

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento, estabilidade e eficácia de formulações
fotoprotetoras contendo extrato de *Matricaria chamomilla* e seus
componentes isolados**

Luciana da Silva Freitas

Ribeirão Preto
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento, estabilidade e eficácia de formulações
fotoprotetoras contendo extrato de *Matricaria chamomilla* e seus
componentes isolados**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Medicamentos e Cosméticos, para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos.

Orientada: Luciana da Silva Freitas

Ribeirão Preto

2011

Freitas, Luciana da Silva

Desenvolvimento, avaliação da estabilidade e eficácia de formulações fotoprotetoras contendo extrato de *Matricaria chamomilla* ou seus componentes isolados. Ribeirão Preto, 2011.

139 p.; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Patrícia M.B.G. Maia campos

1. Fotoprotetores 2. *Matricaria chamomilla* 3. Apigenina 4. Alfa-bisabolol 5. Radiação UV

RESUMO

FREITAS, L. S. **Desenvolvimento, estabilidade e de eficácia de formulações fotoprotetoras contendo extrato de *Matricaria chamomilla* e seus componentes isolados.** 2011. 139. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

As propriedades dos extratos vegetais vêm sendo cada vez mais investigadas, suscitando o interesse em aliar o potencial destes para minimizar efeitos do fotoenvelhecimento da pele decorrentes da ação dos radicais livres à fotoproteção proporcionada pelos filtros solares. Apesar do uso difundido de vários extratos vegetais, alguns deles, como a *Matricaria chamomilla*, ainda carecem de estudos acerca de suas propriedades e efeitos biológicos na pele, especialmente quando este é veiculado em formulações dermocosméticas. Assim, esse trabalho teve por objetivo a avaliação da estabilidade e da eficácia pré-clínica de formulações fotoprotetoras contendo o extrato de *Matricaria chamomilla* ou dos componentes isolados do vegetal, α -bisabolol e apigenina, na proteção de danos causados pela radiação ultravioleta (UV). Para tal, verificou-se a estabilidade dos ativos veiculados em formulação com FPS previamente determinado, bem como outras formulações de protetor solar foram desenvolvidas e a estas adicionadas extrato de camomila ou alfa-bisabolol, sendo testados por centrifugação, pH e análise visual. A estabilidade física das formulações mais estáveis foi analisada por estudos reológicos. A estabilidade química de formulações contendo extrato de camomila, apigenina e bisabolol foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Estas formulações acrescidas de apigenina, extrato de camomila, ou alfa-bisabolol finalmente foram avaliadas no que tange à eficácia pré-clínica. Neste estudo, camundongos foram submetidos à radiação UV e o efeito protetor das formulações foi avaliado através de técnicas de biofísica não-invasiva e análise de imagem, que forneceram medidas de eritema, o teor de água do estrato córneo, a perda de água transepidermica, ecogenicidade e espessura da derme. Os resultados permitiram selecionar as formulações fisicamente estáveis para ambas as combinações de filtros UV associados contendo as substâncias ativas em estudo. No estudo de estabilidade química, a apigenina foi mais estável quando comparada às outras substâncias ativas em estudo e o bisabolol mostrou estabilidade química baixa. Todas as formulações foram eficazes na redução da perda de água transepidermica. Os efeitos destas formulações na pele foram muito positivos, pois todas elas levaram a aumentos ecogenicidade e valores menores de espessura quando comparada às regiões irradiadas. Esses resultados mostraram efeitos significativos na melhoria do processo inflamatório causado pela radiação. Finalmente, as formulações desenvolvidas foram estáveis e eficazes na proteção da pele. Além disso, quando o extrato de camomila ou apigenina esteve presente na formulação fotoprotetora os efeitos foram mais pronunciados.

Palavras chave: camomila, estabilidade, eficácia, apigenina, α -bisabolol, fotoprotetor.

ABSTRACT

FREITAS, L. S. **Development, stability and efficacy of sunscreens containing *Matricaria chamomilla* extract or its isolated components**. 2011. 139f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Particular plant extracts are being increasingly studied for their properties, in order to combine their potential to minimize skin photoaging effects from the action of free radicals with photoprotection provided by sunscreens. Despite of the widespread use of various plant extracts, some of them as it is the case of *Matricaria chamomilla* still need more detailed studies especially on their properties and biological effects on skin, especially in dermocosmetic formulations. The aim of the present study was to assess the stability and the preclinical efficacy of sunscreen formulations containing *M. chamomilla* extract or its isolated components, alpha-bisabolol and apigenin, in the protection from damage caused by ultraviolet radiation.

