UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito fotoquimioprotetor de quercetina incorporada em microemulsão contra os danos na pele causados pela radiação ultravioleta

Fabiana Testa Moura de Carvalho Vicentini

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito fotoquimioprotetor de quercetina incorporada em microemulsão contra os danos na pele causados pela radiação ultravioleta

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada:
Fabiana Testa Moura de Carvalho Vicentini

Orientadora:
Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca

Ribeirão Preto
2009

RESUMO

VICENTINI, F.T.M.C. **Efeito fotoquimioprotetor de quercetina incorporada em microemulsão contra os danos na pele causados pela radiação ultravioleta.** 2009. 173f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A exposição à radiação ultravioleta (RUV) pode provocar desequilíbrio no balanço oxidante/antioxidante da pele, causando prejuízos à sua integridade e levando a diversas alterações, entre as quais o envelhecimento precoce e o câncer de pele. Considerando a estreita relação entre o aumento do estresse oxidativo e os efeitos danosos causados pela RUV na pele, aliado ao fato de que estudos epidemiológicos demonstram que o uso de protetores ou bloqueadores solares não é completamente efetivo na prevenção dos diversos malefícios causados pela exposição à RUV, o uso de antioxidantes aparece como importante alternativa nas terapias de fotoproteção. A administração tópica de antioxidantes, como a quercetina, poderia afetar as alterações moleculares desencadeadas pela RUV e conseqüentemente as seqüelas biológicas e clínicas resultantes das mesmas. Desta forma, na presente pesquisa, sistema microemulsionado para a liberação cutânea de quercetina foi obtido, caracterizado e avaliado quanto a sua capacidade em promover maior penetração cutânea deste ativo, estabilidade, segurança e eficácia *in vivo* contra os danos na pele causados pela exposição à RUV. Além disso, o efeito da quercetina contra diferentes alterações moleculares induzidas pela RUV foi também avaliado, com o objetivo de investigar os possíveis mecanismos de ação fotoprotetora deste flavonóide. Os resultados demonstram que a incorporação da quercetina em sistema microemulsionado aumentou a penetração cutânea *in vitro* e *in vivo* deste flavonóide sem causar irritação, sendo, portanto, uma importante estratégia para melhorar a liberação tópica da quercetina. O estudo de estabilidade demonstra a necessidade de armazenamento deste sistema a 4°C para manutenção de sua funcionalidade. A microemulsão contendo quercetina inibiu a depleção do antioxidante endógeno GSH, assim como o aumento da atividade/secreção de proteinases e da atividade da MPO, induzidos pela exposição à RUVB. O pré-tratamento de queratinócitos com quercetina não alterou a indução pela RUV das MAP quinases, conseqüentemente não houve inibição na elevação dos níveis de c-Jun e c-Fos, assim como no aumento da produção das MMPs 1 e 3, mas por outro lado foi efetivo contra o aumento na produção das citocinas IL-1β, IL-6, IL-8 e TNF-α. Finalmente, demonstrou-se que a ação fotoprotetora da quercetina contra os danos na pele causados pela RUV é mediada principalmente pela inibição da via de sinalização do NF-κB, uma vez que, enquanto o pré-tratamento de queratinócitos com quercetina diminuiu a ativação deste fator de transcrição, nenhum efeito contra a indução da via de sinalização da AP-1 foi observado. Concluindo, este trabalho sugere a incorporação da quercetina em sistema microemulsionado como estratégia relevante no combate ao aparecimento de desordens cutâneas causadas pela exposição à RUV, além de contribuir para a elucidação, pelo menos em parte, do mecanismo de ação fotoprotetora da quercetina contra alterações moleculares induzidas pela RUV.

Palavras-chave: Quercetina, RUV, NF-κB, Pele, Microemulsão, Fotoquimioproteção.

ABSTRACT

VICENTINI, F.T.M.C. **Photochemoprotective effect of quercetin incorporated in microemulsion against skin damages induced by ultraviolet irradiation.** 2009. 173p. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The ultraviolet radiation (UVR) exposition may lead to the skin oxidant/antioxidant imbalance injuring its integrity and leading to several disorders, such as ageing and skin cancer. Considering the close relationship between the increase in oxidative stress and UV-induced skin damages, together with the fact that epidemiological studies indicate that the use of sunscreen and sun block are not completely effective in preventing UV-induced damages, the use of antioxidants arises as an important approach to photoprotection therapies. The topical use of antioxidants, such as quercetin, would affect the molecular changes induced by UV and subsequent biological and clinical sequela. Therefore, in the present study, microemulsion system for topical delivery of quercetin was obtained, characterized and evaluated with regards to its capability to increase skin penetration of quercetin, stability, toxicity and *in vivo* effectiveness against UV-induced skin damages. Moreover, quercetin effect against different UV-induced molecular changes was also assessed, in order to investigate the possible photoprotective mechanisms of action of this flavonoid. The results demonstrate that the incorporation of quercetin into microemulsion increased the *in vitro* and *in vivo* skin penetration of this flavonoid without causing skin irritation, being an important strategy to improve the topical delivery of quercetin. The stability study demonstrate the necessity to storage this system at 4°C to maintain its functionality. The microemulsion containing quercetin inhibited the depletion of the endogenous antioxidant GSH, as well as the increase in proteinases activity/secretion and MPO activity induced by UVB irradiation exposure. The pretreatment of keratinocytes with quercetin had no blocking effect on UV activation of MAP kinases, consequently, there was no inhibition in the c-Jun and c-Fos levels, as well as in the induction of MMPs 1 and 3, on the other hand, it was effective against the increase in the production of cytokines IL-1β, IL-6, IL-8 e TNF-α. Finally, it was demonstrated that the photoprotective action of quercetin against UV-induced skin damages is mediated mainly by suppression of NF-κB signaling pathway, once, while the pretreatment of keratinocytes with quercetin suppressed the activation of this transcription factor, no effect was observed against UV-induced AP-1 activation. In conclusion, the present study suggests the incorporation of quercetin into microemulsion system as a relevant strategy to prevent UV-induced skin disorders, and contribute, at least in part, to the elucidation of quercetin photoprotective mechanism of action against UV-induced molecular changes.

Keywords: Quercetin, UVR, NF-κB, Skin, Microemulsion, Photochemoprotection.

1. INTRODUÇÃO

A pele é um tecido altamente metabólico, possui a maior área superficial do corpo e serve como proteção física, microbiológica e bioquímica para os órgãos internos, sendo provida com grande número de mecanismos de defesa antioxidante (KOHEN; GATI, 2000). Mecanismos estes que contam com sistemas enzimáticos (catalase, superóxido dismutase, glutationa peroxidase e glutationa redutase) e não-enzimáticos (glutationa, α-tocoferol, ácido ascórbico, β-caroteno) (STEENVOORDEN; Van HENEGOUUWEN, 1997), que estão em maior concentração na epiderme, indicando ser esta mais susceptível que a derme ao estresse oxidativo (SHINDO et al., 1994).

Sob tensão normal de oxigênio tais mecanismos são suficientes para manter a homeostasia, removendo os radicais livres produzidos. Entretanto, a capacidade destes sistemas é limitada e pode ser prejudicada pela exposição excessiva aos raios ultravioleta (UV), deixando a pele vulnerável ao ataque das espécies reativas de oxigênio (EROs) (PODDA et al., 1998), de forma que, quando a geração destas EROs excede a capacidade das células de reduzi-las quimicamente, a concentração de radicais livres aumenta incontrolavelmente, rompendo o equilíbrio oxidante/antioxidante no organismo, em favor do primeiro, com conseqüente dano nos lipídios, proteínas e ácidos nucléicos das células da epiderme. Além disso, o aumento nas EROs é acompanhado pela ativação de diversos caminhos de sinalização sensíveis a estas espécies e indução na transcrição de determinados genes (ARRIGO, 1999; MAALOUF et al., 2002; MANTENA; KATIYAR, 2006; SIERENS et al., 2001).

Desta forma, considerando a estreita relação entre aumento do estresse oxidativo e efeitos danosos causados pela radiação ultravioleta (RUV) na pele, aliado ao fato de que estudos epidemiológicos demonstram que o uso de protetores ou bloqueadores solares não é completamente efetivo na prevenção do câncer de pele induzido pela exposição à RUV, o uso de antioxidantes aparece como importante alternativa nas terapias de fotoproteção e prevenção do câncer de pele e outras patologias cutâneas (COOPER; RANGER-MOORE; BOWDEN, 2005; GONZÁLEZ; FERNÁNDEZ-LORENTE; GILABERTE-CALZADA, 2008; MAALOUF et al., 2002). A administração tópica de antioxidantes poderia afetar as alterações moleculares desencadeadas pela RUV e conseqüentemente as seqüelas biológicas e clínicas resultantes (FUCHS, 1998).

1.1. EVENTOS MOLECULARES INDUZIDOS PELA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

A RUV é a maior fonte de reações adversas na pele e o principal fator ambiental causador de câncer (PEUS et al., 2001).

O sol emite RUV através das bandas UVC (200-280 nm), UVB (280-320 nm) e UVA (320-400 nm). A radiação UVC, de maior energia e conseqüentemente a mais danosa biologicamente, é absorvida pela camada de ozônio da atmosfera terrestre e assim seu papel nas patogenias humanas causadas pela exposição à radiação solar é mínimo. Já as radiações UVB e em menor extensão a UVA, são fatores causadores de diversas desordens, incluindo câncer de pele (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005).

Os raios UVB, os mais energéticos comprimentos de onda que atingem a Terra, podem diretamente induzir lesões no DNA, já os raios UVA são menos energéticos que UVB, mas têm maior poder de penetração, sendo que o seu principal modo de ação ocorre pela geração de EROs (VIOUX-CHAGNOLEAU et al., 2006). Em níveis moleculares, as radiações UVA e UVB diferem em seus sítios de ação na geração de lesões. Os efeitos fotobiológicos gerados pela radiação UVB são eritematogênicos e carcinogênicos, induzindo ao fotoenvelhecimento e aos danos diretos do DNA, RNA, proteínas e outros componentes da célula. Enquanto que a radiação UVA apresenta papel importante na indução de eritema pela geração de espécies fotossensibilizadas de oxigênio reativo, que danificam o DNA e membranas celulares, promovendo carcinogênese e mudanças associadas com fotoenvelhecimento (TEDESCO; MARTÍNEZ; GONZÁLEZ, 1997).

Para manifestar seus efeitos nas células, a energia eletromagnética inerente da RUV deve ser absorvida pelos cromóforos celulares e convertida em energia química. Cromóforos celulares como DNA, porfirinas, ácido urônico e aminoácidos aromáticos são capazes de absorver energia UV. Estes cromóforos energizados podem reagir com oxigênio molecular, resultando na geração de EROs (XU; FISHER, 2005). Tais espécies atuam como mensageiros químicos modulando a expressão de determinados genes pela ativação de vias de transdução do sinal. Particularmente nas vias de sinalização induzidas pela RUV sugere-se a participação das EROs como mediadores (FUCHS, 1998).

A multiplicidade de fatores de transcrição ativados em resposta à RUV sugere que esta desencadeia diversos elementos da cascata de sinalização, tanto nucleares quanto citoplasmáticos (FUCHS, 1998). Desta forma, como demonstrado

no diagrama da Figura 1, a exposição à RUV altera uma variedade de eventos de sinalização celular, causando modificações no perfil de expressão de determinados genes (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005). A elucidação dos mecanismos moleculares induzidos pela RUV resulta na proposição de métodos novos e eficazes para prevenir os danos na pele induzidos pela exposição à RUV (XU; FISHER, 2005).

