



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DAVID LAIOS DO VALE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DA QUERCETINA
MICROENCAPSULADA NOS DANOS CUTÂNEOS
INDUZIDOS PELA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B EM
CAMUNDONGOS SEM PELO**

Londrina
2016

DAVID LAIOS DO VALE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DA QUERCETINA
MICROENCAPSULADA NOS DANOS CUTÂNEOS
INDUZIDOS PELA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B EM
CAMUNDONGOS SEM PELO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Rúbia Casagrande

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcela M. Baracat

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Vale, David Laios do.

Avaliação do efeito terapêutico da quercetina microencapsulada nos danos cutâneos induzidos pela radiação ultravioleta B em camundongos sem pelo / David Laios do Vale.
- Londrina, 2016.
119 f. : il.

Orientador: Rúbia Casagrande.

Coorientador: Marcela Maria Baracat.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Flavonóides - Teses. 2. Formas farmacêuticas - Teses. 3. Inflamação - Teses. 4. Radiação ultravioleta - Teses. I. Casagrande, Rúbia . II. Baracat, Marcela Maria . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

DAVID LAIOS DO VALE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DA QUERCETINA
MICROENCAPSULADA NOS DANOS CUTÂNEOS INDUZIDOS PELA
RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B EM CAMUNDONGOS SEM PELO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a Rúbia Casagrande –
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a Sandra R. Georgetti
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 20 de maio de 2016.

VALE, David Laios do. **Avaliação do efeito terapêutico da quercetina microencapsulada nos danos cutâneos induzidos pela radiação ultravioleta B em camundongos sem pelo.** 2016. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

A pele é o maior órgão do corpo humano em extensão e a primeira barreira do organismo com o meio externo. Entre os fatores externos destaca-se a exposição à radiação UVB que pode causar aumento dos radicais livres, inflamação cutânea, a qual pode levar ao desenvolvimento de câncer e envelhecimento precoce. Neste contexto, os flavonoides, encontrados em frutas e vegetais, são de grande importância por serem antioxidantes. Dentre os flavonoides, destaca-se a quercetina, a qual tem demonstrado eliminar os radicais livres e inibir a inflamação. No entanto, ela apresenta solubilidade reduzida em água que contribui para uma baixa biodisponibilidade *in vivo*. Para vencer este desafio uma estratégia é a preparação de microcápsulas cuja matriz polimérica contenha pectina e caseína para carrear a quercetina. Assim, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a eficácia terapêutica da quercetina microencapsulada nos danos cutâneos induzidos pela radiação UVB em camundongos. O preparo das microcápsulas foi realizado pelo método de coacervação complexa seguido pela incorporação das mesmas em emulsão óleo/água para administração tópica. As emulsões foram analisadas quanto à estabilidade físico-química e funcional (verificado pelo ensaio em doar átomos de hidrogênio ao radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil – DPPH) e depois foram avaliadas quanto às atividades antioxidante e anti-inflamatória em camundongos sem pelo expostos à radiação UVB. Os resultados *in vitro* demonstraram que a emulsão contendo a quercetina microencapsulada é estável e os resultados *in vivo* evidenciaram que estas microcápsulas reduziram a inflamação cutânea, diminuindo o edema de pele, recrutamento de neutrófilos, produção de citocinas inflamatórias e atividade de metaloproteinase-9 comparada com a microcápsula inerte e a emulsão contendo quercetina. A mesma comparação foi realizada para se determinar o efeito da quercetina microencapsulada contra o estresse oxidativo induzido pela radiação UVB e foi demonstrado que estas microcápsulas com o flavonoide mantiveram os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e atividade da catalase a níveis basais, e ainda diminuíram a produção de hidroperóxidos lipídicos e de ânions superóxidos. Além disso, estes efeitos da emulsão contendo a quercetina microencapsulada resultaram em melhora da capacidade antioxidante da pele pela manutenção do poder redutor do ferro e da capacidade em reduzir o radical ABTS. Dessa forma, os resultados sugerem que as microcápsulas podem ter melhorado a absorção cutânea da quercetina, prevenindo a inflamação da pele e inibindo o estresse oxidativo induzido pela radiação UVB.

Palavras-chaves: Microcápsulas. Quercetina. Antioxidante. Inflamação. Radiação UVB.

VALE, David Laios do. **Evaluation of the therapeutic effect of quercetin microencapsulated in skin damage induced by ultraviolet B radiation in hairless mice.** 2016. 119p. Dissertation (Master in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

The skin is the largest organ of the human body and it is the first barrier of the body with the external environment. Among the external factors, stands out the exposure to UVB radiation can cause an increase of free radicals, skin inflammation, which can bring cancer and premature aging. In this context, the flavonoids found in fruits and vegetables, are great importance due to its antioxidant. Among the flavonoids, there is quercetin, which has been shown to eliminate free radicals and inhibit inflammation. However, quercetin has low water solubility that contributes to a low bioavailability *in vivo*. To overcome these limitations was used to prepare microcapsules whose polymeric matrix containing pectin and casein for carrying quercetin. Thus, this study aimed at evaluate the therapeutic efficacy of quercetin-loaded microcapsule in skin damage induced by UVB radiation in hairless. The preparation of the microcapsules was performed by the complex coacervation method and were incorporated into the oil/water emulsion for topical administration. The emulsions were analyzed for physical-chemical and functional stability (verified by assay to donate hydrogen atoms to the radical 2, 2'-diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical – DPPH[•]) and were evaluated antioxidant and anti-inflammatory activity in hairless. The *in vitro* results showed that the emulsion containing quercetin-loaded microcapsule is stable and *in vivo* results showed that these microcapsules have reduced skin inflammation, decreasing skin edema, neutrophil recruitment, production of inflammatory cytokines and matrix metalloproteinase-9 activity compared with microcapsule without quercetin and the emulsion containing quercetin. The same comparison was performed to determine the effect of quercetin-loaded microcapsule against oxidative stress by UVB-irradiation-induced and it was shown that these microcapsules with flavonoid maintained the levels of reduced glutathione (GSH) and catalase activity to basal levels, and even decreased production of lipid hydroperoxides and production of superoxide anions. Furthermore, these effects of the emulsion containing quercetin-loaded microcapsule resulted in improved antioxidant capacity in the skin by maintaining the ferric reducing ability and ABTS radical reducing capacity. Thereby, the results suggest that the microcapsules can have improved cutaneous absorption of quercetin, preventing skin inflammation and inhibiting oxidative stress induced by UVB radiation.

Keywords: Microcapsules. Quercetin. Antioxidant. Inflammation . UVB radiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Histologia normal da pele. 1. Epiderme; 2. Estrato córneo; 3. Derme. Modificado.	19
Figura 2 - Vias de permeação do fármaco – via transcelular e intercelular	23
Figura 3 - Espectro eletromagnético.....	24
Figura 4 - Absorção da radiação UV por diferentes cromóforos da pele	25
Figura 5 - Estrutura molecular da quercetina.....	31
Figura 6 - Organização dos tempos de tratamento com os protocolos experimentais para avaliação da eficácia de formulação tópica contendo quercetina microencapsulada. Os animais foram irradiados com radiação UVB durante 5 horas e 30 min (tempo necessário para atingir 4,14 J/cm ²). Doze horas, seis horas, imediatamente antes da radiação e meia hora após a finalização da radiação os animais foram tratados com as formulações tópicas para cada grupo (3, 4, 5 e 6). Os animais foram eutanasiados e amostras de pele foram coletadas 2 horas (produção do ânion superóxido [NBT] e atividade da catalase), 4 horas (dosagem de citocinas e hidropéroxido lipídico) e 12 horas (avaliação do teste de edema, atividade de metaloproteinase-9 [MMP-9], atividade de mieloperoxidase [MPO], níveis de glutatona reduzida [GSH], avaliação do poder antioxidante redutor de ferro [FRAP] e transferência de elétrons ao radical [ABTS]), após o fim da radiação UVB.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Constituintes do gel de separação e do gel de concentração	47
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Ativador de proteína-1
APS	Persulfato de amônio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAT	Catalase
COX-2	Ciclooxigenase-2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazil
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPM	Erro padrão da media
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fe ²⁺	Ferro
FeCl ₃ .6H ₂ O	Cloreto férrico hexahidratado
FRAP	Poder antioxidante de redução férrica
Gapdh	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Gp91phox	Glutationa peroxidase 91fox
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa reduzida

HCl	Ácido clorídrico
HO [•]	Radical hidroxil
HO-1	Hemeoxigenase-1
HTAB	Brometo de hexadecil trietil amônio
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IL	Interleucina
KCl	Cloreto de potássio
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio dibásico
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
KOH	Hidróxido de potássio
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
LPO	Peroxidação lipídica
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT	Azul de nitrotetrazólico
NF-κB	Fator nuclear-κB
Nrf2	Fator nuclear eritróide 3 relacionado ao fator 2
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido

OD	Densidade optica
OH	Radical hidroxil
PBS	Tampão fosfato salino
QC	Quercetina
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloro acético
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TPTZ	2,4,6 tripiridil-S-triazina
Tris	Hidroximetil aminometano
UV	Ultravioleta
UVB	Ultraviolet B

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
1.1	HISTOLOGIA DA PELE NORMAL.....	19
1.2	RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E SUAS CONSEQUÊNCIAS NA PELE.....	23
1.3	AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DA QUERCETINA.....	30
1.4	SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS: MICROCÁPSULA	33
2.	OBJETIVOS	37
2.1	OBJETIVO GERAL	37
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	MATERIAIS	38
3.1.1	Reagentes, padrões e polímeros	38
3.1.2	Equipamentos	38
3.2	MÉTODOS	39
3.2.1	Obtenção das microcápsulas	39
3.2.2	Preparo das emulsões	39
3.2.3	Estudo de Estabilidade das emulsões.....	40
3.2.3.1	Avaliação da estabilidade físico-químico e funcional	41
3.2.3.1.1	Aparência física.....	41
3.2.3.1.2	Determinação do pH	41
3.2.3.1.3	Teste de centrifugação.....	41
3.2.3.1.4	Determinação da atividade doadora de átomos de hidrogênio ao radical DPPH.....	41
3.2.4	Avaliação do efeito terapêutico <i>in vivo</i> da quercetina microencapsulada nos danos s induzidos pela radiação UVB	42
3.2.4.1	Animais experimentais	43
3.2.4.2	Sistema e fonte de radiação UVB	43
3.2.4.3	Protocolo experimental para administração das formulações tópicas.....	43

3.2.5	Avaliação do edema de pele	45
3.2.6	Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase	45
3.2.7	Determinação da atividade/secreção de proteinases por zimografia em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS).....	46
3.2.8	Dosagem das citocinas pró-inflamatórias: TNF α , IL-1 β	48
3.2.9	Avaliação do poder antioxidante redutor do ferro (FRAP) na pele	49
3.2.10	Avaliação do poder antioxidante pelo ensaio de sequestro do radical 2,2',azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)	50
3.2.11	Avaliação dos níveis do antioxidante endógeno (GSH)	50
3.2.12	Avaliação da atividade da catalase (CAT).....	51
3.2.13	Avaliação da produção de ânion superóxido (O $_2^{\bullet-}$).....	52
3.2.14	Avaliação da produção de hidroperóxido (LOOH).....	52
3.3.	Análise estatística dos resultados	53
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGO CIENTÍFICO	54
4.1	Effect of topical formulation containing quercetin-loaded microcapsules against UVB-induced skin damage in mice	54
5.	CONSIDERAÇÕES GERAIS	83
6.	REFERÊNCIAS	85
ANEXO		103
ANEXO I –	Informações sobre submissão do artigo a revista Photochemical and Photobiological Science.....	103

1. INTRODUÇÃO

A radiação solar, especificamente a radiação ultravioleta (RUV), é importante para o organismo por fazer parte do processo de síntese da vitamina D3. Esta vitamina é um hormônio esteroide conhecido pelo seu papel importante na homeostasia do cálcio. Sabe-se que a principal causa da deficiência da vitamina D é a ausência de exposição à luz solar, uma vez que os raios UVB agem sobre o 7-desidrocolesterol produzido na camada basal da epiderme da pele e convertem-no em pré-vitamina D3. As células dendríticas da pele expressam a enzima D3-hidrolase que converte a pré-vitamina em sua forma ativa (IRURETAGOYENA *et al.*, 2015; CLARK, 2010). Não obstante, a exposição à radiação ultravioleta, em excesso, pode levar ao desenvolvimento de inflamação cutânea e ao aumento de oxidantes os quais desequilibram o estado homeostático da pele (CASAGRANDE *et al.*, 2006a). Além disso, a RUV induz fatores de transcrição de genes metaloproteinases, enzimas proteolíticas, produzidas principalmente por células polimorfonucleares e células tumorais, resultando em danos severos à pele e em fotoenvelhecimento (FISHER *et al.*, 1997).

De acordo com o projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, ligado a Organização Mundial de Saúde (OMS), a estimativa para os anos de 2014 e 2015, no Brasil, era de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma. O projeto aponta que o câncer de pele do tipo não melanoma seria o mais incidente (182 mil) na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata, mama feminina, cólon, entre outros. A quantidade de novos casos de câncer tende a aumentar caso as medidas preventivas não sejam amplamente aplicadas (FERLAY *et al.*, 2013). De acordo com o INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva), o câncer de pele não melanoma é o mais frequente no Brasil, representando 25% de todos os tumores malignos registrados e é mais comum em pessoas com mais de 40 anos de idade, de pele clara, sensível à ação dos raios solares. A estimativa para 2016 é de 175.760 casos, sendo 80.850 homens e 94.910 mulheres (BRASIL, 2015).

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 do câncer de pele induzido pela exposição à RUV, o uso de antioxidantes mostra-se como importante alternativa nas terapias de fotoproteção e prevenção do câncer de pele e outras patologias cutâneas (MAALOUF *et al.*, 2002; COOPER, RANGER-MOORE, BOWDEN, 2005; GONZÁLEZ, FERNÁNDEZ-LORENTE, GILABERTE-CALZADA, 2008). A administração tópica e oral de antioxidantes poderia afetar as alterações moleculares desencadeadas pela RUV e conseqüentemente as sequelas biológicas e clínicas resultantes (FUCHS, 1998; MCARDLE *et al.*, 2002).

Os flavonoides são exemplos de antioxidantes abundantes na natureza e podem suprimir a indução da inflamação induzida pela RUV, prevenir a fotoimunossupressão e diminuir a fotocarcinogênese. Como exemplo, há vários estudos sobre o epigallocatequina-3-galato, encontrado no chá verde, por mostrar eficácia contra os danos foto-oxidativos (KATIYAR *et al.*, 1999). Dentre os flavonoides, outro potente antioxidante que tem sido amplamente estudado é a quercetina. Ela apresenta diversas atividades biológicas, como ação antialérgica, antineoplásica, anti-inflamatórias e apresenta capacidade de eliminar os radicais livres e quelar metais de transição como o ferro e o cobre (D'ANDREA, 2015; CASAGRANDE *et al.*, 2007). Contudo, a quercetina apresenta baixa solubilidade em água prejudicando a sua permeação cutânea fazendo com que permaneça principalmente no estrato córneo apresentando dificuldades de atingir a epiderme viável (HUNG *et al.*, 2012).

Com o intuito de ultrapassar as limitações de permeação cutânea do fármaco, algumas alternativas podem contribuir como a diminuição do tamanho de partículas, revestimento do fármaco, assim como, sistemas de liberação de fármacos (SLF), o qual resulta em otimização da resposta terapêutica (MARCATO, 2009; SCHMALTZ; SANTOS; GUTERRES, 2005). Como exemplo de SLF tem-se o sistema multiparticulado, no qual o fármaco é microencapsulado em um revestimento de polímero, possibilitando a ampliação de variedade das formas farmacêuticas (BARACAT *et al.*, 2012). Um estudo recente evidenciou efeito benéfico deste flavonoide na forma microencapsulada para tratamento de colite em camundongos (GUAZELLI *et al.*, 2013). Dessa forma, os sistemas microencapsulados podem proporcionar eficácia na distribuição das substâncias

ativas, podendo melhorar a penetração do fármaco na pele e a absorção por via oral (POHLMANN *et al.*, 2013).

Neste contexto, a proposta deste trabalho foi avaliar a eficácia da quercetina microencapsulada no modelo de radiação UVB na pele.

1.1 HISTOLOGIA DA PELE NORMAL

A pele reveste a superfície do corpo tendo como constituição uma parte epitelial cuja origem é ectodérmica, chamada de epiderme, e uma parte conjuntiva cuja origem é mesodérmica, chamada de derme (Figura 1). Abaixo da derme encontra-se a hipoderme que faz união com os órgãos subjacentes. A pele é considerada o maior órgão do corpo humano em extensão contendo 16% do peso corporal, o qual desempenha múltiplas funções como proteção contra a desidratação e contra o atrito. Além disso, auxilia na termorregulação e excreção de inúmeras substâncias. O pH da pele está entre 4,6 a 5,8 (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

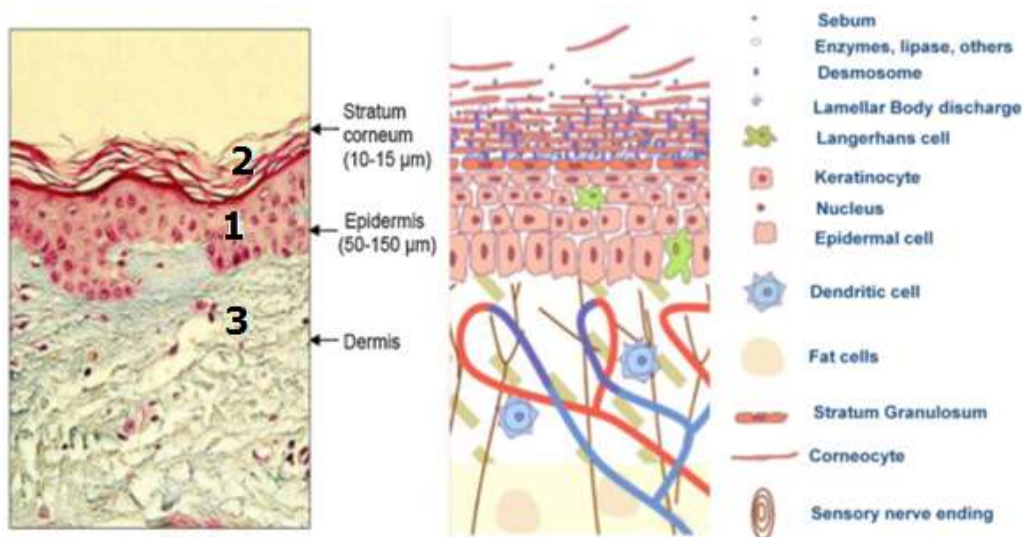


Figura 1: Histologia normal da pele. 1. Epiderme; 2. Estrato córneo; 3. Derme.

Modificado. (MENON; CLEARY; LANE, 2015).

De acordo com Gartner e Hiatt, 2007, a epiderme é composta pelo tecido epitelial de revestimento estratificado pavimentoso queratinizado. É composta pelo sistema ceratinocítico, cujas células são denominadas queratinócitos, responsáveis

pelo corpo da epiderme e seus anexos como pêlos, unhas e glândulas. E apresenta cinco estratos descritos abaixo:

- Basal: células cilíndricas ou cuboídes que está em cima da membrana basal, a qual separa a epiderme da derme. Esta primeira camada é rica em células tronco, sendo assim, apresenta intensa atividade mitótica, responsável pela contínua renovação da epiderme. Apresenta também filamentos intermediários de queratina (MENON, 2002);
- Espinhoso: células em formato poligonal ou achatadas, de núcleo central, apresentando feixes de filamentos de queratina com citoplasma acidófilo e ricos em desmossomos. Graças a essa quantidade de desmossomos, esta camada tem aspecto espinhoso. Os filamentos de queratina e os desmossomos mantêm a coesão entre as células da epiderme resistindo ao atrito (AZULAY; AZULAY; AZULAY-ABULAFIA, 2013);
- Granuloso: células achatadas, núcleo central e citoplasma com grânulos basófilos chamados de querato-hialina. Outra peculiaridade desta camada é a presença de grânulos lamelares, vistos apenas pelo microscópio eletrônico, os quais são formados por bicamadas lipídicas. Eles se fundem com a membrana plasmática e liberam o conteúdo para o espaço entre as células desta camada, contribuindo assim para a formação da barreira contra a penetração de substâncias e para que a pele fique impermeável à água, inibindo a desidratação do organismo (KIERSZEMBAUM, 2004);
- Lúcido: presente apenas na epiderme da pele espessa (palma das mãos e planta dos pés), apresentando células sem núcleos e organelas, no entanto apresenta elidina que é um produto das reações bioquímicas da querato-hialina (GARTNER; HIATT, 2007).
- Córneo: células achatadas, mortas, sem núcleo, com queratina no citoplasma. No estrato córneo os filamentos de queratina se unem com uma matriz de grânulos querato-hialina. Este estrato é altamente hidrofóbico contendo de 10 a 15 camadas de corneócitos, contendo ceramidas e lipídios neutros (colesterol, ácidos graxos e ésteres de

colesterol) organizados no formato de bicamada. Em virtude desta estrutura organizada, o estrato córneo é a principal barreira de permeabilidade para as substâncias externas e é classificado como fator limitante da penetração dos medicamentos através da pele (FOLDVARI, 2000).

A epiderme também é constituída pelo sistema melânico, composto pelas células denominadas melanócitos; células de Langerhans de função imunológica; células de Merkel que são interligadas com o sistema nervoso; e as células dendríticas indeterminadas sem função definida (AZULAY; AZULAY; AZULAY-ABULAFIA, 2013).

A pele apresenta moléculas orgânicas como lipídios, glicídios, proteínas e ácidos nucleicos. Uma dessas moléculas que é excretada pela pele, de suma importância, é a melanina, que é uma proteína de pigmento cor marrom-escura, que tem função protetora contra os raios ultravioletas, a qual é sintetizada principalmente nos melanócitos. Esses são provenientes de células da crista neural embrionária e se encontram, após a organogênese, nas proximidades da derme com a epiderme ou ainda entre os queratinócitos da camada basal da epiderme (CICHOREK *et al.*, 2013). A melanina é encontrada em dois tipos de células: melanócitos e queratinócitos. No melanócito ocorre a síntese da melanina, que após ser formada, migra para o citoplasma do queratinócito e fica depositada. Nas células epiteliais, os grânulos de melanina ficam em posição supranuclear, oferecendo, conseqüentemente, proteção máxima ao DNA contra os efeitos deletérios da radiação ultravioleta (COSTIN; HEARING, 2007).

Já a derme possui elementos fibrosos, filamentos difusos e celulares que dispõem os vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas. Nessa camada conjuntiva há células residentes englobando os fibroblastos, macrófagos, mastócitos e células circulantes do sistema imune (WOLFF *et al.*, 2011). Ela é formada pelo tecido conjuntivo denso não modelado, com colágeno tipo I e entrelaçamento de fibras elásticas, as quais apóiam a epiderme e se ligam a hipoderme. É organizada em duas regiões: derme papilar e derme reticular (ROSS; ROMRELL; REITH, 1993).

A derme papilar é mais superficial, é irregular no local onde se interliga com a epiderme, formando projeções em direção à epiderme chamada de papilas dérmicas. Constituída por tecido conjuntivo frouxo, fibras de colágeno tipo I e III e fibras elásticas. Essa camada contém fibroblastos, macrófagos, plasmócitos, corpúsculos de Meissner, entre outros. Já a derme reticular está mais profunda, também contém estruturas derivadas da epiderme, como as glândulas sudoríparas, sebáceas e folículo piloso. Ela é contínua com a derme papilar, constituída de tecido conjuntivo denso não modelado, com colágeno tipo I, dispostos em feixes paralelos. Apresenta fibras elásticas que estão entremeadas com as fibras colágenas. Não há tantas células nesta região, contudo, encontram-se linfócitos, mastócitos, fibroblastos e células adiposas. A substância que mais predomina é o dermatan sulfato (RAMOS-E-SILVA; CASTRO, 2010).

A última camada e mais profunda é a hipoderme, a qual isola o corpo, reserva a energia, protege a pele e permite a mobilidade sobre estruturas de suporte, moldando os contornos do corpo. Os adipócitos formam a maior parte das células nessa camada e estão organizados em septos de tecido conectivo fibroso, podendo ser encontrado nervos, vasos sanguíneos e linfáticos (WOLFF *et al.*, 2011).

As substâncias com potencial terapêutico podem ser aplicadas na pele com objetivo de tratar diretamente aquela área lesada ou liberar substâncias para outros tecidos. Deve-se avaliar as condições físicas e fisiológicas que atuam nas interações das substâncias ativas com o órgão (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

A camada mais externa da pele humana, como já descrito anteriorme, é o estrato córneo e muitas drogas administradas topicamente não têm a capacidade de penetrar através dela por ser quimicamente lipofílica. Por isso, são necessárias estratégias como formulações apropriadas, alteração na forma de liberação do fármaco, utilização de agentes promotores de permeação, entre outros (TROMMER; NEUBERT, 2006). As três vias que os fármacos alcançam a epiderme viável são através da via transcelular, intercelular e apêndices (figura 2). A primeira ocorre com a difusão do ativo que passa diretamente pelos corneócitos e pela matriz lipídica intercelular intermediária; a segunda o ativo passa entre as células permitindo a difusão de solutos lipofílicos ou apolares através da matriz lipídica contínua (rota proposta para a maioria dos ativos) e a terceira pelos apêndices cutâneos (glândulas

ou folículos pilosos) (ALLEN.; POPOVICH; ANSEL, 2013; MARTINS; VEIGA, 2002; ALKILANI; MCCRUDDEN; DONNELLY, 2015).

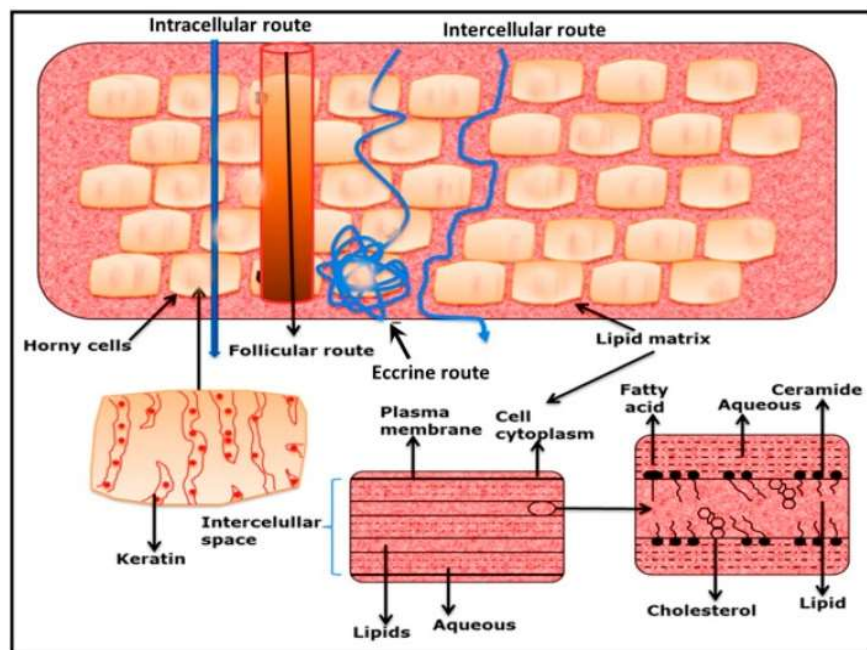


Figura 2: Vias de permeação do fármaco – via transcelular e intercelular (ALKILANI; MCCRUDDEN; DONNELLY, 2015).