For this purpose, the physical stability in a pre-determined SPF formulation added of the active substances under study was determined. Other sunscreen formulations were developed and supplemented with chamomile extract or alpha-bisabolol, and these were tested for centrifugation stability, pH and visual analysis. Physical stability of the most stable formulations was estimated by rheological measurements. The chemical stability of the formulations containing chamomile extract, apigenin, and bisabolol was determined by High Efficiency Liquid Chromatography (HPLC). These formulations with chamomile extract, apigenin or alpha-bisabolol were finally evaluated in terms of preclinical efficacy. In this study, hairless mice were submitted to UV radiation and the protective effect of the formulations was evaluated using noninvasive biophysics techniques and image analysis, in which we obtained measures of erythema, the water content of stratum corneum, transepidermal water loss, the echogenicity and the thickness of the dermis. The results allowed selecting physically-stable formulations for both the combinations of UV-filters associated containing the active substances under study. In the chemical stability study, the apigenin present in the extract was more stable when compared to the other active substances under study and the bisabolol showed a low chemical stability. All the formulations were effective in the transepidermic water-loss reduction. The effects of these formulations on skin were very positive since all of them led to ecogenicity increases and lower thickness values when compared to irradiated regions. These results showed significant effects in the improvement of the inflammatory process caused by radiation. Finally, the formulations developed were stable and effective in the skin protection. In addition, when the chamomile extract or apigenin was present in the formulation the photoprotective effects were more pronounced.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os efeitos deletérios da radiação ultravioleta(UV) sobre a pele tem sido, nos dias de hoje, foco de trabalhos e discussões importantes na área da saúde. Sabe-se que a radiação UV ocasiona e/ou acelera processos bioquímicos importantes implicados no fotoenvelhecimento cutâneo e que juntamente com outros agentes tais como poluição atmosférica, traumatismos, fumo, álcool e outros agressores, constituem fatores extrínsecos relacionados ao processo de envelhecimento cutâneo. (KRUTMANN, 2000)

Dentre os importantes processos bioquímicos implicados no fotoenvelhecimento, podemos citar o incremento na formação de radicais livres, que origina, por sua vez, cascatas bioquímicas subseqüentes levando a danos à membrana celular e ao DNA (FARAGE, 2008). Esses processos incluem hiperpigmentação, formação de rugas e mudanças na textura da pele como manifestações clínicas (BEITNER, 2003) expressivas de dano, intensificando o envelhecimento cronológico. Este papel de intensificador do envelhecimento pode ser observado comparando-se áreas expostas à radiação UV a áreas não expostas, pois tais áreas costumam apresentar graus diferentes de envelhecimento (REXBYE et al.,2006; GUINOT et al., 2002).

Para o desenvolvimento de estratégias de proteção à radiação UV é necessário conhecer não só as alterações na estrutura da pele, seus efeitos, mas também os mecanismos pelos quais essa radiação atua provocando estas alterações. Nesse sentido, substâncias com ação antioxidante e/ou antiinflamatória, tais como os extratos vegetais ricos em compostos fenólicos, têm sido amplamente discutidas para emprego em formulações de uso diário, com a finalidade de proteção da pele contra danos causados pelos radicais livres (DAL'BELO, 2006; CASAGRANDE, 2007; MAIA CAMPOS et al., 2006).

Os extratos vegetais estão entre os ingredientes comumente empregados em formulações cosméticas com finalidades diversas (AFAQ; MUKHTAR, 2002). Dentre os compostos investigados como responsáveis pelas propriedades antioxidantes e antiinflamatórias dos extratos vegetais estão os flavonóides, presentes em extratos glicólicos, e vários outros componentes presentes em óleos essenciais tais como os sesquiterpenos (CHOI; BERSON, 2006).

O extrato de *M. chamomilla* tem sido pesquisado quanto ao seu potencial antiinflamatório, cicatrizante, emoliente, anti-séptico e antialérgico (BAUMANN, 2007; ABURJAI et al.,2003; BEDI; SHENEFLT, 2002).

Entretanto, em função do efeito na estabilidade das formulações e do grande número de componentes químicos complexos contidos nos extratos padronizados, é interessante o estudo quanto aos efeitos em formulações de uso tópico dos flavonóides isolados, tais como a quercetina e a apigenina, esta última constituindo-se em um componente importante no extrato de camomila (CASAGRANDE et al.,2007; TONG et al., 2007).

Em função das propriedades acima mencionadas, o extrato de *M. chamomilla*, bem como o α -bisabolol e a apigenina, adicionados a formulações fotoprotetoras podem vir a conferir benefícios frente às alterações provocadas pela ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas em excesso em resposta à incidência de radiação UV, contribuindo para uma melhoria na performance deste tipo de formulação e constituindo uma importante contribuição no desenvolvimento de formulações que procurem abarcar mais de uma estratégia de fotoproteção (HEIM et al., 2002; PILLAI et al., 2005; ADHAMI et al.,2008).

No entanto, a adição de deste tipo de composto suscita desafios interessantes no desenvolvimento de formulações fotoprotetoras, pois muitas vezes a adição desses compostos pode provocar problemas de instabilidade ou diminuição de viscosidade, requerendo a comprovação de que os veículos utilizados favoreçam não somente a estabilidade do produto final, mas também a eficácia proposta (DI MAMBRO et al., 2004). Portanto, na pesquisa e desenvolvimento de formulações cosméticas contendo extratos vegetais, vários estudos devem ser realizados visando à obtenção de produtos estáveis, seguros e eficazes. Nesse sentido, os estudos de estabilidade física são primordiais para verificar se as características iniciais exigidas para uma formulação de qualidade mantêm-se durante todo o seu prazo de validade. Para tal, é importante a seleção de combinações de emolientes que possam favorecer a solubilidade dos ativos e filtros envolvidos.

