

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Nanoemulsões de cumestrol incorporadas em hidrogéis:
Efeito de materiais gelificantes sobre a retenção cutânea
e atividade antioxidante**

LAURA KARSBURG OLIVEIRA

PORTO ALEGRE, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Nanoemulsões de cumestrol incorporadas em hidrogéis:
Efeito de materiais gelificantes sobre a retenção cutânea e atividade
antioxidante**

Dissertação apresentada por
Laura Karsburg Oliveira para
obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Porto Alegre, 2012

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul a ser apresentada em 26 de março de 2012, frente à Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Angela Machado de Campos

Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Cássia Virginia Garcia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Valquiria Linck Bassani

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (606) da Faculdade de Farmácia da UFRGS

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, Olinda e Eurico, que em nenhum momento mediram esforços para a realização dos meus sonhos, pelo amor incondicional, exemplo, educação, por terem compreendido meus momentos distantes e por acreditarem e terem fornecido condições para que eu concluísse mais uma etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado forças e iluminando meu caminho para que eu pudesse concluir mais uma etapa da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Helder Teixeira, pela oportunidade, orientação, dedicação e amizade, pela confiança em mim depositada, pela tranquilidade que me passou nos momentos difíceis e por todos os conselhos e ensinamentos.

Aos meus pais, pelo constante incentivo, amor e apoio nos momentos difíceis.

À minha irmã Jerusa e sua família, pelo amor e amizade.

À minha avó Dorvalina, por estar sempre torcendo e rezando para que meus objetivos fossem alcançados e ao meu avô Arlindo (em memória) por todo amor.

Ao Leandro, pelo amor, companheirismo e compreensão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, pela oportunidade de aperfeiçoamento científico.

Aos professores do corpo docente da UFRGS, pelos ensinamentos transmitidos.

A todos os meus colegas e amigos do LDG, Bruna, Cristiane, Daiane, Débora, Francini, Juliana Bidone, Juliana Carini, Luisa, Pedro, Regina, Samuel, Simone, Vinícius sem os quais a realização dessa dissertação teria sido bem mais difícil.

À Débora pelas idéias, troca de conhecimento, ajuda nos experimentos e principalmente por ter disponibilizado seu tempo para contribuir com o desenvolvimento desse trabalho bem como pela amizade.

À CAPES pelo apoio financeiro recebido durante a realização deste trabalho.

RESUMO

O cumestrol é um isoflavonóide de ocorrência natural, encontrado em diferentes leguminosas como a soja, alfafa e trevo vermelho. Estudos têm demonstrado que este composto apresenta uma relevante atividade antioxidante e estrogênica. Neste contexto, o cumestrol torna-se de interesse para a prevenção do envelhecimento e da fotocarcinogênese. Assim, o objetivo desta dissertação foi desenvolver hidrogéis contendo cumestrol incorporado em nanoemulsões visando a sua aplicação tópica. Na primeira fase foram desenvolvidas, pelo método de emulsificação espontânea, nanoemulsões compostas de triglicerídeos de cadeia média, lecitina de gema de ovo, polissorbato 80 e água. Tal procedimento conduziu à obtenção de nanoemulsões monodispersas com diâmetro médio de gotícula de aproximadamente 200-250 nm, confirmado por microscopia eletrônica de transmissão, e com potencial zeta de aproximadamente -30mV. Após o espessamento com carbopol (0,5%), hidroxietilcelulose (3,2%) e quitosana (3,9%), as formulações apresentaram uma viscosidade similar com comportamento não-Newtoniano pseudoplástico. Na segunda etapa, o teor de cumestrol nas formulações foi determinado por CLAE, através de método isocrático com detecção por ultravioleta em 343 nm desenvolvido anteriormente pelo grupo de pesquisa. Os perfis de liberação do cumestrol, através de membrana artificial, demonstraram uma liberação imediata para todas as formulações, porém com fluxo variando de 21,4 a 39,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, indicando que o material gelificante usado influencia na sua liberação. Estudos de permeação/retenção do cumestrol através de pele de orelha suína foram realizados utilizando-se células de difusão de Franz. Os resultados obtidos demonstram uma maior retenção da molécula na epiderme, e que o perfil de retenção é positivamente influenciado pelo espessamento das formulações. Análises histológicas da pele mostraram que as formulações não causaram dano ao tecido. Por fim, as formulações apresentaram atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH.

Palavras chave: cumestrol, nanoemulsão, hidrogéis, permeação cutânea, DPPH

ABSTRACT

Coumestrol is a naturally occurring isoflavonoid found in various legumes such as soybeans, alfalfa, and red clover. Studies have shown that this compound exhibits significant antioxidant and estrogenic activity. In this context, coumestrol becomes of interest for prevention aging and photo-carcinogenesis. The objective of this work was to develop hydrogels containing coumestrol-loaded in nanoemulsions aimed at topical application. In the first stage, nanoemulsions were developed by means of the spontaneous emulsification method, composed of medium chain triglycerides, lecithin yolk egg, polysorbate 80, and water. This procedure led to obtaining monodisperse nanoemulsions with average droplet diameters of approximately 200-250 nm, confirmed by transmission electron microscopy, and zeta potential of approximately -30mV. After thickening with carbopol (0.5%), hydroxyethylcellulose (3.2%), and chitosan (3.9%), the formulations showed a similar viscosity with pseudoplastic non-Newtonian behavior. In the second stage, the coumestrol content in the formulations was determined by HPLC, using the isocratic method with ultraviolet detection at 343 nm previously developed by the research group. The coumestrol release profiles through artificial membrane showed immediate release for all formulations, but with a flow varying from 21.4 to 39.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, indicating that the gelling material used influences its release. Studies of coumestrol permeation/retention through porcine ear skin were performed using Franz diffusion cells. The results showed a greater retention of the molecule in the epidermis, and that the retention profile is positively influenced by the thickness of the formulations. Histological analyses of the skin showed that the formulations did not cause tissue damage. Finally, the formulations showed antioxidant activity towards DPPH free radical.