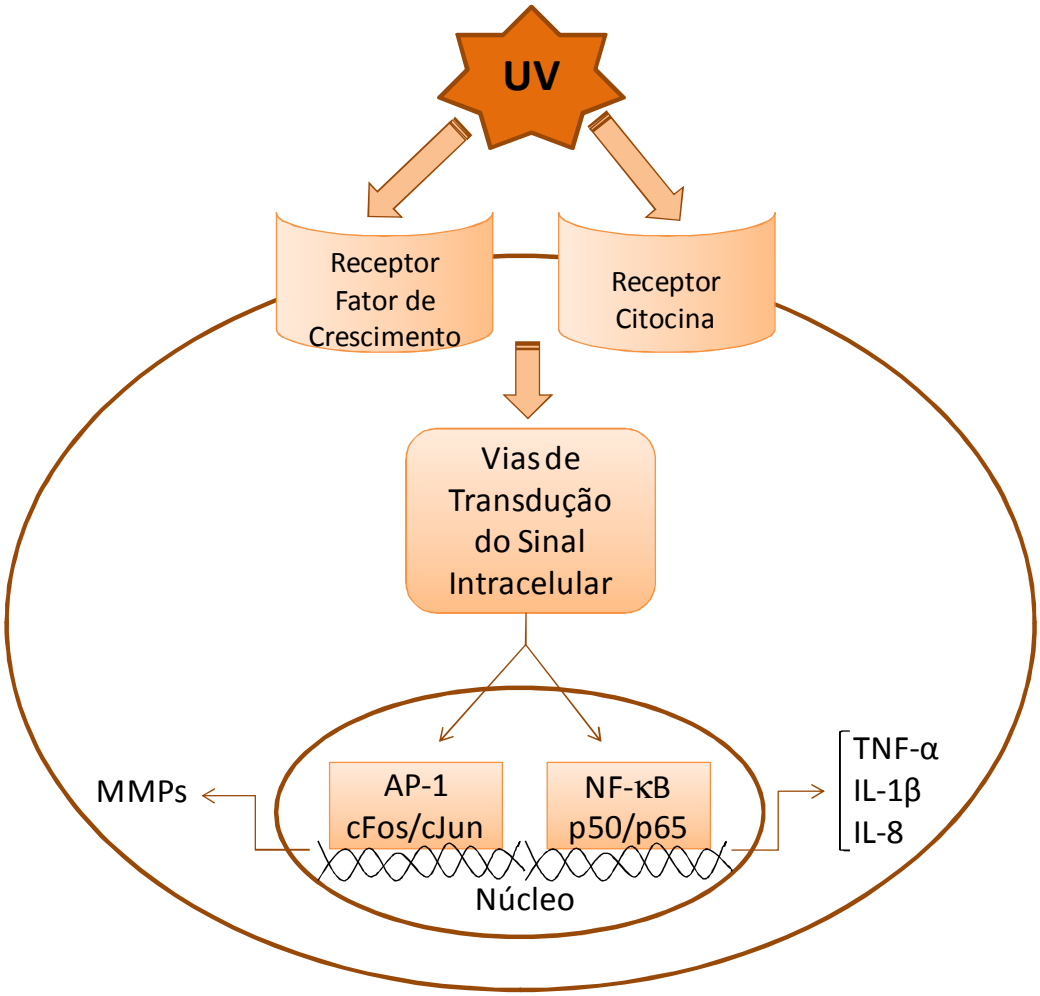

Figura 1. Eventos moleculares induzidos pela radiação ultravioleta. A exposição das células da pele à RUV resulta inicialmente na ativação de receptores de superfície celular para fatores de crescimento (como EGFR) e de receptores citocina (como receptores de IL-1 e TNF-α), com conseqüente ativação das múltiplas vias de transdução do sinal acopladas a estes receptores, como por exemplo, a via das MAP quinases. A ativação de elementos da cascata de sinalização permite a transmissão do sinal da superfície celular para uma variedade de alvos intracelulares como os fatores de transcrição AP-1 e NF-κB, que por sua vez, regulam a expressão gênica. Dentre os genes regulados por estes fatores estão os envolvidos na produção de diversas citocinas, moléculas de adesão, ciclooxigenase-2, óxido nítrico sintase e metaloproteinases da matriz. Adaptado de KANG et al., 2003, 2005.

A ativação de receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é um dos eventos iniciais da ativação das vias de sinalização induzidas pela RUV, de forma que a fosforilação da tirosina dos EGFR ocorre minutos após a exposição à RUV. Embora a ativação de EGFR pela RUV tenha sido bem documentada, os mecanismos envolvidos não foram totalmente esclarecidos (XU; FISHER, 2005).

Além da ativação de receptores de superfície celular, a geração das EROs pela RUV tem papel crítico na indução da sinalização de proteínas quinases ativadas por mitogênicos (MAP quinases). As EROs causam fosforilação e ativação das MAP quinases, importantes mediadores da resposta celular ao estresse (FUCHS, 1998; KANG et al., 2003).

As MAP quinases compreendem um número de serina/treonina quinases envolvidas na regulação de diferentes processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, adaptação ao estresse e apoptose (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005). Nas células de mamíferos, três MAP quinases relacionadas estruturalmente, mas distintas bioquimicamente e funcionalmente, foram identificadas, são elas: quinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2), quinase c-Jun amino-terminal (JNK) e quinase p38 (CHUNG, 2003; MANTENA; KATIYAR, 2006).

Estas MAP quinases são mediadores na transdução do sinal da superfície celular para o núcleo e são de grande importância no processo de ativação e controle da expressão gênica. As ERKs são ativadas em resposta a fatores de crescimento e estimulam a proliferação, sobrevivência e diferenciação celular, tendo papel importante também na promoção de tumores, principalmente estimulados pelo estado oxidativo. Já as MAP quinases JNK e p38 são principalmente ativadas por estressores ambientais como RUV, citocinas inflamatórias, choque térmico e agentes causadores de dano no DNA, e a fosforilação destas tem papel importante na diferenciação celular e resposta inflamatória. Sugere-se que o balanço dinâmico na ativação das diversas vias das MAP quinases é importante para sobrevivência celular, de modo que estas atuam nas células controlando a resposta aos diversos sinais do meio (CHUNG, 2003; MANTENA; KATIYAR, 2006).

A ativação destas MAP quinases resulta em aumento na expressão do fator de transcrição c-Jun em pele humana. Os heterodímeros de c-Jun juntamente com o fator de transcrição c-Fos formam o complexo fator de transcrição da proteína ativadora-1 (AP-1) (XU; FISHER, 2005).

O fator de transcrição AP-1 é um dímero de proteína que consiste tanto de heterodímeros, produtos da família de genes *fos* e *jun,* como homodímeros produtos da família de genes *jun.* Evidências sugerem o envolvimento da família de proteínas AP-1 na proliferação e sobrevivência celular pela regulação da expressão e função de grande número de proteínas reguladoras do ciclo celular. A atividade de transcrição de AP-1 é dependente do grau de fosforilação de c-Jun e da expressão de c-Fos, assim como de sua abundância. Estudos têm demonstrado que a exposição a doses subletais de RUVB produz forte indução de c-Jun e c-Fos em diversos tipos celulares (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005; MOON; CHUNG, 2006).

A atividade aumentada de AP-1 induz a expressão de diversos genes, dentre estes, vários membros da família das metaloproteinases. AP-1 é a principal força condutora da expressão de metaloproteinases em queratinócitos e fibroblastos de pele, induzindo a transcrição das mesmas (KIM, M.S. et al., 2005; XU; FISHER, 2005).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são uma família de zinco endopeptidases capazes de degradar estruturas protéicas como colágeno, elastina e outras proteínas presentes na matriz extracelular (KOSSODO et al., 2004; LAHMANN et al., 2001). Estas enzimas são responsáveis principalmente pela remodelagem, degradação ou modificação da matriz extracelular (LAHMANN et al., 2001; VIOUX-CHAGNOLEAU et al., 2006). Baseado em similaridades estruturais e especificidade ao substrato, as MMPs são divididas em sub-classes, incluindo colagenases, gelatinases, estromelisinas, matrilisinas e outras não classificadas (MOON; CHUNG, 2006).

Em condições fisiológicas, 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 RUV (FISHER et al., 1996, 1997), durante a inflamação, a cicatrização de feridas e câncer no estágio de progressão (STERNLICHT; WERB, 2001; ZUCKER et al., 2003).

A RUV induz aumento nos níveis de RNAm, de proteína e atividade enzimática de pelo menos três MMPs. São elas: MMP-1 (colagenase 1 ou colagenase intersticial), que degrada fibras de colágeno tipo I e III, MMP-3 (estromelisina-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 compõe o tecido conectivo dérmico (FISHER et al., 2001; XU; FISHER, 2005).

Ademais, além do fator de transcrição AP-1, a RUV ativa ainda o fator nuclear-kappa B (NF-κB), importante na regulação da expressão de grande número de genes, principalmente aqueles envolvidos na produção de substâncias pró-inflamatórias (COOPER; RANGER-MOORE; BOWDEN, 2005).

Descoberto em 1986, o NF-κB é um fator nuclear (NF) que, uma vez ativado possui a capacidade de ligar-se a uma seqüência de 10 pares de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve κ das moléculas de anticorpo das células B (κB) (SEN; BALTIMORE, 1986).

Atualmente, cinco membros da família NF-κB/Rel foram clonados e caracterizados, são eles: c-Rel, NF-κB1 (p50/p105), NF-κB2 (p52/p100), RelA (p65) e RelB. No entanto, em diversos sistemas celulares, o heterodímero constituído das subunidades p65/p50 é o mais abundante e investigado, de forma que na literatura, o termo NF-κB autêntico designa a combinação p50/RelA (BALDWIN JR, 1996; COOPER; RANGER-MOORE; BOWDEN, 2005; GLEZER et al., 2000; MAALOUF et al., 2002).

Sob condições normais, o fator NF-κB encontra-se no citoplasma como complexo inativo, no qual as subunidades p65 e p50 estão ligadas à proteína inibitória kappa B (IκB) (KANG et al., 2005). Duas formas de IκB (IκBα e IκBβ) estão associadas a este complexo, de maneira que IκBα mantém NF-κB no citoplasma por tornar a seqüência de localização nuclear inacessível e assim impedir sua translocação (BALDWIN JR, 1996). A fosforilação e degradação de IκBα resultam em rápida indução de NF-κB, ao passo que a degradação de IκBβ está associada à ativação prolongada de NF-κB (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2005).

Estudos demonstrando correlação direta entre a perda de IκBα com o aparecimento de NF-κB no núcleo e a recuperação nos níveis de IκBα em um período de aproximadamente uma hora após o estímulo, indicam que NF-κB e IκBα são componentes de um sistema regulatório mútuo, no qual os níveis de um dos componentes controlam a atividade ou quantidade do outro (BALDWIN JR, 1996).

A fosforilação de IκB ocorre pela ação de proteínas quinase específicas, como o complexo IκB quinase (IKK), composto pelas serina/treonina quinases IKKα

e IKKβ. A proteína IκB fosforilada sofre degradação, dependente de ubiquitinação, pelo complexo proteassoma 26S. O desmembramento do complexo IκB/NF-κB permite o transporte do NF-κB para o núcleo, com conseqüente ligação deste nos genes que apresentam a seqüência regulatória GGGACTTTCC junto à região promotora, causando aumento na expressão do gene alvo (BALDWIN JR, 1996; GLEZER et al., 2000; KIM, et al., 2007; MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2005).

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram a capacidade dos diferentes dímeros de NF-κB em reconhecer diferentes seqüências de bases na região do DNA. Como conseqüência, o fator de transcrição NF-κB regula enorme quantidade de genes, implicados em vários processos celulares (BALDWIN JR, 1996; GLEZER et al., 2000).

Dentre os inúmeros genes e fenômenos regulados pelo NF-κB, sua participação é crucial como mediador das respostas imuno inflamatórias (TANAKA et al., 2005). Diversos trabalhos demonstraram papel fundamental deste fator de transcrição na regulação de grande número de genes envolvidos na função imunológica e na resposta inflamatória, como por exemplo, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), fator de necrose tumoral (TNF-α), interleucinas (IL-1α, IL-1β e IL-6), etc, que promovem a reação de outras células efetoras como leucócitos e células endoteliais (BALDWIN JR, 1996; CARINI et al., 2000; FUCHS, 1998).

Por isso, embora o NF-κB esteja envolvido na manutenção da homeostasia na pele, a excessiva ativação do mesmo é patogênica, justificando o freqüente uso deste fator como alvo terapêutico no tratamento, principalmente, de doenças inflamatórias, já que a inibição de sua ativação pode gerar benefícios terapêuticos em vários tipos de inflamação. Assim, considera-se que a inibição de NF-κB seja capaz de prevenir as alterações patogênicas induzidas pela RUV (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2005; TANAKA et al., 2005).