As absorções cutâneas e percutâneas podem ser melhoradas por um aumento da atividade termodinâmica, supersaturação e modificadores de penetração (como o propilenoglicol) e para tal utiliza-se as emulsões que apresentam capacidade de solubilização de substâncias ativas lipofílicas e hidrofílicas, além de ser de fácil aplicação (OTTO; DU PLESSIS; WIECHERS, 2009).

1.2 RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E SUAS CONSEQUÊNCIAS NA PELE

O espectro solar possui três componentes que são: ultravioleta, visível e infravermelho (Figura 3). O primeiro foi descoberto por Johann Ritter, em 1801, que mostrou a ação química causada por alguma forma de energia na porção além do violeta. E em 1800, Herschel demonstrou a existência da radiação além do vermelho do espectro visível, chamado de infravermelho. Vale ressaltar que 5% da

luz solar terrestre são dos raios ultravioletas (RUV) (LIM; HÖNIGSMANN; HAWK, 2007).

O espectro eletromagnético é dividido em três regiões distintas: região elétrica com as ondas de rádio e microondas, radiação óptica que compreende as radiações infravermelha visível e ultravioleta e a terceira que compreende os raios X, raios gama e os raios cósmicos (Figura 3). A energia relacionada às ondas eletromagnéticas é conhecida por energia fotônica com a unidade de medida em fóton. Os fótons não apresentam massa, e quando ocorre a absorção, a energia incorpora-se à matéria absorvente e exerce o seu efeito. As radiações com comprimento de onda menores que 10 nm geralmente ionizam as moléculas que as absorvem e as radiações com comprimento de onda superior a 10 nm têm a capacidade de excitar as moléculas que as absorvem. A primeira é conhecida como radiação ionizante enquanto a segunda como radiação não ionizante. As radiações não ionizantes quando interagem com as estruturas moleculares de uma célula produzem diversos efeitos (ARAUJO; SOUZA, 2008; DIFFEY, 2002).

A radiação ultravioleta (RUV) faz parte do espectro eletromagnético e está compreendido de 100 a 400nm de comprimento de onda. O espectro apresenta outras regiões como o raio-X, radiação gama, micro-ondas, ondas de rádio, entre outros. Pelo fato da faixa do comprimento de onda variar em 300nm, a RUV foi subdividida em três regiões: UVA (400-315nm), UVB (315-280nm) e UVC (menor que 280nm). A UVA consegue atravessar a camada de ozônio e pode causar queimadura solar, envelhecimento precoce da pele e até supressão da função imune. Já a UVB sub-região do RUV é bloqueada pela camada de ozônio, porém pode causar queimadura na pele. E a UVC é totalmente filtrada pela camada de ozônio do planeta Terra (SHETTY *et al.*, 2015).

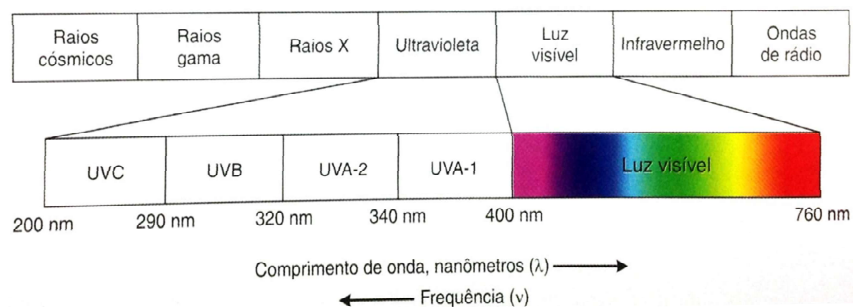


Figura 3: Espectro eletromagnético (AZULAY; AZULAY; AZULAY-ABULAFIA, 2013).

Um estudo conduzido por Chiarelli-Neto *et al.* (2014), mostrou que a luz visível também pode causar danos aos melanócitos encontrados na epiderme através da fotossensibilização da melanina e formação de oxigênio singlete, diminuindo a viabilidade das células, causando fotoenvelhecimento e câncer de pele.

Dependendo do comprimento de onda, a RUV consegue atingir diferentes estratos da pele, logo esta radiação irá interagir com diferentes tipos de células. A radiação UVB é absorvida predominantemente na epiderme, afetando os queratinócitos. Já a radiação UVA consegue penetrar em estratos mais profundos afetando queratinócitos, fibroblastos entre outros. Dessa forma, as moléculas que estão presentes na pele (lipídio, proteína, ácidos nucleicos) e apresentam dupla ou tripla ligações de carbono com carbono em sua estrutura, podem absorver a radiação ultravioleta, sendo então denominadas de cromóforos (Figura 4) (TEWARI *et al.*, 2013). Os cromóforos podem reagir com o oxigênio molecular (O_2) ocasionando excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) (XU; FISHER, 2005).

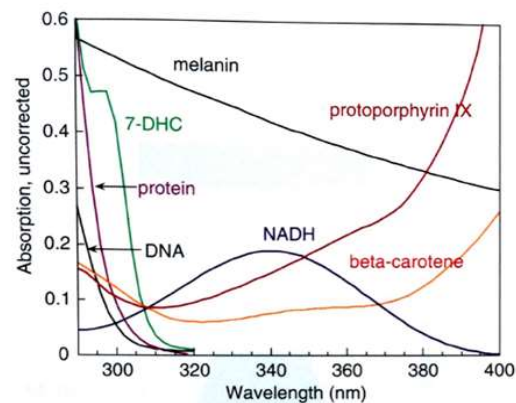


Figura 4: Absorção da radiação UV por diferentes cromóforos da pele (LIM; HÖNIGSMANN; HAWK, 2007).

O mecanismo de ação das EROs é por óxido-redução e são gerados de diferentes maneiras. Uma delas ocorre durante a respiração celular aeróbia, na qual o oxigênio sofre redução tetravalente aceitando quatro elétrons, resultando na formação de H_2O com a formação de intermediários reativos como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) e hidroxila ($\cdot OH$), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A entrada dos quatro elétrons neutraliza a reatividade desses produtos intermediários (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A segunda forma de geração é

pela ativação dos leucócitos durante a inflamação, os quais usam o nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase para a reação redox. Outra maneira, é pela absorção de radiação ionizante o qual pode hidrolisar a água em radicais livres hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e hidrogênio (H) (VALKO *et al.*, 2007). Além disso, o ânion superóxido é produzido por diferentes leucócitos sendo precursor das EROs, ele é gerado como um produto da NADPH oxidase 2 (NOX 2), sendo composta por um subunidade gp91phox que tem por objetivo a transferência completa de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular (HIRAMOTO *et al.*, 2012). Em adição, sabe-se que a produção do ânion superóxido está envolvido com a radiação UVB (MARTINEZ *et al.*, 2015).

Assim, os radicais livres, formados fisiologicamente, atuam como intermediários para a transferência de elétrons nas diferentes reações bioquímicas como descrito anteriormente (SHAMI; MOREIRA, 2004).

A geração de EROs, pela RUV (tanto pela UVA quanto a UVB), pode ativar a peroxidação lipídica e interagir com mecanismos de ação e interação direta com o DNA, RNA e outros componentes da célula (FERNANDEZ *et al.*, 2014). No entanto, a pele apresenta mecanismos próprios para manter a homeostasia com o intuito de enfrentar os diversos fatores que desencadeiam alterações bioquímicas (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Para remover as EROs há os sistemas enzimáticos como catalase (presente nos peroxissomos que decompõe o H_2O_2 em O_2 e H_2O), superóxido dismutase (converte o superóxido em H_2O_2), glutathione peroxidase (protege contra lesão catalisando a degradação do H_2O_2 em homodímero de glutathione e dois moles de água), glutathione redutase e os não enzimáticos como glutathione, alfa tocoferol, ácido ascórbico, beta caroteno, os quais bloqueiam o início da formação de radicais livres ou os inativam (PODDA *et al.*, 1998; HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008). Entretanto, a capacidade destes mecanismos é limitada e pode ser prejudicada pela exposição excessiva a agentes nocivos como a RUV deixando a pele vulnerável ao ataque das EROs (VITALE *et al.*, 2013). Quando a produção de EROs ultrapassa a capacidade das células em reduzi-las quimicamente, a concentração de radicais livres aumenta incontrolavelmente, rompendo o equilíbrio oxidante/antioxidante no organismo, instalando-se o estresse oxidativo cutâneo (MANTENA; KATIYAR, 2006). Este estresse acarreta a oxidação de biomoléculas como lipídios, proteínas, ácidos

nucléicos, ácidos graxos poli-insaturados entre outros. Após a reação inicial com as EROs, ocorre uma reação em cadeia levando à lesão celular e algumas vezes até a morte da célula (JI; LI, 2016). Estudos recentes ratificam a associação entre o estresse oxidativo e o desenvolvimento de câncer de pele (SOLIMAN; VAN DROSS, 2015; VENZA *et al.*, 2015; MCADAM; BREM; KARRAN, 2016). O ferro, abundante no organismo, é capaz de catalisar as reações de oxidação das biomoléculas, reduzindo-se a Fe^{+3} com a formação do radical hidroxila, altamente reativo que causa dano ao DNA (AUST; MOREHOUSE; THOMAS, 1985).

Neste contexto, o fator nuclear (derivado de eritróide-2) tipo 2 (Nrf2) tem papel primordial na defesa contra o estresse oxidativo através de sua capacidade em induzir a expressão de genes que codificam as proteínas antioxidantes e enzimas desintoxicantes. O Nrf2 interage com o elemento responsivo a antioxidante (ARE) ativando a expressão de certos genes, responsáveis na transcrição de enzimas antioxidantes como a glutatona peroxidase (GPx), hemeoxigenase (HO-1) (BEYER *et al.*, 2007).

A membrana das células é atingida com mais frequência pelas EROs ocorrendo a peroxidação lipídica, ocasionando a alteração da estrutura da membrana, modificação da permeabilidade e seletividade, podendo levar à morte celular (MELLO FILHO; HOFFMANN; MENEGHINI, 1984). A lipoperoxidação é essencial no processo inflamatório por resultar na formação de prostaglandinas, porém, o seu excesso leva a danos celulares (ROSS; MOLDEUS, 1991). É considerada uma reação em cadeia apresentado três fases distintas que são: iniciação (fase em que ocorre o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado da membrana); propagação (fase em que há a formação do radical lipídico que reage com o O_2 formando o radical peroxila, este, por sua vez, reage com outro hidrogênio do ácido graxo formando novo radical peroxila e com subproduto o hidroperóxido lipídico) e o término (fase em que os radicais lipídicos e peroxilas propagam-se até se auto-destruírem) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os efeitos perceptíveis da radiação UV podem ser divididos em prévios, como calor, eritema, queimadura, dor, bronzeamento, suor e imunossupressão e os tardios, como fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese (AZULAY; AZULAY; AZULAY-ABULAFIA, 2013; LIM; HÖNIGSMANN; HAWK, 2007). A inflamação

geralmente ocorre quando o organismo detecta um agente patogênico, porém ela também pode ser iniciada na ausência de sinais associados ao agente patogênico (JOHNSON *et al.*, 2013). Um exemplo disso ocorre após a exposição à radiação ultravioleta, no qual os queratinócitos expressam uma ampla variedade de citocinas e quimiocinas, sendo por isso consideradas como as principais células que iniciam a resposta inflamatória (BARKER *et al.*, 1991). Os queratinócitos alteram sua morfologia apresentando cromatina condensada e citoplasma eosinofílico. Com isso, essas células entram em apoptose para eliminar o DNA danificado e este processo é proporcional ao tempo de exposição à RUV. Após a exposição, a morfologia das células de Langerhans também é alterada e os neutrófilos são acumulados rapidamente na derme que clinicamente acompanha o eritema (LIM *et al.*, 2007). Estas células polimorfonucleares apresentam diversas enzimas como as metaloproteinases (MMP), responsáveis em degradar o colágeno e a fibronectina, as mieloperoxidases (MPO), as quais estão armazenadas nos grânulos azurófilos, que produzem ácido hipocloroso destruindo os microorganismos, entre outros (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). Além disso, os neutrófilos geram EROs que são convertidos em produtos eficientes também contra os microorganismos invasores (SEAGAL, 2005). No entanto, como não há uma infecção por microorganismo, os danos teciduais são mais expressivos.

Mesmo que a radiação UVB não atinja as camadas mais profundas da pele, os efeitos sobre a derme são indiretamente iniciados pelos mediadores liberados pelas células da epiderme (ROSARIO *et al.*, 1979). Terui, Okuyama e Tagami (2001), descrevem a ocorrência de três fases da inflamação induzida por RUV, sendo que a primeira é a vasodilatação precoce, a segunda é a inflamatória, na qual, muitas células inflamatórias como neutrófilos e células T se acumulam na pele, e a terceira fase é a regressiva, a qual se baseia nos eventos anti-inflamatórios.

Ao nível celular, a RUV pode também regular a expressão de moléculas de adesão na superfície e modificar o crescimento celular, principalmente dos queratinócitos. No nível molecular, ela induz a fosforilação de tirosina-quinase associada ao receptor de proteína-quinase C, ativa fatores de transcrição como o fator nuclear kappa β (NF-K β) precoce e tardio, fator de proteína – 1 (AP-1) e p53 (TERUI; OKUYAMA; TAGAMI, 2001). O NF-K β leva à expressão do fator de crescimento endotelial vascular, assim como à expressão do gene para TNF α , IL-1 β

e IL-6 (estes são responsáveis pelas respostas imunológicas e inflamatórias). O tipo de início é independente e está associado com a ativação da tirosina-quinase do receptor de uma forma independente do ligante, enquanto o tipo tardio é mediada pela IL-1 liberada por meio de respostas induzidas pelos danos ao DNA (BENDER *et al.*, 1998). As citocinas desencadeiam a vasodilatação, o alargamento das junções interendoteliais com separação de células endoteliais, ocasionando desequilíbrio da pressão hidrostática do líquido intersticial, resultando no edema (JANTSCHKO *et al.*, 2005). Especialmente a IL-1 pode ativar o NADPH oxidase, levando a um aumento do ânion superóxido, este, por sua vez, ativa o NF- κ B, estimulando a liberação de citocinas, ou seja, ocorre *feedback* positivo (VERRI *et al.*, 2012).

O AP-1, composto por heterodímeros da família Fos e Jun e homodímeros ou heterodímeros da família Jun, desempenha funções variadas nos processos celulares, incluindo a proliferação celular, diferenciação, apoptose e tumorigênese (BACHELOR *et al.*, 2005). O aumento da atividade de AP-1 interfere com a síntese dos colágenos da derme do tipo I e III bloqueando o efeito do TGF- β (fator de crescimento transformador), interferindo na transcrição do gene do colágeno (KWON *et al.*, 2015; FAN *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2008). Além disso, a atividade do AP-1 aumenta os níveis de atividade de diversas enzimas que degradam os componentes da matriz extracelular, como as metaloproteinases de matriz MMP-1 (colagenase), MMP-9 (gelatinase), entre outras (ONOUÉ *et al.*, 2003; AHN *et al.*, 2013).

A proteína p53 apresenta quatro domínios funcionais: um domínio de ativação da transcrição no terminal N, um domínio de ligação ao DNA, dois domínios de regulação e de oligomerização no terminal C. Estes domínios apresentam atividades distintas, sendo que quando ativado, o p53 implica no controle do ciclo celular, reparação do DNA e apoptose. Após a ativação do p53, os intermediários do processamento do DNA sugerem um estímulo para a ativação de respostas de estresse celular (TERUI; OKUYAMA; TAGAMI, 2001).

Conforme descrito acima, vários são os danos que a radiação RUV pode causar na pele. Os efeitos podem ser agudos como o eritema, inflamação local e até mesmo crônico como o fotoenvelhecimento (AZULAY; AZULAY; AZULAY-ABULAFIA, 2013; QUAN *et al.*, 2009). Segundo Heurung, Raju e Warshaw, 2014, os protetores solares que apresentam em sua formulação benzofenona ou

dibenzolimetano podem causar reações alérgicas e dermatite de contato pela presença de benzofenona-3 (oxibenzona) e a degradação dessas substâncias ativas podem causar uma inflamação local. Por isso, é necessário o uso de protetores ou bloqueadores aliados com outras fontes de antioxidantes com o intuito de prevenir a pele contra a ação da radiação (GOWELL *et al.*, 2015).

1.3 AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DA QUERCETINA

A exposição à RUV leva à formação de radicais livres e de inflamação cutânea. Em um ciclo vicioso, a inflamação aumenta os níveis de radicais livres fazendo com que os mecanismos próprios do organismo não consigam por si só equilibrar a proporção de substâncias oxidantes, resultando no estresse oxidativo (SWANSON, 1998). O estudo de substâncias naturais com mecanismo antioxidante permite a elucidação de novas estratégias sobre as EROs geradas no organismo.

Neste contexto destaca-se a quercetina (3, 5, 7, 3', 4' pentahidroxi flavona), um flavonoide encontrado em vários legumes, no chá e no vinho tinto (FORMICA; REGELSON, 1995). Este flavonoide é utilizado como suplemento dietético em doses entre 200 a 1200 mg e nutracêutico para alimentos funcionais na concentração de 0,008-0,5% (HARWOOD *et al.*, 2007). Ela apresenta algumas características físico-químicas importantes como coloração amarela, solubilidade em água de 60 mg/L a 16°C, solubilidade em éter, metanol, etanol, acetona, piridina e ácido acético apresentando absorção espectral entre 256 nm a 373 nm e massa molecular de 302.2357 g/mol (U.S NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE). Estudo conduzido por Günther *et al.* (2015) mostrou que a quercetina em meio básico (pH 7.4) apresentou melhor solubilidade em meio aquoso, pesquisado pelo logaritmo do coeficiente de partição (Log P 1,48) e pelo coeficiente de distribuição (Log D 0,58) ratificando com outro estudo realizado por Kendre, Pande e Chavan (2014), o qual mostrou o aumento da solubilidade da quercetina em tampão fosfato (pH 7,4).

A quercetina (figura 5) apresenta diversas atividades biológicas com expressiva ação antioxidante. Esta ação é principalmente atribuída à presença de dois farmacóforos antioxidantes dentro da molécula que tem a configuração ótima

para eliminação de radicais livres, destacando-se o grupo catecol (anel B), o qual proporciona a formação de radicais fenoxil mais estáveis após a doação do átomo de hidrogênio e o grupo OH na posição 3 que junto com a dupla ligação entre carbonos aumenta a estabilização por ressonância dos elétrons deslocados sobre a molécula (HEIJNEN *et al.*, 2002). Devido esta característica, a quercetina consegue inibir a peroxidação lipídica interferindo na estabilização dos radicais formados (PRINCE; SATHYA, 2010). Também consegue induzir o aumento dos níveis de glutathiona prevenindo a formação de novos EROs (ANSARI *et al.*, 2009). Ainda, apresenta ação antioxidante quelando íons metálicos e formando complexos inertes que não participarão da conversão de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio em radicais hidroxila (COTELLE, 2001).

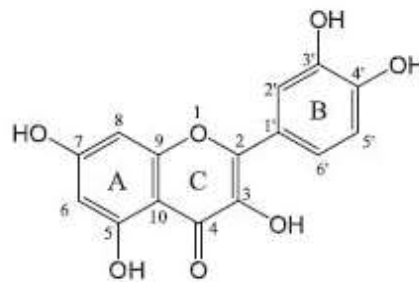


Figura 5. Estrutura molecular da quercetina

Vários estudos demonstraram que a quercetina exerce o efeito anti-inflamatório e antioxidante ativando o fator nuclear 2 (Nrf2) e inibindo as vias de NF- κ B (NAM, 2006; CHIRUMBOLO, 2010; HUR; GRAY, 2011). Taniguawa *et al.*, (2007) demonstraram que a quercetina não atua apenas na regulação da expressão do RNAm de Nrf2, como também estabiliza a atividade da proteína Nrf2. Esse efeito produz citoproteção e quimioprevenção contras as EROs.

Estudo realizado por Lim e Kim (2007), concluiu que a quercetina inibiu a enzima MMP-1 e regulou negativamente a expressão da MMP-1 através da inibição da AP-1. A quercetina também é capaz de inibir a MMP-9 e regular a citocina pró-inflamatória TNF- α , através da via AP-1 e NF- κ B através da inibição direta do fosfatidilinositol 3-quinase (HWANG *et al.*, 2009). Ela também consegue inibir a secreção de citocinas inflamatórias como a IL-1 β e IL-6 e estimula a citocina anti-inflamatória IL-10 (SEO *et al.*, 2015). No caso da radiação UVB, a quercetina diminui

a atividade da enzima MPO, reduziu a secreção de proteinases e a depleção de GSH (CASAGRANDE *et al.*, 2006a). Esses mecanismos reforçam o potencial benéfico deste flavonoide no tratamento de inflamações cutâneas e a proteção contra o fotoenvelhecimento.

Para a veiculação desta substância, deve-se analisar a via de administração e as estratégias que poderão ser utilizadas. A quercetina é absorvida na sua forma livre na microflora intestinal e estômago (GUAZELLI *et al.*, 2013). No entanto, somente 36 a 53% da quercetina é absorvida pelo intestino (WALLE; WALLE; HALUSHKA, 2001). Esta baixa absorção pode ser explicada pelo fato de que a quercetina apresenta baixa solubilidade em água. Este flavonoide é rapidamente metabolizado apresentando tempo de meia-vida em torno de 11 horas a 28 horas (GRAEFE *et al.*, 2001; MANACH; MAZUR; SCALBERT, 2005). Durante o processo de metabolização a quercetina é submetida a reações de metilação, glicuronização e sulfatação e é rapidamente eliminada (BOERSMA *et al.*, 2002).

A quercetina apresenta baixa permeação na pele confirmada por estudos *in vitro* com células de Franz (CASAGRANDE *et al.*, 2007; ZILLICH *et al.*, 2013). A solubilidade reduzida deste flavonoide em água foi determinada como uma das razões para justificar a ineficiência da permeação cutânea. O uso de tecnologia tem sido amplamente usado com a finalidade de melhorar a penetração deste flavonoide na pele como o uso de encapsulação com polímeros, síntese de pró-drogas, entre outros (PALECO *et al.*, 2014). Como exemplo tem-se o estudo feito por Jeon, Yoo e Park (2015) usando lipossoma de hialuronato de quitosana que resultou numa liberação gradativa da quercetina com melhora na permeação na pele.

Estudo desenvolvido por Lee *et al.* (2016) utilizou nanopartículas de sílica como matéria-prima para encapsular a quercetina através de um método de microemulsão óleo-em-água. Este método resultou em nanopartículas esféricas, altamente monodispersa e estável no meio aquoso. Os resultados destas nanopartículas, em cultura de células, mostraram redução das citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α .

Estudo realizado por Maramaldi *et al.* (2016) avaliou a capacidade da quercetina, formulada em um sistema de liberação modificado, contra a estimulação com histamina em seres humanos saudáveis. Este estudo único e cego, envolveu 30

voluntários que foram tratados com o produto a base de quercetina (1% de creme), placebo e o controle positivo (formulação tópica com 1% de dexclorfeniramina). Os resultados mostraram que a quercetina e o controle positivo reduziram o eritema e o diâmetro da pápula formada. Evidenciando que a quercetina nesta formulação foi capaz de reduzir o vermelhidão, prurido e a inflamação da pele danificada e também auxiliou a restaurar a função de barreira da pele, aumentando a hidratação e reduzindo a perda de água.

Em outro estudo usando a pele de orelha de porco, conduzido por Casagrande *et al.* (2006), foi evidenciado que a quercetina, incorporada a uma formulação tópica, fica retida na epiderme. Já foi demonstrado que a quercetina veiculada em uma microemulsão A/O aumentou a penetração do fármaco para o estrato córneo, epiderme e derme e também preveniu significativamente a depleção de GSH e a atividade de metaloproteinases contra a irradiação UVB (VICENTINI *et al.*, 2008).

Em virtude da característica de barreira que a pele apresenta somada as características físico-químicas da quercetina, discutidas anteriormente, se faz necessário uma investigação com outras formas de liberação de fármaco que possam agragar melhora na absorção e biodisponibilidade de fármacos lipossolúveis.

1.4 SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS: MICROCÁPSULA

A forma farmacêutica convencional (liberação imediata) permite que o fármaco seja liberado rapidamente e fique disponível para a absorção e ação sistêmica imediata. Todavia, apresenta algumas desvantagens para os fármacos com baixa solubilidade e tempo de meia-vida curto necessitando repetir as doses para manter a concentração plasmática, e variação na concentração do fármaco no sangue e nos tecidos (AULTON, 2005). Com o propósito de transpor estas limitações, a indústria farmacêutica tem investido na pesquisa de novas formas farmacêuticas como microcápsulas, lipossomas, nanopartículas poliméricas e complexos de inclusão como as ciclodextrinas (ROSSI-BERGMANN, 2008).

O termo sistema de liberação de fármacos (SLF) apareceu como nova classe de forma farmacêutica no final dos anos de 1940 e de 1950 (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2009). O SLF apresenta diferentes formas para controlar a velocidade e extensão de liberação do fármaco e a utilização de sistemas monolíticos ou multiparticulados podem aumentar a versatilidade. Soma-se a isso o uso de adjuvantes específicos com intuito de formar estruturas microporosas com semipermeabilidade, tendo capacidade de intumescimento em contato com a água e capacidade de complexação com fármacos e processos difusionais (RATNAPARKHI; GUPTA, 2013; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

A microencapsulação é um processo no qual as substâncias ativas são isoladas por uma camada de polímero que atua como filme protetor evitando os efeitos prejudiciais de sua exposição na forma livre (mascaramento de sabor e odor, estabilidade química, física e biológica, melhora da absorção do fármaco e aumento do tempo de atividade da substância) (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). Essa camada se desfaz sob estímulo específico, liberando a substância ativa no local e no tempo ideal (DONBROW, 1991). As substâncias ativas podem estar no estado líquido, sólido e até no estado gasoso (TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008). No entanto, as microcápsulas apresentam-se na forma esférica e aspecto sólido. Também vale salientar que algumas técnicas de microencapsulação apresentam alto custo e não são viáveis para todas as substâncias.

Há vários métodos de microencapsulação que dependem da substância a ser encapsulada e o material para o revestimento. Por isso, os métodos podem ser divididos em métodos químicos, físicos e físico-químicos (TIWARI *et al.*, 2010):

- Métodos químicos: pode ser utilizado o método de inclusão molecular ou inclusão em complexos, geralmente se utiliza a β -ciclodextrina e a substância ativa deve ser líquida e o resultado final será de microcápsulas variando o tamanho entre 5-50 μm (HUNDRE; KARTHIK; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2015). Outro método é a polimerização na qual a substância ativa pode ser líquida ou sólida e o agente encapsulante é composto por monômeros que irão se polimerizar e revestir a substância ativa (KASTURAGI *et al.*, 1995);

- Métodos físicos: são subdivididos em outras metodologias como o *spray drying* (substância ativa é dispersa ou dissolvida em uma solução aquosa junto com o agente encapsulante e depois ocorre a evaporação do solvente obtendo-se a solidificação das gotículas), leite fluidizado (método pelo qual uma corrente de ar quente atravessa as partículas sólidas, esta técnica permite o revestimento por qualquer tipo de agente encapsulante) (ZHANG *et al.*, 2011), entre outros;
- Métodos físico-químicos: emulsificação/evaporação do solvente (a substância ativa fica dispersa na fase interna de uma emulsão sendo posteriormente emulsionada com o agente tensoativo para a fase externa e então, o solvente orgânico é removido por evaporação) (SUAVE *et al.*, 2006) e o método de coacervação e separação de fases, descrito abaixo.