Keywords: coumestrol, nanoemulsion, hydrogels, skin permeation, DPPH

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1. Estrutura da pele.....06
- Figura 2. Estrutura química do cumestrol.....10

CAPÍTULO II

- Figure 1. Transmission electronic microscopy images of coumestrol-loaded nanoemulsion before (A) and after incorporation into carbopol (B), hydroxyethylcellulose (C) or chitosan hydrogels (D).....50
- Figure 2. Spreadability curves of coumestrol-loaded nanoemulsion after incorporation into carbopol, hydroxyethylcellulose or chitosan hydrogels.....52
- Figure 3. Rheograms of coumestrol-loaded nanoemulsion after incorporation into carbopol (B), hydroxyethylcellulose (C) or chitosan hydrogels (D). Solid and open symbols represent ascendant and descendant curves, respectively.....53
- Figure 4. Coumestrol released from nanoemulsions before and after thickening with carbopol, hydroxyethyl cellulose and chitosan through cellulose esters membranes.....54
- Figure 5. Representative chromatograms of specificity study. (A) Chromatograms obtained from the analysis of samples from nanoemulsion and hydrogels. (B) Chromatograms obtained from the analysis of samples from skin layers. Coumestrol methanol solution.....55
- Figure 6. *In vitro* skin retention of coumestrol-loaded nanoemulsions into epidermis and dermis from nanoemulsions before and after incorporation into hydrogels after 8h of kinetics.....57
- Figure 7. Photomicrographs of skin permeation kinetics (optical increase of 40-fold). Key: untreated skin (A); Skin treated with NE after 2h (B); Skin treated with NE after 8h (C); Skin treated with NE/CBP (D), NE/CHT (E) and NE/HEC (F) after 8h.....58
- Figure 8. Percentage inhibition of radical DPPH by the coumestrol in ethanolic solution at different concentrations.....59
- Figure 9. Percentage inhibition of radical DPPH by the various formulations containing coumestrol in the same concentration (20 μ g / ml).....60
-

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Table 1.	Final composition (% w/w) of formulations.....	44
Table 2.	Physicochemical properties of nanoemulsions.....	50
Table 3.	COUM content (%) in nanoemulsion before and after incorporation in hydrogels (initial and after storage at 4°C).....	51
Table 4.	<i>In vitro</i> release characteristics of coumestrol through cellulose membrane.....	55
Table 5.	Precision, accuracy and recovery data for skin samples...	56

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
Referências.....	4
CAPÍTULO I.....	06
Revisão da literatura.....	06
Pele e envelhecimento cutâneo.....	06
Propriedades biológicas dos flavonóides/cumestanos.....	09
Nanoemulsões de uso tópico.....	14
Reologia.....	20
Permeação/retenção cutânea.....	23
Referências.....	29
CAPÍTULO II.....	40
Parte experimental.....	40
Artigo	40
Abstract.....	41
Introduction.....	42
Materials and methods.....	43
Materials.....	43
Preparation of formulations.....	44
Characterization of nanoemulsion.....	45
Characterization of hydrogels.....	45
Coumestrol content.....	46
Release studies.....	47
Coumestrol assay.....	46
In vitro skin permeation and retention.....	48
Antioxidant activity.....	49
Results	49
Physicochemical properties of formulations.....	49

TEM imaging.....	50
Coumestrol content.....	51
Spradability study.....	51
Rheological investigation.....	52
Release kinetics.....	54
Coumestrol analysis for skin retention evaluation.....	55
Skin permeation/retention.....	57
Histological evaluation.....	58
Antioxidant activity.....	59
Discussion	60
Acknowledgements.....	63
References	63
<hr/>	
CONCLUSÕES.....	67
<hr/>	

INTRODUÇÃO

O cumestrol é um isoflavonóide presente em diversas leguminosas como a soja, alfafa e trevo vermelho. Estudos recentes têm descrito a potente atividade antioxidante do cumestrol decorrente da capacidade deste composto em doar hidrogênio/elétrons das hidroxilas fenólicas, podendo proteger os componentes celulares dos danos oxidativos. MITCHELL et al. (1998) demonstraram o efeito antioxidante do cumestrol através de diferentes modelos experimentais. O cumestrol apresentou uma maior atividade antioxidante em comparação com outros fitoestrógenos avaliados (genisteína e daidzeína). A maior atividade antioxidante do cumestrol, quando comparado com isoflavonas isoladas ou em extratos - de *Trifolium pretense* L. (trevo vermelho) e *Glycine max* (soja), - também foi descrito em outros estudos (GEORGETTI et al., 2003; LEE et al., 2006).

A aplicação tópica de antioxidantes incorporados em nanosistemas tem sido considerada como uma estratégia promissora para evitar o fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese. Entre esses, destaca-se a incorporação de antioxidantes em nanoemulsões lipídicas (ALMEIDA et al 2010; SILVA et al, 2009; VARGAS et al, 2012). Nanoemulsões são dispersões de nanogotículas oleosas em uma fase aquosa externa, as quais são estabilizadas por tensoativos adequados. O interesse desses sistemas de aplicação tópica reside, entre outros, na possibilidade de aumento da taxa de permeação na pele devido ao tempo de permanência prolongado no local, a grande área de superfície e a baixa tensão superficial (KLANG e BENITA, 1998).

Estudos recentes descrevem a viabilidade de incorporação de agliconas flavonoídicas em nanoemulsões, incluindo compostos da classe dos flavonóis (quercetina), metilflavonas (3-O-metilquercetina) e isoflavonas (genisteína) (FASOLO et al., 2009; SILVA et al., 2009; VARGAS et al., 2012). Devido à reduzida hidrossolubilidade, esses compostos encontram-se preferencialmente no interior da gotícula de óleo e/ou adsorvidos na interface das nanoestruturas. O conjunto dos resultados indica um baixo fluxo dos flavonóides estudados através da pele de orelha suína, avaliado através de estudos de difusão em células de Franz, apontando para uma potencial aplicação destes produtos para tratamento tópico.

Recentemente, ARGENTA (2011), em sua dissertação de mestrado, demonstrou a viabilidade de incorporação do cumestrol em nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea. Tais formulações foram constituídas de um núcleo de triglicerídeos de cadeia média estabilizado por lecitina de gema de ovo e polissorbato 80, adicionadas ou não de um tensoativo catiônico, o cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAB). Após a validação de uma metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência, foi claramente demonstrada a retenção preferencial do cumestrol na epiderme de orelha suína em comparação à derme especialmente para as formulações carregadas positivamente, utilizando estudo de permeação em células de difusão de Franz.