Ao lado da estabilidade física, a avaliação da estabilidade química é imprescindível para o desenvolvimento de um produto seguro e eficaz e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um dos métodos de escolha para a avaliação quantitativa das substâncias ativas presentes na formulação. Juntamente à aplicação desta técnica, as equações de cinética química de degradação de substâncias vêm sendo empregadas para prever o prazo

de validade das formulações, com os dados obtidos tratados matematicamente usando a equação de Arrhenius. (MAGARI et al., 2004; LI et al., 2000).

Isso posto, o estudo teve como objetivo desenvolver formulações contendo extrato de *M. chamomilla* ou α -bisabolol, utilizando-se de estudos de estabilidade física por determinação do comportamento reológico destas formulações e, de estudos de estabilidade química para a determinação quantitativa da apigenina e alfa-bisabolol. Além disso, a avaliação da eficácia de tais formulações é primordial para a obtenção de uma formulação estável e eficaz contendo as substâncias ativas estudadas.

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

- Na etapa de desenvolvimento das formulações, o pH demonstrou ser um parâmetro crítico na estabilidade. De forma geral, houve queda no pH, especialmente nas formulações contendo extrato e α -bisabolol;
- Dentre as formulações desenvolvidas, de acordo com o estudo reológico, a formulação F2 acrescida de extrato de camomila ou α -bisabolol com base fosfato e polímero de ácido poliacrílico mostrou-se mais estável, tanto para a combinação de filtros A quanto para a B;
- No estudo de estabilidade química a formulação avaliada contendo o extrato de camomila apresentou maior estabilidade química que a formulação que continha o alfa-bisabolol ou apigenina;
- Na avaliação de eficácia fotoprotetora *in vivo*, os resultados mostraram que todas as formulações estudadas foram-se efetivas na diminuição da perda transepidérmica de água após a irradiação, ou seja, protegeram a função barreira da pele.
- Além disso, ainda, a formulação contendo os filtros da combinação A e apigenina ou o extrato mostraram melhora na hidratação em relação ao controle não irradiado e a formulação contendo os filtros e o alfa-bisabolol foi efetiva na manutenção da condição de hidratação prévia à irradiação
- Na avaliação das alterações da derme da pele irradiada foi possível observar que todas as formulações estudadas, ou seja, o veículo com os filtros ou este adicionado das substâncias em estudo, provocaram um aumento da ecogenicidade frente à radiação, sendo que as formulações contendo apigenina ou alfa-bisabolol mostraram este efeito mais de forma mais pronunciada. No parâmetro espessura da derme, as regiões irradiadas que receberam o veículo ou este adicionado de apigenina ou extrato de camomila ou alfa-bisabolol demonstraram menores valores de espessura em relação às região controle (irradiadas sem tratamento). Por outro lado, a formulação contendo apigenina mostrou eficácia frente ao controle não irradiado e ao veículo;

- As formulações desenvolvidas foram consideradas estáveis e eficazes na proteção da pele frente à radiação UV, sendo que, as que continha o extrato ou apigenina, apresentaram efeitos protetores mais pronunciados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABURJAI T., NATSHEH F.M., Plants Used in Cosmetics, **Phytother. Res.** v. 17, p. 987–1000, 2003.

ADHAMI, V. M.; SYED, D. N.; KHAN, N.; AFAQ, F. Phytochemicals for Prevention of Solar Ultraviolet Radiation-induced Damages. **Photochem Photobiol**, v. 84, p.489–500, 2008.

AFAQ, F.; MUKHTAR, H.. Photochemoprevention by Botanical Antioxidants. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v.15, p. 297-306, 2002.

AMAT, A.; DE ANGELIS, F.; SGAMELLOTTI, A.; FANTACCI, S. Theoretical investigation of the structural and electronic properties of luteolin, apigenin and their deprotonated species. **Journal of Molecular Structure:THEOCHEM**, n. 868p. 12–21,2008.

ANDERSEN F, HEDEGAARD K, PETERSEN T K, FULLERTON A, BINDSLEV-JENSEN C, ANDERSEN K E. The hairless guinea-pig as a model for treatment of cumulative irritation in humans. **Skin Res Technol.** v.12, p. 60–67, 2006a.

ANDERSEN, F.; HEDEGAARD,K.; PETERSEN,T.K.; BINDSLEV-JENSEN,C.; FULLERTON,A.; ANDERSEN,K.E. Anti-irritants I: Dose-response in acute irritation. **Contact. Dermatitis.** v. 55, n.3, p. 148-154, 2006b.

ANDERSEN, P.H.; MAIBACH, H.I. Skin irritation in man: a comparative bioengineering study using improved reflectance spectroscopy. **Contact Dermatitis** , v.33, p.315-322, 1995.

BARNES, H.A., Rheology of emulsions-a review. **Colloids Surfaces A: Physicochen. Eng. Aspects**, Amsterdam, v.91, p.89-95, 1994.

BARNES, H.A., Thixotropy – a review. **J. Non-Newton. Fluid**, Amsterdam v.70, n.1-2, p. 1-33, 1997.

BAUMANN, L.S, Less-known Botanical Cosmeceuticals, **Dermatologic Therapy**, v. 20, p. 330–342, 2007.

BAUTISTA, F.; DE SANTOS, J.M.; PUIG, J.M.; MANERO, O. Understanding thixotropic and antithixotropic behavior of viscoelastic micellar solutions and liquid crystalline dispersions. I. The model. **J. Non-Newtonian Fluid Mech**, Cambridge, v. 80, p. 93-113, 1999.