Em termos gerais, o processo de encapsulação por coacervação inicia-se com a dissolução dos excipientes específico na água, sob agitação. Posteriormente, o fármaco a ser encapsulado é adicionado sob agitação. Então, um segundo material é adicionado para concentrar o polímero em gotículas de líquido. Estas gotículas (o coacervado) formam um filme ao redor da substância ativa garantindo a permanência do tamanho da partícula (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2009). O tamanho da microcápsula e suas características podem ser alteradas com a modificação do pH da dispersão, concentração iônica, razão entre a substância ativa e a matriz polimérica e também o tipo de matriz (VERRI *et al.*, 2012). Já há um medicamento microencapsulado sendo comercializado que é o cloreto de potássio da empresa Ther-Rx Corp. (Micro-K Extencaps, A.H. Robins).

A escolha do polímero deve ser feita analisando-se as características físico-químicas e a compatibilidade biológica. Há uma forte tendência em utilizar os polímeros naturais por serem de baixo custo e por serem passíveis de degradação *in vivo* através da hidrólise ou ataque enzimático (CARMIGNAN; BIDONE; LEMOS-SENNA, 2008). Entre estes polímeros há a pectina e a caseína que apresentam grupos funcionais, que podem se interagir e formar uma matriz polimérica capaz de liberar o fármaco gradativamente (BARACAT *et al.*, 2012). A pectina é um polissacarídeo linear de resíduos do ácido D-galacturônico em ligação α (1-4), a qual

pode formar complexos com outros polímeros em decorrência de suas cargas dependendo do pH. Já a caseína é uma glicofosfoproteína encontrada no leite, que apresenta característica anfifílica, ou seja, caráter anfótero (carga negativa acima do seu ponto isoelétrico e carga positiva abaixo deste) (MARRETO *et al.*, 2013; BRANDAO; ANDRADE, 1999).

Estudo anterior com microcápsula de quercetina revestida com polímero de polimetil metacrilato mostrou um padrão de liberação prolongada durante 36 horas de estudo (LEE *et al.*, 2008). Em outro estudo, as microcápsulas com pectina e caseína mostraram cinética de liberação de primeira ordem durante as 6 horas de estudo e o tamanho médio destas microcápsulas era de 3.138 e 4,929 μm (BARACAT *et al.*, 2012). De acordo com as informações discutidas, as microcápsulas de pectina/caseína mostram ser uma alternativa para a liberação gradual e absorção de fármaco, além do processo de produção ser de baixo custo e a possibilidade de obtenção em meio aquoso, sem prejudicar o meio ambiente. Por isso, torna-se interessante o estudo da eficácia destas microcápsulas carregadas com quercetina nos danos causados pela radiação UVB na pele.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia terapêutica da quercetina microencapsulada administrada topicamente em modelo de inflamação e estresse oxidativo cutâneo induzido pela radiação UVB.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar as microcápsulas, a partir do polímero biodegradável de pectina/caseína, contendo quercetina;
- Preparar emulsões para veiculação da quercetina microencapsulada;
- Realizar estudo de estabilidade das emulsões adicionadas de quercetina microencapsulada;
- Avaliar os efeitos terapêuticos da quercetina microencapsulada quando administrada em emulsão por via tópica em camundongos sem pelo, no modelo de lesão cutânea induzida pela radiação UVB.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Reagentes, padrões e polímeros

Pectina USP (68% de esterificação) da CPKelco (Limeira, SP, Brasil); caseína da Katuffman & Co (Germany); ácido cítrico, hidróxido de sódio, ácido clorídrico e fosfato de potássio, Merck (grau analítico, Darmstadt, Hessen, Alemanha); tween 20[®], Santa Cruz Biotechnology Inc (Dallas, Texas, USA); terc-butil hidroperóxido, Acros Organics (Geel, Antwerp, Bélgica); quercetina, Acrós (Pittsburgh, PA, USA). Azul brilhante R, glutathiona reduzida (GSH), brometo de hexadeciltrimetil amônio (HTAB), *o*-dianisidina, nitroblue tetrazolium (NBT), 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), Trolox, bisacrilamida foram obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Xilene cianol e hidroximetil aminometano (Tris) da Amresco (Solon, OH, USA). Acrilamida, dodecil sulfato de sódio (SDS), glicerol. Os adjuvantes usados para o preparo das formulações foram obtidos da Galena (Campinas, SP, Brasil). Kits de Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas da eBioscience (San Diego, CA, USA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.1.2 Equipamentos

Agitador mecânico, Fisatom[®]; Balança analítica, HR-120, A&d[®], precisão de 4 casas; Banho-maria, 314/2 DN, Nova Ética[®]; Banho-maria 100, Fanem; Centrífuga refrigerada, Rotina 46R, Hettich Zentrifugen[®]; Câmara de madeira projetada para irradiação; Deionizador de água, Purebal Option-Q, Elga[®]; Estufa 0-120°C, De Leo & Cia[®]; Fonte elétrica para eletroforese MS 300V, Major Science[®]; Homogeneizador de tecidos Ultra Turrax[®], T18 basic, IKA; Lâmpada ultravioleta fluorescente PHILIPS TL/12 40W RS-UVB, MedicalHoland[®]; Leitor de microplaca, Asys Expert Plus, Biochrom[®]; Leitor de microplaca, Enspire, Perkin Elmer[®]; Leitor de microplaca, Multiskan GO, Thermo Scientific; pHmetro, Tec-3MP, TECNAL[®]; Radiômetro IL 1700 Research Radiometer. Detectores: SED240 – filtro UVB (290nm), SED005 – filtro UV (350nm); Sistema de eletroforese Mini Vertical, Mini-

Protean® Tetra System, Bio-RAD®; Spray drier, model SD-05, Lab Plant®; Termociclador, TX96, Amplitherm®; Ultra-som, TSO, Thornton®.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtenção das microcápsulas

As microcápsulas foram obtidas seguindo-se o método de coacervação complexa proposto por Baracat *et al.* (2004). Dispersou-se a caseína e a pectina separadamente, sob agitação mecânica constante e o pH foi ajustado para $8,0 \pm 0,1$ pela adição de hidróxido de sódio 4,0 M. A quercetina foi dispersa em água deionizada por três minutos sob agitação mecânica e, então, adicionada à dispersão de pectina. Após este procedimento, a dispersão de caseína foi adicionada à mistura pectina e quercetina e as microcápsulas foram obtidas através da diminuição gradativa do pH para $4,0 \pm 0,1$ com adição de ácido cítrico 1,0 M. A proporção final de quercetina e polímero foi de 1:3. O processo foi o mesmo para o preparo das microcápsulas inertes, ou seja, microcápsulas sem quercetina, no entanto, ao invés de adicionar o fármaco foi adicionada água deionizada. As microcápsulas foram secas em Spray Dryer (Lab Plant – Model SD05) com as seguintes especificações: temperatura do ar na entrada foi mantida constante a 180°C; a taxa de alimentação foi de 7,75mL/min e o fluxo de ar foi de 1,1m³/min.

3.2.2 Preparo das emulsões

Foi escolhido como base de creme não iônico a cera auto-emulsionante Polawax® (álcool cetoestearílico + monoestearato de sorbitol polioxietileno 20 OE) cuja proporção estava em 10% (m/m). Foi adicionado junto ao Polawax®, o emoliente triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico (5%) e aquecidos a 70°C. Em outro recipiente foi adicionada água deionizada (q.s.p 100 ml) e aquecido a 70°C. Após atingirem a temperatura adequada, a fase aquosa foi vertida na fase oleosa e agitadas até resfriamento (40° C). Então, foi acrescentada uma solução conservante (Pheonip®) cuja proporção final ficou em 0,4% (m/m) na formulação.

As emulsões foram utilizadas apenas 24 horas após o preparo com o intuito de estabilizar os excipiente e o conservante. Então, foram separadas e identificadas como: controle, quercetina, microcápsula sem quercetina e microcápsula com quercetina. Na formulação controle foi adicionada 6% de propilenoglicol (umectante) e água deionizada (q.s.p). A quercetina foi incorporada correspondendo a 0,5% (m/m) na formulação tópica. A massa microcápsulas foi ajustada para resultar em uma concentração de 0,5% (m/m) de quercetina na formulação final. Estes fármacos foram dispersados em 6% de propilenoglicol.

As microcápsulas de quercetina foram previamente preparadas conforme descrito no item 3.2.1. A concentração utilizada de quercetina foi 0,5%, baseando-se nos seus efeitos terapêuticos em estudos experimentais com animais em modelo de pele (CASAGRANDE *et al.*, 2006a).

3.2.3 Estudo de Estabilidade das emulsões

O estudo de estabilidade tem como objetivo analisar a estabilidade da emulsão e prever a validade da formulação bem como as condições de armazenamento. Os testes de estabilidade conseguem avaliar a capacidade de um produto em manter seu aspecto original, as características físicas, químicas e microbiológicas (AZZINI, 1999).

As emulsões foram armazenadas em temperatura de 4°C, temperatura ambiente e de 40±2°C/75±5% de umidade relativa pelo período de seis meses (CASAGRANDE *et al.*, 2006b; BRASIL, 2005).

Sendo assim, todas as emulsões de Polawax®, adicionadas ou não com o fármaco livre ou microencapsulado, bem como o pó de quercetina e microcápsula sem quercetina, deste estudo foram acondicionadas, em frascos de polipropileno do tipo semipermeável (permeável a gases e à umidade), e armazenadas nas condições de estocagem supracitadas. Nos intervalos de 0, 1, 30, 60, 90 e 180 dias foram coletadas alíquotas e analisadas para a estabilidade físico-química e funcional.

3.2.3.1 Avaliação da estabilidade físico-químico e funcional

3.2.3.1.1 Aparência física

As emulsões foram inspecionadas quanto a coloração, homogeneidade e consistência (SHATALEBI; RAFIEI, 2014).

3.2.3.1.2 Determinação do pH

A determinação do valor do pH é importante por proporcionar informações sobre a integridade das fases da emulsão, uma vez que quando se aplica à pele uma formulação com pH muito distante do pH ideal da pele há uma maior chance de desenvolver efeitos adversos (AZZINI, 1999).

Foi pesado 2 g de cada emulsão e dissolvido em 18 g de água deionizada, ou seja, realizou-se diluição 1:10 (m/m), respectivamente. Após completa homogeneização o pH das amostras foi determinado em pHmetro (ANCHISI *et al.*, 2001; GEORGETTI *et al.*, 2006).

3.2.3.1.3 Teste de centrifugação

O teste de centrifugação permite informar e comparar as propriedades de estabilidade de diferentes emulsões. Este teste, além disso, permite verificar a estabilidade avaliando se houve ou não a separação de fases da formulação, ou seja, permite analisar se houve instabilidade físico-química (AZZINI, 1999).

Foi pesado 2 g de cada emulsão em tubo específico para centrífuga e esses tubos foram submetidos à centrifugação a 1660xg por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após a finalização da centrifugação, foi observado se ocorreu ou não a separação de fases de cada emulsão (GEORGETTI *et al.*, 2006).

3.2.3.1.4 Determinação da atividade doadora de átomos de hidrogênio ao radical DPPH·

A estabilidade funcional das formulações foi analisada pela atividade antioxidante da quercetina e da microcápsula contendo quercetina em sequestrar o

radical 2,2-difenil-1-picrihidrazil (DPPH). Este teste é um método indireto realizado em álcool absoluto, interessante por causa da lipossolubidade da quercetina. A alteração colorimétrica foi mensurada usando o espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution® 60 no comprimento de onda de 517nm (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Foi pesado 0,024 g de quercetina em pó, em gral de vidro, e adicionado 4 mL de etanol absoluto. Posteriormente, realizou-se diluição 1:5 e 1:20, respectivamente, utilizando etanol absoluto como solvente. Foi pesado 0,096 g das microcápsulas em pó contendo ou não quercetina e adicionado 4 mL de etanol absoluto. Diluiu-se esta solução 1:5 e depois 1:20 também em etanol absoluto.

Para cada formulação foi pesado 0,5 g e adicionado 5 mL de etanol absoluto e logo depois foi feita diluição 1:10 com etanol absoluto.

A medida do sequestro do radical DPPH· foi analisada adicionando-se 50 µL de cada amostra, em triplicata, no meio reacional contendo 1 mL de tampão acetato 0,1 M (pH 5,5), 1 mL de etanol absoluto e 500 µL de solução etanólica de DPPH 250 µM. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente foi feita a leitura no espectrofotômetro.

Foram preparados 2 controles positivos: i) adicionando-se 50 µL de etanol absoluto ao meio reacional e ii) adicionando-se 50 µL de microcápsula sem quercetina diluída conforme especificado acima no meio reacional. Já o branco foi constituído de 1 mL de tampão acetato 0,1 M (pH 5,5) e 1,5 mL de etanol. O controle positivo foi considerado com o máximo de elétrons livres do radical DPPH (100%), uma vez que não apresentava amostra. A capacidade doadora de hidrogênio (%) da quercetina foi calculada por meio da equação (1):

$$\% \text{ Atividade} = (1 - \text{absorvância da amostra} / \text{absorvância do controle}) \times 100 \quad (1)$$

3.2.4 Avaliação do efeito terapêutico *in vivo* da quercetina microencapsulada nos danos induzidos pela radiação UVB

3.2.4.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos sem pelo da linhagem HRS/J, de ambos os sexos, adultos e com massa de 20 a 30 g. Os camundongos foram mantidos no Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina com temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração. Os experimentos foram realizados conforme as normas da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina (registrado no Ofício Circular CEUA nº55/2014, processo CEUA nº 4923.2014.22).

3.2.4.2 Sistema e fonte de radiação UVB

A fonte de luz utilizada nos experimentos para indução das lesões foto-oxidativas foi uma lâmpada UVB fluorescente modelo PHILIPS TL/12 40W RS (Medical). A lâmpada emite radiação na faixa λ de 270 a 400 nm com pico máximo de emissão em torno de 313 nm. A medida da irradiância foi realizada utilizando-se um radiômetro (IL 1700) com detectores para radiação UV (SED 005) e, especialmente, para UVB (SED 240) (CARINI *et al.*, 2000; CASAGRANDE *et al.*, 2006a). A lâmpada foi instalada numa câmara de madeira desenvolvida especificamente para a indução do estresse oxidativo e inflamação. Os camundongos foram separados em caixas de plástico e cobertos com tela plástica para garantir a total exposição da região dorsal. Foi realizado rodízio com as caixas contendo os animais devido às variações de radiação ao longo da lâmpada. Os animais foram colocados a 20 cm de distância da lâmpada UVB e expostos à radiação à temperatura ambiente com livre movimentação na caixa (CASAGRANDE *et al.*, 2006a). A dose de radiação utilizada para indução da inflamação e do estresse oxidativo foi de $4,14 \text{ J/cm}^2$ (CAMPANINI *et al.*, 2013; IVAN *et al.*, 2014; MARTINEZ *et al.*, 2015).

3.2.4.3 Protocolo experimental para administração das formulações tópicas

Os camundongos foram distribuídos em seis grupos com cinco animais cada:

- Grupo 1: controle não irradiado;
- Grupo 2: controle irradiado;
- Grupo 3: irradiado e tratado com formulação tópica sem fármaco;
- Grupo 4: irradiado e tratado com formulação tópica contendo quercetina não microencapsulada;
- Grupo 5: irradiado e tratado com formulação tópica contendo microcápsulas sem fármaco;
- Grupo 6: irradiado e tratado com formulação tópica contendo quercetina microencapsulada.

Os camundongos foram tratados topicamente, na parte dorsal, com 0,5 g de formulação contendo 0,5% de quercetina (livre ou microencapsulada), 12h, 6h, imediatamente antes e 6 h após o início da sessão de irradiação UVB (Figura 6) (MARTINEZ, *et al.*, 2016). Os animais foram eutanasiados e as amostras de pele foram coletadas 12 horas após o final da irradiação para os seguintes ensaios: edema; atividade de mieloperoxidase, avaliação de FRAP; capacidade em reduzir o radical ABTS; níveis de GSH e atividade de metaloproteinase (MMP-9). O segundo tempo de irradiação foi realizado com a mesma quantidade de animais e mesmo esquema de tratamentos com a eutanásia ocorrendo 2 horas após o final da irradiação e a pele coletada foi utilizada para os seguintes ensaios: teste de produção de ânion superóxido e atividade da catalase. Já a terceira irradiação, seguiu os mesmos parâmetros descritos, porém a eutanásia ocorreu 4 horas após o final da irradiação e as amostras de pele foram usadas para analisar citocinas, e produção de hidroperóxido lipídico (LOOH).

As amostras foram divididas para os diferentes testes e armazenadas a -80°C para as análises. Apenas o teste de edema cutâneo foi realizado no mesmo dia em que a pele foi retirada. Para os testes de 12 horas os animais foram terminalmente anestesiados com 1,5% de isoflurano ou anestesiados seguido de decapitação para os testes de 2 e 4 horas após o término da radiação UVB (4,14 J/cm²). As peles foram lavadas com NaCl 145 mM e limpas com auxílio de algodão e água deionizada com o intuito de retirar a formulação que ficou depositada no dorso do animal (CASAGRANDE *et al.*, 2006a; IVAN *et al.*, 2014).

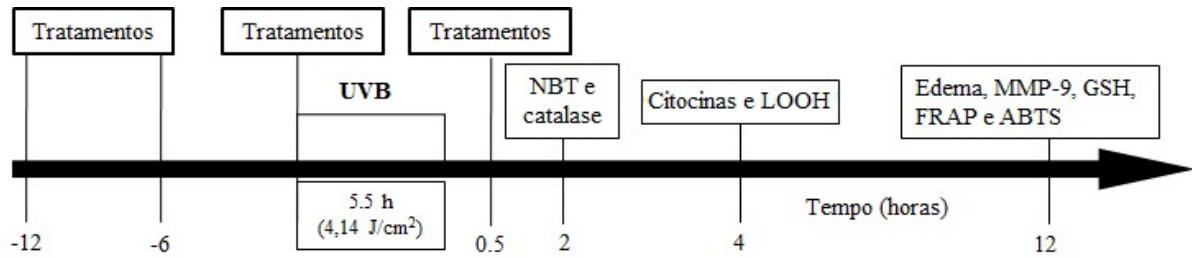


Figura 6. Organização dos tempos de tratamento com os protocolos experimentais para avaliação da eficácia de formulação tópica contendo quercetina microencapsulada. Os animais foram irradiados com radiação UVB durante 5 horas e 30 min (tempo necessário para atingir $4,14 \text{ J/cm}^2$). Doze horas, seis horas, imediatamente antes da radiação e meia hora após a finalização da radiação os animais foram tratados com as formulações tópicas para cada grupo (3, 4, 5 e 6). Os animais foram eutanasiados e amostras de pele foram coletadas 2 horas (produção do ânion superóxido [NBT] e atividade da catalase), 4 horas (dosagem de citocinas e hidropéroxido lipídico) e 12 horas (avaliação do teste de edema, atividade de metaloproteinase-9 [MMP-9], atividade de mieloperoxidase [MPO], níveis de glutathiona reduzida [GSH], avaliação do poder antioxidante redutor de ferro [FRAP] e transferência de elétrons ao radical [ABTS]), após o fim da radiação UVB.

3.2.5 Avaliação do edema de pele

A exposição em demasia da radiação UVB sobre a pele pode causar uma expressiva reação inflamatória levando entre outras consequências o edema (MARTINEZ *et al.*, 2015).

As amostras de pele do dorso de cada animal foram coletadas com auxílio de um molde com área fixa de 5 mm de diâmetro e posteriormente foram pesadas (BOLLER *et al.*, 2010; IVAN *et al.*, 2014; MARTINEZ *et al.*, 2015). O efeito dos tratamentos no edema cutâneo causado pela radiação UVB foi mensurado pelo aumento do peso de pele na região dorsal. A análise foi feita comparando-se o peso de pele entre os diferentes grupos. Os resultados foram expressos em mg de pele.

3.2.6 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase

Os grânulos azurófilos dos neutrófilos contêm a enzima mieloperoxidase (MPO), que, na presença de sais como o íon cloreto, converte o peróxido de hidrogênio a hipoclorito. Para o estudo da quantificação de MPO foi adicionado no

meio reacional o substrato o-dianisidina, a qual resultou em uma solução colorida que foi analisada pelo espectrofotômetro em 540 nm (BRADLEY *et al.*, 1982; CASAGRANDE *et al.*, 2006a; MARTINEZ *et al.*, 2015).

As amostras de pele dos animais (aproximadamente 30 mg) foram coletadas em microtubos contendo 400 µL de tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 6,0) com 0,5% de brometo de hexadecil trietil amônio (HTAB) e mantidas a - 80 °C até o uso. Para realização do ensaio, as amostras foram homogeneizadas com auxílio do homogeneizador Ultra Turrax® (T18 basic, IKA). O homogenato foi centrifugado a 16.100 g por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante foi retirado para o ensaio.

Em microplaca de 96 poços, foi adicionado alíquota do sobrenadante das amostras (30 µL). A reação colorimétrica iniciou-se pela adição de 200 µL de uma solução contendo 10% de tampão fosfato 0,05 M (pH 6.0), 0,0167 % de o-dianisidina e 0,05% de H₂O₂ em água deionizada. Após 20 minutos de reação a atividade da MPO das amostras foi determinada em 450 nm (Asys Expert Plus, Biochrom) e comparada com uma curva padrão de neutrófilos de concentração conhecida.

A curva padrão foi preparada na mesma placa com a adição de 100 µL de tampão fosfato 0,05 M e uma solução contendo 200.000 neutrófilos no primeiro poço (A1) com posterior diluição seriada até o décimo primeiro poço (A11). O décimo segundo poço (A12) foi utilizado como branco ao qual foi adicionado apenas 200 µL de água deionizada. Os resultados foram expressos como atividade da MPO (número de neutrófilos/mg de pele).

3.2.7 Determinação da atividade/secreção de proteinases por zimografia em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS)

Para determinação da atividade da MMP-9 foi utilizado o ensaio de zimografia em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (FONSECA *et al.*, 2010; FONSECA *et al.*, 2011). As metaloproteinases são enzimas importantes em degradar as matrizes extracelulares como o colágeno e podem desenvolver o fotoenvelhecimento cutâneo (BAE *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2015).

Foi feito um pool das amostras de pele de cada grupo e armazenadas em eppendorfs. As amostras foram homogeneizadas com auxílio do homogeneizador de tecidos Ultra Turrax® (T18 basic, IKA), na proporção 1:4 em tampão fosfato Tris/HCl

50mM (pH 7,4) com cloreto de cálcio (CaCl_2) e 1% de inibidores de proteinases (fenantrolina, fluoreto de fenilmetilsulfonila e N-etilmaleimida).

Os homogenatos foram centrifugados duas vezes a 12.000 g por 10 min a 4°C e os sobrenadantes foram submetidos ao ensaio de zimografia. Também foi realizada dosagem de proteínas das amostras pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). Alíquota de 50 μL do sobrenadante foi diluída em 10 μL de tampão Tris/HCl (pH 6,8) contendo 20% de glicerol, 4% de duodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,001% de azul de bromofenol. Em seguida estas amostras foram colocadas em banho-maria a 37 °C durante 8 minutos imediatamente antes de ser aplicada no gel de eletroforese.

A espessura do gel utilizado foi de 1 mm, composto por um gel de separação e um gel de concentração, preparado conforme tabela 1.

Tabela 1. Constituintes do gel de separação e do gel de concentração.

Substância	Quantidade (μL)	
	Gel de separação	Gel de concentração
Água miliQ	5870	4060
Tampão Tris/HCl 1 M (pH 8,8) com 0,4% SDS	3750	-
Tampão Tris/HCl 0,5 M (pH 6,8) com 0,4% SDS	-	1670
Acrilamida: bis-acrilamida (30:0,8)	5000	860
Gelatina 10%	375	-
Persulfato de amônio 10%	50	33
Temed 20%	10	6,6

Após a finalização da solução do gel de separação e de concentração, os mesmos foram aplicados no aparato específico do Sistema de eletroforese Mini Vertical (Bio-RAD®).

O interior da cuba de eletroforese foi preenchido com tampão Tris/glicina 190 mM (pH 8.3) contendo 0,1% de SDS. Antes da aplicação das amostras, o gel foi

submetido a uma pré-corrida de 10 mA por 15 minutos. Após, foram aplicados 25 µL de cada amostra. Durante a eletroforese a corrente aplicada foi de 10 mA para o gel de concentração e 13 mA para o gel de separação, sendo que a última corrente foi mantida constante por 15 minutos após a saída do corante do gel de separação.

Ao término da eletroforese o gel de poliacrilamida foi lavado por 1 hora com solução de Triton X-100 2% sob constante agitação, posteriormente o gel foi incubado por 16 horas a 37 °C em tampão Tris/HCl 50 mM (pH 7.4) contendo CaCl₂ 10 mM e 0,02% de azida sódica. Ao final da incubação o gel foi corado com uma solução contendo 0,25% de azul brilhante, 10% de ácido acético e 50% de metanol em água deionizada. Para visualização das bandas o gel foi descorado com ácido acético 20% (FONSECA *et al.*, 2011). A atividade proteolítica foi analisada por meio da comparação das diferenças de densidades de cor entre as bandas de cada grupo pelo programa ImageJ® (NIH, Bethesda, MD, USA).

3.2.8 Dosagem das citocinas pró-inflamatórias: TNF α , IL-1 β

Foram realizadas utilizando-se a técnica de enzima imunoenensaio (ELISA) com kits comerciais (eBioscience) baseando-se nas instruções do fabricante e conforme descrito na literatura científica (VERRI *et al.*, 2008). As amostras foram coletadas em microtubos contendo 500 µL de solução salina 0,9% estéril e foram trituradas com o homogeneizador de tecidos Ultra Turrax® (T18 basic, IKA). Em seguida, foram centrifugadas a 2000 g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi retirado para análise.

Para a realização do ensaio, microplacas com 96 poços foram incubadas por toda à noite a 4 °C com anticorpos de captura contra as proteínas de interesse. Após esse tempo de incubação, as placas foram lavadas com PBS com 0,05% de Tween 20 e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com uma solução a 1% de albumina bovina. Após esse bloqueio e lavagem das placas com tampão de lavagem, a curva padrão e as amostras foram adicionadas (50 µL) e incubadas a 4 °C por 16 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas com tampão de lavagem e os anticorpos policlonais biotinizados (anticorpo de detecção) foram adicionados (100 µL). Após incubação em temperatura ambiente por 1 hora, as placas foram lavadas com tampão de lavagem e 100 µL de enzima avidina-peroxidase foram adicionados.

As placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, lavadas, e adicionado 100 μ L do substrato contendo 0,04% de ortofenilenodiamina (OPD) e 0,04% de H₂O₂ em tampão fosfato, a placa foi mantida no escuro em temperatura ambiente por 15 minutos. A reação enzimática foi interrompida com uma solução de H₃PO₄ 1 M e as absorvâncias foram determinadas em 450 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific).

Curvas padrões de cada uma das citocinas foram utilizadas para quantificar as citocinas presentes nas amostras e os resultados foram expressos em picogramas (pg) de citocina/mg de pele.