Desta forma, a RUV exerce múltiplos efeitos nas células da pele, sendo a interação entre tais efeitos determinante na resposta gerada pela exposição a tal radiação (WANG; KOCHEVAR, 2005). Normalmente, a exposição aguda à radiação solar pode causar queimaduras, eritemas dolorosos, danos no DNA, degradação do tecido conectivo e ainda alterar a função imune da pele; já a exposição crônica, resulta em envelhecimento precoce e fotoenvelhecimento, queda imunológica,

podendo finalmente levar ao câncer de pele (FUCHS, 1998; GARMYN, 1995; XU et al., 2006). A incidência dessas doenças de pele cresce continuamente, à medida que a estimativa de vida da população aumenta e maiores quantidades de RUV atingem a superfície da Terra em decorrência da destruição da camada de ozônio (MANTENA; KATIYAR, 2006).

1.2. QUERCETINA

A quercetina (3,5,7,3',4' pentahidroxi flavona) foi isolada e biologicamente identificada em 1936 por Szent-Gyorgyi. Pertencente à classe dos flavonols, é o flavonóide encontrado em maior quantidade nos alimentos, é lipossolúvel e pode ter açúcares ligados à molécula (FORMICA; REGELSON, 1995; SKIBOLA; SMITH, 2000). A estrutura química da quercetina está representada pela Figura 2.

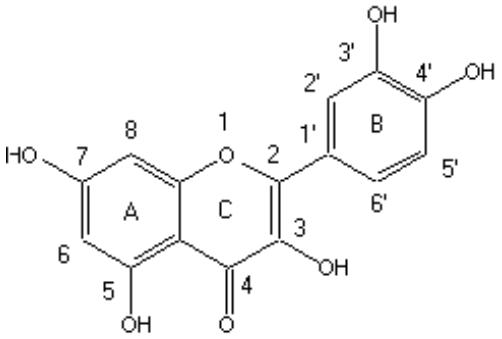

Figura 2. Estrutura química da quercetina.

Este importante flavonóide apresenta diversas atividades biológicas, como ação anti-hipertensiva, antiaterogênica, antiarrítmica, antialérgica, antineoplásica, antiagregante plaquetária, antiviral, antimicrobiana, antioxidante e antiinflamatória (FORMICA; REGELSON, 1995; MOON et al., 2003).

A atividade antiinflamatória da quercetina tem sido atribuída ao seu efeito inibitório sobre diversos processos envolvidos na resposta inflamatória, tais como: formação de leucotrienos (LAUGHTON et al., 1991); expressão de moléculas de adesão por células endoteliais (KIM et al., 2006); produção de óxido nítrico por macrófagos (MATSUDA et al., 2003); desgranulação de neutrófilos e mastócitos (MIDDLETON JR; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000).

Os mecanismos moleculares envolvidos no efeito antiinflamatório da quercetina não foram totalmente elucidados, mas investigações recentes sugerem

que as vias da tirosina quinase e das MAP quinases possam ser possíveis alvos farmacológicos (CHO et al., 2003). Além disso, a capacidade da quercetina em inibir a atividade do fator de transcrição NF-κB, importante na ativação de genes envolvidos na produção de substâncias pró-inflamatórias, também foi observada (CHO et al., 2003; DIAS et al., 2005; GARCÍA-ROMÁN et al., 2008; HÄMÄLÄINEN et al., 2007; MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2005; NAIR et al., 2006; RANGAN et al., 1999; SATO et al., 1997; SHIH et al., 2004; TAN et al., 2003).

A quercetina apresenta ainda diversas características que a torna um potente composto anticarcinogênico, sendo relatada atividade antiproliferativa *in vitro* deste flavonóide contra células cancerígenas do ovário, mama e estômago (SCAMBIA et al., 1990; YANAGIHARA et al., 1993). Além disso, Tan et al. (2003) evidenciaram que a quercetina inibiu diversos passos importantes da angiogênesis, incluindo proliferação, migração e formação *in vitro* do tubo de células endoteliais; além de promover atividade antiangiogênica *in vivo*. Tais resultados sugerem que o constante consumo de alimentos ricos em quercetina pode ser benéfico na prevenção e controle de alguns tipos de câncer.

Este efeito protetor da quercetina tem sido atribuído à inibição de enzimas chave da sinalização, como por exemplo, proteína quinase C, tirosina quinase e fosfoinositide 3-quinase, envolvidas na regulação da proliferação celular, angiogênesis e apoptose, assim como por suas propriedades antioxidantes atuando como seqüestrador de EROs (MORROW et al., 2001).

Desta maneira, a ingestão de quercetina pode ser benéfica para a saúde humana e sua atividade antioxidante poderia, pelo menos em parte, ser a responsável por tais efeitos biológicos (MAITI et al., 2005).

As propriedades antioxidantes da quercetina devem-se principalmente à sua capacidade em eliminar radicais livres como hidroxil, peroxil e ânions superóxido e quelar metais de transição como Fe e Cu, que quando livres aumentam o potencial de formação das EROs pela reação de Fenton (CHOI; CHEE; LEE, 2003). Diversas pesquisas demonstraram que a quercetina inibe de forma efetiva a peroxidação lipídica por meio do seqüestro de radicais livres e/ou quelando metais de transição (MAITI et al., 2005).

Erden Inal e Kahraman (2000) observaram queda nos níveis de malondialdeído (MDA), conhecido produto da peroxidação lipídica, quando administrada solução contendo quercetina em ratos previamente expostos à RUVA.

Observaram ainda aumento na atividade de enzimas antioxidantes como glutationa reduzida, glutationa redutase, glutationa peroxidase, catalase e superóxido dismutase no fígado, confirmando a ação antioxidante deste flavonóide.

Três componentes estruturais revelaram ter papel importante na relação estrutura x atividade da quercetina, são eles: (i) presença do grupo catecol no anel B, o qual proporciona a formação de radicais fenoxil mais estáveis após a doação do átomo de hidrogênio; (ii) a dupla ligação entre os C_2 – C_3 em conjugação com o grupo 4-carbonil presente no anel C, que permite o deslocamento de um elétron do radical fenoxil no anel B para o anel C; e finalmente, (iii) a presença do grupo 3-OH em combinação com a dupla ligação entre os C_2 – C_3, o que aumenta a estabilização por ressonância dos elétrons deslocados sobre a molécula (BONINA et al., 1996; PIETTA, 2000; SILVA et al., 2002; SUGIHARA et al., 1999).

Foram evidenciados também os efeitos benéficos do uso tópico da quercetina na diminuição dos danos oxidativos causados pela RUV na pele (CASAGRANDE et al., 2006; SAIJA et al., 1998). No entanto, o uso de outras estratégias capazes de promover aumento na penetração da quercetina pela pele deve ser considerado para otimizar sua ação (SAIJA et al., 1998).

1.3. MICROEMULSÃO COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO

A pele é composta por três camadas que desempenham funções específicas e distintas (KOHEN; GATI, 2000). Uma camada profunda, a hipoderme ou camada gordurosa subcutânea, uma intermediária, a derme, e uma camada superior, a epiderme (Figura 3).

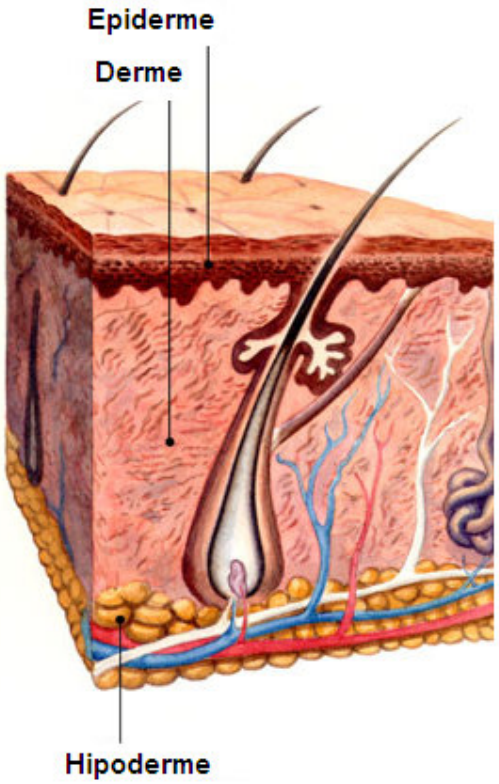

Figura 3. Representação esquemática da pele. Adaptado de www.artistry.com, obtida em fev. 2009.

A hipoderme ou camada gordurosa subcutânea é composta pelo tecido adiposo e conjuntivo, interpondo-se entre a pele e os planos profundos adjacentes funciona como barreira protetora isolante (BARRY, 1983; MASTERS; GONNORD; CORCUFF, 1997).

A derme está acima da hipoderme, e constitui-se de tecido conjuntivo composto de fibroblastos, fibras colágenas e reticulíneas, na qual se situam os vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e terminações nervosas, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas. O suprimento vascular da derme regula a temperatura, pressão, nutrição e remove produtos do metabolismo (BARRY, 1983; CHIEN, 1992).

A elasticidade da derme é atribuída a uma rede de proteínas fibrosas, incluindo colágeno (tipos I e III) e elastina, envolvidos por material amorfo (FOLDVARI, 2000). Oitenta por cento do colágeno total da pele humana é do tipo I, que está presente em toda derme, concedendo força de tensão. O colágeno tipo III constitui 15% do colágeno dérmico, e desempenha importante papel de âncora da epiderme à derme. O colágeno tipo IV é o componente em maior quantidade na

membrana de vasos, nervos, anexos e da junção dermo-epidérmica (MAUCH; KRIEG, 1993).

A epiderme é um epitélio estratificado, escamoso e queratinizado. Os queratinócitos compreendem o principal componente celular (> 90%) e são responsáveis pela evolução da função barreira. A epiderme por si mesma pode ser dividida em 5 camadas distintas:

♦ A camada basal ou estrato basal é responsável pela renovação contínua da epiderme (processo que ocorre a cada 20-30 dias). A proliferação das células *stem* na camada basal gera novos queratinócitos, os quais empurram as células existentes para a superfície externa. Durante este trânsito celular, dado que a epiderme é avascular, os queratinócitos começam a se diferenciar, atingindo a diferenciação terminal no estrato córneo (EC).

♦ A próxima camada da epiderme é o estrato espinhoso denominado pelas inúmeras projeções (desmossomas) na superfície das células. Os queratinócitos mantêm um conjunto completo de organelas e também grânulos envoltos por membranas (corpos lamelares), os quais são originados no Golgi.

♦ Subseqüentemente encontra-se o estrato granuloso, caracterizado pelos numerosos grânulos de queratohialina presentes no citoplasma dos queratinócitos mais achatados, porém ainda viáveis. Mais corpos lamelares também são mais aparentes e concentrados na parte superior das células granulares. Os corpos lamelares contêm pilhas de vesículas lipídicas achatadas.

♦ A camada de transição, o estrato lúcido, compreende células achatadas, as quais não são fáceis de visualizar microscopicamente. As organelas celulares encontram-se rompidas apresentando somente filamentos de queratina no estrato granuloso, um material interfilamentoso de matriz encontrado no compartimento intracelular. Os grânulos fundem-se com a membrana celular e liberam seu conteúdo no espaço intercelular. Estes lipídios intercelulares organizam-se em domínios multilamelares.

♦ Finalmente, no EC, a camada mais externa, proteínas são adicionadas à superfície interna da membrana celular para formar um envelope cornificado que aumenta a resistência das células (HILLERY; LLOYD; SWARBRICK, 2001; MOSER et al., 2001).

As diversas camadas anatômicas que compõem a epiderme representam diferentes estágios de diferenciação celular, tornando-se queratinizadas à medida que migram para a superfície da pele e quando isto ocorre, as células são denominadas corneócitos (MARJUKKA SUHONEN; BOUWSTRA; URTTI, 1999; MENON, 2002).

O EC é a interface do organismo com o meio ambiente, sua estrutura o torna altamente resistente às agressões externas como exposição a solventes orgânicos, soluções ácidas e básicas e enzimas proteolíticas; protege contra a entrada de microrganismos e de toxinas, naturais ou sintetizadas, e finalmente atua como barreira semipermeável à água, eletrólitos e não eletrólitos, representando assim o principal obstáculo à permeação de ativos (ASBILL; MICHNIAK, 2000; FARTASCH, 1996; FOLDVARI, 2000).

As principais rotas (Figura 4) de penetração de ativos através do EC são:

- via transcelular: o ativo passa diretamente pelos corneócitos e pela matriz lipídica intercelular intermediária;
- via intercelular: o ativo difunde-se entre os corneócitos, permanecendo na matriz lipídica - rota proposta para a maioria dos ativos (ABRAHAM; CHADHA; MITCHELL, 1995; BARRY, 2001; HADGRAFT, 2004; MARJUKKA SUHONEN; BOUWSTRA; URTTI, 1999);
- via apêndices: rota paralela na qual o ativo pode ser absorvido pelo folículo pilosebáceo e poros, sem a necessidade de hidratação do EC. Tais apêndices representam apenas 0,1% da superfície cutânea, de modo que sua contribuição é pequena.