- BEDI, M.K, SHENEFELT, P.D. Herbal Therapy in Dermatology. **Arch Dermatol**, v.138, p. 232-242, 2002.
- BEITNER, H. Randomized, placebo-controlled, double blind study on the clinical efficacy of a cream containing 5% α -lipoic acid related to photoageing of facial skin. **Br J Dermatol**, Oxford, v.149, n.4, p.841-849, 2003.
- BENAVIDES, F. ; OBERYSZYN, T. M.; VANBUSKIRK, A.M.; REEVE, V. E.; KUSEWITT, D. F. The hairless mouse in skin research. **Journal of Dermatological Science**, n. 53, p.10–18, 2009.
- BIRT, D.F; MITCHELL, D.; GOLD, B.; POUR, P.; PINCH, H.C. Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid. **Anticancer Res**, v. 17(1A), p. 85-91, 1997
- BISSETT, D.; MCBRIDE, J. F.; HANNON, D. P.; PATRICK, L.F. Time-dependent decrease in sunscreen protection against chronic photodamage in UVB irradiated hairless mouse skin . **J. Photochem. Photobiol. B**, N. 9, P. 323-334, 1991.
- BLACK, A.K.; FINCHAM, N.; GREAVES, M.W.; HENSBY, C.N. Time course changes in levels of arachidonic acid and prostaglandins D2, E2 and F2 α in human skin following ultraviolet B irradiation. **Br J Clin Pharmacol**, v. 10, p. 453–457, 1980.
- BLACK, H. Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage. **Photochem. Photobiol.** v. 46, p.213–21, 1987.
- 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. **Int J Pharm**, v. 145, n. 1-2,6 December, p. 87-94, 1996.
- BOUER, M; CHAMMAS, M.C.; MESSINA, M.C.L.; OLIVEIRA, I.R.S.; CERRI, G.G. Correlação clínica e ultrasonográfica na esclerodermia localizada cutânea. **Radiol Bras.**, n.41, v.2, p.:87–91, 2008
- BOYER, B.; FOURTANIER, A.; KERR, P. ; LABAT-ROBERT, J. UVA- and UVB-induced changes in collagen and fibronectin biosynthesis in the skin of hairless mice. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, n. 14 , p. 247-259, 1992.
- BRAGA, P. C.; SASSO, M. D.; FONTI, E.; CULICI, M. Antioxidant Activity of Bisabolol: Inhibitory Effects on Chemiluminescence of Human Neutrophil Bursts and Cell-Free Systems . **Pharmacology**, v.83, p.110–115, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RE nº. 89, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da "LISTA DE REGISTRO SIMPLIFICADO DE FITOTERÁPICOS". Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 18 de março de 2004.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos.pdf>. Acesso em 22 de janeiro de 2005.

BRUMER, R.; GODERSKY, S. Rheological studies to objectify sensations occurring when cosmetic emulsions are applied to the skin. **Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, Amsterdam, v.152, p.89-94, 1999.

CARLSSON, A.; KARLSTROM, G.; LINDMAN, B. Thermal Gelation of Nonionic Cellulose Ethers and Ionic Surfactants in Water. **Colloids and Surfaces**, v. 47, p. 147-165, 1990.

CARBONARE, M. D.; PATHAK, M. A. Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, n.14, p. 105-124, 1992.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W.A.; BORIN, M.F.; LOPEZ, R.F.; FONSECA, M.J. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **Int J Pharm.**, v.328, n.2, p.183-190, 2007.

CHENG, Z.; YAN, G.; LI, Y.; CHANG, W. Determination of antioxidant activity of phenolic antioxidants in a Fenton-type reaction system by chemiluminescence assay. **Anal Bioanal Chem.**, v.375, p.376-380, 2003.

CHOI, C.M, BERSON, D.S, Cosmeceuticals, **Semin Cutan Med Surg**, v.25, p.163-168, 2006.

CHUN, KYUNG-SOO; LANGENBACH, R. A Proposed COX-2 and PGE2 Receptor Interaction in UV-Exposed Mouse Skin. **Molecular Carcinogenesis**, v. 46, p.699-704, 2007

COBA, F. DE LA; AGUILERA, J.; GÁLVEZ, M.V. DE; ÁLVAREZ, M.; GALLEGO, E.; FIGUEROA, F.L.; HERRERA, E.; Prevention of the ultraviolet effects on clinical and histopathological changes, as well as the heat shock protein-70 expression in mouse skin by topical application of algal UV-absorbing compounds. **Journal of Dermatological Science**, n. 55, p. 161-169, 2009.

D'LEÓN, L. F. P. Estudo de Estabilidade de Produtos Cosméticos. **Cosmetics & Toiletries**. Jul./Ago., (Edição em Português), p.54-60, 2001.

DAL'BELO, S.E.; GASPAR, L.R; MAIA CAMPOS, P.M.B.G, Moisturizing effect of cosmetic formulations containing Aloe vera extract in different concentrations assessed by skin bioengineering techniques, **Skin Res Technol**, v.12, n.30, 2006.

DAL'BELO, S.E.; GASPAR, L.R; MAIA CAMPOS, P.M.B.G; MARTIN, J.P. Skin penetration of epigallocatechin-3-galato and quercetin from green tea and Ginkgo biloba extracts vehiculated in cosmetic formulations. **Skin Pharmacol Physiol.**, n. 22, v.6, p.299-304, 2009.