Em continuidade aos estudos do nosso grupo de pesquisa, o presente estudo visa ao desenvolvimento de hidrogéis contendo nanoemulsões de cumestrol, com ênfase no efeito de diferentes materiais gelificantes nas propriedades dos hidrogéis, perfil de permeação/retenção do cumestrol, bem como na atividade antioxidante dos produtos desenvolvidos. A dissertação está estruturada em dois capítulos:

- O capítulo I trata da revisão da literatura acerca do tema da dissertação, resumindo os aspectos principais tratados ao longo do trabalho, envelhecimento cutâneo, atividades biológicas dos flavonóides/cumestanos, nanoemulsões de uso tópico, reologia e permeação/retenção cutânea;
- O capítulo II apresenta os resultados obtidos no estudo de desenvolvimento de hidrogéis contendo cumestrol incorporado em nanoemulsões, o efeito de diferentes agentes gelificantes sobre a reologia, retenção cutânea, bem como a atividade antioxidante do cumestrol encapsulado nas nanoestruturas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. S., LIMA, F., ROS, S. D., BULHÕES, L. O., DE CARVALHO, L. M., BECK, R. C. Nanostructured Systems Containing Rutin: In Vitro Antioxidant Activity and Photostability Studies. **Nanoscale Res Lett** 15:1603-1610, 2010.

ARGENTA, D. F. Nanoemulsões de uso tópico contendo cumestrol: estudos de formulação e permeação cutânea. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

FASOLO, D.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. Development of topical nanoemulsions containing quercetin and 3-O-methylquercetin. **Pharmazie**, v. 64, p. 726-730, 2009.

GEORGETTI, S. R., CASAGRANDE, R., DI MAMBRO, V. M., AZZOLINI, A. E., FONSECA, M. J. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. **AAPS PharmSci** 5: E20, 2003.

KLANG, S., BENITA, S. **Submicron emulsions in drug targeting and delivery**, p.340, 1998.

LEE, J. H., LEE, B. W., KIM, J. H., JEONG, T. S., KIM, M. J., LEE, W. S., PARK, K. H. LDL-Antioxidant Pterocarpanes from Roots of Glycine max (L.) Merr. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2057-2063, 2006.

MITCHELL, J. H., GARDNER, P. T., MCPHAIL, D. B., MORRICE, P. C., COLLINS, A. R., DUTHIE, G. G. Antioxidant Efficacy of Phytoestrogens in Chemical and Biological Model Systems. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 360, p. 142-148, 1998.

SILVA, A. P. C., NUNES, B. R., DE OLIVEIRA, M. C., KOESTER, L. S., MAYORGA, P., BASSANI, V. L. & TEIXEIRA, H. F. Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein. **Pharmazie** 64: 32-35, 2009.

VARGAS, B.A. ; BIDONE, J. ; OLIVEIRA, L. K. ; KOESTER, L. S. ; BASSANI, V. ; TEIXEIRA, H. F. Development of topical hydrogels containing genistein-loaded nanoemulsions. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, p. 1-7, 2012.

CAPÍTULO I

Revisão da literatura

Pele e envelhecimento cutâneo

A pele é o órgão que abrange toda a superfície do corpo fornecendo proteção contra agentes físicos, ambientais e biológicos que podem ser nocivos ao organismo (AFAK, 2011; KHAVKIN et al., 2011). A pele tem como funções o controle da temperatura corporal, a proteção contra a perda de água, a proteção contra os raios ultravioletas, a síntese de vitamina D₃, fornece vigilância imunológica e contém nervos sensoriais que servem de receptores para as mais diversas sensações (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999; KHAVKIN et al., 2011). Suas funções são mediadas principalmente pela estrutura de suas três camadas principais: epiderme, derme e hipoderme (figura 1) (NAYLOR et al., 2011).

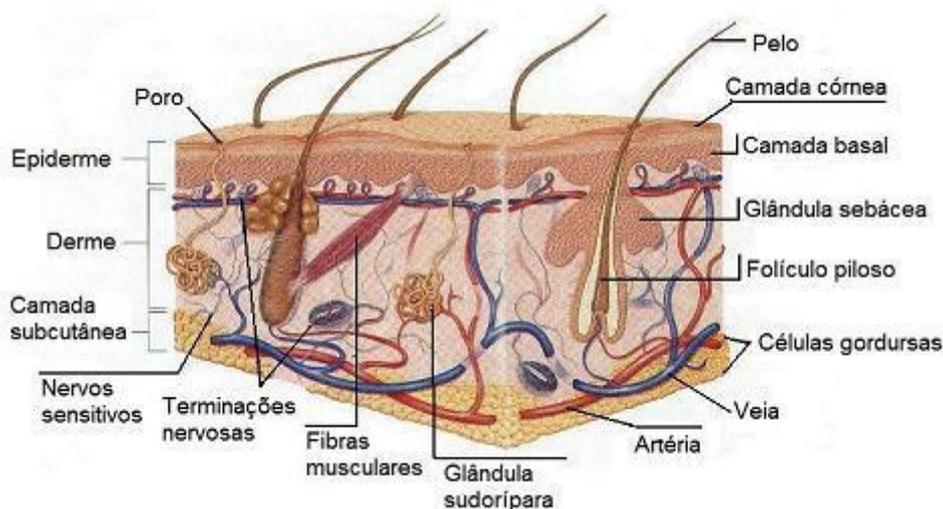


Figura 1. Estrutura da pele. Fonte: [http:// bioqdoenvelhecimento.blogspot.com](http://bioqdoenvelhecimento.blogspot.com)

A epiderme normal é um epitélio formado na sua maioria por células achatadas justapostas chamadas de queratinócitos, que se originam na camada basal e ao se deslocarem à superfície formam várias camadas morfologicamente distintas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999; KHAVKIN et al., 2011). A camada mais externa da epiderme, o estrato córneo, é composta por queratinócitos achatados que perderam seus núcleos e organelas citoplasmáticas ocasionando um caminho tortuoso para a entrada e saída de compostos e água do organismo (KHAVKIN et al., 2011). A derme é um tecido conjuntivo sob a qual se apóia a epiderme,

constituída de fibras protéicas, colágeno, fibras de elastina, vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas, órgãos sensoriais, glândulas e outros anexos como pêlos e unhas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999; KHAVKIN et al., 2011).