3.2.9 Avaliação do poder antioxidante redutor do ferro (FRAP) na pele

O método de FRAP já foi utilizado para medir o poder redutor do ferro nos tecidos do coração, rim, fígado e cérebro de ratos (KATALINIC *et al.*, 2005). O ensaio foi adaptado e utilizado para avaliar o poder antioxidante de redução férrica da pele (MARTINEZ *et al.*, 2015).

As amostras de pele dos animais (aproximadamente 30 mg) foram coletadas em microtubos contendo 500 μ L de KCl 1,15%. Para a realização do ensaio, as amostras foram trituradas com auxílio do homogeneizador de tecidos Ultra Turrax® (T18 basic, IKA). Em seguida, foram centrifugadas a 1.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi retirado para a análise. Para a reação foram adicionados em microplaca contendo 96 poços, 30 μ L do sobrenadante e 150 μ L de reagente FRAP. O branco foi preparado com 30 μ L de KCl a 1,15% e 150 μ L do reagente de FRAP. O reagente de FRAP foi preparado adicionando 2,5 mL de uma solução 10 mM de 2,4,6 tripiridil-S-triazina (TPTZ) em HCl 40 mM com 2,5 mL de cloreto de ferro hexahidratado 20mM e 25 mL de tampão acetato 0,3 mM (pH 3.6), e esta solução foi incubada a 37°C por 30 min antes do uso. A microplaca foi lida em espectrofotômetro a 595 nm (EnSpire, Perkin Elmer). Foi realizada o preparo de uma curva padrão utilizando-se diferentes concentrações de trolox (antioxidante análogo solúvel da vitamina E) de 0,5 a 20 nmol. Os resultados foram expressos como nmol equivalente de Trolox/mg de pele (KATALINIC *et al.*, 2005).

3.2.10 Avaliação do poder antioxidante pelo ensaio de sequestro do radical 2,2',azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)

O ensaio baseia-se na capacidade do antioxidante em sequestrar o cátion ABTS⁺ causando uma redução da absorvância (ZUL *et al.*, 2015).

Para a reação de ABTS, as amostras foram homogeneizadas em 400 µL de KCl a 1,15% com auxílio do homogeneizador de tecidos Ultra Turrax® (T18 basic, IKA) e centrifugadas a 1.000 g por 10 min a 4°C, posteriormente o sobrenadante foi utilizado para análise.

A solução de ABTS foi preparada após reagir 7mM da solução de ABTS com 2,45mM de persulfato de potássio resultando no cátion ABTS⁺. A mistura foi armazenada em frasco âmbar e em geladeira por no mínimo 16 horas antes do uso. Após as 16 horas, a solução de ABTS foi misturada com tampão fosfato até atingir a absorvância de 0,8 em 730 nm. Foi adicionado, na microplaca, 7 µL do sobrenadante e 200 µL da solução de ABTS diluída. O branco era composto apenas do tampão. Após 6 minutos de reação, foi realizada a leitura em 730nm (EnSpire, Perkin Elmer). Uma curva padrão foi preparada com diferentes concentrações de trolox (0,01 a 20 nmol) e os resultados foram expressos em nmol equivalente de trolox/mg de pele. (KATALINIC *et al.*, 2005; MARTINEZ *et al.*, 2015).

3.2.11 Avaliação dos níveis do antioxidante endógeno (GSH)

A enzima glutatona é importante na homeostasia da pele por eliminar os radicais livres que foram produzidos durante a exposição à radiação UV. O ensaio baseia-se na reação da quebra da ligação do ácido 5',5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) pelo grupo sulfidril da glutatona, para tal, é detectado a quantidade do ácido 5-mercaptop-2-nitrobenzóico (SRINIVASAN *et al.*, 2008).

As amostras de pele dos animais foram coletadas em microtubos e posteriormente diluídas (1:4) em EDTA 0,02 M e trituradas em homogeneizador Ultra Turrax® (T18 basic, IKA). Ao homogenato foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 50%, com o intuito de precipitar as proteínas do meio reacional, na proporção de 1:0,2 de EDTA e TCA, respectivamente. A mistura foi centrifugada a 2.700 g por 10

minutos a 4°C. O sobrenadante foi recentrifugado a 2.700 g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante final foi retirado para análise.

Para o ensaio de quantificação dos níveis de GSH na pele foram adicionados 50 µL do último sobrenadante em microplaca com o meio reacional contendo 100 µL de tampão Tris 0,4 M (pH 8,9) e 5 µL de uma solução de 1,9mg/mL de ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) em metanol. Após 5 minutos de incubação, a leitura da microplaca foi realizada no espectrofotômetro (EnSpire, Perkin Elmer) em 405 nm. Foi preparada uma curva padrão com 5 a 150 µM de GSH. Os resultados foram expressos em µM de GSH/ mg de pele (SRINIVASAN *et al.*, 2007; MARTINEZ *et al.*, 2015).

3.2.12 Avaliação da atividade da catalase (CAT)

A catalase é uma heme enzima responsável por reduzir o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. O nível dessa enzima se reduz quando há um estresse oxidativo, indicando um possível desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a ação antioxidante endógena (PALLAVI *et al.*, 2015).

As amostras de pele dos animais (aproximadamente 100 mg) foram coletadas em microtubos e diluídas em 500 µL de EDTA 0,02 M. Em seguida, foram trituradas (Ultra Turrax® - T18 basic, IKA) e o homogenato foi centrifugado a 2.700 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recentrifugado a 2.700 g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante final foi retirado para análise.

A determinação da atividade da CAT na pele foi realizada em microplaca de 96 poços por meio da adição de 10 µL de amostra, 160 µL de tampão Tris-HCl 1M com EDTA 5 mM pH 8,0, 20 µL de água deionizada e 20 µL de H₂O₂ 200 mM. Ao teste foi incluído um branco para cada amostra preparado com 10 µL de amostra, 180 µL de tampão Tris-HCl 1M com EDTA 5 mM pH 8,0 e 20 µL de água deionizada. A velocidade com que o H₂O₂ é reduzido pela ação da CAT foi avaliada por meio da diminuição no valor da absorbância pela diferença entre a leitura inicial e a leitura 30 segundos após a adição do H₂O₂ 200 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (EnSpire, Perkin Elmer) em 240 nm com temperatura mantida em 25 °C. Os valores de catalase foram expressos como unidade de catalase/mg de pele/minuto.

3.2.13 Avaliação da produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

O ânion superóxido é um íon produzido endogenamente durante o processo de respiração celular aeróbia. No entanto, na exposição acentuada a radiação UVB pode apresentar aumento da sua quantidade e conseqüentemente ativa a enzima superóxido dismutase a qual converte o ânion em peróxido de hidrogênio favorecendo a geração de outro radical que é prejudicial para a manutenção da homeostasia da célula (CHA *et al.*, 2014; MARTINEZ *et al.*, 2015).

Foi realizada usando o ensaio de redução de *nitroblue tetrazolium* (NBT) (CAMPANINI *et al.*, 2013). As amostras de pele dos animais (aproximadamente 100mg) foram coletadas em microtubos, homogeneizadas em 500 μ L de EDTA 0,02 M com homogeneizador de tecidos (Ultra Turrax® - T18 basic, IKA), centrifugadas a 2000 g por 20 segundos e o sobrenadante foi retirado para a análise.

Para a reação 50 μ L do sobrenadante foi incubado em placas de 96 poços por 1 hora. Em seguida o sobrenadante foi cuidadosamente removido e às células fixadas foi adicionado 100 μ L de NBT (1 mg/mL). Após 15 minutos o sobrenadante foi cuidadosamente removido e ao precipitado foram adicionados 20 μ L de metanol 100% para fixar, 120 μ L de KOH 2 M e 140 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar as partículas de formazan (NBT reduzido) presentes dentro das células. A redução do NBT foi determinada espectrofotometricamente em 620 nm e os resultados foram apresentados como densidade óptica (OD)/10 mg de pele.

3.2.14 Avaliação da produção de hidroperóxido (LOOH)

A avaliação da produção de hidroperóxido foi realizada por quimiluminescência descrita por Martinez *et al.* (2015). As amostras de pele dos animais (aproximadamente 100 mg) foram coletadas em microtubos e homogeneizadas em 800 μ L de tampão fosfato (pH 7.4) com homogeneizador de tecidos (Ultra Turrax® - T18 basic, IKA). Em seguida, foram centrifugadas a 700 g por 2 minutos a 4 °C e 250 μ L do sobrenadante foram adicionados a 1730 μ L de meio de reação (KCl 120mM, tampão fosfato pH 7,4 30 mM) e 20 μ L de tert-butil hidroperóxido 3 mM. Este ensaio foi realizado em contador β marca Beckman® LS 6000 (Fullerton, CA, EUA) em uma faixa de contagem não coincidente com a

resposta entre 300 e 620 nm. Todo o experimento foi realizado ao abrigo da luz para evitar a fosforescência dos frascos, a 30 °C, durante 120 minutos. Os resultados foram medidos em contagem por minuto (cpm) por mg de pele.

3.3. Análise estatística dos resultados

Todos os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) com um fator seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey e apresentados pela média \pm erro padrão da média (EPM) de mensurações feitas com 5 animais em cada grupo por experimento. As análises foram realizadas usando-se o software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Os resultados foram considerados significativamente diferentes para $p < 0,05$. Os resultados da estabilidade foram apresentados em triplicata e foram representativos de dois experimentos separados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGO CIENTÍFICO

4.1 Effect of topical formulation containing quercetin-loaded microcapsules against UVB-induced skin damage in mice

Photochemical & Photobiological Sciences

David L. do Vale,^a Renata M. Martinez,^a Camila da Rocha,^a Natália Sfeir,^a Waldiceu A. Verri Jr.,^b Sandra R. Georgetti,^a Marcela M. Baracat,^a Rúbia Casagrande^{*a}

^aDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Avenida Robert Koch, 60, Hospital Universitário, 86039-440 Londrina, Paraná, Brazil

^b Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 80, PR445, Cx. Postal 10.011, 86057-970, Londrina, Brazil

* Corresponding author. Address: Avenida Robert Koch, 60, Vila Operária, CEP 86039-440 Londrina, Paraná, Brazil. Tel.: +55 43 33712475. E-mail address: rubiaca@yahoo.com.br (R. Casagrande).

ABSTRACT

The skin is the largest organ of the human body. It is the first barrier of the body with the external environment. Ultraviolet B (UVB) irradiation, derived from the sun, can increase free radicals, production acute inflammation, leading to cancer and premature photoaging. In order to maintain the body homeostasis, can be used topical administration of antioxidants such as quercetin (QC). However, the QC has a high lipid solubility making it difficult to penetrate through the skin. Thus, the aim of this study was to evaluate the physicochemical and functional antioxidant stability and to analyze the effects of topical formulation containing QC-loaded microcapsule against UVB irradiation-induced skin damage (irradiation dosage 4.14 J/cm²) in mice. The results of physical and chemical stability showed that the topical formulation is stable at different temperatures as assessed by functional stability testing by using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical for 6 months. The treatment with topical formulation containing QC-loaded microcapsule inhibited the UVB irradiation-induced skin edema, neutrophil recruitment, matrix metalloproteinase-9 activity and the production of IL-1 β and TNF- α cytokine compared with microcapsule without QC and the emulsion containing QC. The same comparison was performed to determine the effect of QC-loaded microcapsule against oxidative stress and it was shown that these microcapsules maintained similar levels to the baseline of ferric reducing antioxidant power (FRAP), ability to scavenge 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical, reduced glutathione levels, catalase activity, superoxide anion and lipid hydroperoxides production. These effects were not observed with the application of topical formulation containing QC and topical formulation containing microcapsule without QC. Accordingly, the results suggest that the microcapsules can have improved cutaneous absorption of QC, preventing skin inflammation and inhibiting oxidative stress induced by UVB irradiation.

Keywords: Quercetin; Microcapsule; Inflammation; Oxidative stress; Ultraviolet B.

1. Introduction

The skin plays multiple functions for the human body e.g. thermoregulation; protection against dehydration and release of substances as melanin (important against the deleterious effects of ultraviolet radiation) besides presenting endogenous antioxidants (glutathione peroxidase, catalase, etc).^{1,2} However, the capacity of these mechanisms is limited and can be damaged by excessive exposure to ultraviolet radiation (UVR) making the skin vulnerable to attack by reactive oxygen species (ROS).³ The UVB irradiation, of electromagnetic spectrum between 290-320 nm, is absorbed predominantly in the epidermis, affecting the keratinocytes and the molecules present in the skin such as lipids, proteins and nucleic acids can also absorb UVR being denominated chromophores.^{4,5} These chromophores react with the molecular oxygen resulting in excess of ROS. The generation of ROS can cause the development of acute effects in the activation of lipid peroxidation, production of superoxide anion, nuclear factor *kappa* B (NF- κ B) activation, release of inflammatory cytokines, increase of metalloproteinase enzymes and also chronic effects as photoaging and photocarcinogenesis.^{6,7,8,9}

A group of biologically active molecules with antioxidant properties has been studied aiming to reduce the skin effects of UVR. This group includes flavonoids such as naringenin,⁷ rutin,⁸ and the quercetin¹¹. Particularly, the quercetin (QC) has the catechol and hydroxyl groups that are antioxidant chemical structures which allow them to act in the elimination of free radicals.¹² Because of these characteristics, the QC can inhibit lipid peroxidation interfering in the stabilization of radicals formed.¹³ The QC can increase glutathione levels preventing the formation of new ROS,¹⁴ presents action chelating metal ions to form inert complexes that will not participate in the conversion of superoxide radicals and hydrogen peroxide into hydroxyl radicals.¹⁵ Therefore, topical application of QC has received considerable attention for its ability to protect against ROS – mediated damage in the skin.¹¹

QC is highly lipophilic and therefore, presents low penetration in the viable epidermis and is rather retained mostly in the stratum corneum.¹⁶ In order to overcome these limitations Drug Release System (DRS) has been developed, which results in optimization of the therapeutic response.^{17,18} An example of DRS is a multiparticulate system in which the drug is microencapsulated by a coating polymer, enabling a broad range of pharmaceutical forms.¹⁹ Previous studies evidenced a beneficial effect of this flavonoid in microencapsulated form for treating colitis in mice.²⁰ The microencapsulated systems provide a different way to carry and distribute the active substances, and may improve the penetration of the drug into the skin.²¹ Thus, this study aimed to prepare and to evaluate the physicochemical and functional stabilities of topical formulations containing QC

microencapsulated. Noteworthy, we also investigated the potential use of stable topical formulation containing QC microencapsulated to prevent and/or reduce UVB irradiation-induced skin inflammation and oxidative stress.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

Pectin USP (68% of esterification) from CPKelco (Limeira, SP, Brazil). Casein from Katuffman & Co (Germany). Citric acid and potassium phosphate, Merck (analytical grade, Darmstadt, Hessen, Germany). Tween 20®, Santa Cruz Biotechnology Inc (Dallas, Texas, USA). Tert-butyl hydroperoxide, Acrós Organics (Geel, Antwerp, Belgium). Brilliant blue R, reduced glutathione (GSH), hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), N-ethylmaleimide, o-dianisidine dihydrochloride, phenylmethanesulfonyl fluoride, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and nitroblue tetrazolium (NBT), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-(picrylhydrazyl) (DPPH), trolox, bisacrylamide were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Isoflurane from Abbott (Chicago, IL, USA). ELISA kits for determination of cytokine were obtained from eBioscience (San Diego, CA, USA). Quercetin (QC) from Acrós (Pittsburgh, PA, USA). Xylene cyanol and hydroxymethyl aminomethane (Tris) were obtained from Amresco (Solon, OH, USA). Acrylamide, sodium dodecyl sulfate (SDS), glycerol. The excipients used for the preparation of the formulations were obtained from Galena (Campinas, SP, Brazil). ELISA kits for determination of cytokine were obtained from eBioscience (San Diego, CA, USA). All other reagents used were of pharmaceutical grade.

2.2 Microcapsules

Were prepared followed the complex coacervation method as described elsewhere.¹⁹ The polymeric matrix was prepared by dispersing of the pectin and casein in distilled water, separately, under constant mechanical shaking and the pH was adjusted to 8.0. After the adjustment, QC was added at the proportion 1:3 (drug:polymer). Then, the pH was adjusted gradually to 3.5 with 1.0 M citric acid. The process was the same for the preparation of inert (without QC) microcapsules followed the procedures aforementioned. However, instead of adding the QC was added distilled water. The microcapsules were dried in a spray dryer (Lab Plant – Model SD05) with the following specifications: the temperature of the inlet air was kept constant at 180°C, the feed rate was 7.75 mL/min and the air flow was 1.1 m³/min.

2.3 Topical formulations

Were prepared using non-ionic cream base Polawax® (cetosteraryl alcohol + sorbitan monostearate polyoxyethylene 20 OE) 10% (w/w), along with the emolient capric acid triglyceride and caprylic (5%), the preservative Phenonip® (0.4%) and deionized water (q.s.p. 100 mL). After 24 hours of preparation, the formulations were separated and identified as control, quercetin, microcapsule without quercetin and microcapsule with quercetin. The QC was weighed corresponding 0.5% of formulation. The amount of microcapsules was adjusted to result in a concentration of 0.5% (w/w) of quercetin in the final formulation, further, they were dispersed in propylene glycol (6%) and incorporated in the emulsion.

2.4 Stability study of topical formulations

All incorporated formulations with or without QC were stored in semipermeable polypropylene vials and divided by temperature: 4°C, room temperature (25°C) and 40±2°C and 75%±5% relative humidity for 180 days. The QC and QC-loaded microcapsules were also stored in the same storage conditions for functional stability evaluation. At 0, 1, 30, 60, 90 and 180 days, samples were withdrawn and analyzed for physico-chemical and functional stability.

2.5 Evaluation of physico-chemical and functional stability

2.5.1 Organoleptic test. The organoleptic features of the samples were examined for color, homogeneity, appearance, phase separation and consistency.²²

2.5.2 Determination of pH. Two grams of each formulation was weighted and dissolved with 18 g of deionized water, dilution 1:10. After homogenization, the pH of the samples was determined using a digital potentiometer.^{23, 24}

2.5.3 Centrifugation assay. Sample of each formulation weighing 2 g were centrifuged at 1660xg for 30 minutes at room temperature. Further, the separation of the dispersed phase due to either creaming or coalescence was observed.²⁴

2.5.4 Determination of DPPH radical scavenging activity. The functional stability of the formulations, QC and QC-loaded microcapsules was analyzed by antioxidant activity. Each sample was diluted in ethanol to attain 1µg/mL. The following controls were included in the test: positive control in the absence of sample and positive control added with formulations

without QC. The colorimetric change was measured using Thermo Scientific Evolution®60 spectrophotometer at 517 nm and was calculated by the equation:

$$\% \text{ of activity} = (1 - \text{absorbance sample} / \text{absorbance control}) \times 100.^{25}$$

2.6 Evaluation *in vivo* of therapeutic effect of QC-loaded microcapsules in photooxidative damage induced by UVB radiation

Animals. The experiments were performed in sex matched hairless mice (HRS/J), weighing 20-30 g, obtained from the University Hospital of Londrina State University. Mice had free access to water and food at a temperature of 23 °C ± 2 and a 12 h light and 12 h dark cycles. The Animal Ethics Committee (Of. Circ. CEUA n° 55/2014, process CEUA n° 4923.2014.22) of the Londrina State University approved all procedures of this study. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Experimental protocol. Hairless mice were randomly designed to different groups with 5 mice each:

- non-irradiated control group;
- irradiated control group;
- irradiated group and treated with topic formulation without QC;
- irradiated group and treated with topic formulation containing QC;
- irradiated group and treated with topic formulation containing microcapsules without QC;
- irradiated group and treated with topic formulation containing QC-loaded microcapsules.

In the experiments presented in Figures 1-7 mice were treated topically, in dorsal part, with 0.5 g of formulation containing 0.5% of QC or QC-loaded microcapsules 12 h, 6 h, immediately before and 6 h after the beginning of UVB irradiation session.²⁷ The concentration of quercetin used in these assays was determined according on an anti-inflammatory and antioxidant activity study reported previously.¹¹

2.7 Irradiation

The UVB source used in the experiments to induce oxidative stress was a Philips TL/12 RS 40W (Medical-Holand) emitting a continuous spectrum between 270 and 400 nm

with a peak emission at 313 nm. The lamp was mounted 20 cm above the place where the mice were placed on, resulting in an irradiation of 0.384 mW/cm² as measured by a IL 1700 radiometer (Newburyport, MA, USA) equipped with sensor of UV (SED005) and UVB (SED240). The radiation dose for induction of inflammation and oxidative stress was 4.14 J/cm².^{7, 25} The mice were terminally anesthetized with 1.5% isoflurane 12 h (Figs. 3, 4, 5A, 5B and 5C), 2 h (Figs. 5D and 6B) or 4 h (Figs 6A and 7) after the UVB exposure, and the full dorsal skins were removed and stored at -80°C for further analysis. The sample collected for verification of cutaneous edema was weighed just when removed and was not frozen.^{7, 25}

2.8 Skin edema

The effect of topical formulations on UVB-induced skin edema of hairless mice was measured as an increase in the dorsal skin weight. After dorsal skin removal, a constant area (5 mm diameter) was delimited with the aid of a mold, followed by weighing of this constant area.^{24, 27} The analysis was obtained by comparing the weight of the skin between groups and the result was expressed in mg of skin.

2.9 Enzyme myeloperoxidase activity evaluation by recruitment of neutrophils

Leukocyte recruitment was indirectly assessed by the presence of myeloperoxidase enzyme (MPO). The quantifying MPO was performed as follows: the sample of skin was homogenized in 0.05 M phosphate buffer (pH 6.0) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) using Ultra Turrax® (T18 basic, IKA). The homogenates were centrifuged at 11000 rpm for 2 min at 4 °C. Withdrew 30 µL of the resulting supernatant and was dissolved with 200 µL of 0.05 M phosphate buffer (pH 6.0), containing 0.0167% o-dianisidine dihydrochloride and 0.05% hydrogen peroxide. The absorbance was determined after 20 min incubation at 450 nm (Enspire, Perkin Elmer®). The MPO activity of the sample was compared to a standard curve of neutrophils. The results are presented as MPO activity (number of neutrophils per milligram of skin).^{7, 11, 28}

2.10 Analyses of skin proteinase substrate-embedded enzymography

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) substrate-embedded enzymography was used to detect enzymes with gelatinase activity. Assays were carried out as previously described.^{24, 27} The dorsal skin of hairless mice (1:4, w/w dilution) was homogenized (Ultra Turrax® - T18 basic, IKA) in 0.05 M Tris-HCl buffer

(pH 7.4) containing 0.01 M CaCl₂ and 1% protease inhibitor cocktail. Whole homogenates were centrifuged twice at 12000xg for 10 min at 4°C. The Lowry method was used to measure protein levels in skin homogenates²⁹. Aliquots of 50 µL of samples were mixed with 10 µL of 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) containing 20% glycerol, 4% SDS and 0.005% xylene cyanol. For electrophoresis, 25 µL of the mixture was used were taken for electrophoresis in a gel containing 10% acrylamide and 0.025% gelatin. After electrophoresis, the gels were incubated for 1 h with 2.5% Triton X-100 under constant shaking, incubated overnight in 0.05 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.01 M CaCl₂ and 0.02% sodium azide at 37°C, and stained the following day with brilliant blue R. After destaining in 20% acetic acid, zone of enzyme activity were analyzed by comparing the groups in the ImageJ software package (NIH, Bethesda, MD, USA).

2.11 Quantification of endogenous antioxidant (GSH)

Followed the method described elsewhere.^{24, 27, 30} Briefly, skin sample was homogenized in 0.02 M EDTA using a Ultra Turrax® (T18 basic, IKA) at a ratio 1:4 w/w dilution. Whole homogenates were treated with 50% trichloroacetic acid and centrifuged twice at 2700xg for 10 min at 4°C. The reaction mixture contained 50 µL of sample, 100 µL of 0,4 M Tris and 5 µL DTNB (1.9 mg/mL in methanol). The absorbance was determined after 5 min incubation at 405 nm (Enspire, Perkin Elmer®). The standard curve was prepared with GSH 5-150 µM. The results are presented as µM of GSH per mg of skin.

2.12 Levels of the of endogenous antioxidant catalase (CAT)

Was evaluated by measuring the decay in the concentration of hydrogen peroxide (H₂O₂) and the generation of oxygen.³¹ Skin sample was homogeneized in 500 µL of 0.02 M EDTA using Ultra Turrax® - (T18 basic, IKA), and centrifuged twice at 2700xg for 10 min at 4°C. The reaction mixture contained 10 µL sample, 160 µL buffer Tris-HCl 1 M with EDTA 5mM pH 8.0, 20 µL of deionized water and 20 µL H₂O₂ 200 mM. Measurement of CAT activity was estimated through the difference between the initial reading and the reading performed 30 seconds after the addition of H₂O₂ at 240 nm in a microplate reader (EnSpire, Perkin Elmer) at 25°C. The CAT values were expressed as unit of CAT/mg of skin minute.

2.13 Antioxidant power by radical sequestration assay 2,2'azinobis (3-sulfonic ethylbenzothiazoline-6 acid) (ABTS)

This assay is based on the inhibition of the absorbance of the radical ABTS. Approximately 30 mg of hairless mice skin was homogenized in 500 μ L of KCl (1.15%) using a Tissue-Tearor (Biospec 985370), centrifuged at 1000xg for 10 min at 4°C and the supernatant was used measuring the antioxidant capacity of skin. The solution of ABTS was prepared with 7 mM of ABTS and 2.45 mM of potassium persulfate diluted with phosphate buffer pH 7.4 to an absorbance of 0,7 – 0,8 in 730 nm was prepared. The supernatant (7 μ L) was mixed on ABTS solution and after 6 min the absorbance was determined in 730 nm microplate reader (EnSpire, Perkin Elmer).³² Previously, a curve of trolox (0,01 a 20 nmol) was prepared and the results were expressed as equivalent nmol of Trolox/mg skin.

2.14 Power evaluation antioxidant iron reducer (FRAP) in skin

This assay was used to evaluate the antioxidant power of ferric reduction of skin.⁷ The sample of hairless mice skin was homogenized in 500 μ L KCl (1.15%) using a Tissue-Tearor (Biospec 985370), centrifuged at 1000xg for 10 min at 4°C and the supernatant was employed for measurement the antioxidant capacity of skin. The reaction consisted in adding the supernatant (30 μ L) to the FRAP reagent prepared with 0.3 mM acetate buffer pH 3.6, 10 mM TPTZ in 40 mM hydrochloride acid and 20 mM ferric chloride. The FRAP reagent was warmed up to 37°C for 30 min. The absorbance was determined at 595 nm (EnSpire, Perkin Elmer). Previously, a curve of trolox (0.5 – 20 nmol) was prepared and the results were expressed as equivalent nmol of Trolox/mg skin.³²

2.15 Evaluation of production hydroperoxides (LOOH)

Was performed by chemiluminescence as described previously.⁷ The samples of hairless mice skin were homogenized in 800 μ L of phosphate buffer (pH 7.4) using a Tissue-Tearor (Biospec 985370) centrifuged at 700xg at 4°C for 2 min and the supernatant (250 μ L) was diluted in 1730 μ L reaction medium (120 mM KCl, 30 mM phosphate buffer, pH 7.4) and mixed with 20 μ L de tert-butyl hydroperoxide 3mM. The reading was performed in a β -counter Beckman® LS 600 (Fullerton, CA, USA) in a non-coincident counting for 30 seconds with a response range between 300 and 620 nm. The vials were kept in the dark up to the moment of the assay, and determinations were obtained in dark in order to avoid vial phosphorescence activated by light. The experiment was performed at 30°C for 2 hours. The results were measured in counts per min (cpm) per mg of skin.