DENCAUSSE, L.; GALLAND, A.; CLAMOU, J. L.; BASSO, J. Validation of HPLC method for quantitative determination of Tinosorb_S and three other sunscreens in a high protection cosmetic product. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 30, 373–382, 2008.

DI MAMBRO, V.M.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G; FONSECA, M. J. Physical and chemical stability of different formulations with superoxide dismutase. **Pharmazie**, v. 59, n.10, p.786-90,Oct, 2004.

DUMAY, O.; KARAM, A.; VIAN, L.; MOYAL, D.; HOURSEAU,C.; STOEIBNER,P.; PEYRON,J.L.; MEYNADIER, J.; CANO, J. P.; MEUNIER, L. Ultraviolet A1 exposure of human skin results in Langerhans cell depletion and reduction of epidermal antigen-presenting cell function: partial protection by a broad-spectrum sunscreen. **British Journal of Dermatology**, n.144, p. 1161-1168, 2001.

DUNLAP, W.C.; YAMAMOTO, Y.; INOUE, M.; KASHIBA-IWATSUKI, M.; YAMAGUCHI, M. Uric acid photo-oxidation assay: in vitro comparison of sunscreens agents. **Int. J. Cosmet. Sci.** 20, 1–18, 1998.

EL-ABASERI, T. B. ; PUTTA S.; HANSEN , L. A. Ultraviolet irradiation induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia through the activation of the epidermal growth factor receptor. **Carcinogenesis** , vol.27 no.2 pp.225–231, 2006.

EL-DOMYATI, M.; ATTIA, S.; SALEH F.; BROWN, D.; BIRK, D.E.; GASPARRO, F.; AHMAD, H.; UITTO, J. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. **Experimental Dermatology**, n. 11, p.398–405, 2002.

ELIAS, P, FEINGOLD, KR. Lipids and the epidermal water barrier: metabolism, regulation, and pathophysiology. **Semin Dermatol** , v. 11, 176–82, 1992.

FARAGE, M. A.; MILLER, K. W.; ELSNER, P.; MAIBACH, H. I. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. **International Journal of Cosmetic Science**, n. 30, p. 87–95, 2008.

FORNAGE, B.D. High-frequency sonography of the skin. **European Journal of Ultrasound**, 2. p.172-182, 1995.

FRANKE, R.; SCHILCHER, H. Ed. Chamomile: industrial profiles. CRC Press. 2005

FREEMAN, B.A.; CRAPO, J.D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. **Lab. Invest.**, n. 47, p.412–26, 1982.

FUCHS, J.; MILBRADT, R. Skin anti-inflammatory activity of apigenin-7-glucoside in rats. **Arzneimittelforschung**, v.43, n.3, p. 370-2, 1993.

GAGLIARDI, L.; AMATO, A.; BASILI, A.; CAVAZZUTTI, G; TONELLI, D. Determination of sunscreen agents in cosmetic products by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 408, p. 409-415, 1987.

GAO,T.; TIEN, J.M.; CHOI, Y.H. Sunscreen formulas with multilayer lamellar structure. **Cosmetics & Toiletries**, v.18, N.10, P.41-52, 2003.

GASPAR L.R.; CAMPOS P.M Photostability and efficacy studies of topical formulations containing UV-filters combination and vitamins A, C and E. **Int J Pharm.** v. 343, n.1-2, p. 181-9. 2007.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **Int. J. Pharma.**, v.250, n.1, p.35-44, 2003a.

GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Evaluation of the protective effect of alpha-tocopheryl acetate in a sunscreen, preventing erythema formation, transepidermal water loss and sunburn cell formation. **IFSCC Magazine**, v. 6, n. 3, p. 213 - 217, 2003b.

GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **International Journal Pharmaceutical.**, v.250, n.1, p.35-44, 2003.

GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE,R.; DI MAMBRO, V. M.; AZZOLINI, A. E.C.S. ; FONSECA, M. J. V. Evaluation of the Antioxidant Activity of Different Flavonoids by the Chemiluminescence Method. **AAPS PharmSci.**; n. 5, v.2, 2003

GIBBS, N. K.; TYE, J.; NORVAL, M. Recent advances in urocanic acid photochemistry, photobiology and photoimmunology. **Photochem. Photobiol. Sci**, n.7, p. 655–667, 2008.

GNIADÉCKA, M.; SERUP, J.; SONDERGAARD, J. Age-related Diurnal Changes of Dermal Oedema: evaluation by high-frequency ultrasound. **British Journal of Dermatology**, n. 131, p. 849-855, 1994.

GUARATINI, T.; GIANETI, M.D.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. 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

GUINOT, C.; MALVY, D. J.-M.; AMBROISINE, L.; LATREILLE, J.; MAUGER, E.; TENENHAUS, M.; MORIZOT, F.; LOPEZ, S.; LE FUR, I.; TSCHACHLER, E. Relative Contribution of Intrinsic vs Extrinsic Factors to Skin Aging as Determined by a Validated Skin Age Score. **Arch Dermatol**. v. 138, n.11, p. 1454-1460, 2002.