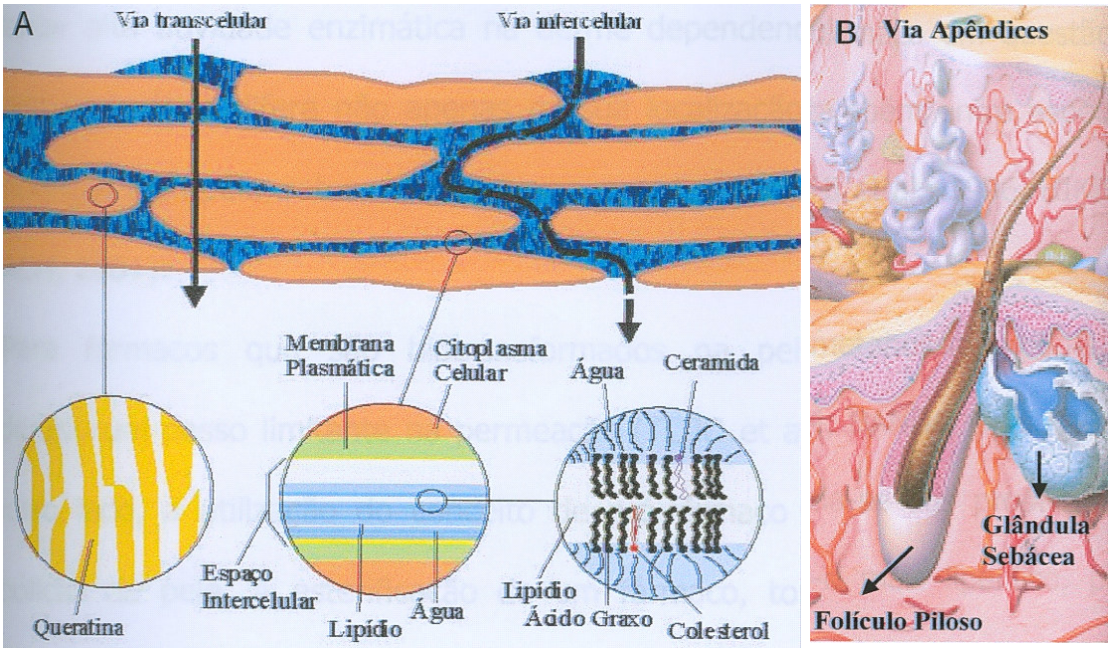

Figura 4. Rotas de penetração de ativos pelo estrato córneo: (A) através dos corneócitos e da matriz lipídica (penetração transcelular) e através da matriz lipídica, entre os corneócitos (penetração intercelular), adaptado de MOSER et al., 2001 e (B) através dos apêndices cutâneos, adaptado de GERAS, 1990.

O EC é principalmente visto como uma barreira predominantemente lipofílica (isto faz muito sentido uma vez que o EC foi desenvolvido para evitar a perda passiva de água dos tecidos em um ambiente árido), a qual apresenta alto grau de organização, e leva as moléculas permeadoras a um caminho de absorção longo e complexo. Estas características determinam a permeabilidade da membrana e a extensão em que ativos de diferentes propriedades físico-químicas são transportados (MOSER et al., 2001).

Assim sendo, a pele representa um desafio (devido à função barreira) e também uma oportunidade (devido à longa extensão e possibilidade de modular a função barreira) na administração de ativos. Técnicas físicas, compostos químicos e sistemas de liberação, como as microemulsões, têm sido utilizados na tentativa de modular a função barreira do EC e facilitar o transporte de ativos na pele (BARRY, 2004; KARANDE; JAIN; MITRAGOTRI, 2004; PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004).

A microemulsão (ME) foi introduzida por Hoar e Schulman, em 1943, que descreveram esse sistema como transparente ou translúcido, obtido por titulação a partir de uma emulsão comum de aspecto leitoso, que pela adição de um álcool de

cadeia média torna-se transparente (GARTI; ASERIN, 1996; LAWRENCE; REES, 2000).

Atualmente, MEs são definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos, transparentes, constituídos por dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizados por um filme de compostos tensoativos localizado na interface água/óleo (CHEN et al., 2006; FORMARIZ et al., 2005; KOGAN; GARTI, 2006; KREILGAARD, 2002).

Do ponto de vista microestrutural (Figura 5), as MEs podem ser do tipo água em óleo (A/O), óleo em água (O/A) ou estruturas bicontínuas. Nas MEs do tipo A/O, o componente hidrofílico é disperso na forma de gotículas coloidais no componente lipofílico. Já nas MEs do tipo O/A, o componente lipofílico é disperso na forma de gotículas coloidais no componente hidrofílico e ambas podem ser invertidas de A/O para O/A ou vice-versa ao variar as condições de emulsificação. Nas MEs com estrutura bicontínua os componentes hidrofílicos e lipofílicos formam canais adjacentes alongados com gotículas na faixa de 1-100 nm, como uma rede de tubos aquosos em matriz oleosa ou rede de tubos oleosos em matriz aquosa, contendo volumes relativos aproximadamente iguais entre as fases aquosa e oleosa (D'CRUZ; UCKUN, 2001; GODDEERIS et al., 2006; KREILGAARD, 2002; LAWRENCE; REES, 2000; LV et al., 2006; MO; ZHONG; ZHONG, 2000).

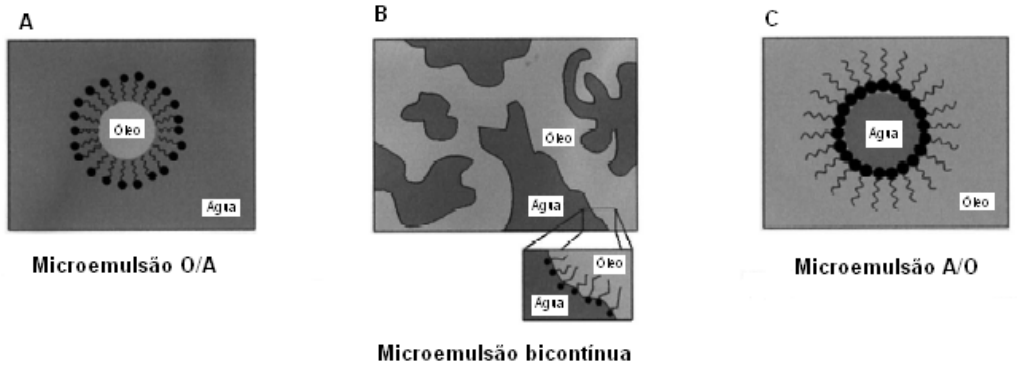

Figura 5. Representação esquemática da microestrutura dos três tipos de microemulsão mais comumente encontrados. Microemulsão do tipo (A) óleo em água, (B) bicontínua e (C) água em óleo. Adaptado de LAWRENCE; REES, 2000.

A formação da ME geralmente envolve a combinação de três a cinco componentes, tais como, tensoativo, água, óleo e, quando necessário, o co-tensoativo (D'CRUZ; UCKUN, 2001; LAWRENCE, 1996). A orientação para sistemas

O/A ou A/O é dependente das propriedades físico-químicas do tensoativo e do óleo, da relação entre as proporções tensoativo/co-tensoativo e entre as proporções água/óleo (CONSTANTINIDES et al., 1994; D'CRUZ; UCKUN, 2001). Portanto, a escolha adequada e as concentrações desses componentes tornam-se extremamente importantes para a orientação desses sistemas (KREILGAARD, 2002).

Embora as MEs sejam termodinamicamente estáveis, podem existir algumas barreiras cinéticas para sua formação e a ordem de adição dos componentes influencia a facilidade de obtenção destes sistemas, sendo que em alguns casos o uso de calor e/ou agitação mecânica pode facilitar o processo de formação das mesmas (LAWRENCE; REES, 2000).

A possibilidade de formar MEs também depende do balanço entre as propriedades hidrofílicas e lipofílicas do tensoativo, determinada não somente pela sua estrutura química, mas também por outros fatores como temperatura, força iônica e a presença de co-tensoativo (MITTAL, 1999). A literatura mostra que a adição de um co-tensoativo diminui o tamanho das gotículas e amplia as regiões de MEs e isso ocorre porque a mistura de tensoativo com um co-tensoativo é mais eficiente em reduzir a tensão interfacial entre água-óleo, proporcionando a redução máxima do tamanho das gotículas da fase interna (KREILGAARD, 2002; LAWRENCE; REES, 2000; TROTTA; PATTARINO; IGNONI, 2002).

O fator de empacotamento (Equação 1) é um parâmetro útil para predizer a geometria preferencialmente formada por um composto anfifílico, uma vez que relaciona o formato da molécula com propriedades que influenciam a curvatura da interface polar-apolar e, conseqüentemente, o tipo de agregado formado (MITCHELL; NINHAM, 1981):

Equação 1:

$$K = \frac{V}{A.L}$$

Em que: K= fator de empacotamento
V= volume da porção hidrofóbica do tensoativo
A= área da cabeça polar
L= comprimento da cauda do tensoativo

A inclusão de outros compostos no sistema microemulsionado pode influenciar tais parâmetros e, conseqüentemente, modificar a microestrutura formada (LAWRENCE; REES, 2000).

Deve-se ressaltar que tensoativos não-iônicos e anfotéricos são mais aceitáveis para aplicações farmacêuticas, uma vez que são menos alterados pelas mudanças de pH e forca iônica e contornam problemas de toxicidade (D'CRUZ; UCKUN, 2001; KREILGAARD, 2002).

A caracterização físico-química dos sistemas microemulsionados, principalmente por estudos de viscosidade e determinação do tamanho das gotículas, pode auxiliar na interpretação dos experimentos de liberação *in vitro* e *in vivo*. O diâmetro das gotículas da fase interna das MEs, assim como, a viscosidade do sistema estão diretamente relacionados com a velocidade de liberação *in vitro* e com o processo de difusão *in vivo*, facilitando ou dificultando a fração disponível do ativo por unidade de tempo (CORREA et al., 2005).

Vários métodos podem ser utilizados na caracterização de uma ME, de forma que para elucidação da sua estrutura é necessário a análise por diferentes métodos, sendo os mais utilizados:

- Microscopia de luz polarizada - verifica a isotropia;
- Espalhamento de luz - determina o diâmetro da fase dispersa;
- Métodos espectroscópicos - a ressonância magnética nuclear caracteriza a estrutura interna da ME;
- Outros métodos - reologia para determinação da viscosidade e condutividade elétrica do sistema para determinação do tipo de ME (NEUBERT; SCHMALFUSZ, 1999).

Dentre estes, o mais utilizado para caracterização de MEs é o espalhamento dinâmico de luz. Trata-se de uma técnica não invasiva para medição do tamanho de partículas menores que 1 µm. Os sistemas microemulsionados apresentam normalmente diâmetro médio das gotículas entre 10 – 100 nm (100 – 1000 Å), o que torna estes sistemas opticamente transparentes, uma vez que o tamanho máximo das gotículas é menor do que ¼ do comprimento de onda da luz incidente, e assim, as partículas não espalham luz (SINTOV; SHAPIRO, 2004).

Diferente das emulsões convencionais, as MEs são geralmente formadas espontaneamente quando quantidades adequadas dos componentes são

misturadas, sem a necessidade de energia mecânica adicional (KREILGAARD, 2002; LAWRENCE; REES, 2000; PAOLINO et al., 2002). As MEs são ainda superiores às soluções micelares em termos de potencial de solubilização de substâncias, por isso, são usadas para aumentar a solubilização e a absorção de ativos lipofílicos (CONSTANTINIDES, 1995; D'CRUZ; UCKUN, 2001).

As principais vantagens das MEs como veículos para liberação de ativos são a alta capacidade de solubilização de ativos com diferentes propriedades físico-químicas, estabilidade termodinâmica, simples tecnologia de preparo, custo relativamente baixo, baixa viscosidade com comportamento Newtoniano, grande área superficial e diâmetro das gotículas muito pequeno (CHEN et al., 2006; DJORDJEVIC et al., 2004; KOGAN; GARTI, 2006; KREILGAARD, 2002; LAWRENCE; REES, 2000; PELTOLA et al., 2003; SPICLIN et al., 2003).