2.16 Evaluation of the production of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$)

The measurement of $O_2^{\cdot-}$ production in the skin was performed using the nitroblue tetrazolium assay (NBT).³³ The samples of hairless mice skin were homogenized in 500 μ L of 0,02 M EDTA using a Tissue-Tearor (Biospec 985370), centrifuged at 2000 g for 20 seconds at 4°C, the supernatant (50 μ L) was incubated in microplate for 1 h. The non-adherent/non-precipitated supernatant was carefully removed, 100 μ L of NBT (1 mg/mL) was added to each well and incubated over 15 min. NBT reaction medium was the carefully removed followed by fixation in methanol. Formazan particles were dissolved by adding 120 μ L of KOH 2 M and 140 μ L of dimethylsulfoxide. Reduction of NBT to formazan was measured at 600 nm using a microplate spectrophotometer reader (EnSpire, Perkin Elmer) and the results are presented as optical density (OD) per 10 mg of skin.

2.17 Dosage of pro-inflammatory cytokines: TNF α , IL-1 β

The samples of hairless mice skin were homogenized in 500 μ L of saline solution using Tissue-Tearor (Biospec 985370), centrifuged at 2000xg for 15 min at 4°C and stored at -80°C for further use. The supernatant was used to measure the cytokine levels by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to manufacture's instructions (eBioscience).²⁷ The absorbance was determined at 450 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific). The standard curves for each cytokine were used to quantify each cytokine present in the samples and the results were expressed as pictograms (pg) cytokine/mg skin.⁸

2.18 Statistical analysis

Results were analysed by GraphPad Prism® software package, version 4.00 and expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). *In vitro* data represent triplicate analysis per experiment and are representative of two separate experiments. *In vivo* results are presented of 5 mice per group per experiment and are representative of two separated experiments. The differences were evaluated by ANOVA followed by Tukey's test. Results were considered significantly different when $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Physico-chemical and functional stability of formulation containing QC and QC-loaded microcapsule

After six months in different conditions, all formulations maintained their color, homogeneity, appearance, consistency and there was no phase separation. The pH values of all formulations remained between 4.4 to 6.0, similar to the pH value of the skin.

The functional stability of the formulations was analyzed for antioxidant activity (AA) of QC and QC-loaded microcapsule in to sequestering the radical 2,2-diphenyl-1-1-picryldrazyl (DPPH).³⁴ The DPPH assays were performed with all formulations and the raw materials. Figure 1 and Figure 2 shows that the capacity to scavenge DPPH radical was maintained in all formulations at 4°C, RT and 40±2°C and 75%±5% RH.

Taking into account all stability results, all formulations have demonstrated physico-chemical and functional stability and were used for evaluation of *in vivo* efficacy of QC-loaded microcapsule against damage caused by UVB radiation on the skin.

3.2 *In vivo* assessment of QC-loaded microcapsule against UVB-induced inflammation and oxidative stress

3.2.1 Topical formulation containing QC-loaded microcapsule reduces UVB radiation-induced skin edema and MPO activity

The anti-inflammatory action of QC-loaded microcapsule was first assessed by the edema assay and MPO activity (neutrophil marker). UVB radiation induced significant increase of skin edema and MPO activity in untreated irradiated mice, irradiated mice treated with control formulations and irradiated mice treated with formulation containing QC. The UVB radiation-induced skin edema (Fig. 3A) and MPO (Fig. 3B) was only significantly inhibited by treatment with formulation containing QC-loaded microcapsule.

3.2.2 Topical formulation containing QC-loaded microcapsule prevent UVB radiation-induced skin MMP-9 activity

After exposure to UVB radiation occurs a significant increase in the secretion/activity of gelatinases in the skin of mice as described previously.^{24,27} In this study, MMP-9 activity in the skin was induced by UVB exposition and was inhibited by topical formulation containing

QC-loaded microcapsule (Fig. 4) and unaffected by others formulations similarly to edema test and MPO activity.

3.2.3 Topical formulation containing QC-loaded microcapsule prevents UVB radiation-induced decrease of skin antioxidants

Firstly, we analyzed FRAP and ABTS radical scavenging assays to evaluate the effect of QC-loaded microcapsule in antioxidant capacity of the skin. In both assays, topical formulation containing QC-loaded microcapsule inhibited antioxidant depletion keeping close to the baseline (Fig. 5A and 5B). Then, we evaluated the effects of QC-loaded microcapsule in the depletion of GSH levels and CAT activity. The results showed that the levels of GSH (Fig. 5C) and activity of catalase (Fig. 5D) remained close to baseline formulation with the QC-loaded microcapsule protecting the skin against UVB radiation. No effect was observed with others formulations.

3.2.4 Topical formulation containing QC-loaded microcapsule reduces UVB radiation-induced hydroperoxides (LOOH) and superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) production

To complete the study of antioxidant activity of QC-loaded microcapsule, we evaluated the production of LOOH and production of $O_2^{\cdot-}$. The $O_2^{\cdot-}$ reacts with H_2O_2 generating hydroxy radical that induce lipid peroxidation (LPO).³⁵ In these assays, topical formulation containing QC-loaded microcapsule inhibited LPO (Fig. 6A) and in others formulations such inhibition was not observed. Moreover, QC-loaded microcapsule inhibited the $O_2^{\cdot-}$ production (Fig. 6B) and no effect was observed with others formulation.

3.2.5 Topical formulation containing QC-loaded microcapsule inhibits UVB radiation-induced skin inflammation by reducing cytokine production

The inflammatory cytokine IL-1 β and TNF- α are produced after excessive exposure to UVB radiation.³⁶ We investigated how was the behavior of the production of cytokines in the treatment with different formulations. The results showed that topical formulation containing QC-loaded microcapsule inhibited the increases of inflammatory cytokines IL-1 β (Fig. 7A) and TNF- α (Fig. 7B) and no effect was observed with others formulation.

4. Discussion

QC is a flavonoid encountered in several foods³⁶ which has antiallergic, anticancer, antiviral, antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory action.^{11, 37, 38} Because of its low bioavailability *in vivo* and because of previous studies with QC-loaded microcapsules,²⁰ we also microencapsulated this flavonoid in a polymeric matrix of pectin and casein and the microcapsules were added to a topical formulation.

Then, we investigated the physical-chemical and functional stability of all formulations containing QC and QC-loaded microcapsule. Moreover, we investigated the QC and QC-loaded microcapsule raw materials. All formulations remained physically stable (no phase separation occurs after centrifuged test) and the pH value was maintained at three different temperatures suitable analyzed. An adequate formulation pH is important to avoid adverse effect due to incompatibility with the skin. None formulation showed change coloration, texture or appearance. The raw material, in free form, had more antioxidant activity (AA) than formulations containing QC and QC-loaded microcapsules. This reduced AA in the emulsions may be due to interaction of the active substance and the excipients. The results of QC in free form shows that AA of QC at $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ and $75\%\pm 5\%$ RH was reduced in time 180 days compared to time zero. However, the AA of formulation containing QC remained constant, i.e., there is a possible evidence that the formulation protects the flavonoid. Furthermore, these results showed compliance with the results reported in the stability study of a formulation containing QC by Casagrande *et al.*³⁹

UVB radiation is absorbed mainly in the epidermis, affecting the keratinocytes. The molecules that are present in the skin (lipid, protein and nucleic acid) can absorb ultraviolet radiation,⁴ and can react with molecular oxygen (O_2) causing excess ROS.⁴⁰ Considering that the QC acts to hold glutathione levels and chelates metal ions forming inert complexes preventing the oxidation process,¹⁵ this study investigated this antioxidant potential and observed that the formulation containing QC-loaded microcapsule was capable of inhibiting depletion of endogenous antioxidants such as GSH, maintaining the levels close to the non-irradiated control. Study conducted by Vicentini *et al.*⁴¹ showed that microemulsion containing QC was capable to maintained the levels of GSH in the model of inflammation UVB radiation-induced.

The flavonoid's ability to reduce the ions Fe^{+3} to Fe^{+2} and the ability to reduce the ABTS radical were measured in accordance with previous studies,^{7, 25, 33, 42} which show a correlation with oxidative stress. The QC has antioxidant activity *in vitro* evidenced by methods of FRAP and ABTS^{43, 44, 45} so, in this study we investigated the antioxidant activity of the formulations applied in mice. The results showed that the formulation containing QC-

loaded microcapsule was able to attenuate the antioxidant depletion, while maintaining a similar antioxidant activity to non-irradiated control group in the both assays. The results of ABTS assay showed a tendency similar to the results of GSH levels, exhibiting some correlation between assays.³²

The generation of ROS by UVB radiation can activate LPO and interact with mechanisms of action and direct interaction with DNA, RNA and other cell components.⁶ However, the skin presents own mechanisms to maintain homeostasis in order to combat various factors that induce biochemical changes. There are enzymatic systems, such as catalase (present in peroxisomes which decomposes H_2O_2 into H_2O and O_2), superoxide dismutase (converts superoxide to H_2O_2) specific in removing ROS.² There are reports that the activity of these enzymatic systems were reduced in mice exposed to UV radiation.^{46, 47} In this study, CAT activity remained close to baseline levels in the group treated with topical formulation containing QC-loaded microcapsule, but the CAT levels were low for the groups treated with microcapsule without QC and for the emulsion containing QC. Herein, the consumption of CAT evidenced by irradiated controls group and formulation containing only QC, can be indicative of increased production of superoxide anions, whereas this dismutation leads to the formation of H_2O_2 . It is known that UVB radiation causes the formation of superoxide anions^{7, 25} and in this study, the levels of these anion remained close to baseline levels in the group treated with the QC-loaded microcapsule, while the others groups was evident the increased production of the anion.

Another important factor caused by UVB radiation is the hydroperoxide production (LOOH),⁴⁸ which may result in increased production of inflammatory mediators in the skin such as phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 (COX-2).⁴⁹ There is evidence that QC inhibits the production of LOOH,^{50, 51, 52} although, in this study, we observed that QC-loaded microcapsule inhibited the formation of these hydroperoxides, while no effect was observed with the group treated with microcapsule without QC and group treat only QC.

After exposure to UV irradiation, keratinocytes express a variety of cytokines and chemokines and are therefore considered the major cells that initiate inflammatory responses⁵³ occurring with this increased vascular permeability, edema, recruitment inflammatory cells (neutrophils) and perceptible effects on the skin.⁵⁴ The pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1) stimulates metalloproteinase expression in keratinocytes as well as fibroblasts in the skin, especially to MMP-9 that degrades collagen causing the skin photoaging.^{55, 56} Previous studies showed that the QC inhibits the enzyme matrix metalloproteinase-2 and 9 (MMP-2 and MMP-9)⁵⁷, regulates pro-inflammatory cytokine TNF- α , through via AP-1 and Nf-kB⁵⁸ and inhibits the secretion of inflammatory cytokines such as

IL-1 β and IL-6.⁵⁹ According to Zhu *et al.*,⁶⁰ QC-loaded nanoparticles were able to block the action of UVB radiation on HaCaT cell line by inhibiting the COX-2 expression and activation of NF- κ B. We demonstrated that the treatment with topical formulation containing QC-loaded microcapsule inhibited the production of TNF- α and IL-1 and inhibited the production of MMP-9. These effects were not observed with topical formulation containing QC and microcapsules without QC.

We also investigated neutrophil recruitment and edema. The result showed that this formulation containing QC-loaded microcapsule was able to inhibit neutrophil recruitment [checked indirectly by the presence of the enzyme myeloperoxidase (MPO)] and edema, while no effect was observed with the treatment QC and microcapsules without QC.

A possible explanation for these results may be the preparation of microcapsules, in which QC was in contact with a reaction medium of pH 8.0 and previous studies have shown that this flavonoid, dispersed in an alkaline medium, modifies the characteristics of solubility in water.^{61,62} During the process of coacervation, the pH of reaction medium was decreased and QC returned to crystallized state. Consequently, inside the microcapsules, the QC is in microcrystal form. According to Baracat *et al.*,¹⁹ the microcapsules developed by complex coacervation had an average size of 3.138 and 4,929 μ m. In the study developed by Toll *et al.*,⁶³ proved that microspheres from 0.75 to 6 μ m are able to penetrate the hair follicle and have an extended action.

The study by Saar *et al.*⁶⁴ evaluated ibuprofen-d3 (lipophilic drug), solubilized in propylene glycol (PG) and the results showed that in less than 30 minutes, after application in mouse ear, occurred the formation of ibuprofen crystals (size of tens of microns), observed on the skin surface (stratum corneum). The logical explanation for the precipitation of ibuprofen is because occurred a more quickly penetration of PG (plus, perhaps, with some evaporation from the surface). This analysis can be done with the addition of QC and microcapsules in the formulation performed in the presence of PG. Possibly, the microcapsules were more time on the skin surface, jointly with the positive charge of the microcapsules interacting with the negative charge of the stratum corneum. The QC, possibly, also recrystallized on the skin surface, but in larger sizes, saturating medium and did not occurs an efficient penetration at it occurred with the QC-loaded microcapsules.

As described above, the QC-loaded microcapsules has reduced size, a fact that increases the area of active with the skin. Corroborating the study by Vidlářová, Romero *et al.*,⁶⁵ wherein the drug-loaded nanoparticles increase the interface area with the skin. Furthermore, occurs a recoating more efficiently of the skin. The formulation containing QC-loaded microcapsules may do an occlusion effect, or prevents the evaporating water from the

skin, increasing the hydration level. Several studies show that the permeation of substances through this organ is directly proportional to the level of skin hydration.^{66, 67, 68}

In summary, the results showed that the QC-loaded microcapsules have a better action than the formulations containing QC or microcapsules without QC. Probably, the microcapsules improved the penetration of QC in the skin. This improvement was able to protect the skin against the deleterious effects caused by UVB radiation. More studies are needed to elucidate the mechanism of action of the formulation containing microcapsules applied on skin.

Acknowledgements

The authors would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária and Parana State Government. We thank the technical assistance of Denise Duarte from Post-graduation Laboratory of UEL. Authors declare no conflict of interest.

References

- 1 G. E. Costin and V. J. Hearing, *FASEB J.*, 2007, **21**, 976-994.
- 2 M. Podda, M. G. Traber, C. Weber, L. J. Yan and L. Packer, *Free Radic. Biol. Med.*, 1998, **24**, 55-65.
- 3 N. Vitale, A. Kisslinger, S. Paladino, C. Procaccini, G. Matarese, G. M. Pierantoni, F. P. Mancini and D. Tramontano, *PLoS One*, 2013, **8**, 1-13.
- 4 A. Tewari; M. M. L. Grage, G. I. Harrison, R. Sarkany and A. R. Young, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2013, **1**, 95-103.
- 5 P. K. Shetty, V. Venuvanka, H. V. Jagani, G. H. Chethan, V. S. Ligade, P. B. Musamde, U. Y. Nayak, M. S. Reddy, G. Kalthur, N. Udupa, C. M. Rao and S. Mutalik, *Int. J. Nanomedicine*, 2015, **10**, 6477 – 6491.
- 6 T. L. Fernandez, D. R. Van Lonkhuyzen, R. A. Dawson, M. G. Kimlin and Z. Upton, *Photochem. and Photobiol.*, 2014, **90**, 1332-1339.
- 7 R. M. Martinez, F. A. Pinho-Ribeiro, V. S. Steffen, C. V. Caviglione, J. A. Vignolis, D. S. Barbosa, M. M. Baracat, S. R. Georgetti, W. A. Verri and R. Casagrande, *J. Nat. Prod.*, 2015, **78**, 1647-1655.
- 8 W. A. Verri, F. T. M. C. Vicentini, M. M. Baracat, S. R. Georgetti, R. D. R. Cardoso, T. M. Cunha, S. H. Ferreira, F. Q. Cunha, M. J. V. Fonseca and R. Casagrande, *Studies in natural products chemistry*, 2012, **36**, 297-330.
- 9 G. M. Halliday, *Mutat. Res.*, 2005, **571**, 107-120.
- 10 C. A. Oliveira, M. F. Dario, F. D. Sarruf, I. F. Mariz, M. V. Velasco, C. Rosado and A. R. Baby, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, **140**, 531-537.
- 11 R. Casagrande, S. R. Georgetti, W. A. Verri, D. J. Dorta, A. C. Santos and M. J. V. Fonseca, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2006, **84**, 21-27.
- 12 C. G. Heijnen, G. R. M. M. Haenen, R. M. Oostveen, E. M. Stalpers and A. Bast, *Free Radic. Res.*, 2012, **36**, 575-581.
- 13 P. S. Prince and B. Sathya, *Eur. J. Pharmacol.*, 2010, **635**, 142-148.

- 14 M. A. Ansari, H. M. Abdul, G. Joshi, W. O. Opii and D. A. Butterfield, *J. Nutri. Biochem.*, 2009, **20**, 269-275.
- 15 N. Cotelle, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2001, **1**, 569-590.
- 16 C. F. Hung, C. L. Fang, S. A. Al-Suwayeh, S. Y. Yang and J. Y. Fang, *J. Dermatol. Sci.*, 2012, **68**, 135-148.
- 17 P. D. Marcato, *Rev. Eletrônica de Farmácia*, 2009, **VI**, 01-37.
- 18 C. Schmaltz, J. V. Santos and S. S. Guterres, *Infarma*, 2005, **16**, 13-14.
- 19 M. M. Baracat, A. M. Nakagawa, R. Casagrande, S. R. Georgetti, W. A. Verri and O. De Freitas, *AAPS PharmSciTech*, 2012, **13**, 364-372.
- 20 C. F. S. Guazelli, V. Fattori, B. B. Colombo, S. R. Georgetti, F. T. M. C. Vicentini, R. Casagrande, M. M. Baracat and W. A. Verri, *J. Nat. Prod.*, 2013, **76**, 200-208.
- 21 A. R. Pohlmann, F. N. Fonseca, K. Paese, C. B. Detoni, K. Coradini, R. C. Beck and S. S. Guterres, *Expert. Opin. Drug Deliv.*, 2013, **10**, 623-638.
- 22 M. A. Shatalebi and Y. Rafiei, *Res. Pharm. Sci.*, 2014, **9**, 123-133.
- 23 C. Anchisi, A. M. Maccioni, C. Sinico and D. Valenti, *Farmaco*, 2001, **56**, 427-431.
- 24 S. R. Georgetti, R. Casagrande, F. T. Moura-de-carvalho Vicentini, W. A. Verri and M. J. V. Fonseca, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2006, **64**, 99-106.
- 25 A. L. M. Ivan, M. Z. Campanini, R. M. Martinez, V. S. Ferreira, V. S. Steffen, F. T. M. C. Vicentini, F. M. P. Vilela, F. S. Martins, A. C. Zarpelon, T. M. Cunha, M. J. V Fonseca, M. M. Baracat, S. R. Georgetti, W. A. Verri and R. Casagrande, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2014, **138C**, 124-133.
- 26 Y. Shindo, E. Witt and L. Packer, *J. Invest. Dermatol.*, 1993, **100**, 260-265.
- 27 R. M. Martinez, F. A. Pinho-Ribeiro, V. S. Steffen, T. C. Silva, C. V. Caviglione, C. Bottura, M. J. Fonseca, F. T. Vicentini, J. A. Vignoli, M. M. Baracat, S. R. Georgetti, W. A. Jr. Verri and R. Casagrande, *PLoS One*, **2016**, 11, 1-21.
- 28 P. P. Bradley, D. A. Priebat, R. D. Christensen and G. Rothstein, *J. Invest. Dermatol.*, 1982, **78**, 206-209.
- 29 O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265-275.

- 30 P. Srinivasan, K. E. Sabitha and C. S. Shyamaladevi, *Life Sci.*, 2007, **80**, 1080-1086.
- 31 K. S. Pallavi, V. Venkatesh, V. J. Hitesh, H. C. Gejjalagere, S. L. Virendra, B. M. Prashant, Y. N. Usha, S. R. Meka, K. Guruprasad, U. Nayanabhirama, M. R. Chamallamudi and M.Srinivas, *Int. J. Nanomedicine*, 2015, **10**, 6477-6491.
- 32 V. Katalinic, D. Modun, I. Music and M. Boban, *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 2005, **140**, 47-52.
- 33 M. Z. Campanini, F. A. Pinho-Ribeiro, A. L. Ivan, V. S. Ferreira, F. M. Vilela, F. T. Vicentini, R. M. Martinez, A. C. Zarpelon, M. J. Fonseca, T. J. Faria, M. M. Baracat, W. A. Verri, S. R. Georgetti and R. Casagrande, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2013, **127**, 153-160.
- 34 W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier and C. Berset, *LWT-Food Sci. Technol.*, 1995, **28**, 25-30.
- 35 R. M. Martinez, F. A. Pinho-Ribeiro, V. S. Steffen, C. V. Caviglione, J. A. Vignoli, M. M. Baracat, S. R. Georgetti, W. A. Jr. Verri and R. Casagrande, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2015, **148**, 145-153.
- 36 J. V. Formica and W. Regelson, *Food Chem. Toxicol.*, 1995, **33**, 1601-1080.
- 37 E. J. Choi, K. M. Chee and B. H. Lee, *Eur. J. Pharmacol.*, 2003, **482**, 281-285.
- 38 A. Saija, D. Tomaino, M. Trombetta, A. Giacchi, A. De Pasquale and F. Bonina, *Int. J. Pharm.*, 1998, **175**, 85-89.
- 39 R. Casagrande, S. R. Georgetti, W. A. Verri, M. F. Borin, R. F. V. Lopez and M. J. Fonseca, *Int. J. Pharm.*, 2007, **328**, 183-191.
- 40 Y. Xu and G. J Fisher, *J. Dermatological Sci.*, 2005, **2 Suppl.**
- 41 F. T. M. C. Vicentini, T. R. M. Simi, J. O. Del Ciampo, N. O. Wolga, D. L. Pitol, M. M. Iyomasa, M. V. L. B. Bentley and M. J. V Fonseca, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2008, **69**, 948-957.
- 42 R. Rea, N. Pellegrinia, A. Proteggentea, A. Pannalaa, M. Yanga and C. Rice-Evansa, *Free Radic. Biol.Med.*, 1999, **26**, 1231-1237.
- 43 Z. Sroka, B. Żbikowska and J. Hładyszowski, *J. Mol. Model.*, 2015, **21**, 1-11.
- 44 X. Liu, J. Piao and Y. Tian, *Wei Sheng Yan Jiu*, 2009, **38**, 280-283.

- 45 B. M. Moukette, A. C. Pieme, P. C. N. Biapa, J. R. Njimou, M. Stoller, M. Bravi and J. Y. Ngogang, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2015, **2015**, 1-14.
- 46 Y. Shindo, E. Witt and L. Packer, *J. Invest. Dermatol*, 1993, **100**, 260–265.
- 47 P. Evelson P, C. Ordonez, M. F. S. Llesuy and A. Boveris. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, 1997, **38**, 215-219.
- 48 B. Gonzales-Flecha, S. Llesuy and A. Boveris, *Free Radic. Biol. Med.*, 1991, **2**, 93–100.
- 49 A. Mahns, R. Wolber, F. Stäb, L-O. Klotz and H. Sies. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2004, **3**, 257-262.
- 50 G. Hädrich, G. R. Vaz, M. Maidana, J. M Kratz, G. Loch-Neckel, D. C. Favarin, A. P. Rogerio, F. M. Jr. da Silva, A. L. Muccillo-Baischm and C. L. Dora, *Pharm. Res.*, 2015, **33**, 1-11.
- 51 A. O. Ademosun, G. Oboh, F. Bello and P. O. Ayeni *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.*, 2015, **4**, 6-14.
- 52 B. M. Fahlman and E. S. Krol, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 5301-5305.
- 53 J. N. Barker, R. S. Mitra, C. E. Griffiths, V. M. Dixit and B. J. Nickoloff, *Lancet*, 1991, **337**, 211-214.
- 54 W. Jantschko, P. G. Furtmüller, M. Zederbauer, K. Neugschwandtner, I. Lehner, C. Jakopitsch, J. Arnhold and C. Obinger, *Biochem. Pharmacol.*, 2005, **69**, 1149-1157.
- 55 H. C. Chang, H. L. Yang, J. H. Pan, M. Korivi, J. Y. Pan, M. C Hsieh, P. M. Chao, P. J. Huang, C. T. Tsai and Y. C. Hseu, *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2015, **2016**, 1-15.
- 56 N. Ozeki, M. Mogi, N. Hase, T. Hiyama, H. Yamaguchi, R. Kawai, A. Kondo and K. Nakata, *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, **17**, 1-14.
- 57 W. W. Lai, S. C. Hsu, F. S. Chueh, Y. Y. Chen, J. S. Yang, J. P. Lin, J. C. Lien, C. H. Tsai and J. G. Chung, *Anticancer Res.*, 2013, **5**, 1941-1950.
- 58 M. K. Hwang, N. R. Song, N. J. Kang, K. W. Lee and H. J. Lee, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2009, **41**, 1592-1600.
- 59 M. J. Seo, Y. J. Lee, J. H. Hwang, K. J. Kim and B. Y. Lee, *J. Nutr. Biochem.*, 2015, **26**, 1308-1316.

- 60 X. Zhu, X. Zeng, X. Zhang, W. Cao, Y. Wang, H. Cheng, T. Wang, H. I. Tsai, R. Zhang, D. Chang, S. He, L. Mei and X. Shi, *Nanomedicine*, 2016, **12**, 623-632.
- 61 G. Günther, E. Berríos, N. Pizarro, K. Valdés, G. Montero, F. Arriagada, J. Morales, *PLoS One*, 2015, **10**, 1-17.
- 62 P. N. Kendre, V. V. Pande, K. M. Chavan, *Pharmacophore*, 2014, **5**, 358-370.
- 63 R. Toll, U. Jacobi, H. Richter, J. Lademann, H. Schaefer and U. Blume-Peytavi, *J. Invest. Dermatol.*, 2004, **123**, 168–176.
- 64 B. G. Saar, L. R. Contreras-Rojas, X. S. Xie and R. H. Guy, *Mol. Pharm.*, 2011, **8**, 969–975.
- 65 L. Vidlářová, G. B. Romero *et al.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2016, accepted (ID: EJPB-D-16-00184).
- 66 D. E. Wurtser and S.F. Kramer, *J. Pharm Sci.*, 1961, **50**, 288-293;
- 67 R. J. Feldman and H.I. Maibach, *Arch. Dermatol.*, 1965, **91**, 661-666.
- 68 J. R. Bond and B. W. Barry, *J. Invest. Dermatol.*, 1988, **90**, 486–489.