HALLIDAY, G. M.; NORVAL, M.; BYRNE, S. N.; HUANG, X. X.; WOLF, P. The effects of sunlight on the skin. **Drug Discovery Today**. v.5, n.2 2008.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**. v.96, p.67-202, 2002.

HAWK, J.L.M.; BLACK, A.K.; JAENICKE, K.F.; BARR, R.M.; SOTER, N.A.; MALLETT, A.I.; GILCHREST, B. A. ; HENSBY, C.N.; PARRISH, J. A.; GREAVES, M. W. Increased Concentrations of Arachidonic Acid, Prostaglandins E₂, D₂, and 6-oxo-F_{1α}, and Histamine in Human Skin Following UVA Irradiation. **J. Invest. Dermatol**. v. 80, p.496–499, 1983

HEIM, K. E. ; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, n. 10, p. 572-584, 2002.

HOLMBERG, K.; JÖNSSON, B.; KRONBERG, B.; LINDMAN, BJÖRN. **Surfactants and Polymers in Aqueous Solution**. England, John Wiley & Sons, 2002

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **J. Agric. Food Chem**. N. 53, p. 1841-1856, 2005.

HWANG, I.K.; YOO, K.-Y. KIM, D.W. ; JEONG, S.J. ; WON, C.-K.; MOON, W.-K. ; KIM, Y.S.; KWON, D.Y.; WON, M.H.; KIM, D.-W. An extract of *Polygonum multiflorum* protects against free radical damage induced by ultraviolet B irradiation of the skin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n.39, p. 1181-1188, 2006.

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

IDSON, B.; LAZARUS, J. Semi-sólidos. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, J. L. Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica. Fundação Calouste Gulbekian, Lisboa, 2001.

JOHNCOCK, W. Interação de formulações com filtro solar. *Cosmetics & Toiletries* (Ed. Em Português), v.12, n.4, 2000.

JÚNIOR, L.R.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim. Nova*, v.24, n.1, p.112-119, 2001.

KARTAL, M. LC method for the analysis of paracetamol, caffeine and codeine phosphate in pharmaceutical preparations. *J Pharm Biom Anal.*, V.26, P. 857 – 864, 2001.

KATDARE, A.; CHAUBAL, M. V. **Excipient Development for Pharmaceutical, Biotechnology, and Drug Delivery Systems**. Taylor & Francis Group. 2006

KERSCHER, M.J. Influence of Liposomal encapsulation on the activity of a herbal non-steroidal anti-inflammatory drug. In: BRAUN-FALCO, O.; KORTING, H. C.; MAIBACH, H. I. (Eds.). **Liposome Dermatics**, Berlin: Springer-Verlag, 1992.

KORTING, H. C.; SCHÄFER-KORTING, M.; HART, H.; LAUX, P. SCHMID, M. Anti-inflammatory activity of hamamelis distilled applied topically to the skin. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, v. 44, p. 315-318, 1993

KRUTMANN, J. Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatosis. *Journal of Dermatological Science*, v. 23 S.I. n.1, p. S22–S26, 2000.

KRUTMANN, J. The interaction of UVA and UVB wavebands with particular emphasis on signaling. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 92, p.105–107, 2006.

LABA, D. **Rheological Properties of Cosmetics and toiletries**. New York. Marcel Dekker, p.09-33, 1993.

LAVKER, R.M, KLIGMAN, AM, Chronic heliodermatitis: a morphologic evaluation of chronic actinic dermal damage with emphasis on the role of mast cells. *J Invest Dermatol*, v. 90, n.3, p.325-30, 1988.

LEMANSKA, K.; SZYMUSIAK, H.; TYRAKOWSKA, B.; ZIELINSKI, R.; SOFFERS, A.E. M. F.; RIETJENS, I. M. C. M. The Influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. **Free Radical Biology & Medicine**, Vol. 31, No. 7, pp. 869–881, 2001.

LEONARDI, G.R. **Cosmetologia Aplicada**. Medfarma, 1ªed., p.92-93, 2004.

LEONARDI, G.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Estabilidade de Formulações Cosméticas. **Internacional Journal of Pharmaceutical Compounding**. Editora Brasileira, V.3, N.4, jul/ago., p.154-156, 2001.

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

LI, B.; BIRT, D. F. *In vivo* and *in vitro* percutaneous absorption of cancer preventive flavonoid apigenin in different vehicles in mouse skin. **Pharm Res**, v.13, n.11, p. 1710-5, 1996a

LI, B; PINCH, H.; BIRT, D.F. Influence of vehicle, distant topical delivery and biotransformation on the chemopreventive activity of apigenin, a plant flavonoid in mouse skin. **Pharm Res (NY)**, v.13, p.1530–1534, 1996b

LI, BOYONG; ROBINSON, D. H.; BIRT, D. F. Evaluation of properties of apigenin and [G-3H]apigenin and analytic method development. **J Pharm Sci**, v. 86, n.6, p.721 – 725, 2000.

LIANG, Y.C.; HUANG, Y.T.; TSAI, S.H.; LIN-SHIAU, S.Y.; CHEN, C.; LIN, J.K. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. **Carcinogenesis**, n. 20: p. 1945-1952, 1999.

