cosmetics, Mechanisms and Methodology**, 3º ed, Marcel Dekker, New York, p.395-409, 1999.

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

TRUSH, M.A.; EGNER, P.A.; KENSLER, T.W. Myeloperoxidase as a biomarker of skin irritation and inflammation. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 32, p. 143-147, 1994.

TZAPHLIDOU, M. The role of collagen and elastin in aged skin: an image processing approach. **Micron**, Oxford, v. 35, p. 173-177, 2004.

VARANI, J.; SPEARMAN, D.; PERONE, P.; FLIGIEL, S.E.G.; DATTA, S.C.; WANG, Z.Q.; SHAO, Y.; KANG, S.; FISHER, G.J.; VOORHEES, J.J. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. **American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 158, p. 931-942, 2001.

VAYALIL, P.K.; ELMETS, C.A.; KATYAR, S.K. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 24, p. 927-936, 2003.

VERZIJL, N.; DEGROOT, J.; THORPE, S.R.; BANK, R.A.; SHAW, J.N.; LYONS, T.J.; BIJLSMA, J.W.J.; LAFEBER, F.P.J.G.; BAYNES, J.W.; TEKOPPELE, J.M. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, p. 39027-39031, 2000.

VICENTINI, F.T.M.C., SIMI, T.R.M., DEL CIAMPO, J.O., WOLGA, N.O., PITOL, D.L., IYOMASA, M.M., BENTLEY, M.V.L.B., FONSECA, M.J.V., Quercetin in w/o microemulsion: *in vitro* and *in vivo* skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated *in vivo*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 948-957, 2008.

VIOUX-CHAGNOLEAU, C.; LEJEUNE, F.; SOK, J.; PIERRARD, C.; MARIONNET, C.; BERNERD, F. Reconstructed human skin : from photodamage to sunscreen photoprotection and anti-aging molecules. **Journal of Dermatological Science Supplement**, Tokyo, v. 2, p. S1-S12, 2006.

VOLPATO, A.M.M.; RIOS, E.M.; MIGUEL, M.D.; SANDER, P.C.; MIGUEL, O.G. Investigação da atividade antibacteriana de *Calendula officinalis* L (Asteraceae). **Revista Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 2, p. 7-10, 2001.

WAGNER, S.; MERFORT, I. Skin penetration behaviour of sesquiterpene lactones from different Arnica preparations using a validated GC-MSD method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 43, p. 32-38, 2007.

WANG, M.; QIN, X.; MUDGETT, J.S.; FERGUSON, T.A.; SENIOR, R.M.; WELGUS, H.G. Matrix metalloproteinases deficiencies affect contact hypersensitivity: stromelysin-1 prevents the response and gelatinase B deficiencies prolongs the response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Allahabad, v. 96, p. 6885-6889, 1999.

WLASCHEK, M.; TANTCHEVA-POÓR, I.; NADERI, L.; MA, W.; SCHNEIDER, L.A.; RAZI-WOLF, Z.; SCHÜLLER, J.; SCHARFFETTER-KOCHANKE, K. Solar UV irradiation and dermal photoaging. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 63, p. 41-51, 2001.

WESTER, C.R.; MAIBACH, H.L. In vitro testing of topical pharmaceutical formulations In: OSBORNE, D.W., AMAMNN, A.H. **Topical Drug Delivery Formulations**. New York: Marcel Dekker, p. 213-220, 1990.

WILGUS, T.A.; KOKI, A.T.; ZWEIFEL, B.S.; KUSEWITT, D.F.; RUBAL, P.A.; OBERYSZYN, T.M. Inhibition of cutaneous ultraviolet light B-mediated inflammation and tumor formation with topical celecoxib treatment. **Molecular carcinogenesis**, New York, v. 38, p. 49-58, 2003.

WOISKY R.G. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. Tese de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

XU, Y.; FISHER, G.J. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. **Journal of Dermatological Science Supplement**, Tokyo, v. 1, p. S1-S8, 2005.

YAN, S.; HONG, X.; HU, Y.; LIAO, K. Tempol, one of nitroxides, is a novel ultraviolet-A1 radiation protector for human dermal fibroblasts. **Journal of Dermatological Science**, Clare, v.37, p.137-143, 2005.

ZATZ, J. Rationale and approaches to skin permeation In: ZATZ, J.L. **Skin Permeation – Fundamentals and application**. Wheaton: Allured Publishing Corporation, p.11-31, 1993.

ZATZ, J.; KUSHLA, G.P. Gels. In: LIEBERMAN, H.A.; RIEGER, M.M.; BANKER, G.S. **Pharmaceutical dosage forms**. New York: Marcel Dekker, p. 399-421, 1996.

ZITTERL-EGLEER, K.; SOSA, S.; JURENITSCH, J.; SCHUBERT-ZSSILAVECZ, M.; DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A.; BERTOLDI, M.; FRANZ, C. Anti-oedematous activities of the main triterpenodiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L., Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 57, n. 2, p. 139-144, 1997.

ZUCKER, S.; PEI, D.; CAO, J.; LOPEZ-OTIN, C. Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP). **Current Topics in Developmental Biology**, San Diego, v. 54, p. 1-74, 2003.