O envelhecimento da pele é determinado por fatores exógenos, tais como exposição contínua à radiação ultravioleta (KOHL et al., 2011; NAYLOR et al., 2011). Embora os processos de envelhecimento estejam associados com alterações fenotípicas em células cutâneas, as manifestações funcionais mais importantes do envelhecimento ocorrem como consequência da remodelação estrutural e da composição das proteínas da matriz extracelular dérmica (NAYLOR et al., 2011). A epiderme torna-se mais fina pelo estreitamento da junção dermo-epidérmica, a renovação celular diminui, a camada córnea torna-se laminar e quebradiça e ocorre a diminuição da produção de células de Langerhans, com consequente redução da defesa imune. A derme torna-se atrófica com a diminuição do número de fibroblastos, as fibras de colágeno tornam-se rígidas e as de elastina sobrecarregam-se de lipídeos e perdem a elasticidade (KHAVKIN et al., 2011; RIBEIRO, 2010). Clinicamente a pele apresenta-se flácida, seca, com rugas, sem elasticidade e pigmentação irregular (KHAVKIN et al., 2011; NAYLOR et al., 2011).

O envelhecimento extrínseco é decorrente de fatores ambientais. Cerca de 80% do envelhecimento da pele facial é atribuída à exposição crônica à radiação ultravioleta. Outros fatores incluem a poluição ambiental, fumo, abuso de álcool e a desnutrição (KOHL et al., 2011; REBELLO, 2005; RIBEIRO, 2010). A energia radiante do sol é emitida na faixa de UV, sendo dividida em UVC (200-280 nm), UVB (280-320 nm) e UVA (320-400 nm). A radiação UVC, apesar de ser extremamente prejudicial para a pele, é na sua maior parte absorvida pela camada de ozônio. UVB e UVA alcançam a terra e são capazes de causar danos às células. A radiação UVB tem um poder de penetração menor que a UVA, no entanto é mais genotóxica, alcança a epiderme e induz queimaduras, inflamação, danos ao DNA, estresse oxidativo, produção de radicais livres, imunossupressão, fotoenvelhecimento e câncer de pele (AFAQ, 2011).

Um dos mecanismos moleculares originados da ação da radiação UV é a indução direta de radicais livres e espécies reativas do metabolismo do oxigênio, intimamente ligados ao fotoenvelhecimento e carcinogênese (MIYACHI, 1995; PINNEL et al., 2003). Radicais livres ou espécies reativas de oxigênio são átomos ou moléculas com um elétron desemparelhado, presentes em vários tecidos incluindo a pele. Exemplos incluem o oxigênio singlete, o ânion superóxido, o radical peróxido, e o radical hidroxila. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é considerado um radical livre verdadeiro, mas é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas. Essas moléculas são extremamente reativas e de curta duração e são a principal causa do envelhecimento precoce devido principalmente a exposição solar (AFAQ e MUKHTAR, 2001; BIANCHI e ANTUNES, 1999; PINNEL et al., 2003).

Os diferentes sistemas do corpo humano utilizam os antioxidantes como uma maneira de lidar com o estresse oxidativo ocasionado pela luz UV e limitar as mudanças ocasionadas na pele (AFAQ e MUKHTAR, 2001; LIN et al., 2003; PINNEL et al., 2003). Os antioxidantes são responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Esses são divididos em dois grupos, enzimáticos e não enzimáticos, que interagem para fornecer proteção intra e extracelulares (BIANCHI e ANTUNES, 1999). Em relação à pele, a atividade enzimática é mais elevada na epiderme e na derme. Contudo, diversos fatores como luz solar, tabagismo, poluição, podem sobrecarregar o sistema de defesa, fazendo controles inadequados de proteção natural, resultando no dano oxidativo, tornando-se desejável a utilização exógena de moléculas com potencial antioxidante (PINNEL et al., 2003).

O envelhecimento intrínseco da pele é fortemente influenciado por mudanças hormonais. Receptores de estrogênio chamados $ER\alpha$ e $ER\beta$, estão presentes na pele, sendo que os $ER\beta$ são amplamente expressos na epiderme, vasos sanguíneos e fibroblastos dérmicos. Já nas glândulas sebáceas, a expressão dos receptores ER é semelhante. Ambos os receptores $ER\alpha$ e $ER\beta$ influenciam a regulação da ação de

estrógenos na pele (HALL e PHILLIPS, 2005; THORNTON et al., 2003). Os efeitos indesejáveis do envelhecimento cutâneo são exacerbados por níveis de estrogênio em declínio em mulheres pós-menopáusicas (HALL e PHILLIPS, 2005; KOHL et al., 2011; RIBEIRO, 2010). Vários estudos têm demonstrado que a aplicação tópica de estrogênio pode atenuar os efeitos dessa deficiência hormonal gerando efeitos benéficos na pele pelo aumento de colágeno e da espessura dérmica. Também foi relatada uma maior hidratação da pele e aumento da atividade das glândulas sebáceas (KOHL et al., 2011; PHILLIPS et al., 2001; RAINE-FENNING et al., 2003; SATOR et al., 2001; ZOUBOULIS et al., 2011).

Propriedades biológicas dos flavonóides/cumestanos

Diversas espécies vegetais produzem uma variedade de compostos de baixo peso molecular, coletivamente chamados de flavonóides, um grupo de metabolitos secundários da classe dos polifenóis (DU et al., 2010). Os flavonóides são quimicamente caracterizados por um esqueleto básico de três unidades, C6-C3-C6, contendo dois anéis aromáticos (em chalconas) que pode ser distinguido por um anel adicional no resto dos flavonóides (MARIN et al., 2006). Dentre as diversas subclasses dos flavonóides, os isoflavonóides destacam-se por seus efeitos biológicos e farmacológicos em humanos. Vários estudos demonstraram sua ação semelhante ao estrogênio, portanto, são comumente chamados de fitoestrógenos, termo este que apareceu pela primeira vez na literatura no final dos anos 80, referenciando aquelas substâncias que são estruturalmente semelhantes e produzem efeitos análogos aos hormônios estrogênicos (DIXON, 2004; MUELLER, 2002; SIMÕES et al., 2004; TAKEUCHI et al., 2009).

Dados epidemiológicos têm demonstrado o efeito protetor de dietas à base de plantas sobre várias enfermidades de caráter oncológico, cardiovascular e hormonal como síndrome pós-menopausa e osteoporose (DIÁZ-BATALLA et al., 2006; KARKOLA et al., 2009; UGARTE, 2006). Diversos estudos apontam que mulheres que consomem uma dieta rica em fitoestrógenos apresentam menor intensidade e

frequência de sintomas vasomotores, característicos do período pós-menopausa, e dos demais sintomas como fogachos e atrofia do epitélio vaginal (ADLERCREUTZ et al., 1992; DALAIS et al., 1998; MARTÍNEZ, 2006; SCAMBIA et al., 2000).