O uso tópico de MEs tem aumentado a absorção cutânea de ativos tanto hidrofílicos como lipofílicos quando comparados aos veículos convencionais (BOLTRI et al., 1994; BONINA et al., 1995; CHEN et al., 2004; DELGADO-CHARRO et al., 1997; DREHER et al., 1997; KREILGAARD; PEDERSEN; JAROSZEWSKI, 2000; KRIWET; MÜLLER-GOYMANN, 1995; PELTOLA et al., 2003; RHEE et al., 2001; SCHMALFUSZ; NEUBERT; WOHLRAB, 1997; SINTOV; SHAPIRO, 2004; TROTTA et al., 1994; TROTTA; MOREL; GASCO, 1997; WU et al., 2001).

A Figura 6 representa um diagrama esquemático da variedade dos possíveis eventos envolvidos na liberação tópica a partir de uma ME. Existem diferentes processos de partição ocorrendo entre as fases interna e externa da ME, e entre estas fases e a pele (passos a, b e c). O transporte do ativo pode ser controlado por qualquer um destes processos e a força termodinâmica impulsora da liberação vai refletir as atividades relativas do ativo nestas diferentes fases. Além disso, deve-se considerar que um ou mais componentes da ME, por si só, são capazes de interagir de alguma forma com a membrana e alterar a função barreira da pele (passo d). Finalmente, existe ainda a possibilidade de que constituintes da pele como, por exemplo, os lipídios sejam extraídos pelas MEs, o que permite maior penetração do ativo (passo e) (DELGADO-CHARRO et al., 1997).

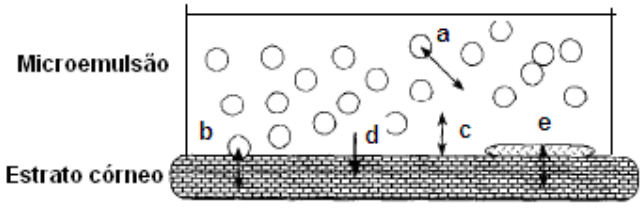

Figura 6. Diagrama esquemático da variedade dos possíveis eventos envolvidos na liberação tópica a partir de uma microemulsão. (a, b e c) Partição do ativo a partir de uma ou mais fases. (d) Difusão pelo estrato córneo. (e) Remoção de constituintes da pele. Adaptado de DELGADO-CHARRO et al., 1997.

Devido à estrutura dinâmica das MEs, acredita-se que os monômeros de tensoativos possam difundir-se pela superfície da pele e atuar como promotores tanto por romperem a estrutura lipídica do EC, facilitando a difusão dos ativos pela camada barreira, como por aumentarem a solubilidade dos mesmos na pele, aumentando assim o coeficiente de partição entre a pele e o veículo. Acredita-se que as MEs, que atuam rompendo a estrutura lipídica do EC, promovem aumento tanto na penetração quanto na permeação dos ativos, enquanto os sistemas que atuam aumentando a partição dos ativos na pele promoverão principalmente aumento na penetração (KREILGAARD, 2002).

Os efeitos combinados dos componentes hidrofílicos e lipofílicos das MEs aumentam a atividade do sistema. As MEs são capazes de reduzir a tensão interfacial entre a pele e o veículo devido ao contato próximo com os lipídios do epitélio, o que poderá resultar em penetração e permeação mais rápidas pelas camadas mais profundas da pele. Assim, a localização das substâncias nas camadas mais profundas deste tecido pode ser determinada pelas interações entre os diferentes componentes da formulação e certos domínios estruturais do EC (SCHMALFUSZ; NEUBERT; WOHLRAB, 1997).

No entanto, esta capacidade de interagir com os lipídios do EC pode comprometer a barreira epidérmica. Além disso, o alto conteúdo de tensoativos presentes nas MEs pode causar irritação cutânea sendo, portanto, de grande importância a avaliação do potencial de irritação cutânea e da ocorrência de possíveis reações tóxicas desencadeadas pela aplicação destas formulações (KREILGAARD, 2002; LEHMANN; KEIPERT; GLOOR, 2001).

5. CONCLUSÕES

A discussão dos resultados obtidos permitiu concluir que:

♦ A cromatografia líquida de alta eficiência utilizando detecção no UV mostrou-se um método analítico sensível e adequado para quantificação da quercetina presente na [E +D] e no sistema microemulsionado. Apesar de não ter sido seletiva para quantificação de quercetina presente no estrato córneo. A validação do método foi realizada, apresentando resultados adequados;

♦ A quercetina apresentou atividade antioxidante, atuando no seqüestro do radical estável $DPPH^{\bullet}$. O método de medida da atividade doadora de H^{+} ao radical estável $DPPH^{\bullet}$ mostrou-se seletivo para quantificação de quercetina presente no estrato córneo e para determinação da atividade antioxidante da quercetina presente nas microemulsões até a concentração final no meio de reação de 1 µg/mL de ativo. A validação deste método apresentou resultados adequados;

♦ A quantidade máxima de quercetina capaz de ser solubilizada na microemulsão formada por óleo de canola, Span® 80, Tween® 80, PG e água, sem haver alteração das características físico-químicas, foi de 0,3% m/m.

♦ O sistema microemulsionado apresentou-se como sistema estável, isotrópico translúcido, do tipo A/O, com comportamento reológico característico de um fluido Newtoniano e tamanho médio de gotículas e potencial zeta de aproximadamente 15 nm e -6 mV, respectivamente;

♦ Os métodos de extração da quercetina de secções de pele e da fase receptora, propostos e padronizados neste trabalho, promoveram recuperação adequada do ativo em análise, o que viabiliza seu emprego em estudos de permeação/retenção que proponham o uso tópico da quercetina;

♦ O uso da microemulsão aumentou a penetração cutânea *in vitro* e *in vivo* da quercetina sem gerar permeação do ativo, sendo, portanto, uma importante estratégia para aumentar a liberação tópica deste flavonóide lipofílico;

♦ A aplicação tópica, por 15 dias consecutivos, da microemulsão adicionada ou não de quercetina não acarretou alterações que indiquem irritação cutânea;

♦ O estudo de estabilidade mostrou a necessidade de armazenamento do sistema microemulsionado a 4°C para manutenção da concentração e atividade antioxidante da quercetina;

♦ Os estudos de fotoestabilidade da microemulsão adicionada de quercetina demonstraram não ter havido degradação ou perda de atividade deste flavonóide quando submetido a condições severas de exposição à radiação, sugerindo a fotoestabilidade do mesmo e confirmando a viabilidade do uso deste sistema contra os danos oxidativos na pele induzidos pela exposição à RUVB;

♦ A aplicação tópica da microemulsão contendo quercetina em camundongos sem pêlos mostrou-se eficaz contra os danos induzidos pela RUVB, sendo efetiva na proteção do antioxidante endógeno GSH, bem como na inibição da atividade/secreção de proteinases e da atividade da MPO. No entanto, a avaliação do efeito deste sistema no aumento do eritema e nas alterações histopatológicas causadas pela exposição à RUVB demonstra que a eficácia *in vivo* não é decorrente de efeito protetor da formulação;

♦ O pré-tratamento de queratinócitos humanos com quercetina não alterou a indução pela RUV das MAP quinases ERK, JNK e p38, conseqüentemente não houve inibição na elevação dos níveis de c-Jun e c-Fos, assim como no aumento da produção das MMPs 1 e 3, não sendo, portanto, detectado efeito deste flavonóide contra a indução do fator de transcrição AP-1. Por outro lado, este flavonóide foi efetivo contra o aumento na produção das citocinas IL-1β, IL-6, IL-8 e TNF-α;

♦ O pré-tratamento de queratinócitos humanos com quercetina diminuiu os níveis da subunidade RelA/p65 no núcleo e a atividade de ligação ao DNA do fator de transcrição NF-κB, mas não teve efeito algum na degradação de IκBα induzida pela exposição à RUV;

Desta forma, os resultados obtidos na presente pesquisa evidenciam que o potencial do flavonóide quercetina em atenuar os danos causados na pele pela exposição à RUV deve-se principalmente a seus efeitos inibitórios contra a ativação do fator de transcrição NF-κB, importante mediador do processo inflamatório. Além disso, considerando que a ativação desta via de sinalização celular em resposta à exposição à RUV participa das reações inflamatórias envolvidas nos processos de fotoenvelhecimento, fotodermatoses e fotocarcinogênese, o uso da microemulsão contendo quercetina, desenvolvida e avaliada nesta pesquisa, como agente fotoquimioprotetor, aparece como estratégia relevante no combate ao aparecimento destas desordens cutâneas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As Referências Bibliográficas estão de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)

ABOOFAZELI, R.; BARLOW, D.; LAWRENCE, M.J. Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions II. Photon correlation spectroscopy. **AAPS PharmSci,** v.2, n.3, E.19, 2000.

ABRAHAM, M.H.; CHADHA, H.S; MITCHELL, R.C. The factors that influence skin penetration of solutes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology,** v.47, n.1, p.8-16, 1995.

AFAQ, F.; ADHAMI, V.M.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutation Research**, v.571, n.1-2, p.153-173, 2005.

ARRIGO, A.P. Gene expression and the thiol redox state. **Free Radical Biology & Medicine,** v.27, n.9-10, p.936-944, 1999.

ASBILL, C.S.; MICHNIAK, B.B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. **Pharmaceutical Science and Technology Today,** v.3, n.1, p.36-41, 2000.

BALDWIN JR, A.S. The NF-κB and IκB proteins: new discoveries and insights. **Annual Review of Immunology,** v.14, p.649-83, 1996.

BARRY, B.W. Breaching the skin's barrier to drugs. **Nature Biotechnology,** v.22, n.2, p.165-167, 2004.

BARRY, B.W. **Dermatological formulations: percutaneous absorption.** New York: Marcel Dekker, 1983.

BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.14, n.2, p.101-114, 2001.

BILIA, A.R.; BERGONZI, M.C.; MORGENNI, F.; MAZZI, G.; VINCIERI, F.F. Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some

preparations. **International Journal of Pharmaceutics,** v.213, n.1-2, p.199-208, 2001.

BISSETT, D.L.; HANNON, D.P.; ORR, T.V. Wavelength dependence of histological, physical, and visible changes in chronically UV-irradiated hairless mouse skin. **Photochemistry and Photobiology,** v.50, n.6, p.763-769, 1989.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, n.4617, p.1199-1200, 1958.

BOLTRI, L.; MOREL, S.; TROTTA, M.; GASCO, M.R. *In vitro* transdermal permeation of nifedipine from thickened microemulsions. **Journal de Pharmacie de Belgique,** v.49, n.4, p.315-320, 1994.

BOND, M.; BAKER, A.H.; NEWBY, A.C. Nuclear factor κB activity is essential for matrix metalloproteinase-1 and -3 upregulation in rabbit dermal fibroblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v.264, n.2, p.561-567, 1999.

BONINA, F.; LANZA, M.; MONTENEGRO, L.; PUGLISI, C.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SAIJA, A. Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. **International Journal of Pharmaceutics**, v.145, n.1-2, p.87-94, 1996.

BONINA, F.; MONTENEGRO, L.; SCROFANI, N.; ESPÓSITO, E.; CORTESI, R.; MENEGATTI, E.; NASTRUZZI, C. Effects of phospholipid based formulations on *in vitro* and *in vivo* percutaneous absorption of methyl nicotinate. **Journal of Controlled Release,** v.34, n.1, p.53-63, 1995.

BOS, J.D.; MEINARDI, M.M.H.M. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. **Experimental Dermatology,** v.9, n.3, p.165-169, 2000.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **The Journal of Investigative Dermatology,** v.78, n.3, p.206-209, 1982.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology,** v.28, n.1, p.25-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** RE n° 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br.>. Acesso em: 26 de fev. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Guia para realização de estudos de estabilidade.** RE n°1, de 29 de julho de 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br.> Acesso em: 26 de fev. 2009.

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, 1993. cap.4, p.93-111.

BUMAJDAD, A.; EASTOE, J. Conductivity of water-in-oil microemulsions stabilized by mixed surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science,** v.274, n.1, p.268-276, 2004.

CALABRÓ, M.L.; TOMMASINI, S.; RANERI, D.; DONATO, P.; FICARRA, P.; FICARRA, R. Selective reversed-phase liquid chromatography method for the kinetic investigation of 3-hydroxyflavone photostability. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences,** v.800, n.1-2, p.245-251, 2004.