Figures

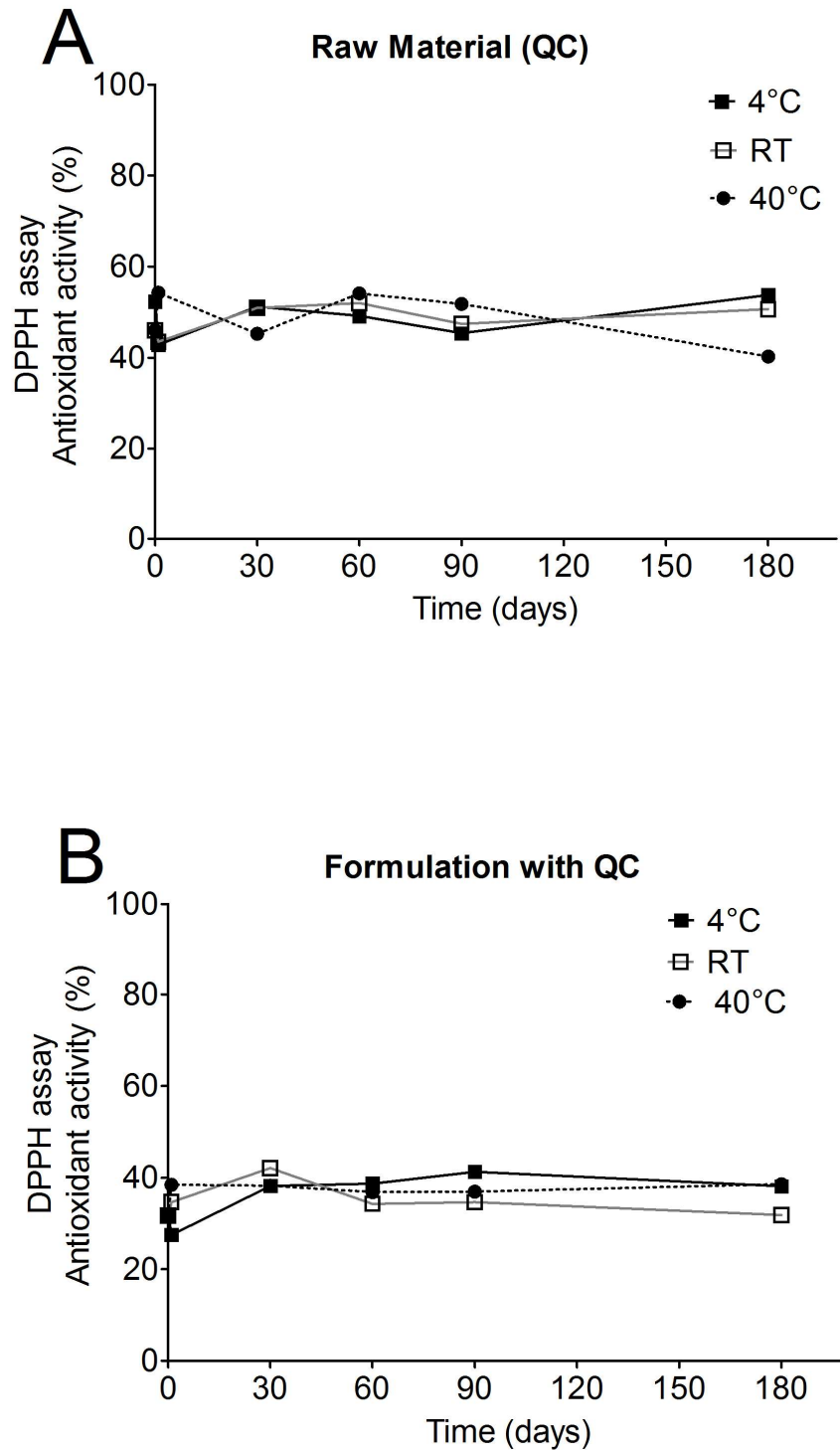


Fig. 1. Stability of DPPH radical scavenging ability of raw material quercetin (A) and topical formulation containing quercetin (B) stored at 4°C, RT and 40°C/75% RH for 6 months. Results are represented by mean \pm SEM.

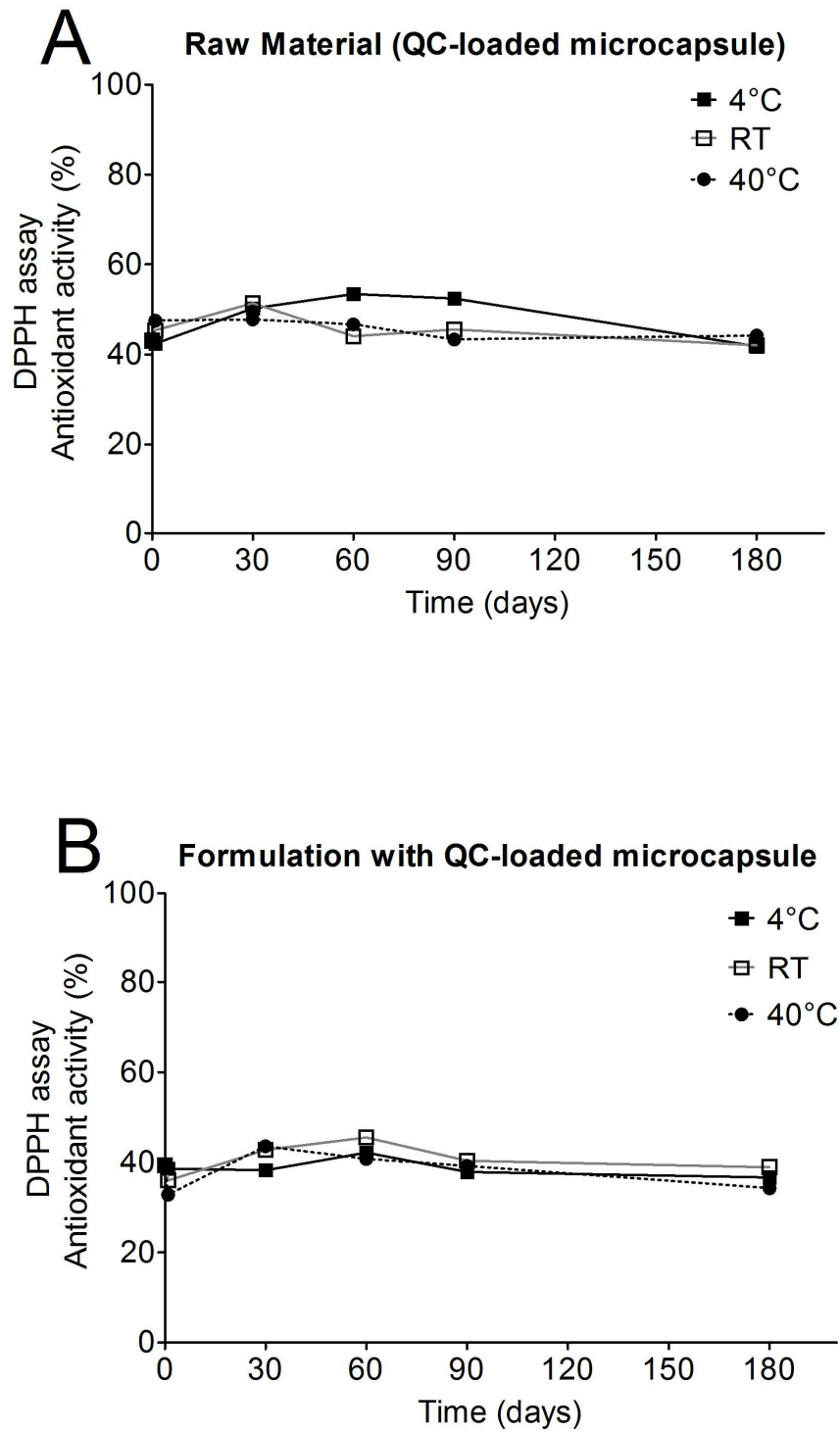


Fig. 2. Stability of DPPH radical scavenging ability of raw material quercetin-loaded microcapsule (A) and topical formulation containing quercetin-loaded microcapsule (B) stored at 4°C, RT and 40°C/75% RH for 6 months. Results are represented by mean \pm SEM.

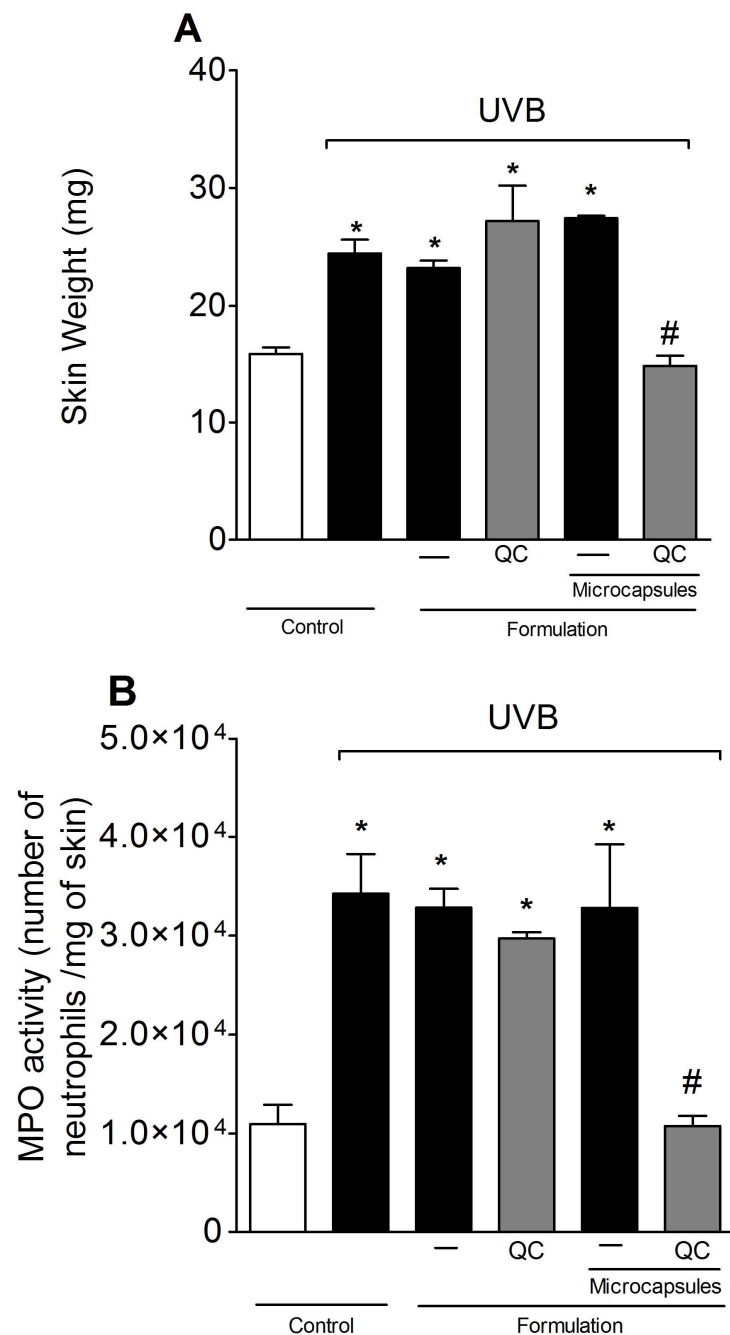


Fig. 3. Topical formulation containing QC-loaded microcapsule reduces UVB radiation-induced skin edema and MPO activity. The skin edema (A) and MPO activity (B) were determined in samples collected 12 h after the end of radiation. Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ compared to the non-irradiated control and # $p < 0.05$ compared to the irradiated control group, formulation containing QC-unloaded microcapsule control group and formulation containing quercetin.

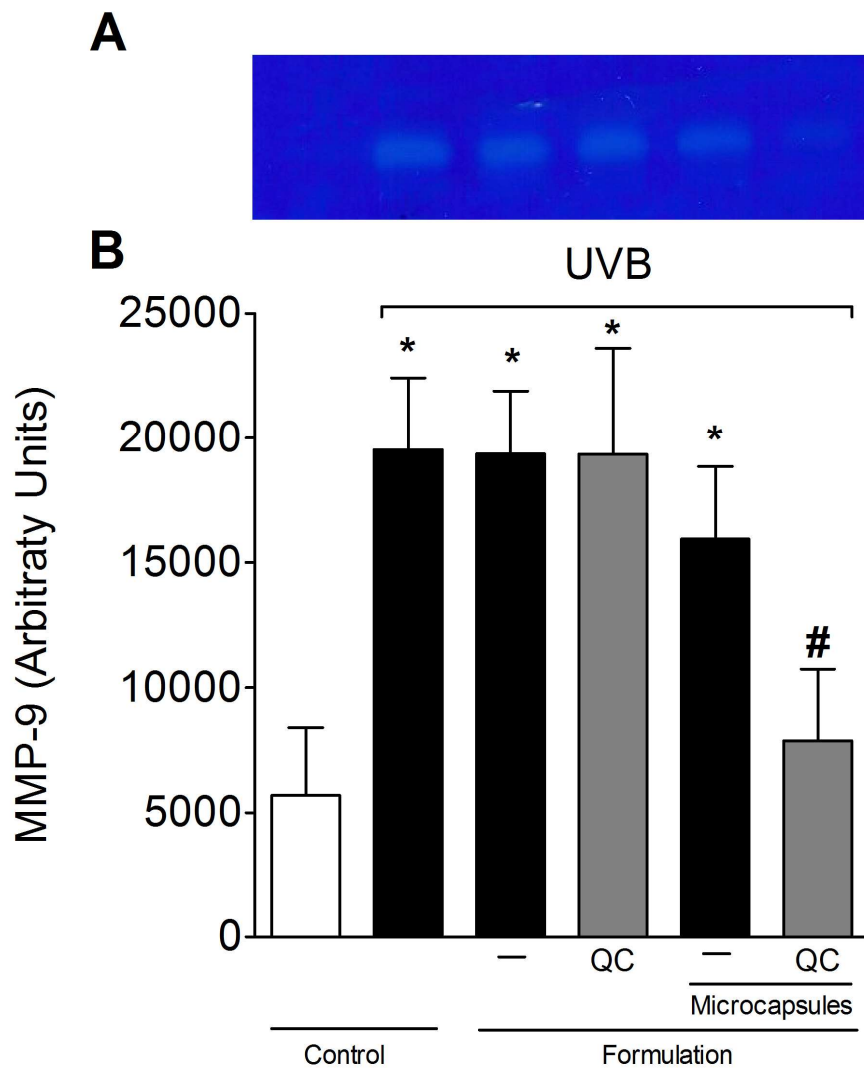


Fig. 4. Topical formulation containing QC-loaded microcapsule reduces UVB radiation-induced increase of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity. The MMP-9 activity was determined in samples collected 12 h after the end of radiation. (A) Image of gelatin zymography. (B) Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ compared to the non-irradiated control and # $p < 0.05$ compared to the irradiated control group, formulation containing QC-unloaded microcapsule control group and formulation containing QC.

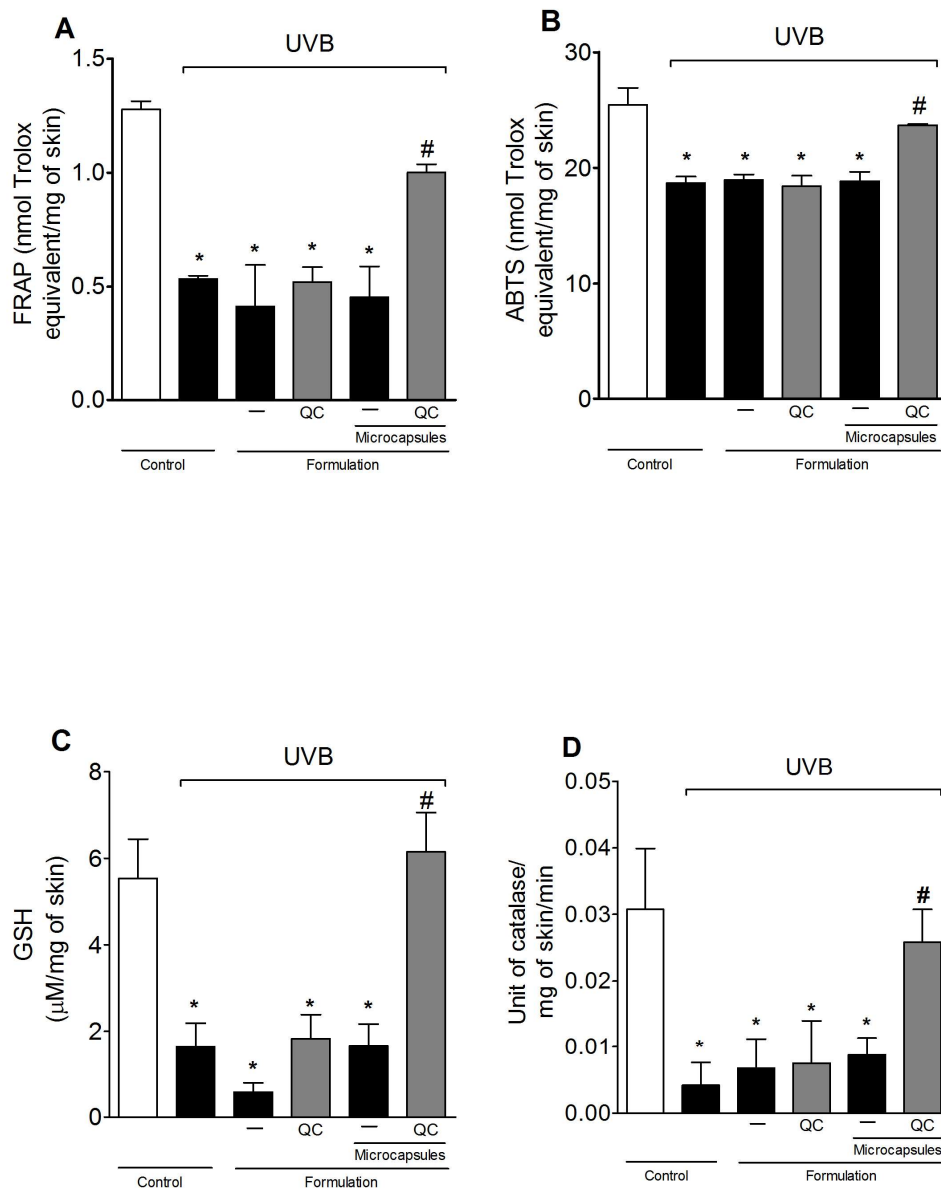


Fig. 5. Topical formulation containing QC-loaded microcapsule on antioxidant capacity of skin after UVB radiation. The antioxidant capacity was determined by FRAP (A), ABTS (B), GSH (C) assays in samples collected 12 h after the end of radiation. The CAT assays (D) was determined in samples collected 2 h after the end of radiation. Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ compared to the non-irradiated control and # $p < 0.05$ compared to the irradiated control group, formulation containing QC-unloaded microcapsule control group and formulation containing QC.

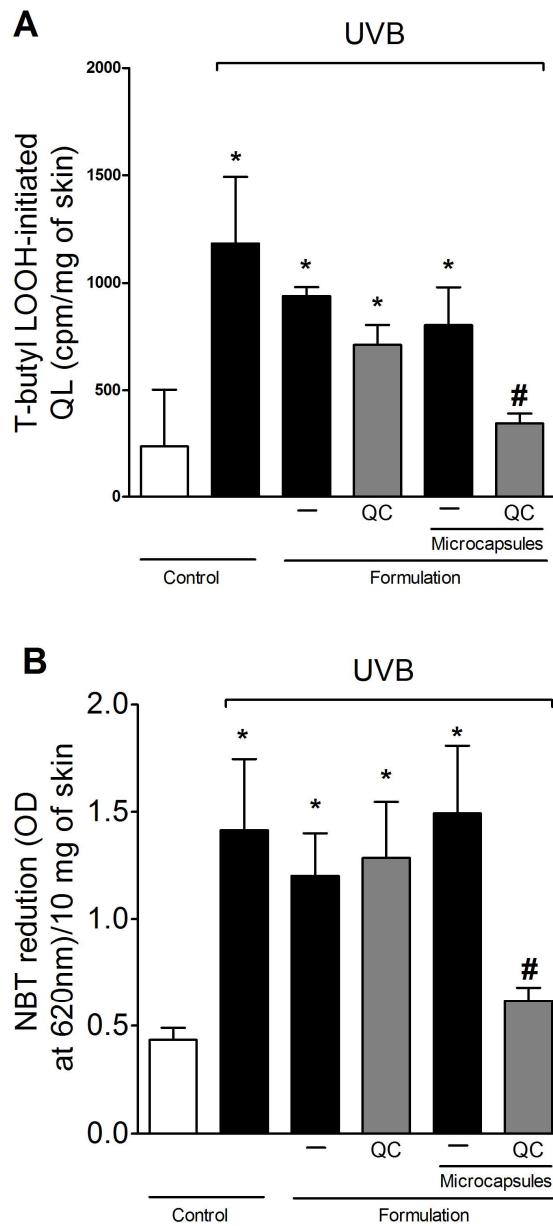


Fig. 6. Topical formulation containing QC-loaded microcapsule inhibited UVB-radiation-induced lipid peroxidation (LOOH) and superoxide anion production. The t-butyl LOOH-initiated chemiluminescence (QL) (A) and nitroblue tetrazolium (NBT) reduction (B) were determined in samples collected 4 h and 2 h after the end of radiation, respectively. Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ compared to the non-irradiated control and # $p < 0.05$ compared to the irradiated control group, formulation containing QC-unloaded microcapsule control group and formulation containing QC.

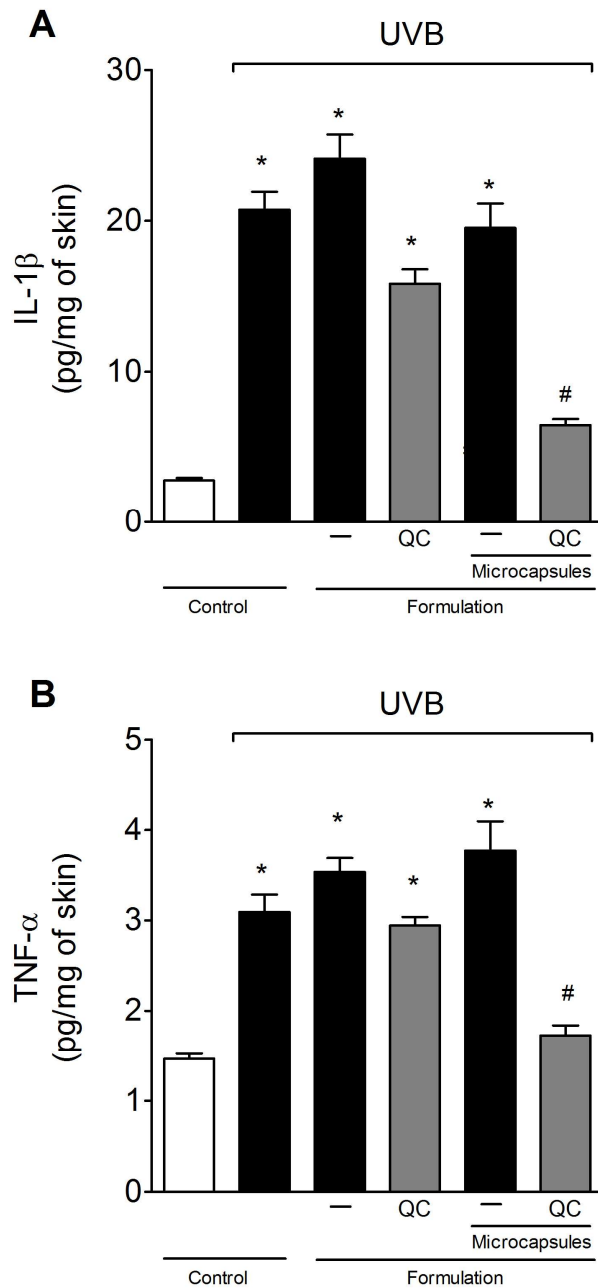


Fig. 7. Topical formulation containing QC-loaded microcapsule inhibited UVB-radiation-induced cytokine production. The levels of inflammatory cytokines IL-1 β (A) and TNF- α (B) were determined by skin samples collected 4 h after the end of exposure to radiation. Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$ compared to the non-irradiated control and # $p < 0.05$ compared to the irradiated control group, formulation containing QC-unloaded microcapsule control group and formulation containing QC.

5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A exposição à radiação ultravioleta induz profundas mudanças biológicas na pele, pois afeta os antioxidantes endógenos que protegem as células contra os efeitos deletérios causados pelas espécies reativas de oxigênio. Assim, antioxidantes de fontes naturais, como os flavonoides, fornecem novas possibilidades para o tratamento e para a prevenção de doenças da pele mediadas por estresse oxidativo. Estudos anteriores, elencados neste trabalho, evidenciaram efeitos benéficos do uso de quercetina na diminuição dos danos oxidativos causados pela radiação ultravioleta na pele e da administração oral na forma microencapsulada para tratamento em colite. No entanto, devido às suas características físico-químicas, sua penetração cutânea é baixa. A estratégia utilizada foi microencapsular a quercetina utilizando um polímero de pectina e caseína e analisar se as microcápsulas foram capazes de melhorar ou prevenir os danos inflamatórios e oxidantes causados pela radiação UVB nos camundongos.

O método utilizado para preparar as microcápsulas foi o de coacervação complexa e depois foram incorporadas em uma formulação para aplicação tópica. Os resultados dos ensaios *in vitro* demonstraram que todas as formulações foram estáveis capazes de manter o pH em valores aceitáveis para aplicação na pele e também foram capazes de doar átomos de hidrogênio ao radical DPPH em diferentes temperaturas de armazenamento por 180 dias.

Já os resultados *in vivo* mostraram que a formulação tópica de quercetina microencapsulada protegeu a pele contra a inflamação e contra os danos oxidativos induzidos pela radiação UVB comparado com a formulação contendo quercetina e formulação com microcápsula inerte. Este trabalho mostrou que a microencapsulação pode ter melhorado a penetração da quercetina na pele evidenciado por manter os níveis de GSH, atividade de catalase, produção de ânions superóxidos, além de melhorar a capacidade antioxidante da pele mantendo o poder redutor do ferro e a capacidade em reduzir o radical ABTS. Somam-se a isso, as microcápsulas de quercetina veiculadas em formulação tópica também foram capazes de inibir o edema cutâneo, recrutamento de neutrófilos, atividade da MMP-9, produção de hidroperóxidos lipídicos e citocinas inflamatórias (IL-1 β e TNF- α).

Dessa forma, os resultados sugerem que a quercetina microencapsulada pode ser uma nova estratégia para controlar e/ou prevenir os danos causados pela radiação UVB na pele, com melhor penetração cutânea que a quercetina livre, utilizando um processo de baixo custo, obtido de polímeros naturais e sem usar quaisquer substâncias prejudiciais à saúde e ao meio ambiente.

6. REFERÊNCIAS

AHN, B. N.; KIM, J. A.; KONG, C. S.; SEO, Y.; KIM, S. K. Photoprotective effect of libanoridin isolated from *Corydalis heterocarpa* on UVB stressed human keratinocyte cells. **Experimental Dermatology**, v. 22, n. 2, p. 155-157, February 2013.

ALKILANI, A. Z.; MCCRUDDEN, M. T.; DONNELLY, R. F. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the stratum corneum. **Pharmaceutics**, v. 7, n. 4, p. 438–470, December 2015.

ALLEN, L. V. JR.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 9. ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

ANCHISI, C.; MACCIONI, A. M.; SINICO, C.; VALENTI, D. Stability studies of new cosmetic formulations with vegetable extracts as functional agents. **Farmaco**, v. 56, n. 5-7, p. 427-431, May-Jul 2001.

ANSARI, M. A.; HAFIZ, M. A.; JOSHI, G.; OPII, W. O.; BUTTERFIELD, D. A. Protective Effect of Quercetin in Primary Neurons Against A β (1-42): Relevance to Alzheimer's Disease. **J Nutri Biochem**, v. 20, n. 4, p. 269-275, April 2009.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. JR. **Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems**. 9. ed. ed. [S.l.]: Wolters Kluwer - Lippincott Williams & Wilkins, 2009. ISBN 978-0-7817-7934-0.