Além disso, os flavonóides apresentam em sua estrutura, substituintes capazes de doar elétrons ou hidrogênio, e apresentam baixo potencial redox, sendo capazes de reduzir radicais livres altamente oxidantes. Também inibem enzimas envolvidas com a geração de espécies reativas do oxigênio (ROS) e são capazes de ligar metais promotores de ROS. Assim, existe um grande interesse na atividade antioxidante dos flavonóides devido a sua capacidade de reduzir a formação de radicais livres evitando danos a lipídeos, proteínas e DNA que podem causar envelhecimento e várias doenças degenerativas (PIETTA et al., 2000). Dessa forma, os fitoestrógenos têm sido estudados para o desenvolvimento de formulações com atividade antioxidante, incluindo sua ação fotoprotetora quando usado topicamente na pele (PRAKASH et al., 2007; SETCHELL, 1998; SHINDE et al., 2010).

Baseado em sua estrutura química, os fitoestrógenos podem ser classificados em três principais grupos: isoflavonas, lignanos e cumestanos, e estão presentes em diversas plantas como feijão, soja, trevo vermelho, linhaça, grão de bico, brotos de alfafa e ervilha (KARKOLA et al., 2009; UGARTE, 2006). Os cumestanos são uma importante classe de produtos naturais aromáticos oxigenados que possuem em suas estruturas o anel 6H-benzofuro [3,2-c] benzopiran-6-ona. O representante mais proeminente e potente da classe, o cumestrol (figura 2).

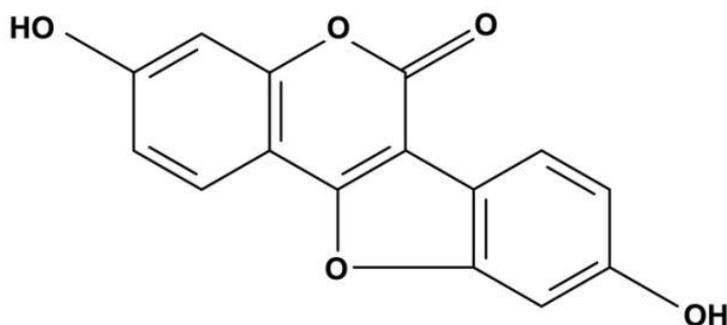


Figura 2. Estrutura química do cumestrol.

Nas plantas, o cumestrol é formado a partir da via dos fenilpropanóides: Fenilalanina - ácido p-hidroxicinâmico Co-A - 7,4'-hidroxiflavanona - daidzeína - composto intermediário - cumestrol. Esse composto foi identificado e caracterizado estruturalmente por Bickoff, em 1958. Com relação à síntese do cumestrol, ALMAHARIK e BOTTING (2004) descrevem um método rápido e fácil de ser executado, consistindo em duas etapas: condensação catalisada do acetato de fenila com cloreto de benzoila, seguido de dimetilação e ciclização intramolecular.

O cumestrol se apresenta na forma de cristais que sublimam em 325 °C e, em alto vácuo, próximo a 175 °C. Os máximos de absorção do cumestrol na região ultravioleta (em metanol) ocorrem em 208, 243 e 343 nm. Em meio alcalino forte, esse composto exibe fluorescência azul. Quanto à solubilidade, o cumestrol é praticamente insolúvel em água, em pH ácido ou neutro; pouco solúvel em água, em pH alcalino (pH 11-12); ligeiramente solúvel em metanol, clorofórmio e éter e muito levemente solúvel em tetracloreto de carbono e benzeno (THE MERCK INDEX, 1996).

As fontes vegetais de cumestrol incluem muitas frutas, grãos, sementes (feijão, ervilha, soja) e café. As maiores concentrações desse composto têm sido encontradas no trevo (*Trifolium pratense*, leguminosae – 56411 mg/Kg) e alfafa (*Medicago sativa*, Leguminosae – 1,2 mg/Kg), em particular nos brotos de alfafa em concentrações de 720 mg/Kg. Cabe ressaltar que nos casos de contaminação por fungos, a concentração de cumestrol pode ser aumentada nessas plantas (PATRI et al., 2006). No entanto, sua distribuição na alimentação humana é um pouco restrita comparado aos outros fitoestrógenos, a ingestão diária de cumestrol por mulheres nos Estados Unidos corresponde a 0,6mg/dia (WHITTEN et al., 2002).

Em relação às suas propriedades biológicas, o cumestrol apresenta propriedade antioxidante, a qual é bem relatada para o grupo dos flavonóides. A atividade antioxidante dos flavonóides se dá por suas propriedades quelantes de ferro, sequestrantes de radicais livres, por sua capacidade de inibição de enzimas

como as oxidases que são diretamente envolvidas nos processos oxidativos, como pela inibição de enzimas envolvidas indiretamente nesses processos, além de sua capacidade de aumentar a disponibilidade de antioxidantes endógenos (TRUEBA, 2003). A análise da estrutura química dos flavonóides indica que a retirada de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pode ocorrer através da presença de uma orto-hidroxilação no anel B da molécula, do número de grupos hidroxilas livre, uma ligação dupla no anel C, C2-C3, ou da presença de um grupo 3-hidroxila, sendo geralmente classificados como condições de atividade antioxidante e anti-radical (BURDA e OLESZEK, 2001).

MITCHELL e colaboradores (1998) avaliaram a atividade antioxidante de alguns fitoestrógenos, incluindo o cumestrol, e constataram que o mecanismo de ação antioxidante ocorre por meio da doação de hidrogênio/elétrons dos grupos hidroxilas fenólicas. Isso evidencia a possibilidade do cumestrol atuar como removedor de radicais livres, prevenindo danos oxidativos e até inibir o desenvolvimento de algumas doenças. Os autores relataram uma capacidade inibitória de peroxidação dezesseis vezes mais alta para os cumestanos em relação ao alfa tocoferol (antioxidante não-enzimático natural). Porém, essa potência não descarta a possibilidade de ser encontrada ação pró-antioxidante, de acordo com a concentração empregada.

BURDA e OLESZEK (2001) avaliou a habilidade de inibição da oxidação do sistema composto por β -caroteno e ácido linoléico, além da capacidade de remoção dos radicais livres 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) de vários grupos de flavonóides. Os resultados revelaram uma potente atividade antioxidante apresentada pelos flavonóis. O cumestrol, único cumestano estudado, apresentou atividade antioxidante moderada, porém maior que das outras classes de flavonóides estudadas (flavonas, flavanonas, dihidroflavonóis, isoflavonas, biflavanonas).