CARINI, M.; ALDINI, G.; PICCONE, M.; FACINO, R.M. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. **Farmaco,** v.55, n.8, p.526-534, 2000.

CASAGRANDE, R. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo quercetina: controle físico-químico e avaliação da eficácia *in vivo*.** 2005. 229f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

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,** v.328, n.2, p.183-190, 2007.

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,** v.84, n.1, p.21-27, 2006.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B, Biomedical Sciences and Applications,** v.689, n.1, p.175-180, 1997.

CHANG, X.L.; CHEN, H.B.; ZHAO, X.Z.; GAO, Z.H.; XU, H.B.; YANG, X.L. High-performance liquid chromatography determination of triptolide *in vitro* permeation studies. **Analytica Chimica Acta,** v.534, n.2, p.215-221, 2005.

CHANGEZ, M.; VARSHNEY, M. Aerosol-OT microemulsions as transdermal carriers of tetracaine hydrochloride. **Drug Development and Industrial Pharmacy,** v.26, n.5, p.507-512, 2000.

CHARRO, M.B.D. Sistemas dispersos heterogéneos. In: JATO, J.L.V. **Tecnología Farmacéutica: Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas.** Madrid: Editorial Síntesis, 1997. p.207-316.

CHEN, H.; CHANG, X.; DU, D.; LI, J.; XU, H.; YANG, X. Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.315, n.1-2, p.52-58, 2006.

CHEN, H.; CHANG, X.; WENG, T.; ZHAO, X.; GAO, Z.; YANG, Y.; XU, H.; YANG, X. A study of microemulsion systems for transdermal delivery of triptolide. **Journal of Controlled Release,** v.98, n.3, p.427-436, 2004.

CHIEN, Y.W. Transdermal drug delivery and delivery systems. In: ___. **Novel drug delivery systems:** Drug and the pharmaceutical sciences. New York: Marcel Dekker, 1992. v.50, cap.7, p.301-380.

CHOI, E.J.; CHEE, K.M.; LEE, B.H. Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. **European Journal of Pharmacology,** v.482, n.1-3, p.281-285, 2003.

CHO, J.Y.; KIM, I.S.; JANG, Y.H.; KIM, A.R.; LEE, S.R. Protective effect of quercetin, a natural flavonoid against neuronal damage after transient global cerebral ischemia. **Neuroscience Letters,** v.404, n.3, p.330-335, 2006.

CHO, S.Y.; PARK, S.J.; KWON, M.J.; JEONG, T.S.; BOK, S.H.; CHOI, W.Y.; JEONG, W.I.; RYU, S.Y.; DO, S.H.; LEE, C.S.; SONG, J.C.; JEONG, K.S. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF-κB pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. **Molecular and Cellular Biochemistry,** v.243, n.1-2, p.153-160, 2003.

CHUNG, J.H. Photoaging in Asians. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine,** v.19, n.3, p.109-121, 2003.

CONSTANTINIDES, P.P. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. **Pharmaceutical Research,** v.12, n.11, p.1561-1572, 1995.

CONSTANTINIDES, P.P.; SCALART, J.P.; LANCASTER, C.; MARCELLO, J.; MARKS, G.; ELLENS, H.; SMITH, P.L. Formulation and intestinal absorption enhancement evaluation of water-in-oil microemulsions incorporating medium-chain glycerides. **Pharmaceutical Research,** v.11, n.10, p.1385-1390, 1994.

CONSTANTINIDES, P.P.; YIV, S.H. Particle size determination of phase-inverted water-in-oil microemulsions under different dilution and storage conditions. **International Journal of Pharmaceutics,** v.115, p.225-234, 1995.

COOPER, S.; RANGER-MOORE, J.; BOWDEN, T.G. Differential inhibition of UVB-induced AP-1 and NF-κB transactivation by components of the jun bZIP domain. **Molecular Carcinogenesis,** v.43, n.2, p.108-116, 2005.

CORREA, M.A.; SCARPA, M.V.; FRANZINI, M.C.; OLIVEIRA, A.G. On the incorporation of the non-steroidal anti-inflammatory naproxen into cationic O/W microemulsions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.43, n.2, p.108-114, 2005.

D'CRUZ, O.J.; UCKUN, F.M. Gel-microemulsions as vaginal spermicides and intravaginal drug delivery vehicles. **Contraception,** v.64, n.2, p.113-123, 2001.

D'LEÓN, L.F.P. Estudos de estabilidade de produtos cosméticos. **Cosmetics & Toiletries,** v.13, p.54-64, 2001.

DELGADO-CHARRO, M.B.; IGLESIAS-VILAS, G.; BLANCO-MENDEZ, J.; LOPEZ-QUINTELA, M.A.; MARTY, J.P.; GUY, R.H. Delivery of a hydrophilic solute through the skin from novel microemulsion systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v.43, p.37-42, 1997.

DIAS, A.S.; PORAWSKI, M.; ALONSO, M.; MARRONI, N.; COLLADO, P.S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Quercetin decreases oxidative stress, NF-κB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. **The Journal of Nutrition,** v.135, n.10, p.2299-2304, 2005.

DICK, I.P.; SCOTT, R.C. Pig ear skin as an *in vitro* model for human skin permeability. **Journal of Pharmacy and Pharmacology,** v.44, n.8, p.640-645, 1992.

DINIS, T.C.P.; MADERIA, V.M.C.; ALMEIDA, L.M. Action of phenolic derivates (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid

peroxidation and as peroxyl radical scavengers. **Archives of Biochemistry and Biophysics,** v.315, n.1, p.161-169, 1994.

DJORDJEVIC, L.; PRIMORAC, M.; STUPAR, M. *In vitro* release of diclofenac diethylamine from caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics,** v.296, n.1-2, p.73-79, 2005.

DJORDJEVIC, L.; PRIMORAC, M.; STUPAR, M.; KRAJISNIK, D. Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. **International Journal of Pharmaceutics**, v.271, n.1-2, p.11-19, 2004.

DREHER, F.; WALDE, P.; WALTHER, P.; WEHRLI, E. Interaction of a lecithin microemulsion gel with human stratum corneum and its effects on transdermal transport. **Journal of Controlled Release,** v.45, n.2, p.131-140, 1997.

ERDEN INAL, M.; KAHRAMAN, A. The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet A induced oxidative stress in rats. **Toxicology**, v.154, n.1-3, p.21-29, 2000.

ESPOSITO, E.; BORTOLOTTI, F.; MENEGATTI, E.; CORTESI, R. Amphiphilic association systems for Amphotericin B delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.260, n.2, p.249-260, 2003.

FARKAS, B.; MAGYARLAKI, M.; CSETE, B.; NEMETH, J.; RABLOCZKY, G.; BERNATH, S.; NAGY, P.L.; SÜMEGI, B. Reduction of acute photodamage in skin by topical application of a novel PARP inhibitor. **Biochemical Pharmacology,** v.63, n.5, p.921-932, 2002.

FARTASCH, M. The nature of the epidermal barrier: structural aspects. **Advanced Drug Delivery Reviews,** v.18, n.3, p.273-282, 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,** v.117, n.2, p.219-226, 2001.

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,** v. 379, n.6563, p.335-339, 1996.

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,** v. 337, n.20, p.1419-1428, 1997.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science and Technology Today,** v.3, n.12, p.417-425, 2000.

FONSECA, M.J.V. **Formulações fotoquimioprotetoras: controle da qualidade física e funcional (atividade antioxidante) e avaliação da eficácia *in vivo*.** 2005. 78f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

FORMARIZ, T.P.; URBAN, M.C.C.; SILVA JÚNIOR, A.A.; GREMIÃO, M.P.D.; OLIVEIRA, A.G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,** v.41, n.3, p.301-313, 2005.

FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology,** v.33, n.12, p.1061-1080, 1995.

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. **The Journal of Investigative Dermatology,** v.93, n.6, p.769-773, 1989.

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

GARCÍA-ROMÁN, R.; SALAZAR-GONZÁLEZ, D.; ROSAS, S.; ARELLANES-ROBLEDO, J.; BELTRÁN-RAMÍREZ, O.; FATTEL-FAZENDA, S.; VILLA-TREVIÑO, S. The differential NF-κB modulation by S-adenosyl-L-methionine, N-acetylcysteine and quercetin on the promotion stage of chemical hepatocarcinogenesis. **Free Radical Research,** v.42, n.4, p.331-343, 2008.

GARMYN, M. Molecular response of human keratinocytes to ultraviolet radiation: an attempt to understand the pathogenesis to acute and chronic photodamage. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology,** v.4, p.235-238, 1995.

GARTI, N.; ASERIN, A. Pharmaceutical emulsions, double emulsion and microemulsion. In: ___. **Drug and the pharmaceutical science**. New York: Marcel Dekker, 1996. v.73, cap. 15, p.412-519.

GASCO, M.R.; GALLARATE, M.; PATTARINO, F. *In vitro* permeation of azelaic acid from viscosized microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics,** v.69, n.3, p.193-196, 1991.

GERAS, A.J. **Dermatology:** a medical artist's interpretation. Sandoz Medical Publications, Sandoz Pharma Ltda, 1990.

GLEZER, I.; MARCOURAKIS, T.; AVELLAR, M.C.W.; GORENSTEIN, C.; SCAVONE, C. The role of the transcription factor NF-κB in the molecular mechanism of action of psychoactive drugs. **Revista Brasileira de Psiquiatria,** v.22, n.1, p.26-30, 2000.

GODDEERIS, C.; CUPPO, F.; REYNAERS, H.; BOUWMAN, W.G.; VAN DEN MOOTER, G. Light scattering measurements on microemulsions: Estimation of

droplet sizes. **International Journal of Pharmaceutics**, v.312, n.1-2, p.187-195, 2006.

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

GRIMM, T.; SCHAFER, A.; HOGGER, P. Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (pycnogenol). **Free Radical Biology & Medicine,** v.36, n.6, p.811-822, 2004.

GUARATINI, T.; GIANETI, M.D.; CAMPOS, P.M.B.G.M. Stability of cosmetic formulations containing esters of vitamins E and A: chemical and physical aspects. **International Journal of Pharmaceutics,** v.327, n.1-2, p.12-16, 2006.

HADGRAFT, J. Passive enhancement strategies in topical and transdermal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics,** v.184, n.1, p.1-6, 1999.

HADGRAFT, J. Skin deep. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v.58, n.2, p.291-299, 2004.

HÄMÄLÄINEN, M.; NIEMINEN, R.; VUORELA, P.; HEINONEN, M.; MOILANEN, E. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-κB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-κB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. **Mediators of Inflammation,** v.2007, n.45673, p.1-10, 2007.

HILLERY, M.A.; LLOYD, A.W.; SWARBRICK, J. **Drug Delivery and Targeting: For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists.** New York: Taylor & Francis Inc., 2001.

HISSIN, P.J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry,** v.74, n.1, p.214-226, 1976.

ICH. International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH harmonized tripartite guideline). **Validation of analytical procedures: methodology**, de 6 nov. 1996.

ICH. International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH harmonized tripartite guideline). **Stability testing of new drugs substances and products**, de 6 fev. 2003.

KANG, S.; CHUNG, J.H.; LEE, J.H.; FISHER, G.J.; WAN, Y.S.; DUELL, E.A.; VOORHEES, J.J. Topical N-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet-light-induced signaling that leads to photoaging in human skin *in vivo*. **The Journal of Investigative Dermatology,** v.120, n.5, p.835-841, 2003.

KANG, S.; CHO, S.; CHUNG, J.H.; HAMMERBERG, C.; FISHER, G.J.; VOORHEES, J.J. Inflammation and extracellular matrix degradation mediated by activated transcription factors nuclear factor-κB and activator protein-1 in inflammatory acne lesions *in vivo*. **American Journal of Pathology,** v.166, n.6, p.1691-1699, 2005.

KARANDE, P.; JAIN, A.; MITRAGOTRI, S. Discovery of transdermal penetration enhancers by high-throughput screening. **Nature Biotechnology,** v.22, n.2, p.192-197, 2004.

KERKELA, E.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. **Experimental Dermatology,** v.12, n.2, p.109-125, 2003.