ARAUJO, T. S.; & SOUZA, S. O. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. **Scientia Plena**, v. 4, n. 11, p. 1-7, 2008.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. ed. Porto Alegre: Artemed, 2005. 298-315 p.

AUST, S. D.; MOREHOUSE, L. A.; THOMAS, C. E. Role of metals in oxygen radical reactions. **Journal of free radicals in biology & medicine**, v. 1, n. 1, p. 3-25, 1985.

AZULAY, R. D., AZULAY, D. R., AZULAY-ABULAFIA, L. **Dermatologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guabanabara Koogan, 2013. 2-9 p. ISBN 978-85-277-2320-6.

AZZINI, R. G. **Desenvolvimento e avaliação in vitro e in vivo de emulsões contendo óleo de canola e ácidos carboxílicos. Dissertação (Mestrado). 169p.** São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1999.

BACHELOR, M. A.; COOPER, S. J.; SIKORSKI, E. T.; BOWDEN, G. T. Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase Decreases UVB-Induced Activator Protein-1 and Cyclooxygenase-2 in a SKH-1 Hairless Mouse Model. **Molecular Cancer Research**, p. 90-99, February 2005.

BAE, M. J.; KARADENIZ, F.; AHN, B. N.; KONG, C. S. Evaluation of Effective MMP Inhibitors from Eight Different Brown Algae in Human Fibrosarcoma HT1080 Cells. **Preventive nutrition and food science**, v. 20, n. 3, p. 153-161, September 2015.

BARACAT, M. M.; NAKAGAWA, A. M.; FREITAS, L. A. P.; FREITAS, O. Microcapsule Processing in a Spouted Bed. **Can J Chem Eng.**, v. 82, p. 134-41, 2004.

BARACAT, M. M.; NAKAGAWA, A. M.; CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A. JR.; DE FREITAS, O. Preparation and characterization of microcapsules based on biodegradable polymers: pectin/casein complex for controlled drug release systems. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 2, p. 364-372, June 2012.

BARKER, J. N, MITRA, R. S., GRIFFITHS, C. E., DIXIT, V. M., NICKOLOFF, B. J. Keratinocytes as initiators of inflammation. **Lancet**, v. 337, p. 211-214, January 1991.

BENDER, K.; GOTTLICHER, M.; WHITESIDE, S.; RAHMSDORF H. J.;HERRLICH, P. Sequential DNA damage independent and -dependent activation of NFk-B by UV. **EMBO J**, v. 17, p. 5170-5181, 1998.

BEYER, T. A.; AUF DEM KELLER, U.; BRAUN, S.; SCHÄEFER, M.; WERNER, S. Roles and mechanisms of action of the Nrf2 transcription factor in skin morphogenesis, wound repair and skin cancer. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n. 7, p. 1250-1254, July 2007.

BOERSMA, M. G.; WOUDE, H. VAN DER; BOGAARDS, J.; BOEREN, S.; VERBOORT, J.; CNUBBEN, N. H. P.; IERSEL, M. L. P. S. VAN; BLADEREN, P. J.

VAN; RIETJENS, I. M. C. M.. Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. **Chemical Research in Toxicology**, v. 15, n. 5, p. 662-670, May 2002.

BOLLER, S.; SOLDI, C.; MARQUES, M. C.; SANTOS, E. P.; CABRINI, D. A.; PIZZOLATTI, M. G.; ZAMPRONIO, A. R.; OTUKI, M. F. Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 2, p. 263-266, July 2010.

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

BRANDAO, E. M.; ANDRADE, C. T. Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação. **Polímeros**, v. 9, n. 3, p. 38-44, 1999. ISSN 1678-5169.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Resolução nº1, de 29 de julho de 2005. Brasília: Diário Oficial, 2005.

BRASIL. **INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva)**, 2015. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_ao_melanoma>. Acesso em: 08 dezembro 2015.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. Tradução de Augusto Langeloh et al. 12. ed. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda., 2012. 1803-1806 p. ISBN 978-85-8055-116-7.

CAMPANINI, M. Z.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; IVAN, A. L.; FERREIRA, V. S.; VILELA, F. M.; VICENTINI, F. T.; MARTINEZ, R. M.; ZARPELON, A. C.; FONSECA, M. J.; FARIA, T. J.; BARACAT, M. M.; VERRI, W. A. JR.; GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R. Efficacy of topical formulations containing Pimenta

pseudocaryophyllus extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 127, p. 153-160, 2013.

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

CARMIGNAN, F.; BIDONE, J.; LEMOS-SENNA, E. Emprego dos polihidroxicanoatos em sistemas de liberação controlada de fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 131-143, 2008. ISSN 0326-2383.

CASAGRANDE, R. GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A. Jr.; 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. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 328, n. 2, p. 183-190, January 2007.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A. JR.; DORTA, D. J.; 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. 85, p. 21-27, 2006a.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A. JR.; JABOR, J. R.; SANTOS, A. C.; FONSECA, M. J. Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 1, p. E10, 2006b.

CHA, J. W.; PIAO, M. J.; KIM, K. C.; YAO, C. W.; ZHENG, J.; KIM, S. M.; HYUN, C. L.; AHN, Y. S.; HYUN, J. W. The Polyphenol Chlorogenic Acid Attenuates UVB-mediated Oxidative Stress in Human HaCaT Keratinocytes. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 22, n. 2, p. 136-142, February 2014.

CHIARELLI-NETO, O. ; FERREIRA, A. S.; MARTINS, W. K.; PAVANI, C.; SEVERINO, D.; FAIÃO-FLORES, F.; MARIA-ENGLER, S. S.; ALIPRANDINI, E.; MARTINEZ, G.R.; MASCIO, P. D.; MEDEIROS, M. H. G.; BAPTISTA, M. S. Melanin Photosensitization and the Effect of Visible Light on Epithelial Cells. **PLOS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1-9, November 2014.

CHIRUMBOLO, S. The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function. **Inflamm. Allergy Drug Targets**, v. 9, n. 4, p. 263-285, 2010.

CICHOREK, M.; WACHULSKA, M.; STASIEWICZ, A.; TYMINSKA, A. Skin melanocytes: biology and development. **Postep. Derm. Alergol.**, p. 30-41, 2013.

CLARK, R. A. Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 2, p. 362-370, February 2010.

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

COSTIN, G. E.; HEARING, V. J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. **The FASEB Journal**, New York, v. 21, p. 976-994, April 2007.

COTELLE, N. Role of flavonoids in oxidative stress. **Curr Top Med Chem.**, v. 1, n. 6, p. 569-590, December 2001.

D'ANDREA, G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? **Fitoterapia**, v. 106, p. 256-271, October 2015.

DIFFEY, B. L. What is light? **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 18, n. 2, p. 68-74, April 2002.

DONBROW, M. **Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy**. Inc. Boca Raton: CRC Press, 1991. 360 p. ISBN 9780849369865.

FAN, C.; DONG, Y.; XIE, Y.; SU, Y.; ZHANG, X.; LEAVESLEY, D.; UPTON, Z. Shikonin reduces TGF- β 1-induced collagen production and contraction in hypertrophic scar-derived human skin fibroblasts. **International Journal of Molecular Medicine.**, v. 4, p. 36, October 2015.

FAURSCHOU, M.; & BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and infection/ Institut Pasteur**, v. 5, n. 14, p. 1317-1327, November 2003.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO M., PARKIN, D.M.; FORMAN D.; BRAY, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11., 2013. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 08 dezembro 2015.

FERNANDEZ, T. L.; VAN LONKHUYZEN, D. R.; DAWSON , R. A.; KIMLIN, M. G.; UPTON, Z. In Vitro Investigations on the Effect of Dermal Fibroblasts on Keratinocyte Responses to Ultraviolet B Radiation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 90, p. 1332-1339, 2014.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de. **Revista da Associação Médica Brasileira**, p. 61-68, 1997. ISSN 1806-9282.

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. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 20, p. 1419-1428, November 1997.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Research Focus - Reviews**, v. 3, n. 12, p. 417-425, December 2000.

FONSECA, Y. M.; CATINI, C. D.; VICENTINI, F. T.; NOMIZO, A.; GERLACH, R. F. FONSECA, M. J. Protective effect of Calendula officinalis extract against UVB-induced oxidative stress in skin: evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. **J Ethnopharmacol**, v. 127, n. 3, p. 596-601, 2010.

FONSECA, Y. M.; CATINI, C. D.; VICENTINI, F. T.; CARDOSO, J. C.; CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE JUNIOR, R. L.; VIEIRA FONSECA, M. J. Efficacy of marigold extract-loaded formulations against UV-induced oxidative stress. **J Pharm Sci**, v. 100, n. 6, p. 2182-2193, 2011.

FORMICA, J. V.; & REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 12, p. 1601-1080, December 1995.

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

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. Tradução de Thaís Porto. et al Amadeu. 3º. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 333-343 p. ISBN 978-85-352-2347-7.

GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; VICENTINI, F. T. M. C.; VERRI, W. A., JR.; FONSECA, M. J. Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different in vitro methods and investigation of this activity after its incorporation in topical formulations. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 64, n. 1, p. 99-106, 2006.

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. **Clinics in Dermatology**, v. 26, n. 6, p. 614-626, 2008.

GOWELL, A.; HABEL, J.; WEISS, C.; PARKANZKY, P. Determination of seven sunscreen agents and two ultraviolet stabilizers in skin care products using ultra-performance liquid chromatography. **J Cosmet Sci.**, v. 66, n. 4, p. 261-270, Jul-Aug 2015.

GRAEFE, E. U.; WITTIG, J.; MUELLER, S.; RIETHLING, A. K.; UEHLEKE, B.; DREWELOW, B.; PFORTE, H.; JACOBASCH, G.; DERENDORF, H.; VEIT, M. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. **J Clin Pharmacol.**, v. 41, n. 5, p. 492-499, May 2001.

GUAZELLI, C. F. S.; FATTORI, V.; COLOMBO, B. B.; GEORGETTI, S. R.; VICENTINI, F. T. M. C.; CASAGRANDE, R.; BARACAT, M. M.; VERRI, W. A. JR. Quercetin-loaded microcapsules ameliorate experimental colitis in mice by anti-inflammatory and antioxidant mechanisms. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 2, p. 200-208, 2013.

GÜNTHER, G.; BERRÍOS, E.; PIZARRO, N.; VALDÉS, K.; MONTERO, G.; ARRIAGADA, F.; MORALES, J. Flavonoids in Microheterogeneous Media, Relationship between Their Relative Location and Their Reactivity towards Singlet Oxygen. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. 1-17, Jun 2015.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **Br J Pharmacol.**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HARWOOD, M.; DANIELEWSKA-NIKIEL, B.; BORZELLECA, J. F.; FLAMM, G. W.; WILLIAMS, G. M.; LINES, T. C.. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2179-2205, May 2007.

HEIJNEN, C. G.; HAENEN, G. R. M. M.; OOSTVEEN, R. M.; STALPERS, E. M.; BAST, A. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. **Free Radical Research.**, v. 36, n. 5, p. 575-581, May 2002.

HEURUNG, A. R.; RAJU, S. I.; WARSHAW, E. M. Adverse reactions to sunscreen agents: epidemiology, responsible irritants and allergens, clinical characteristics, and management. **Dermatitis**, v. 25, n. 6, p. 289-326, Nov-Dec 2014.

HIRAMOTO, K.; KOBAYASHI, H.; YAMATE, Y.; ISHII, M.; SATO, E. F. Intercellular pathway through hyaluronic acid in UVB-induced inflammation. **Experimental Dermatology**, v. 21, n. 12, p. 911–914, December 2012.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, Abril 2008.

HUNDRE, S.Y.; KARTHIK, P.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Effect of whey protein isolate and β -cyclodextrin wall systems on stability of microencapsulated vanillin by spray-freeze drying method. **Food Chem.**, v. 1, p. 16-24, May 2015.

HUNG, C. F.; FANG, C. L.; AL-SUWAYEH, S. A.; YANG, S. Y.; FANG, J. Y. Evaluation of drug and sunscreen permeation via skin irradiated with UVA and UVB: comparisons of normal skin and chronologically aged skin. **J Dermatol Sci**, v. 68, p. 135-148, 2012.

HUR, W.; & GRAY, N. S. Small molecule modulators of antioxidant response pathway. **Curr Opin Chem Biol**, v. 15, p. 162-173, January 2011.

HWANG, M. K.; SONG, N. R.; KANG, N. J.; LEE, K. W.; LEE, H. J. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is required for tumor necrosis factor-alpha-induced upregulation of matrix metalloproteinase-9: its direct inhibition by quercetin. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 41, n. 7, p. 1592-1600, July 2009.

IRURETAGOYENA, M.; HIRIGOYEN, D.; NAVES, R.; BURGOS, P. I. Immune Response Modulation by Vitamin D: Role in Systemic Lupus Erythematosus. **Frontiers in Immunology.**, v. 6, p. 1-7, October 2015.

IVAN, A. L. M.; CAMPANINI, M. Z.; MARTINEZ, R. M.; FERREIRA, V. S.; STEFFEN, V. S.; VICENTINI, F. T. M. C.; VILELA, F. M. P.; MARTINS, F. S.; ZARPELON, A. C.; CUNHA, T. M.; FONSECA, M. J. V; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A. JR; CASAGRANDE, R. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. v. 138C, p. 124-133, 2014.

JANTSCHKO, W.; FURTMÜLLER, P. G.; ZEDERBAUER, M.; NEUGSCHWANDTNER, K.; LEHNER, I.; JAKOPITSCH, C.; ARNHOLD J.; OBINGER, C. Exploitation of the unusual thermodynamic properties of human myeloperoxidase in inhibitor design. **Biochem Pharmacol**, v. 69, p. 1149-1157, 2005.

JEON, S.; YOO, C. Y.; PARK, S. N. Improved stability and skin permeability of sodium hyaluronate-chitosan multilayered liposomes by Layer-by-Layer electrostatic deposition for quercetin delivery. **Colloids Surf B Biointerfaces.**, v. 129, p. 7-14, May 2015.

Jl, H.; LI, X. K. Oxidative Stress in Atopic Dermatitis. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 1-8, Feb 2016. ISSN 10.1155/2016/2721469.

JOHNSON, K. E., WULFF, B. C., OBERYSZYN, T. M., WILGUS, T. A. Ultraviolet light exposure stimulates HMGB1 release by keratinocytes. **Arch Dermatol Res**, v. 305, n. 9, p. 805-815, November 2013.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

KASTURAGI, Y.; SUGIURA, Y. C.; LEE, K.; OTSUGI, K.; KURIHARA, K.. Selective inhibition of bitter taste of various drugs by lipoprotein. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 5, p. 658-662, 1995.

KATALINIC, V., MODUN, D., MUSIC, I., BOBAN, M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2V-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. **Comp Biochem Physiol C**, v. 140, n. 1, p. 47-52, January 2005.

KATIYAR, S. K.; CHALLA, A.; MCCORMICK, T. S.; COOPER, K. D.; MUKHTAR, H. Prevention of UVB-induced immunosuppression in mice by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate may be associated with alterations in IL-10 and IL-12 production. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 11, p. 2117-2124, November 1999.

KENDRE, P. N.; PANDE, V. V.; CHAVAN, K. M. Novel formulation strategy to enhance solubility of quercetina. **Pharmacophore**, v. 5, n. 3, p. 358-370, 2014.

KIERSZEMBAUM, A. L. **Histologia e biologia celular**: uma introdução à patologia. Tradução de Nádia Vieira Rangel e Rodrigo Alves Azevedo. 1º. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 322-324 p. ISBN 85-352-1394-5.

KWON, H.; AHN, E.; KIM, S. Y.; KANG, Y.; KIM, M. O.; JIN, B. S.; PARK, S. Inhibition of UV-induced Matrix Metabolism by a Myristoyl Tetrapeptide. **Cell Biology International**, p. 1-12, October 2015.

LEE, J.; JUNG, E.; YU, H.; KIM, Y.; HA, J.; KIM, Y. S.; PARK, D. Mechanisms of carvacrol-induced expression of type I collagen gene. **Journal of Dermatological Science**, v. 52, n. 2, p. 160-169, December 2008.

LEE, G. H.; LEE, S. J.; JEONG, S. W.; KIM, H. C.; PARK, G. Y.; LEE, S. G.; CHOI, J. H. Antioxidative and antiinflammatory activities of quercetin-loaded silica nanoparticles. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 22, n. 143, p. 511-517, Mar 2016.

LIM, H. W.; HÖNIGSMANN, H.; HAWK, J. L. M. **Photodermatology**. 1ª. ed. New York: CRC Press, 2007. 15-27 p. ISBN 978-0849374968.

LIM, H.; KIM, H. P. Inhibition of mammalian collagenase, matrix metalloproteinase-1, by naturally-occurring flavonoids. **Planta Med.**, v. 73, n. 12, p. 1267-1274, October 2007.

LIMA, A. I. G.; MOTA, J.; MONTEIRO, S. A. V. S.; FERREIRA, R. M. S. B. Legum seeds and colorectal cancer revisited: protease inhibitors reduce MMP-9 activity and colon cancer cell migration. **Food Chemistry**, v. 197, p. 30-38, October 2015.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143-154, abr/jun 2005.

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

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, July 2002.

MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Curr Opens Lipidol**, v. 16, p. 77-84, Feb. 2005.

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

MARAMALDI, G.; TOGNI, S.; PAGIN, I.; GIACOMELLI, L.; CATTANEO, R.; EGGENHÖFFNER, R.; BURASTERO, S.E. Soothing and anti-itch effect of quercetin phytosome in human subjects: a single-blind study. **Clin Cosmet Investig Dermatol**, v. 26, p. 55-62, Feb 2016.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. VI, n. 2, p. 01-37, 2009.

MARRETO, R. N.; RAMOS, M. F.; SILVA, E. J.; DE FREITAS, O.; DE FREITAS, L. A. Impact of cross-linking and drying method on drug delivery performance of casein-pectin microparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 14, n. 3, p. 1227-1235, September 2013.

MARTINEZ, R. M.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; STEFFEN, V. S.; CAVIGLIONE, C. V.; VIGNOLIS, J. A.; BARBOSA, D. S.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; VERRI JR., W. A.; CASAGRANDE, R. Naringenin Inhibits UVB Irradiation-Induced Inflammation and Oxidative Stress in the Skin of Hairless Mice. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 7, p. 1647-1655, July 2015.

MARTINEZ, R.M.; PINHO-RIBEIRO, F.A.; STEFFEN, V.S.; SILVA, T.C.; CAVIGLIONE, C.V.; BOTTURA, C.; FONSECA, M.J.; VICENTINI, F.T.; VIGNOLI, J.A.; BARACAT, M.M.; GEORGETTI, S.R.; VERRI, W.A. JR.; CASAGRANDE R. Topical Formulation Containing Naringenin: Efficacy against Ultraviolet B Irradiation-Induced Skin Inflammation and Oxidative Stress in Mice. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. 1-21, Jan 2016.

MARTINS, M. R. F. M; & VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, jan/marc 2002.

MCADAM, E.; BREM, R.; KARRAN, P. Oxidative stress-induced protein damage inhibits DNA repair and determines mutation risk and therapeutic efficacy. **Mol Cancer Res.**, Apr 2016.

MCARDLE, F.; RHODES, L. E.; PARSLEW, R.; JACK, C. I. A.; FRIEDMANN, P. S.; JACKSON, M. J. UVR-induced oxidative stress in human skin in vivo: Effects of vitamin C supplementation. **Free Radical Biological Medicine**, v. 33, n. 10, p. 1355-1362, 2002.

MEDICINE, U.S NATIONAL LIBRARY OF.
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280343#section=Top>. **PubChem Open Chemistry Database**. Acesso em: 07 Janeiro 2016.

MELLO FILHO, A. C.; HOFFMANN, M. E.; MENEHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **The Biochemical journal**, v. 218, n. 1, p. 273-275, February 1984.

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

MENON, G. K.; CLEARY, G. W.; LANE, M. E. The structure and function of the stratum corneum. **International Journal of pharmaceutics.**, v. 435, n. 1, p. 155-64, October 2015.

NAM, N. H. Naturally occurring NF-kappaB inhibitors. **Mini Rev Med Chem**, v. 6, n. 8, p. 945-951, August 2006.

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, November 2003.

OTTO, A.; DU PLESSIS, J.; WIECHERS, J. W. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 31, n. 1, p. 1-19, February 2009.

PALECO, R.; VUČEN, S. R.; CREAN, A. M.; MOORE, A.; SCALIA, S. Enhancement of the in vitro penetration of quercetin through pig skin by combined microneedles and lipid microparticles. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 472, n. 1-2, p. 206-213, September 2014.

PALLAVI, K. S.; VENKATESH, V.; HITESH, V. J.; GEJJALAGERE, H. C.; VIRENDRA, S. L.; PRASHANT, B. M.; USHA, Y. N.; MEKA, S. R.; GURUPRASAD, K.; NAYANABHIRAMA, U.; CHAMALLAMUDI, M. R.; SRINIVAS, M. Development and evaluation of sunscreen creams containing morin-encapsulated nanoparticles for enhanced UV radiation protection and antioxidant activity. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 6477-6491, October 2015.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 43, n. 4, p. 491-502, 2007. ISSN 1516-9332.

PODDA, M.; TRABER, M. G.; WEBER, C.; YAN, L. J.; PACKER, L. UV-Irradiation Depletes Antioxidants and Causes Oxidative Damage in a Model of Human Skin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 1, p. 55-65, January 1998.

POHLMANN, A. R.; FONSECA, F. N.; PAESE, K.; DETONI, C. B.; CORADINI, K.; BECK, R. C.; GUTERRES, S. S. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert opinion on drug delivery.**, v. 10, n. 5, p. 623-638, May 2013.

PRINCE, P. S.; & SATHYA, B. Pretreatment with quercetin ameliorates lipids, lipoproteins and marker enzymes of lipid metabolism in isoproterenol treated cardiotoxic male Wistar rats. **European journal of pharmacology**, v. 635, n. 1-3, p. 142-148, June 2010.

QUAN, T.; QIN, Z.; XIA, W.; SHAO, Y.; VOORHEES, J. J.; FISHER, G. J. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. **J Investig Dermatol Symp Proc.**, v. 14, n. 1, p. 20-24, August 2009.

RAMOS-E-SILVA, M.; CASTRO, M. C. R. **Fundamentos de Dermatologia**. Rio de Janeiro: Atheneu, v. 1, 2010. 9-12 p. ISBN 978-85-7379-213-3.

RATNAPARKHI, M. P.; & GUPTA, J. P. Sustained Release Oral Drug Delivery System - An Overview. **International Journal of Pharma Research & Review**, v. 2, n. 3, p. 11-21, March 2013.

ROSARIO, R.; MARK, G. J.; PARRISH, J. A.; MIHM, M. C. JR. Histological changes produced in skin by equally erythemogenic doses of UV-A, UV-B, UV-C and UV-A with psoralens. **The British Journal of Dermatology**, v. 101, n. 3, p. 299-308, September 1979.

ROSS, D.; & MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In **Vigo Pelfrey C (ed): Membrane lipid oxidation**, n. 1th ed. Boca Raton, CRC Press., p. 151-170, 1991.

ROSS, M. H.; ROMRELL, L. J.; REITH, E. L. **Histologia texto e atlas**. Tradução de Gerson Cotta-Pereira. 2. ed. São Paulo: Panamericana, 1993. ISBN 85-303-0024-6.

ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e cultura**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 54-57, 2008. ISSN 2317-6660.

SCHMALTZ, C.; SANTOS, J. V.; GUTERRES, S. S. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: a imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. **Infarma**, v. 16, p. 13-14, 2005.

SEAGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 197-223, 2005.

SEO, M. J.; LEE, Y. J.; HWANG, J. H.; KIM, K. J.; LEE, B. Y. The inhibitory effects of quercetin on obesity and obesity-induced inflammation by regulation of MAPK signaling. **J Nutr Biochem.**, v. 26, n. 11, p. 1308-1316, November 2015.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr.**, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004. ISSN 10.1590/S1415-52732004000200009.

SHATALEBI, M. A., & RAFIEI, Y. Preparation and evaluation of minoxidil foamable emu oil emulsion. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 2, p. 123-133, March 2014.

SHETTY, P. K.; VENUVANKA, V.; JAGANI, H. V.; CHETHAN, G. H.; LIGADE, V. S.; MUSAMDE, P. B.; NAYAK, U. Y.; REDDY, M. S.; KALTHUR, G.; UDUPA, N.; RAO, C. M.; MUTALIK, S. Development and evaluation of sunscreen creams containing morin-encapsulated nanoparticles for enhanced UV radiation protection and antioxidant activity. **International Journal of Nanomedicine**, p. 6477 - 6491, October 2015.

SOLIMAN, E.; VAN DROSS, R. Anandamide-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis are mediated by oxidative stress in non-melanoma skin cancer: Receptor-independent endocannabinoid signaling. **Mol Carcinog.**, Oct 2015. ISSN 10.1002/mc.22429.

SRINIVASAN, P.; SABITHA, K. E.; SHYAMALADEVI, C. S. Attenuation of 4-nitroquinoline 1-oxide induced in vitro lipid peroxidation by green tea polyphenols. **Life Sciences**, v. 80, n. 12, p. 1080-1086, February 2007.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

SWANSON, C. **Vegetables, fruits, and cancer risk: The role of phytochemicals.** [S.l.]: Lancaster PA: Technomic Publishing, 1998. 1-12 p.

TANIGAWA, S.; FUJII, M.; HOU, D-X. Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, p. 1690-1703, February 2007.

TERUI, T.; OKUYAMA, T.; TAGAMI, H. Molecular events occurring behind ultraviolet-induced skin inflammation. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology.**, v. 1, n. 5, p. 461-467, October 2001.

TEWARI, A.; GRAGE, M. M. L.; HARRISON, G. I.; SARKANY, R.; YOUNG, A. R. UVA is skin deep: molecular and clinical implications. **Photochemical & Photobiological Sciences**, n. 1, p. 95-103, November 2013.

TIWARI, S.; GOEL, A.; JHA, K. K.; SHARMA, A. Microencapsulation techniques and its application: a review. **The Pharma Research**, v. 3, n. 12, p. 112-116, 2010.

TRINDADE, C. S. F.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Review: Microencapsulation of food ingredients. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-109, 2008.

TROMMER, H.; & NEUBERT, R. H. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. **Skin Pharmacology and Physiology.**, v. 19, n. 2, p. 106-121, May 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSNER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, n. 39, p. 44-84, 2007.

VENZA, M.; VISALLI, M.; BENINATI, C.; DE GAETANO, G. V.; TETI, D.; VENZA, I. Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Action in Melanoma. **Oxid Med Cell Longev.**, v. 2015, p. 1-11, May 2015. ISSN 10.1155/2015/481782.

VERRI, W. A. JR.; GUERRERO, A. T.; FUKUDA, S. Y.; VALERIO, D. A.; CUNHA, T. M.; XU, D.; FERREIRA, S. H.; LIEW, F. Y.; CUNHA, F. Q. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, n. 7, p. 2723-2728, 2008.

VERRI, W. A. JR.; VICENTINI, F. T. M. C.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; CARDOSO, R. D. R.; CUNHA, T. M.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; FONSECA, M. J. V.; CASAGRANDE, R. Flavonoids as anti-inflammatory and analgesic drugs: mechanisms of action and perspectives in the development of pharmaceutical forms. In: _____ **Studies in natural products chemistry**. 1st edn. ed. Amsterdam: Elsevier, 2012. p. 297-330.