LOCHHEAD, R Y.; RULISON, C. J. An investigation of the mechanism by which hydrophobically modified hydrophilic polymers act as primary emulsifiers for oil-in-water emulsions, Poly(acrylic acids) and hydroxyethyl celluloses. **Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v.88, p.27-3288, 1994

LUCISANO-VALIM YM, KABEYA LM, KANASHIRO A, RUSSO-CARBOLANTE EM, POLIZELLO AC, AZZOLINI AE, SILVA SC, LOPES JL, DE OLIVEIRA CA, MANTOVANI B. A simple method to study the activity of natural compounds on the chemiluminescence of neutrophils upon stimulation by immune complexes. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v.47, n.1, p.53-58, 2002.

MAGARI, R.T.; MUNOZ-ANTONI, I.; BAKER, J.; FLAGLER, D.J. Determining shelf life by comparing degradations at elevated temperatures. **J. Clin. Lab.Anal.** v.18, n.3, p.159-164, 2004.

MAIA CAMPOS, G. G.M.C. **Software versão 8.0**. Ribeirão Preto, Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, 1999.

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

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; GIANETI, M.D.; KANASHIRO, A.; LUCISANO-VALIN, Y.M.; GASPAR, L.R. In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effects of an association of bioflavonoids with liposoluble vitamins. **Photochem Photobiol**, v.82, n.3, p. 683-688, 2006.

MARROT, L.; MEUNIER, J.-R. Skin DNA photodamage and its biological consequences. **J. Am Acad. Dermatol.**, v.58, n. 5, p.S139-S148, 2008.

MARTIN, A.; BUSTAMANTE, P.; CHUN, A.H.C. **Physical Pharmacy**. Philadelphia, Lea & Febiger ,4^aed., 1993, p. 153-476.

MATSUMOTO,K.; MIZUKOSHI, K.; OYOBIKAWA, M.; OHSHIMA, H.; SAKAI,Y. ; TAGAMI, H. Objective evaluation of the efficacy of daily topical applications of cosmetics bases using the hairless mouse model of atopic dermatitis. **Skin Research and Technology**, v.11, p. 209–217, 2005.

MATSUMURA,Y; ANANTHASWAMY, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, V. 195, p. 298– 308, 2004.

MCKAY, D.L.; BLUMBERG, J.B. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). **Phytother Res**, Jul, v.20, n. 7, p. 519-30, 2006.

MEGURO, S.; ARAI, Y.; MASUKAWA, K.; UIE, K.; TOKIMITSU, I. Stratum Corneum lipid abnormalities in UVB-irradiated skin. **Photochem Photobiol**, Oxford, v. 69, n. 3, p. 317-321, 1999.

MIDDLETON JR., E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for inflammation, Heart Disease, and Cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n.4, p.673-751, 2000.

MILLER, D.; WIENER, E.; TUROWSKI, A.; THUNIG, C. ; HOFFMANN, H. O/W emulsions for cosmetics products stabilized by alkyl phosphates —rheology and storage tests. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.,152, p. 155–160, 1999.

NANGIA, A. et al. In vivo measurement of transepidermal water loss: a rapid alternative to tritiated water permeation for assessing skin barrier functions. **Inter. J. Pharma.**, v.170, n.1, p.31-40, 1998.

NELSON, K. K.; MELENDEZ, J. A. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 37, n. 6, p. 768 – 784, 2004

PALM, M. D.; O'DONOGHUE, M. N. Update on photoprotection. **Dermatologic Therapy**, Vol. 20, p. 360–376, 2007.

PATHAK, M. A.; FITZPATRICK, T. B. Preventive treatment of sunburn, dermatoheliosis and skin cancer with sun-protective agents. In: FITZPATRICK, T. B.; EILSEN, A. Z.; WOLFF, K.;

FREEDBERG, I. M.; AUSTEN K.F. 4thed. **Dermatology in General Medicine**, 4th ed., New York: McGraw-Hill, 1993, cap.137, p.1689-1716.

PIÉRARD, G. E. Instrumental non-invasive assessments of cosmetic efficacy. **J. Cosm. Dermatol.**, v.1, p.57-58, 2002.

PILLAI, S.; ORESAJO, C.; HAYWARD, J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation – a review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 27, p. 17–34. 2005.

PINNELL, S.R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **J Am Acad Dermatol.**, v. 48, n. 1, p. 1-19, 2003.

POTARD,G.; LAUGEL, C.; BAILLET, A.; SCHAEFER, H.; MARTY, J.P. Quantitative HPLC analysis of sunscreens and caffeine during *in vitro* percutaneous penetration studies. **Int. J. Pharm**, Amsterdam, v. 189, p. 249-260, 1999.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH,K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **J. Agric. Food Chem.**, n.53, p.4290-4302, 2005.

QUADRAT, O.; SNUPÁREK JR., J. Temperature Dependence of Viscosity of Ethyl Acrylate-Acrylic Acid Copolymer Lattices. **Journal of Colloid and Interface Science**,v 119, n.2, p. 597-598, 1987

REXBYE, H.; PETERSEN, I.; JOHANSEN, M.; KLITKOU, L.; JEUNE, B.; CHRISTENSEN, K. Influence of environmental factors on facial ageing. **Age and Ageing**, v.35, p. 110–115, 2006.

RITTIÉ, L.; FISHER,G. J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. **Ageing Research Reviews**, n. 1, p. 705–720, 2002.