KIM, B.H.; LEE, I.J.; LEE, H.Y.; HAN, S.B.; HONG, J.T.; AHN, B.; LEE, C.K.; KIM, Y. Quercetin 3-*O*-β-(2''-galloyl)-glucopyranoside inhibits endotoxin LPS-induced IL-6 expression and NF-κB activation in macrophages. **Cytokine,** v.39, n.3, p.207-215, 2007.

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,** v.126, n.11, p.1170-1177, 2005.

KIM, J.D.; LIU, L.; GUO, W.; MEYDANI, M. Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion. **Journal of Nutritional Biochemistry,** v.17, n.3, p.165-176, 2006.

KIM, M.S.; LEE, S.; RHO, H.S.; KIM, D.H.; CHANG, I.S.; CHUNG, J.H. The effects of a novel synthetic retinoid, seletinoid G, on the expression of extracellular matrix proteins in aged human skin *in vivo*. **Clinica Chimica Acta,** v.362, n.1-2, p.161-169, 2005.

KOGAN, A.; GARTI, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. **Advances in Colloid and Interface Science,** v.123-126, p.369-385, 2006.

KOHEN, R.; GATI, I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. **Toxicology**, v.148, n.2-3, p.149-157, 2000.

KOHEN, R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress - New approaches for their evaluation. **Biomedicine and Pharmacotherapy,** v.53, n.4, p.181-192, 1999.

KOSHIISHI, I.; MITANI, H.; SUMITA, T.; IMANARI, T. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) prevents the conversion of adipose tissue into fibrous tissue in skin exposed to chronic UV irradiation. **Toxicology and Applied Pharmacology,** v.173, n.2, p.99-104, 2001.

KOSSODO, S.; WONG, W.R.; SIMON, G.; KOCHEVAR, I.E. Effects of UVR and UVR-induced cytokines on production of extracellular matrix proteins and proteases by dermal fibroblasts cultured in collagen gels%. **Photochemistry and Photobiology,** v.79, n.1, p.86-93, 2004.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews,** v.54, n.1, p.S77-S98, 2002.

KREILGAARD, M.; KEMME, M.J.B.; BURGGRAAF, J.; SCHOEMAKER, R.C.; COHEN, A.F. Influence of a microemulsion vehicle on cutaneous bioequivalence of a

lipophilic model drug assessed by microdialysis and pharmacodynamics. **Pharmaceutical Research,** v.18, n.5, p.593-599, 2001.

KREILGAARD, M.; PEDERSEN, E.J.; JAROSZEWSKI, J.W. NMR characterisation and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems. **Journal of Controlled Release,** v.69, n.3, p.421-433, 2000.

KRIWET, K.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised human stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**, v.125, p.231-242, 1995.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature,** v.227, n.5259, p.680-685, 1970.

LAHMANN, C.; YOUNG, A.R.; WITTERN, K.P.; BERGEMANN, J. Induction of mRNA for matrix metalloproteinase 1 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in human skin *in vivo* by solar simulated radiation. **Photochemistry and Photobiology,** v.73, n.6, p.657-663, 2001.

LAUGHTON, M.J.; EVANS, P.J.; MORONEY, M.A.; HOULT, J.R.; HALLIWELL, B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxigenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. **Biochemical Pharmacology,** v.42, n.9, p.1673-1681, 1991.

LAWRENCE, M.J. Microemulsions as drug delivery vehicles. **Current Opinion in Colloid and Interface Science,** v.1, p.826-832, 1996.

LAWRENCE, M.J.; REES, G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews,** v.45, n.1, p.89-121, 2000.

LEE, J.H.; CHUNG, J.H.; CHO, K.H. The effects of epigallocatechin-3-gallate on extracellular matrix metabolism. **Journal of Dermatological Science,** v.40, n.3, p.195-204, 2005.

LEHMANN, L.; KEIPERT, S.; GLOOR, M. Effects of microemulsions on the stratum corneum and hydrocortisone penetration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v.52, n.2, p.129-136, 2001.

LOPES, L.B.; BENTLEY, M.V.L.B. Cyclosporin A in skin samples from *in vitro* penetration studies may be assayed by a simple HPLC method. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences,** v.41, n.4, p.477-482, 2005.

LOPES, L.B.; LOPES, J.L.C.; OLIVEIRA, D.C.R.; THOMAZINI, J.A.; GARCIA, M.T.J.; FANTINI, M.C.A.; COLLETT, J.H.; BENTLEY, M.V.L.B. Liquid crystalline phases of monoolein and water for topical delivery of cyclosporin A: Characterization and study of *in vitro* and *in vivo* delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v.63, n.2, p.146-155, 2006.

LOPEZ, R.F.V.; BENTLEY, M.V.L.B.; DELGADO-CHARRO, M.B.; SALOMON, D.; van den BERGH, H.; LANGE, N.; GUY, R.H. Enhanced delivery of 5-aminolevulinic acid esters by iontophoresis *in vitro*. **Photochemistry and Photobiology,** v.77, n.3, p.304-308, 2003.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry,** v.193, n.1, p.265-275, 1951.

LV, F.F.; LI, N.; ZHENG, L.Q.; TUNG, C.H. Studies on the stability of the chloramphenicol in the microemulsion free of alcohols. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v.62, n.3, p.288-294, 2006.

MAALOUF, S.; EL-SABBAN, M.; DARWICHE, N.; GALI-MUHTASIB, H. Protective effect of vitamin E on ultraviolet B light-induced damage in keratinocytes. **Molecular Carcinogenesis**, v.34, n.3, p.121-130, 2002.

MAITI, K.; MUKHERJEE, K.; GANTAIT, A.; AHAMED, H.N.; SAHA, B.P.; MUKHERJEE, P.K. Enhanced therapeutic benefit of quercetin-phospholipid complex

in carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats: a comparative study. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics,** v.4, n.2, p.84-90, 2005.

MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Acadêmia Brasileira de Ciências,** v.75, n.4, p.469-486, 2003.

MANTENA, S.K.; KATIYAR, S.K. Grape seed proanthocyanidins inhibit UV-radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF-κB signaling in human epidermal keratinocytes. **Free Radical Biology & Medicine,** v.40, n.9, p.1603-1614, 2006.

MARJUKKA SUHONEN, T.; BOUWSTRA, J.A.; URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. **Journal of Controlled Release**, v.59, n.2, p.149-161, 1999.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, B.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; TUÑÓN, M.J. Quercetin attenuates nuclear factor-κB activation and nitric oxide production in interleukin-1β-activated rat hepatocytes. **The Journal of Nutrition**, v.135, n.6, p.1359-1365, 2005.

MASTERS, B.R.; GONNORD, G.; CORCUFF, P. Three-dimensional microscopic biopsy of *in vivo* human skin: a new technique based on a flexible confocal microscope. **Journal of Microscopy,** v.185, p.329-338, 1997.

MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; ANDO, S.; TOGUCHIDA, I.; YOSHIKAWA, M. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. **Bioorganic and Medicinal Chemistry,** v.11, n.9, p.1995-2000, 2003.

MAUCH, C.; KRIEG, T. Collagens: Their structure and metabolism. In: LAPIERE C.M.; KRIEG, T. **Connective Tissue Diseases in the Skin:** Clinical Dermatology Series. New York: Marcel Dekker, 1993. cap.1, p.1-16.

MEI, Z.; CHEN, H.; WENG, T.; YANG, Y.; YANG, X. Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v.56, n.2, p.189-196, 2003.

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,** v.17, n.5-6, p.609-613, 2003.

MENDEZ, A.S.L.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E.E.S. Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v.33, n.5, p.947-954, 2003.

MENON, G.K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews,** v.54, n.1, p.S3-S17, 2002.

MERKEN, H.M.; BEECHER, G.R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. **Journal Agricultural and Food Chemistry,** v.48, n.3, p.577-599, 2000.

MIDDLETON JR, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids o mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews,** v.52, n.4, p.673-751, 2000.

MIN, Y.D.; CHOI, C.H.; BARK, H.; SON, H.Y.; PARK, H.H.; LEE, S.; PARK, J.W.; PARK, E.K.; SHIN, H.I.; KIM, S.H. Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF-κB and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. **Inflammation Research,** v.56, n.5, p.210-215, 2007.

MITCHELL, D.J., NINHAM, B.W. Micelles, vesicles and microemulsions. **Journal of the Chemical Society,** v.2, n.77, p.601-629, 1981.

MITTAL, L.K. **Handbook of microemulsion science and technology**. New York: Promod Kumar, 1999. p.1-13.

MO, C.; ZHONG, M.; ZHONG, Q. Investigation of structure and structural transition in microemulsion systems of sodium dodecyl sulfonate + n-heptane + n-butanol + water by cyclic voltammetric and electrical conductivity measurements. **Journal of Electroanalytical Chemistry,** v.493, n.1, p.100-107, 2000.

MONTENEGRO, L.; BONINA, F.; RIGANO, L.; GIOGILLI, S.; SIRIGU, S. Protective effect evaluation of free radical scavengers on UVB induced human cutaneous erythema by skin reflectance spectrophotometry. **International Journal of Cosmetic Science,** v.17, n.3, p.91-103, 1995.

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,** v.580, n.3, p.769-774, 2006.

MOON, H.I.; LEE, J.; ZEE, O.P.; CHUNG, J.H. The effect of flavonol glycoside on the expressions of matrix metalloproteinase-1 in ultraviolet-irradiated cultured human skin fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology,** v.101, n.1-3, p.176-179, 2005.

MOON, S.K.; CHO, G.O.; JUNG, S.Y.; GAL, S.W.; KWON, T.K.; LEE, Y.C.; MADAMANCHI, N.R.; KIM, C.H. Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: role of ERK 1/2, cell-cycle regulation, and matrix metalloproteinase-9. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v.301, n.4, p.1069-1078, 2003.

MORGANTI, P.; RUOCCO, E.; WOLF, R.; RUOCCO, V. Percutaneous absorption and delivery systems. **Clinics in Dermatology,** v.19, n.4, p.489-501, 2001.

MORROW, D.M.P.; FITZSIMMONS, P.E.E.; CHOPRA, M.; McGLYNN, H. Dietary supplementation with the anti-tumour promoter quercetin: its effects on matrix metalloproteinase gene regulation. **Mutation Research,** v.480-481, p.269-276, 2001.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v.52, n.2, p.103-112, 2001.

MÜLLER-GOYMANN, C.C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v.58, n.2, p.343-356, 2004.

NAIR, M.P.; MAHAJAN, S.; REYNOLDS, J.L.; AALINKEEL, R.; NAIR, H.; SCHWARTZ, S.A.; KANDASWAMI, C. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF-κβ system. **Clinical and Vaccine Immunology,** v.13, n.3, p.319-328, 2006.

NEUBERT, R.H.H.; SCHMALFUSZ, U. Microemulsions. In: BRONAUGH, R.L.; MAIBACH, H.I. **Percutaneous absorption: Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology.** New York: Marcel Dekker, 1999. p.879-886.

NUUTILA, A.M.; PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AARNI, M.; OKSMAN-CALDENTEY, K.M. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. **Food Chemistry,** v.81, n.4, p.485-493, 2003.

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

ORTHABER, D.; GLATTER, O. Synthetic phospholipid analogs: a structural investigation with scattering methods. **Chemistry and Physics of Lipids,** v.107, n.2, p.179-189, 2000.

PAOLINO, D.; VENTURA, C.A.; NISTICÓ, S.; PUGLISI, G.; FRESTA, M. Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen: percutaneous adsorption through human skin and *in vivo* human skin tolerability. **International Journal of Pharmaceutics**, v.244, n.1-2, p.21-31, 2002.

PAREJO, I.; CODINA, C.; PETRAKIS, C.; KEFALAS, P. Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods,** v.44, n.3, p.507-512, 2000.

PELTOLA, S.; SAARINEN-SAVOLAINEN, P.; KIESVAARA, J.; SUHONEN, T.M.; URTTI, A. Microemulsions for topical delivery of estradiol. **International Journal of Pharmaceutics**, v.254, n.2, p.99-107, 2003.

PETERS, F.T.; DRUMMER, O.H.; MUSSHOFF, F. Validation of new methods. **Forensic Science International,** v.165, n.2-3, p.216-224, 2007.

PEUS, D.; MEVES, A.; POTT, M.; BEYERLE, A.; PITTELKOW, M.R. Vitamin E analog modulates UVB-induced signaling pathway activation and enhances cell survival. **Free Radical Biology & Medicine,** v.30, n.4, p.425-432, 2001.