LEE e colaboradores (2006) avaliaram a ação inibitória da oxidação de LDL induzido por íons cobre. Para isso, foi isolada uma série de dez flavonóides de

raízes de *Glycine max*. O cumestrol apresentou potente atividade antioxidante, sendo essa pelo menos 20 vezes maior que das isoflavonas genisteína e daidzeína. Outro trabalho, realizado por BROZIC e colaboradores (2006), evidenciou uma maior atividade antioxidante para o cumestrol em relação à genisteína sobre a redução dependente de NADPH de 9,10-fenantrenequinona e progesterona. A atividade inibitória sobre 9,10-fenantrenequinona foi identificada devido a presença de hidroxilas nos carbonos 5 e 7 dos compostos testados.

Além disso, o cumestrol também apresenta atividade como agonista estrogênico, atividade importante para o envelhecimento cutâneo intrínseco. Segundo BENASSAYAG e colaboradores (2002) o 17 β -estradiol possui afinidade de ligação por ER β igual a $\frac{1}{4}$ da afinidade de ligação por ER α e o cumestrol mostrou maior afinidade por ER β que por ER α (20-30 vezes maior). KUIPER e colaboradores (1998) avaliaram a atividade estrogênica de fitoestrogênicos, incluindo o cumestrol. Utilizando concentrações de 1 a 10 nM, os autores obtiveram o seguinte ranking de potência estrogênica: 17 β -estradiol >> zearalenol = cumestrol > genisteína > daidzeína > biochanina A > quercetina para receptores ER α e 17 β -estradiol > genisteína > cumestrol > zearalenol > daidzeína > biochanina A > quercetina para receptores ER β .

Quanto a sua toxicidade, trabalhos têm sido conduzidos para determinar se a exposição ao cumestrol, durante os períodos de desenvolvimento, exerce efeitos a longo prazo sobre o sistema reprodutivo, mesmo após o término da exposição. No ovário, os estrogênios aumentam o crescimento folicular, o peso do ovário e do índice mitótico das células granulosas, e regulam a apoptose de células da camada granulosa (BENDELL e DORRINGTON, 1990; RICHARDS, 1980). Após indução de 0,1 mg de cumestrol por dia, durante 5 dias, BURROUGHS e colaboradores (1990), relataram as seguintes observações em camundongos: abertura vaginal precoce, cornificação vaginal persistente ovário-independente, ausência de corpos lúteos e folículos ovarianos hemorrágicos. Um estudo mais recente de MOON e colaboradores (2009) avaliou os efeitos no tamanho do ovário e indução de

apoptose nas células ovarianas de ratas adultas, após exposição com doses crescentes de cumestrol, administradas diariamente, durante 21 dias. Os resultados revelaram uma redução significativa do peso dos ovários após cerca de 80 dias de vida, ocorrendo um aumento da apoptose das células do tecido ovariano após 140 dias de vida.

Nanoemulsões de uso tópico

Nanoemulsões possuem uma infinidade de aplicações na área farmacêutica e cosmética e estão sendo estudadas em produtos de aplicação tópica, tais como, fotoprotetores, produtos antienvelhecimento e para tratamento de doenças de pele (BERNARDI et al., 2011). Nanoemulsões são sistemas estáveis compostos de óleos e tensoativos dispersos em água, apresentando um tamanho de partícula geralmente entre 100 e 300 nm. São sistemas adequados para incorporar moléculas de baixa hidrossolubilidade, visto que a nanoemulsão pode proporcionar um aumento da solubilidade de fármacos lipofílicos. Tais moléculas encontram-se preferencialmente no interior da gotícula de óleo e/ou adsorvidas na interface da nanoestrutura. Visualmente, as nanoemulsões apresentam-se como líquido de aspecto leitoso e pouco viscoso (FASOLO et al., 2009; FRONZA et al., 2004; HATZIANTONIOU et al., 2007; SILVA et al., 2009; TAGNE et al., 2008). Devido ao seu reduzido tamanho de gotícula e sua elevada área superficial, esses sistemas favorecem o contato de substâncias ativas com a pele, promovendo um gradiente de concentração que modula a barreira do estrato córneo controlando a penetração das substâncias (ALVES et al., 2007; FASOLO et al., 2007; FASOLO et al., 2009; JUNYAPRASERT et al., 2009).

A extensão da permeação das moléculas através da pele, o tempo, e ainda o direcionamento a sítios específicos podem ser influenciados pelas matérias primas utilizadas. O núcleo oleoso das nanoemulsões corresponde de 5 a 20% do total da formulação e o óleo a ser utilizado e a sua concentração depende da solubilidade do fármaco nestes adjuvantes. Os triglicerídeos de cadeia média (TCM), normalmente

triglicerídeo cáprico/caprílico, são os óleos mais empregados para o preparo destas dispersões. TCM são ésteres constituídos de três ácidos graxos, com 8 a 12 átomos de carbono, unidos ao glicerol, conseguem dissolver quantidades elevadas de fármacos lipossolúveis e são considerados seguros para via cutânea (FERNANDEZ et al., 2000; HATZIANTONIOU et al., 2007; PRIMO et al., 2008; RUKTANONCHAI et al., 2009; TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007).

A interface óleo/água das nanoemulsões é composta de tensoativos, que tem por principal função estabilizar fisicamente a estrutura formada (YILMAZ e BORCHERT, 2005). Lecitinas são os tensoativos mais empregados, sendo estas, misturas complexas de fosfolipídios extraídos da gema de ovo ou da soja, cujo componente majoritário é a fosfatidilcolina, são empregadas em nanoemulsões na concentração de 1 a 3% para emulsões contendo de 5 a 20% de fase interna (BENITA, 1998). Lecitinas são biocompatíveis e exibem um alto valor de potencial zeta negativo sendo capazes de prevenir a coalescência das gotículas sobre colisões aleatórias (SHIMID et al., 1993).