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

ROGIERS, V. et al. The potential use of non-invasive methods in the safety assessment of cosmetic products – The report and recommendations of ECVAM/EEMCO Workshop 36 **Altern. Lab. Anim.** , n. 27, p.515-537., 1996.

ROGIERS, V.; EEMCO Group EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences. **Skin Pharmacol Appl Skin Physiol**, v.14, n.2, p.117-128, 2001.

ROGIERS,V.; DERDE, M.P; VERLEYE, G.; ROSEEUW, D. Standardized Conditions Needed for Skin Surface Hydration Measurements. **Cosmetics & Toiletries**, 105(10), p.74-82, 1999.

SAFAYHI, H.; SABIERAJ, J. ; SAILER, E.R. ; AMMON, H.P. Chamazulene: an antioxidant-type inhibitor of leukotriene B4 formation. **Planta Med.**, v.60, n.5, p. 410-3, 1994.

SCHAKEL, D.J.; KALSBECK, D.; BOER, K. Determination of sixteen UV filters in sun care formulations by high-performance liquid chromatography. **J Chromat A**, v. 1049, p. 127–130, 2004.

SCHOU,A. J. ; THOMSEN,K.; PLOMGAARD,M.A.; WOLTERS,O.D. Methodological Aspects of High-frequency Ultrasound of Skin in Children. **Skin Research and Technology.**, n. 10, p.200-206, 2004

SEIDENARI,S. High-Frequency Sonography Combined with Image Analysis: A Noninvasive Objective Method for Skin Evaluation and Description. **Clinics in Dermatology**, n. 13, p. 349-359, 1995.

SELLOUM, L.; REICHL, S.; MÜLLER, M.; SEBIHI, L.; ARNHOLD, J. Effects of Flavonols on the Generation of Superoxide Anion Radicals by Xanthine Oxidase and Stimulated Neutrophils. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 395, No. 1, pp. 49–56, 2001.

SEMENZATO, A. ET AL. Rheology: a new approach for stability testing and formulation development. In: IFSCC CONGRESS, 21, 2000, Berlin.CD-ROM.Berlin,2000.

SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **J Chromatogr A**, v.987, p.57-66, 2003.

SILVA, G.M.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Histopathological, morphometric and stereological studies of ascorbic acid and magnesium ascorbyl phosphate in a skincare formulation. **Intern. J. Cosm. Science**, v. 22, p. 169-179, 2000.

STANZL, K.; VOLLHARDT, J. The Case of Alpha-Bisabolol. **Handbook of Cosmetics Science and Technology**, v. 24, p.277-284, 2001.

THORNFELDT, C.R, Chronic inflammation is etiology of extrinsic aging, **J. Cosmet. Dermatol**, v. 7, n.1, p.78-82, 2008.

TONG X, VAN DROSS RT, ABU-YOUSIF A, MORRISON AR, PELLING JC. Apigenin prevents UVB-induced cyclooxygenase 2 expression: coupled mRNA sonal inhibition. **Mol Cell Biol**, v.27, n.1, p.283-96, 2007.

TRIPP, C. S.; BLOMME, E.A.G.; CHINN, K.S.; HARDY, M. M.; LACELLE,P.; PENTLANDZ, A. P. Epidermal COX-2 Induction Following Ultraviolet Irradiation: Suggested Mechanism for the Role of COX-2 Inhibition in Photoprotection. **J Invest Dermatol**, v.121, p.853-861, 2003.

TROIILIUS, A.; SVENDSEN,G.; LJUNGGREN, B. Ultrasound Investigation of Port Wine Stains. **Acta Derm Venereol**, n.80, p.196-199, 2000.

VAN DROSS, R.T.; HONG, XIAOMAN; PELLING, J. C. Inhibition of TPA-Induced Cyclooxygenase-2 (COX-2) Expression by Apigenin Through Downregulation of Akt Signal Transduction in Human Keratinocytes. **Molecular Carcinogenesis**, v. 44, p. 83–91, 2005

VAN DROSS, R.T.; HONG, XIAOMAN; ESSENGUE, S.; FISCHER, SUSAN M.; PELLING, J. C. Modulation of UVB-Induced and Basal Cyclooxygenase-2 (COX-2) Expression by Apigenin in Mouse Keratinocytes: Role of USF Transcription Factors. **Molecular Carcinogenesis**, v. 46, P. 303–314, 2007

VELASCO, M.V.R.; RIBEIRO, M. E., Interação entre filtros solares. Avaliação in vitro de efeito sinérgico. **Cosmetics & Toiletries** (Ed. Em português) v.set/out, p 40-50.1998.

WEI, H.; TYE, L.; BRESNICK, E.; BIRT, D. F. Inhibitory Effect of Apigenin, a Plant Flavonoid, on Epidermal Ornithine Decarboxylase and Skin Tumor Promotion in Mice. **Cancer Research** , v.50, p. 499-502, 1. 1990.

WIECHERS, J.W.; BARLOW, T. Skin moisturization and elasticity originate from at least two different mechanisms. **Int. J. Cosmet. Sci.**, v.21, p.425-435, 1999

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology e Medicine**, Vol. 36, No. 7, p. 838 – 849, 2004

YUAN J.L.; LV, Z.; LIU, Z. G.; HUB, Z.; ZOU, G.L.; Study on interaction between apigenin and human serum albumin by spectroscopy and molecular modeling. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, n. 191, p.104–113, 2007.