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

PINELO, M.; MANZOCCO, L.; NUÑEZ, M.J.; NICOLI, M.C. Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. **Food Chemistry,** v.88, n.2, p.201-207, 2004.

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 & Medicine,** v.24, n.1, p.55-65, 1998.

POLTE, T.; TYRRELL, R.M. Involvement of lipid peroxidation and organic peroxides in UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression. **Free Radical Biology & Medicine,** v.36, n.12, p.1566-1574, 2004.

PRAUSNITZ, M.R.; MITRAGOTRI, S.; LANGER, R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. **Nature reviews. Drug Discovery,** v.3, n.2, p.115-124, 2004.

QUATTROCCHI, O.A.; ANDRIZZI, S.A.; LABA, R.F. Validación de Métodos. In: **Introducción a la HPLC: Aplicación y Práctica**. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro, 1992. cap.12, p.301-328.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova,** v.24, n.1, p.68-76, 2001.

RANGAN, G.K.; WANG, Y.; TAY, Y.C.; HARRIS, D.C. Inhibition of NF-κB activation with antioxidants is correlated with reduced cytokine transcription in PTC. **The American Journal of Physiology,** v.277, n.5, p.F779-789, 1999.

RHEE, Y.S.; CHOI, J.G.; PARK, E.S.; CHI, S.C. Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics,** v.228, n.1-2, p.161-170, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova,** v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RÖPKE, C.D.; KANEKO, T.M.; RODRIGUES, R.M.; da SILVA, V.V.; BARROS, S.; SAWADA, T.C.H.; KATO, M.J.; BARROS, S.B.M. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcathecol from four topical formulations. **International Journal of Pharmaceutics,** v.249, n.1-2, p.109-116, 2002.

ROSSETTI, F.C. **Microemulsões como sistema de liberação cutânea para a zinco ftalocianina tetrassulfonada na terapia fotodinâmica do câncer de pele: Obtenção, caracterização e estudos de permeação e penetração cutâneas.** 2006. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

RUIZ, P.A.; BRAUNE, A.; HÖLZLWIMMER, G.; QUINTANILLA-FEND, L.; HALLER, D. Quercetin inhibits TNF-induced NF-κB transcription factor recruitment to

proinflammatory gene promoters in murine intestinal epithelial cells. **The Journal of Nutrition,** v.137, n.5, p.1208-1215, 2007.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; GIACCHI, M.; DE PASQUALE, A.; BONINA, F. Influence of different penetration enhancers on *in vitro* skin permeation and *in vivo* photoprotective effect of flavonoids. **International Journal of Pharmaceutics**, v.175, n.1, p.85-94, 1998.

SALIOU, C.; KITAZAWA, M.; McLAUGHLIN, L.; YANG, J.P.; LODGE, J.K.; TETSUKA, T.; IWASAKI, K.; CILLARD, J.; OKAMOTO, T.; PACKER, L. Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF-κB activation in a human keratinocyte cell line. **Free Radical Biology & Medicine,** v.26, n.1-2, p.174-183, 1999.

SATO, K.; SUGIBAYASHI, K.; MORIMOTO, Y. Species differences in percutaneous absorption of nicoradil. **Journal of Pharmaceutical Sciences,** v.80, n.2, p.104-107, 1991.

SATO, M.; MIYAZAKI, T.; KAMBE, F.; MAEDA, K.; SEO, H. Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the induction of interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein-1 expression by tumor necrosis factor-α in cultured human synovial cells. **The Journal of Rheumatology,** v.24, n.9, p.1680-1684, 1997.

SCAMBIA, G.; RANELLETTI, F.O.; PANICI, P.B.; PIANTELLI, M.; BONANNO, G.; VINCENZO, R.; FERRANDINA, G.; RUMI, C.; LAROCCA, L.M.; MANCUSO, S. Inhibitory effect of quercetin on OVCA 433 cells and presence of type II oestrogen binding sites in primary ovarian tumours and cultured cells. **British Journal of Cancer,** v.62, n.6, p.942-946, 1990.

SCHMALFUSZ, U.; NEUBERT, R.; WOHLRAB, W. Modification of drug penetration into human skin using microemulsions. **Journal of Controlled Release,** v.46, n.3, p.279-285, 1997.

SCHRECK, R.; ALBERMANN, K.; BAEUERLE, P.A. Nuclear factor κB: An oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). **Free Radical Research Communications,** v.17, n.4, p.221-237, 1992.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cell,** v.46, n.5, p.705-716, 1986.

SHIH, C.M.; LIN, H.; LIANG, Y.C.; LEE, W.S.; BI, W.F.; JUAN, S.H. Concentration-dependent differential effects of quercetin on rat aortic smooth muscle cells. **European Journal of Pharmacology,** v.496, n.1-3, p.41-48, 2004.

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. **The Journal of Investigative Dermatology,** v.102, n.4, p. 470-475, 1994.

SIERENS, J.; HARTLEY, J.A.; CAMPBELL, M.J.; LEATHEM, A.J.; WOODSIDE J.V. Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. **Mutation Research,** v.485, n.2, p.169-176, 2001.

SILVA, M.M.; SANTOS, M.R.; CAROÇO, G.; ROCHA, R.; JUSTINO, G.; MIRA, L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. **Free Radical Research**, v.36, n.11, p.1219-1227, 2002.

SIMON, P.; VEVERKA, M.; OKULIAR, J. New screening method for the determination of stability of pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics,** v.270, n.1-2, p.21-26, 2004.

SINGH, S. Drug stability testing and shelf-life determination according to international guidelines. **Pharmaceutical Technology,** v.23, n.6, p.68-88, 1999a.

SINGH, S. Stability test storage conditions for zones III and IV: Some unresolved issues. **Pharmaceutical Technology,** v.23, n.10, p.130-142, 1999b.

SINTOV, A.C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration *in vitro* and cutaneous drug bioavailability *in vivo*. **Journal of Controlled Release,** v.95, n.2, p.173-183, 2004.

SKAPER, S.D.; FABRIS, M.; FERRARI, V.; DALLE CARBONARE, M.; LEON, A. Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid. **Free Radical Biology & Medicine,** v.22, n.4, p.669-678, 1997.

SKIBOLA, C.F.; SMITH, M.T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biology & Medicine,** v.29, n.3-4, p.375-383, 2000.

SMITH, G.J.; THOMSEN, S.J.; MARKHAM, K.R.; ANDARY, C.; CARDON, D. The photostabilities of naturally occurring 5-hydroxyflavones, flavonols, their glycosides and their aluminium complexes. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry,** v.136, n.1-2, p.87-91, 2000.

SONG, L.; XU, M.; LOPES-VIRELLA, M.F.; HUANG, Y. Quercetin inhibits matrix metalloproteinase-1 expression in human vascular endothelial cells through extracellular signal-regulated kinase. **Archives of Biochemistry and Biophysics,** v.391, n.1, p.72-78, 2001.

SPICLIN, P.; HOMAR, M.; ZUPANCIC-VALANT, A.; GASPERLIN, M. Sodium ascorbyl phosphate in topical microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v.256, n.1-2, p.65-73, 2003.

STARCHER, B.; PIERCE, R.; HINEK, A. UVB irradiation stimulates deposition of new elastic fibers by modified epithelial cells surrounding the hair follicles and sebaceous glands in mice. **The Journal of Investigative Dermatology,** v.112, n.4, p.450-455, 1999.

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

STEIN, B.; BALDWIN JR, A.S.; BALLARD, D.W.; GREENE, W.C.; ANGEL, P.; HERRLICH, P. Cross-coupling of the NF-κB p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. **The EMBO Journal,** v.12, n.10, p.3879-3891, 1993.

STERNLICHT, M.D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual Review of Cell and Developmental Biology,** v.17, p.463-516, 2001.

SUGIHARA, N.; ARAKAWA, T.; OHNISHI, M.; FURUNO, K. Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with α-linolenic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v.27, n.11-12, p.1313-1323, 1999.

SWARTZ, M.E.; MAZZEO, J.R.; GROVER, E.R.; BROWN, P.R. Validation of enantiomeric separations by micellar electrokinetic capillary chromatography using synthetic chiral surfactants. **Journal of Chromatography A,** v.735, n.1-2, p.303-310, 1996.

TAN, W.F.; LIN, L.P.; LI, M.H.; ZHANG, Y.X.; TONG, Y.G.; XIAO, D.; DING, J. Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential. **European Journal of Pharmacology,** v.459, n.2-3, p.255-262, 2003.

TANAKA, K.; HASEGAWA, J.; ASAMITSU, K.; OKAMOTO, T. Prevention of the ultraviolet B-mediated skin photoaging by a nuclear factor κB inhibitor, parthenolide. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,** v.315, n.2, p.624-630, 2005.

TEDESCO, A.C.; MARTÍNEZ, L.; GONZÁLEZ, 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.

TROTTA, M.; GASCO, M.R.; CAPUTO, O.; SANCIN, P. Transcutaneous diffusion of hematoporphyrin in photodynamic therapy: in vitro release from microemulsions. **STP Pharma Sciences,** v.4, p.150-154, 1994.

TROTTA, M.; MOREL, S.; GASCO, M.R. Effect of oil phase composition on the skin permeation of felodipine from o/w microemulsions. **Pharmazie,** v.52, n.1, p.50-53, 1997.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v.53, n.2, p.203-208, 2002.

UNDERSTANDING YOUR SKIN STRUCTURE. Disponível em: <www.artistry.com>. Acesso em: 26 de fev. 2009.

United States Pharmacopeia (USP) XXVIII. Pharmaceutical stability. United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 2005.

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,** v.2, p.S1-S12, 2006.

WALKER, R.B.; SMITH, E.W. Role of percutaneous penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews,** v.18, n.3, p.295-301, 1996.

WALTERSCHEID, J.P.; NGHIEM, D.X.; ULLRICH, S.E. Determining the role of cytokines in UV-induced immunomodulation. **Methods,** v.28, n.1, p.71-78, 2002.

WANG, H.; KOCHEVAR, I.E. Involvement of UVB-induced reactive oxygen species in TGF-β biosynthesis and activation in keratinocytes. **Free Radical Biology & Medicine,** v.38, n.7, p.890-897, 2005.

WARR, G.G. Shear and elongational rheology of ternary microemulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,** v.103, n.3, p.273-279, 1995.

WESSELS, P.; HOLZ, M.; ERNI, F.; KRUMMEN, K., OGORKA, J. Statistical evaluation of stability data of pharmaceutical products for specification setting. **Drug Development and Industrial Pharmacy,** v.23, n.5, p.427-439, 1997.

WU, H.; RAMACHANDRAN, C.; WEINER, N.D.; ROESSLER, B.J. Topical transport of hydrophilic compounds using water-in-oil nanoemulsions. **International Journal of Pharmaceutics,** v.220, n.1-2, p.63-75, 2001.

XIA, Y.; ZWEIER, J.L. Measurement of myeloperoxidase in leukocyte-containing tissues. **Analytical Biochemistry,** v.245, n.1, p.93-96, 1997.

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

XU, Y.; SHAO, Y.; VOORHEES, J.J.; FISHER, G.J. Oxidative inhibition of receptor-type protein-tyrosine phosphatase κ by ultraviolet irradiation activates epidermal growth factor receptor in human keratinocytes. **Journal of Biological Chemistry,** v.281, n.37, p.27389-27397, 2006.

YANAGIHARA, K.; ITO, A.; TOGE, T.; NUMOTO, M. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. **Cancer Research,** v.53, n.23, p.5815-5821, 1993.

YAN, S.X.; HONG, X.Y.; HU, Y.; LIAO, K.H. Tempol, one of nitroxides, is a novel ultraviolet-A1 radiation protector for human dermal fibroblasts. **Journal of Dermatological Science,** v.37, n.3, p.137-143, 2005.

YOSHIHISA, I.; KITAMURA, M. Bioflavonoid quercetin inhibit mitosis and apoptosis of glomerular cells *in vitro* and *vivo*. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v.297, p.629-634, 2000.

ZATZ, J.L. Percutaneous absorption. In: SMOLEN, V.F.; BALL, L.A. **Controlled Drug Bioavailability.** New York: John Wiley and Sons, 1985. p.185-239.

ZATZ, J.L. Scratching the surface: Rationale and approaches to skin permeation. In: ___. **Skin Permeation – Fundamentals and Application.** Wheaton: Allured Publishing Corporation, 1993. cap.1, p.11-31.

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