Em relação às técnicas de preparo, a homogeneização por alta pressão e a emulsificação espontânea são as mais utilizadas para a obtenção das dispersões. A homogeneização por alta pressão é realizada em duas etapas, onde na primeira, a fase aquosa contendo os componentes hidrofílicos e a fase oleosa contendo os lipofílicos, são aquecidas separadamente a uma temperatura de aproximadamente 70°C e então homogeneizadas com o uso de homogeneizadores de alta velocidade (como o ultraturrax e politron) obtendo-se assim, uma suspensão com diâmetro de gotículas submicrométrico. Numa segunda etapa, utiliza-se microfluidizadores ou homogeneizadores de alta pressão, aplicando-se ciclos de homogeneização com pressão e temperatura pré determinados, e o tamanho da gotícula é então reduzido a valores de 50 a 300nm. Esta técnica é amplamente utilizada na indústria, permite o preparo das formulações em larga escala, e ainda, apresenta como vantagem a não utilização de solventes orgânicos (TAGNE et al., 2008; TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007; YLMAZ E BORCHERT, 2005).

A emulsificação espontânea apresenta a vantagem de ser simples e rápida, além de possuir baixo custo e permitir o preparo de pequenas quantidades de amostra em baixa temperatura (FRONZA et al., 2004; TRAU et al., 2000), podendo evitar a degradação de fármacos termolábeis e os próprios fosfolípidos componentes da formulação (RABINOVICHGUILATT et al. 2005). Esta técnica consiste em injetar a fase oleosa solubilizada em um solvente orgânico, contínua e lentamente sobre a fase aquosa, sob agitação constante e moderada (normalmente utilizam-se agitadores magnéticos). Nesta etapa as gotículas nanométricas são formadas. Após, o solvente orgânico é removido com a utilização de rotaevaporador a uma baixa pressão e com temperatura de 40 a 70°C (FASOLO et al., 2007; PRIMO et al., 2008; SILVA et al., 2007). A formação das gotículas das nanoemulsões ocorre sempre que a fase orgânica é vertida na aquosa, pois isto causa uma turbulência interfacial durante a difusão do solvente na água, observando-se rápido espalhamento da interface, como resultado da difusão mútua entre os solventes, o que fornece energia suficiente para a formação das gotículas. Sendo assim, parâmetros como as condições de emulsificação empregada e composição das formulações podem influenciar nas propriedades físico-químicas obtidas (BOUCHEMAL et al., 2004).

As nanoemulsões apresentam tamanho de gotícula que pode variar entre 100 a 300nm com um índice de polidispersão (IP) em torno de 0,2 a 0,3, indicando uma boa distribuição das partículas na amostra e, conseqüentemente, uma boa homogeneidade destes sistemas (ALVES et al., 2007; JUNYAPRASERT et al., 2009). São parâmetros que afetam a estabilidade, a aparência, a cor, a reologia e a vida de prateleira e são afetados pela composição da formulação e pelo procedimento de emulsificação (BERNARDI et al., 2011; SILVA et al., 2007). Em relação às técnicas usadas para analisar estas propriedades, a mais empregada é a espectroscopia de correlação de fótons (PCS), também chamada de espalhamento de luz dinâmico. Outras técnicas como microscopia eletrônica de transmissão (MET), também são empregadas em complemento à PCS (HATZIANTONIOU et al., 2007; RUKTANONCHAI et al., 2009; TAGNE et al., 2008).

A carga de superfície das partículas nas nanoemulsões é um dos fatores que determinam a estabilidade destes sistemas. Valores absolutos elevados, geralmente maiores que 30mV, levam a forças de repulsão entre as gotículas evitando fenômenos de instabilidade como a cremeação, floculação e coalescência. Normalmente esta carga pode ser determinada através do potencial zeta. A sua determinação é realizada, normalmente, através de técnicas eletroforéticas específicas, por exemplo, medindo a mobilidade eletroforética das partículas em um campo elétrico (KLANG et al., 2011; MITRI et al., 2011; RUKTANONCHAI et al., 2009; TEERANACHAIDEEKUL ET al., 2007; YLMAZ E BORCHERT, et al., 2005) . O valor de potencial zeta reflete ainda, a composição da interface, além de poder estar relacionada com a concentração de fármaco na interface óleo/água (TAGNE et al., 2008).

O monitoramento do pH é importante para determinar a estabilidade destes sistemas pois é um parâmetro que afeta consideravelmente a carga de superfície, afetando também o tamanho das gotículas (BERNARDI et al., 2011; YILMAZ e BORCHERT, 2005).

Em relação à viscosidade, este é um parâmetro de grande importância para o desenvolvimento de formulações de uso tópico, uma vez que, produtos dermatológicos e cosméticos devem apresentar uma viscosidade adequada à aplicação sobre a pele, não obstante, a determinação da viscosidade também é indicativa da estabilidade física das formulações (PRINDERRE et al., 1998).

As nanoemulsões apresentam-se como líquido leitoso, pouco viscoso, com viscosidade normalmente compreendida entre 1,5 a 2cP e fluxo newtoniano, desfavorável ao uso tópico. A sua determinação comumente é realizada por viscosímetro capilar (ALVES et al., 2005; FASOLO et al., 2007; SAKULKU et al., 2009; SILVA et al., 2009). A viscosidade é influenciada pela composição das nanoemulsões, principalmente pela viscosidade do óleo formador do núcleo oleoso, e por parâmetros como a concentração da fase interna e o diâmetro de gotícula

(CHUNG et al., 2001; JUMMA et al., 1998; SILVA et al., 2006). Para adequar as formulações ao uso tópico, a preparação de nanoemulsões espessadas com polímeros tem sido descrita em diversos estudos. As nanoemulsões depois de espessadas normalmente apresentam-se como fluido não-newtoniano e ainda com comportamento plástico ou pseudo-plástico tornando-se ideais para aplicação tópica. Entre os polímeros utilizados para esse fim, os carbômeros (como o Carbolpol 940[®]) são frequentemente descritos (ALVES et al., 2005; SCHWARZ et al., 1996; YILMAZ & BORCHERT, 2005; YILMAZ & BORCHERT et al., 2006).

Carbômeros são polímeros sintéticos aniônicos hidrossolúveis de elevado peso molecular de ácido acrílico reticulado com ésteres alílicos de sacarose e/ou pentaeritrol. A viscosidade desses polímeros depende de sua composição, e são utilizados como agentes geleificantes em concentrações de 0,5 a 2,0% em água, estando presente numa ampla variedade de formas farmacêuticas, incluindo comprimidos de liberação controlada, suspensões orais e géis tópicos (ALLEN et al., 2007; HOWE et al., 2009). Apresentam-se como pó branco que se dispersam facilmente em água, originando soluções ácidas. As dispersões são preparadas pela simples adição de água ao pó, devendo-se agitar moderadamente durante toda a operação. Os principais mecanismos que envolvem a geleificação destas moléculas estão ligados à ionização dos grupamentos carboxílicos, através da neutralização com álcalis, com conseqüente repulsão de cargas e estiramento das cadeias poliméricas, formando a matriz tridimensional. Em se tratando de uma resina aniônica, pode-se inferir que a estabilidade é diretamente afetada pelo pH e eletrólitos (PRISTA et al., 2003). São descritas na USP vários tipos de carbômeros (910, 934, 934P, 940 e 1342), com ampla faixa de viscosidade. O carbômero 940 forma géis (hidroalcóolicos ou aquosos) transparentes e brilhantes. É o mais eficiente de todas as resinas carbopol e possui propriedades reológicas adequadas (ALLEN et al., 2007).