VICENTINI, T. M. C.; SIMI, T. R. M.; DEL CIAMPO, J. O.; WOLGA, N. O.; PITOL, D. L.; LYOMASA, M. M.; BENTLEY, M. V. L. B.; FONSECA, M. J. V.. Quercetin in w/o microemulsion: in vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 69, n. 3, p. 948-957, Aug 2008.

VITALE, N.; KISSLINGER, A.; PALADINO, S.; PROCACCINI, C.; MATARESE, G.; PIERANTONI, G. M.; MANCINI, F. P.; TRAMONTANO, D. Resveratrol couples apoptosis with autophagy in UVB-irradiated HaCaT cells. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. 1-13, November 2013.

WALLE, T.; WALLE, U. Ç.; HALUSHKA, P. V. Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 10, p. 2648-2652, October 2001.

WOLFF, K.; GOLDSMITH, L. A.; KATZ, S. I.; GILCHREST, B. A.; PALLER, A. S.; LEFFELL, D. J. **Fitzpatrick Tratado de Dermatologia**. 7^o. ed. Rio de Janeiro: Revinter LTDA., v. 1, 2011. 60-62 p. ISBN 978-85-372-0342-2.

XU, Y.; & FISHER, G. J. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. **J Dermato Sci Suppl**, v. 1, p. S1-S8, 2005.

ZHANG, T.; WANG, C. R.; SHEN, S.; JIN, Y.; GE, Y.R. Preparation and evaluation of enteric-coated and taste masking clarithromycin granules. **Yao Xue Xue Bao**, v. 46, n. 12, p. 1520-1525, Dec 2011.

ZILLICH, O. V.; SCHWEIGGERT-WEISZ, U.; HASENKOPF, K.; EISNER, P.; KERSCHER, M. Release and in vitro skin permeation of polyphenols from cosmetic emulsions. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 35, n. 5, p. 491-501, October 2013.

ZUL, K.; FARHAT, U.; MUHAMMAD, A.; ABDUL, S.; SAJJAD, A.; ANWAR, Z.; ABID, H.; MUHAMMAD, I. Anticholinesterse and antioxidant investigations of crude extracts, subsequent fractions, saponins and flavonoids of atriplex laciniata L.: potential effectiveness in Alzheimer's and other neurological disorders. **Biological Research**, v. 48, n. 1, p. 1-11, April 2015.

ANEXO

ANEXO I –Informações sobre submissão do artigo a revista Photochemical and Photobiological Science

Find out how to prepare your article and present your research clearly, ensuring that all the relevant information is included.

You'll also find guidance here on the experimental data you should include in your article and material that can be placed in the electronic supplementary information (ESI).

For detailed information on acceptable formats for your figures, see our section on [Figures, graphics, images & cover artwork](#).

How to write your article

On this page you'll find guidance and tips for first-time and experienced authors on writing style and how to structure an article. We've also included some [article templates](#) to help you structure and format your manuscript.

These guidelines are relevant to all of our journals. Please make sure you check the specific journal page for additional guidelines; you'll find the journals listed under [Our journals](#).

Article types

Articles commonly fall into one of three main categories: Full papers, Communications and Reviews. However, each journal will have further, specific article types, so you should always refer to a [journal's specific author guidelines](#) while preparing your manuscript.

Full papers are original, unpublished primary research. Extensions of work that has been published previously in short form such as a Communication are usually acceptable.

Communications must contain original and highly significant work whose high novelty warrants rapid publication. Some journals have page limits for Communications.

Reviews may be an authoritative overview of a field, a comprehensive literature reviews, or tutorial-style reference materials. Reviews are usually invited by the editor, but a topic may be proposed by an author via the editorial office.

Format & layout of your article

Articles should be written clearly and concisely, avoiding repetition or embellishment. All submissions must be in English. Standard English or American spelling may be used in our journals, but consistency should be maintained within a manuscript. The use of common or standard abbreviations is encouraged; however, if using non-standard abbreviations, please define these when you first use them.

All articles accepted for publication in our journals are edited and typeset to our house style by professional editors: the manuscript will be formatted for you.

This section describes the content to be included in your article. Note that headings and subheadings are not permitted in articles submitted to *ChemComm*, although they are permitted in Communications submitted to other journals.

Experimental data

On submission of a manuscript authors should provide all data required to understand and verify the research presented in the article. The Royal Society of Chemistry believes that where possible all data associated with the research in a manuscript should be freely available in an accessible and usable format, enabling other researchers to replicate and build on that research.

[Read about our data policy and the experimental data](#) you should include for the characterisation of new compounds, X-ray crystallography and macromolecular structures.

Preparing electronic supplementary information (ESI)

You can include ESI with your article to enhance and increase the impact of your work, for example by including 3D molecular models and movies. Authors can also improve the readability of their articles by placing appropriate material in the ESI, such as repetitive experimental details or bulky data. All information published as ESI is fully archived and permanently linked to the article using CrossMark.

When preparing your ESI data files, you should keep in mind the following points:

- Supplementary data is peer-reviewed and should therefore be included with the original submission.
- ESI files are published 'as is'; editorial staff will not edit the data for style or content.
- Data are useful only if readers can access it; use common, widely known file formats.
- Large files may prove difficult for users to download and access.

We encourage the submission of supporting information for compounds and spectra in electronic format. For compounds, please supply mol files (exported from your chemical drawing package) as unique compounds, without R-groups or variable attachments. Spectral data such as NMR, IR, Raman, ESR should be supplied in the standard [JCAMP-DX](#) format (.jdx files).

We offer a service that enables the 3D visualisation of complex molecules. You can use the [FirstGlance in Jmol tool](#) to prepare these.

Multimedia files

We welcome the use of multimedia files (including videos and animations) as these can be an excellent medium to present elements of your work. Any videos of general interest may be shared with the wider community via our YouTube channel or through social media - please notify the editorial team if you prefer for your video(s) not to be promoted in this way.

If you submit a multimedia file alongside your paper, please refer to it within your paper to draw it to the reader's attention. Please also provide a short descriptive title for the video.

Acceptable formats for video or animation clips are:

- WMV
- AVI
- MOV
- MPG

Please minimise file sizes where you can; we recommend a maximum file size of 5MB and a maximum frame size of 640 x 480 pixels. If your video is very short (only a few seconds long) then it is recommended that you loop the section a few times to provide a more detailed view.

Video abstracts

We welcome the opportunity to help authors promote their papers by the placement of video abstracts on YouTube, which we can then promote via social media channels. Video abstracts offer an exciting opportunity to highlight the importance of a paper to the reader in a new and engaging way.

Content

- Start by introducing the conclusion of your article and concentrate on the main results.
- Focus the video on why the article is relevant to the reader.
- Introduce relevant co-workers and mix in images/footage of your laboratory, experiment and equipment to make it more engaging.
- Videos should be approximately two-three minutes in length (no longer than four minutes).
- On screen text should be used sparingly and be large enough to read clearly.

Technical

- Minimum frame size: 320 x 240 pixels; maximum 640 x 480.
- Frames per second: 25 to 30.
- Aspect Ratio: 4:3 preferred - please contact us regarding 16:9.

- Formats accepted: MPG, MOV, AVI, WMV.
- The maximum size should be 40MB - please contact us if this presents a problem.

Notes

- Video abstracts will be hosted on Youtube or another third party hosting provider.
- We may edit your video if required, overlay a logo on your video and add a splash screen at the end of the video.
- All abstracts will be accessed for suitability prior to being uploaded to the Royal Society of Chemistry YouTube Channel.
- You should ensure that you have copyright permission for any images, stock footage or background music used.
- Please also submit a transcript of the video abstract that we can upload to make it more accessible.

Articles should be submitted using our online submission system. We do not accept submissions by post or email. Details of what files you need to provide can be found below. You will also be asked to supply the names and contact details of all co-authors.

Your submission will be acknowledged as soon as possible - please contact the journal editorial office if you have not received an acknowledgement within two working days.

What to send & when

On submission

When you submit your manuscript to a Royal Society of Chemistry journal, please provide the following.

- Article text as a Word, PDF or LaTeX file (if you use LaTeX, please also include a PDF version); submissions to *Chemical Communications* and *Catalysis Science & Technology* must use our [Communication template](#), for other journals this is optional
- Numbered figures either included within or at the end of the text; [for specifications see information below](#)
- A cover letter, including a justification of the importance of the work
- A list of preferred reviewers
- Any electronic supplementary information (ESI)
- Any CCDC numbers, as well as CheckCIF files for each crystal structure; see the [experimental data](#) section for more information
- [Please consult individual journal guidelines for details of any additional required files](#)

You may also provide a table of contents entry at this stage, although this can wait until you send your revised manuscript. This should include a graphic (maximum size 8 cm x 4 cm) and one sentence of text (maximum 20 words) highlighting the novelty of the work.

The submission system allows for up to five files to be uploaded at once. Alternatively a ZIP file containing up to 20 files can be uploaded. All files relating to a single manuscript should be uploaded simultaneously during one transaction.

At revision

As well as your revised manuscript, you will be asked to provide a response to the referees, your figures as separate high-resolution files and a table of contents entry. Full details of what you should include will be sent to you by the editor when required.

Licence to publish

All authors submitting work for publication are required to agree a [licence to publish](#). Authors will be asked to agree to our licence to publish as part of the submission process.

Alternatively, a downloadable PDF version is available, which can be completed and returned by email, post or fax to the editorial office.

Figures, graphics, images & cover artwork

Figures & graphics

- Colour figures may be used free of charge both online and in print.
- Figures should be supplied as TIFF or EPS files, with a resolution of 600 dpi or greater.
- Files should fit within either single column (8.3 cm) or double column (17.1 cm) width, and must be no longer than 23.3 cm.
- Graphical abstracts should be no larger than 8 cm x 4 cm.
- Schemes and structures should be drawn to make best use of single and double column widths.

Photographs

- Photographs should be provided at the best resolution available (minimum 600 dpi) as TIFF, PDF or JPEG files.
- Biography photographs should be 4 cm wide x 5 cm high (individual photograph) or 8.3 cm wide x 5 cm high (group photograph).

Chemical structures

Structures should ideally be prepared with chemistry drawing software, preferably as ChemDraw files. Chemwindow files (.cwg/.cw2), ISIS/Draw exported in sketch format (.skc) and ChemSketch exported in ChemDraw format (.cdx) may also be supplied.

You should use the settings below or you can use our [chemical structure templates](#) to format these for you.

- Chain bond angle = 120°
- Fixed bond angle = 15°
- Bond length = 0.43 cm *or* 12.2 pt
- Bond width = 0.016 cm *or* 0.5 pt
- Bold bond width = 0.056 cm *or* 1.6 pt
- Double bond space = 20% of bond length
- Stereo bond width = 0.056 cm *or* 1.6 pt
- Hash spacing = 0.062 cm *or* 1.8 pt
- Captions/atom labels = Arial/Helvetica, 7 pt

Wherever possible, please send all ChemDraw files with the final version of your manuscript. We can use chemical drawings to highlight your research and make it more discoverable via our [ChemSpider database](#).

Crystal structure images

A conventional line drawing of the structure should normally be included and one perspective diagram (or stereo pair) if appropriate. Packing diagrams should not be included unless required to illustrate a specific chemical point. The atom numbering scheme should be clearly shown in one of the diagrams.

Journal covers

Authors who wish to have their artwork considered for a journal cover should contact the editorial office of the journal. Use of artwork is at the editor's discretion. A contribution to the additional production costs will be requested.

Help with our submission system

We handle all our peer review through the online system ScholarOne Manuscripts. This system requires the use of pop-ups, so you'll need to enable these in your browser before you start.

An [author guide and FAQ section](#) is available from ScholarOne Manuscripts to help you learn and navigate the system.

Registering a new account FAQ

New users will need to set up an account on the system before starting. To do this go to the [ScholarOne homepage](#) and click on 'Register here' under 'New User?' to the right of the page. It takes only a few minutes to complete the form; once done you will be able to access your account immediately.

Learn more about our publishing process such as our initial assessment of submissions, our journal transfer service and the publication of accepted manuscripts.

This page also outlines our editorial policies on prior publication, data and correction and retraction.

Initial assessment of submissions

We are committed to publishing high quality new work that makes a significant contribution within the scope of its journals. In order to meet this aim, submitted manuscripts undergo initial evaluation by our professional editors to ensure that they meet essential criteria for publication in the journal.

Only those manuscripts that pass this initial review process will be forwarded to reviewers for further consideration.

This process provides a rapid decision to authors of those papers that are unsuccessful and reduces the burden on the reviewers.

A manuscript may be returned to the author(s) without external review if, in the opinion of the editor:

- the manuscript clearly falls outside the scope of the journal
- the work is of poor scientific quality such that it is clearly not suitable for publication in a scientific journal
- the manuscript is of insufficient general interest for the journal and would be better suited to a more specialised journal
- the novelty of the work falls below that required for the journal
- the manuscript represents undue fragmentation of the research into multiple papers
- the manuscript contains redundant information or significant amounts of material that has already been published elsewhere or is under consideration by another journal
- the quality of the English in the manuscript is so poor as to render the science presented unclear
- the manuscript has already been reviewed and rejected by a different Royal Society of Chemistry journal, and the author(s) have made little or no attempt to address the advice that the editor and/or referees have provided already

- the conclusions drawn by the manuscript are well known or have been published previously.

Authors are also expected to abide by the Royal Society of Chemistry's ethical guidelines as described in [Author responsibilities](#).

Authors have the right to appeal against any decision taken on their manuscript at any stage; an appeal would be granted at the discretion of the Royal Society of Chemistry. Through the appeal process further opinion is sought on the manuscript's suitability for publication in the journal. After the appeal process the editor's decision is final.

CrossCheck

The Royal Society of Chemistry is a member of CrossCheck – a multi-publisher initiative to screen published and submitted content for originality.

Through CrossCheck, we use the iThenticate software to detect instances of overlapping and similar text in submitted or published manuscripts.

By depositing all of our content in the CrossCheck database we allow other CrossCheck members to screen their submissions against our published articles.

Further details on our plagiarism policies can be found in our [Author responsibilities](#) section.

Transfer between Royal Society of Chemistry journals

The Royal Society of Chemistry is committed to providing authors with a high level of customer service throughout the publication process. One of the ways we do this is to consider the suitability of a manuscript for another Royal Society of Chemistry journal if the manuscript is unsuitable for publication in the journal to which it was submitted originally.

When a paper is to be rejected from one Royal Society of Chemistry journal, then we would offer the author(s) the option to transfer the paper to one of our other journals for consideration, when this is appropriate. This offer may occur during the initial assessment of a manuscript or after reports on it have been received from reviewers. As part of the peer review process, the reviewers are asked to comment whether the manuscript would be more appropriate for one of our other journals.

An offer by the editorial office to transfer the manuscript to another journal is made in the decision letter to the corresponding author; the author decides whether or not to take up the offer and then selects the appropriate option provided in the letter. On acceptance of the offer the manuscript is transferred automatically to the new journal without the author needing to supply the submission information again.

The transferred manuscript will appear as a 'draft' in the author's 'Author Centre' in the new journal, and the author will receive an email asking them to finalise the submission. The

process provides a quick and easy route for these papers to be considered by another journal.

If the manuscript already has reports from reviewers then the author will be asked to upload the revised files. These files should include a summary of any new work added and a point by point response to the reviewers' comments. Authors should be aware that the reviewers' comments are transferred to the editor of the receiving journal together with the manuscript files. On submission to the new journal, the manuscript will then be assessed by an editor as to whether further peer review will be necessary.

Benefits for authors & reviewers

Transferring manuscripts between our journals has benefits for authors. When transferring to another journal the author does not need to submit the manuscript or provide the accompanying information again. During the initial assessment by the editor, identification of the most suitable journal for the manuscript optimises the evaluation process. If reports have already been received then further review may not be necessary after a transfer, at the discretion of the editor on the journal to which the manuscript has been transferred. A decision by the new journal about suitability of the manuscript for publication should be made more swiftly.

The transfer process also reduces the burden on reviewers. A paper that has been rejected may be submitted by the author to another journal where it would undergo evaluation again. By transferring between journals here we would be able to consider the reports received already, although some additional review may be necessary. Full peer review is not always necessary thereby reducing the number of reviews required and allowing a decision to be reached more quickly.

Accepted manuscripts

Many of our journals give authors the option to have the unedited and unformatted version of their article published shortly after acceptance as an accepted manuscript. This free service allows authors to make their results available to the community, in citable form, before publication of the edited article.

The edited and formatted advance article will replace the accepted manuscript as soon as it becomes available.* Journals that offer this service will give authors the opportunity to opt in during the online submission process.

*For RSC Advances, the accepted manuscript will be replaced by the edited, formatted and paginated article as soon as this becomes available, and it will be published in an 'Issue in Progress.'

Paper reprints service

We supply PDF reprints of their articles to our authors free of charge. If you would like to purchase printed reprints of your article, use our [order form](#), which also includes pricing information.

Correction & retraction policy

It is our policy not to amend, alter or remove the published scientific record, in line with the International Association of Scientific, Technical & Medical Publishers' (STM) guidelines:

Articles that have been published should remain extant, exact and unaltered to the maximum extent possible

(STM Guidelines on Preservation of the Objective Record of Science)

We will respond to any suggestions of scientific misconduct or to convincing evidence that the main substance or conclusions of a published manuscript is erroneous, usually through consultation with the author. This may require the publication of a formal retraction or correction. An expression of concern may be published by the editor whilst an investigation into alleged misconduct or publication of erroneous data is ongoing.

Authors who wish to enquire about publication of a correction for their article, or who have serious concern that they believe may warrant retraction, should contact the journal editorial office.

We follow the [Committee on Publishing Ethics \(COPE\) guidelines](#) for correcting and retracting articles, outlined below.

Expression of concern

We will consider issuing an expression of concern if:

- we receive inconclusive evidence of research or publication misconduct by the authors
- we receive evidence that the findings are unreliable but the authors' institution will not investigate the case
- we believe that an investigation into alleged misconduct related to the publication either has not been, or would not be, fair and impartial or conclusive
- an investigation is underway but a judgement will not be available for a considerable time.

The expression of concern is free to view and is linked to the article of record to which it relates.

Correction

We will consider issuing a correction if:

- the scientific record is seriously affected, for example with regard to the scientific accuracy of published information
- a small portion of an otherwise reliable publication proves to be misleading (especially because of honest error)
- the author/contributor list is incorrect (i.e. a deserving author has been omitted or somebody who does not meet authorship criteria has been included).

We will not usually publish a correction that does not affect the contribution in a material way or if the issue does not significantly impair the reader's understanding of the contribution, such as a spelling mistake or grammatical error. The correction is free to view and is linked to the article of record that it corrects.

Retraction

We will consider issuing a retraction notice if:

- we have clear evidence that the findings are unreliable, either as a result of misconduct (for example, data fabrication) or honest error (such as a miscalculation or experimental error)
- the findings have previously been published elsewhere without proper cross-referencing, permission or justification (that is, cases of redundant publication)
- the publication constitutes plagiarism
- the publication reports unethical research.

The retraction notice is free to view and is linked to the article of record that it retracts; the article of record will be digitally watermarked 'RETRACTED'.

Journal policy on prior publication

As scientific research is becoming more open and discoverable, the Royal Society of Chemistry supports our community of chemical scientists in sharing new research findings before and after publication through a variety of methods.

Authors publishing in our journals may present their research ahead of publication in the following ways.

- Through the deposition of a preprint version of the article in non-commercial repositories (eg ArXiv), institutional repositories or authors' individual websites - a preprint is defined here as an un-refereed author version of the article; a non-commercial repository is defined here as any platform or archiving service that makes digital content free to deposit and access

- At scientific conferences; this includes recorded presentations, poster presentations and abstracts that are made openly available online
- In commercial or non-commercial databases (data without interpretation, discussion, conclusions or context with a wider experimental project)
- In an open electronic lab notebook
- In blogs, wikis, tweets, and other informal communication channels
- As a thesis or dissertation published as part of an academic or professional qualification, in print and online
- In any digital medium which is operated by the Royal Society of Chemistry, excluding journals, books and magazines

We will not consider for publication work that has been previously published, or is under consideration for publication, in another journal. Full papers as a follow up to a previously published communication will be considered for publication in suitable Royal Society of Chemistry journals, subject to the new work meeting the journal's criteria.

Please consult the journal's editor if you have questions about whether or not a particular use constitutes prior publication.

For information about what you can do with your article following acceptance and publication see our guidance on [deposition and sharing rights](#).

Data policy

The Royal Society of Chemistry believes that where possible all data associated with the research in a manuscript should be freely available in an accessible and usable format, enabling other researchers to replicate and build on that research. Please refer to the [experimental data guidelines](#) for further information on our data policy.

This section provides general guidance to authors on their responsibilities and the code of conduct they should follow when submitting to a Royal Society of Chemistry journal. It also describes what are considered to be conflicts of interest, and outlines our policy on human and animal welfare.

The information on this page was reproduced in part with permission from 'Ethical Guidelines to Publication of Chemical Research', *Chem Rev.*, 1995, **95**, pp 11A-13A. © 1985, 1989, 1995 American Chemical Society. Committee on Publication Ethics (COPE)

Authorship

There is no universally agreed definition of authorship, but authors should, as a minimum, take responsibility for a particular section of the study. The award of authorship should

balance intellectual contributions to the conception, design, analysis and writing of the study against the collection of data and other routine work. If there is no task that can reasonably be attributed to a particular individual, then that individual should not be credited with authorship.

All authors must take public responsibility for the content of their paper. The multidisciplinary nature of much research can make this difficult, but this may be resolved by the disclosure of individual contributions.

Authors have a responsibility to give due acknowledgement to all workers contributing to the work. Those who have contributed significantly to the research should be listed as co-authors. On submission of the manuscript, the corresponding author attests to the fact that those named as co-authors have agreed to its submission for publication and accepts the responsibility for having properly included all (and only) co-authors. If there are more than 10 co-authors on the manuscript then the corresponding author should provide a statement to specify the contribution of each co-author.

The corresponding author signs a 'licence to publish' on behalf of all the authors. Any change in authorship after initial submission must be approved by all authors and justified to the editor.

Code of conduct & conflicts of interest

Code of conduct

One of the foundations of the scientific profession is the acceptance by its members of a 'code of conduct', which outlines desired behaviour and obligations of members of the profession to each other and the public. Such a code of conduct seeks to maximise the benefits of science to society and the profession. The advancement of science requires the sharing of knowledge, even though this may sometimes forego any immediate personal advantage.

The publication of scientific research in journals is one of the fundamental ways in which the Royal Society of Chemistry serves the chemical science communities. Central to this service is the responsibility that editors, authors and reviewers maintain the high ethical standard relating to the publication of manuscripts. In cases where these guidelines are breached or appear to be so, the Royal Society of Chemistry will consult the [code of conduct and best practice guidelines](#) of the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#) and act accordingly.

Conflicts of interest

The relevant Royal Society of Chemistry journal concerned should be informed of any significant** conflict of interest that editors, authors or reviewers may have, in order to determine if any action may be appropriate (such as adding a declaration of an author's

conflict of interest to a published piece, or disqualifying a reviewer). Conflicts of interest are almost inevitable and it is not intended to attempt to eliminate these. For a description and discussion of some leading journals' policies on conflicts of interest see: F van Kolfschooten, 'Conflicts of interest: Can you believe what you read?', *Nature*, 28 March 2002, **vol. 416**, pp. 360-363; DOI: 10.1038/416360a.

Financial

Editors, authors and reviewers of a manuscript should inform the relevant journal of any significant financial interest - recent, present or anticipated - in any organisation that may in any way gain or lose financially from the publication of the piece (for example, employment by such an organisation; funds for research; funds for a member of staff; fees for consulting; stock or share holdings; patent interests). If you have such an interest, you may have a conflict of interest, which should be declared.

Other interests

An editor, author or reviewer may wish to disclose to the editor a conflict of interest that would be embarrassing if it became generally known (for example, an academic link or rivalry or a close relationship with, or a strong antipathy to, a person whose interests may be affected by publication of a manuscript).

**Significance may be judged by considering whether an undeclared conflict of interest could be embarrassing were it to become publicly known after the fact.

Authenticity & professionalism

Authors have responsibilities as detailed below.

Gather and interpret data in an honest way: Editors, reviewers, readers and publishers have the right to assume that submitted (and published) manuscripts do not contain scientific dishonesty and/or fraud comprising among others fictitious or manipulated data, plagiarised material (either from the previous work of the authors or that of other persons), reference omissions, false priority statements, 'hidden' multiple publication of the same data and incorrect authorship. Authors must not breach any copyright.

When reproducing figures and/or schemes from previous publications, it is the author's responsibility to seek appropriate permission from the relevant publishers.

Present a concise and accurate report of their research and an objective discussion of its significance.

Give due recognition to published work relating to their submitted manuscript by way of correct reference and citation: All sources should be disclosed, and if a significant amount of other people's material is to be used, permission must be sought by the author in

accordance with copyright law. An author should not use privately obtained information (for example, information obtained through conversation), or information obtained through the performance of a confidential service (for example, the reviewing of a manuscript), without permission from the person from whom the information originated.

Declare all sources of funding for the work in the manuscript, and also to declare any conflict of interest.

Identify clearly in the manuscript any unusual hazards inherent in the use of chemicals, procedures or equipment in the investigation.

Ensure that their submitted articles contain no personal criticism of other scientists; however, criticism of the work of another scientist may be justified; an article may not contain any defamatory or otherwise actionable material.

Funding information

Providing accurate funding information will enable us to help you and your co-authors comply with multiple funder reporting mandates, and increase the visibility of your work through the [FundRef Search tool](#).

Human & animal welfare

When a study involves the use of live animals or human subjects, authors must include in the 'methods/experimental' section of the manuscript a statement that all experiments were performed in compliance with the relevant laws and institutional guidelines, and must state the institutional committee(s) that has approved the experiments. A statement that informed consent was obtained for any experimentation with human subjects is required. Reviewers may be asked to comment specifically on any cases in which concerns arise.

More detailed guidelines for authors submitting to *Toxicology Research* can be found in the [journal specific guidelines](#).

Authors have responsibilities as detailed below.

Avoid undue fragmentation of their work into multiple manuscripts: Editors have the right to reject submitted articles on the grounds of undue fragmentation. In particular, a piece of work should not be split into a number of manuscripts for publication as Communications.

Do not engage in redundant publication: This occurs when two or more papers, without full cross reference, share the same hypothesis, data, discussion points, or conclusions. Previous publication of an abstract or preprint of the proceedings of meetings does not preclude subsequent submission for publication, but full disclosure should be made

at the time of submission; please see our processes and policies page for full details in our section, [Journal policy on prior publication](#).

Re-publication of a paper in another language is acceptable, provided that there is full and prominent disclosure of its original source at the time of submission.

Consider publishing related manuscripts in the same journal or a small group of journals: This can be of benefit to readers.

Inform the editor of related manuscripts under consideration for publication by the same author in any journal, on submission of their current manuscript: Authors should provide copies of these related manuscripts, and details of their present status.

Ensure that a manuscript is submitted for publication in only one journal at a time: It is not acceptable for an author to submit a manuscript (or manuscripts describing essentially the same matter) to more than one journal at a time. A manuscript that is a full paper report of a published Communication may be submitted for publication; however, the author has the responsibility to inform the editor of the previously published Communication.