Recentemente, a quitosana, um copolímero derivado da quitina (polissacarídeo encontrado em crustáceos, insetos e certos fungos), tem recebido

grande atenção devida sua vasta aplicação nas mais diversas áreas. Sua aplicabilidade está aliada ao fato de ser biodegradável, biocompatível, não tóxica e ser derivada de fontes naturais abundantes. Na área farmacêutica tem sido investigada em inúmeras formulações e já é bastante usada em cosméticos, formando géis mucoadesivos. A molécula de quitosana é composta de unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glicose(glicosamina) e 2-acetoamido-2-deoxi-D-glicose sendo obtida por desacetilação da quitina (DASH et al., 2011). A quitosana apresenta natureza catiônica e é comercializada em vários tipos de graus de desacetilação e peso molecular. O grau de desacetilação necessário para obter produtos solúveis deve ser maior que 80-85%. Em solução (pH < 6,5) apresenta uma densidade elevada de carga positiva em seus grupos amino e ocorre uma repulsão entre as unidades desacetiladas e grupamentos vizinhos de glucosamina promovendo o entumescimento. A viscosidade é influenciada pela concentração de quitosana, temperatura e grau de desacetilação, sendo a concentração usual 2 a 6% (HOWE et al., 2009). Tem sido relatada a capacidade da quitosana em promover a abertura das *tight junctions* entre as células epiteliais (WU et al., 2007), mecanismo que poderia promover a penetração de moléculas através da pele (CONTRI et al., 2011).

Derivados de celulose solúveis em água como hidroxietil celulose (HEC), são utilizados em formulações farmacêuticas, como espessantes em produtos alimentares, e em cosméticos (KASTNER et al., 1996). São disponíveis em diferentes graus de substituição dos hidrogênios da celulose por grupamentos poli (hidroxietil) éteres que influenciam a viscosidade das preparações. É um polímero não iônico que forma géis através da hidratação e intumescimento do polímero, dispersando-se o pó em água com agitação e temperatura controlada (20 a 25°C). A concentração utilizada na formulação depende do tipo de solvente e do peso molecular do grau usado, normalmente para uso como agente de incremento de viscosidade em cosméticos utiliza-se de 1 a 10%, sendo o uso comum de 2%. Por ser um material não tóxico e não irritante, além de não iônico, seu uso apresenta vantagens e interesse em formulações tópicas (HOWE et al., 2009).

Reologia

A palavra reologia é derivada do vocabulário grego, que significa “deformação ou fluxo” (*rheo*) e “ciência ou estudo” (*logos*) e foi criada por Bingham e Crawford em 1929. De maneira geral, pode ser definida como a ciência que estuda o comportamento de fluidez da matéria e sua deformação. Na área farmacêutica, classifica e caracteriza líquidos, sólidos e semi-sólidos. A reologia dos materiais na área farmacêutica/cosmética é fundamental, visto que, influencia cada passo do desenvolvimento, como a mistura, a embalagem e a estabilidade, bem como à escolha correta dos equipamentos a serem usados na sua produção, além de preencher parâmetros de aceitabilidade por parte do paciente. As características reológicas de um produto de uso tópico, usualmente são avaliadas pelo toque, no entanto, cada produto deve apresentar consistência adequada à sua finalidade e sua fabricação na indústria deve ser reprodutível, pois tais características também afetam os perfis de liberação dos fármacos estando associadas a aspectos de absorção e biodisponibilidade (ALVES, 2006; AULTON et al., 2005; LEE et al., 2009; MARTIN et al., 2008; NETZ E ORTEGA, 2002; WARD et al., 1974).

A reologia abrange diferentes propriedades associadas à deformação da matéria, entre as quais estão a extrusibilidade, compressibilidade, ductibilidade, espalhabilidade, elasticidade, fluidez e viscosidade. A viscosidade representa a resistência ao fluxo e ao movimento e sua recíproca é denominada fluidez. A viscosidade de um fluido varia com a tensão de cisalhamento e sua consistência depende da duração e da taxa de cisalhamento. A taxa de cisalhamento indica a velocidade com que o líquido escoar quando uma determinada força é aplicada, a esta força chamamos tensão de cisalhamento. Quando se classificam os materiais segundo os tipos de fluxo e de deformação, é usual descrevê-los em uma das seguintes categorias: sistemas newtonianos ou não-newtonianos, dependendo se as propriedades de fluxo seguem ou não a lei do fluxo de Newton (ALVES, 2006; AULTON et al., 2005; LEE et al., 2009; MARTIN et al., 2008; NETZ E ORTEGA, 2002).

Segundo a lei de Newton, a velocidade do fluxo (γ) é diretamente proporcional à tensão aplicada (σ), a constante de proporcionalidade é o coeficiente de viscosidade dinâmica (η), ou simplesmente, viscosidade, podendo ser expressa por: $\sigma = \eta\gamma$. Sistemas newtonianos obedecem a esta lei, ou seja, apresentam viscosidade constante independente da taxa de cisalhamento. A representação gráfica da relação entre a tensão de cisalhamento (σ) e a taxa de cisalhamento (γ), denominado *reograma*, gera uma reta onde a inclinação é a viscosidade (η). A unidade de viscosidade é o *poise*, definido como a força de cisalhamento requerida para produzir uma velocidade de $1 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ entre dois planos paralelos de líquido, de 1 cm^2 de área, separados por uma distância de 1 cm. Na prática, a maioria dos trabalhos utiliza a unidade *centipoise* cp ($1 \text{ cp} = 0,01 \text{ poise}$) (AULTON et al., 2005; MARTIN et al., 2008; NETZ e ORTEGA, 2002).

No entanto, a maioria dos fluidos farmacêuticos não obedecem a Lei de Newton, pois a viscosidade do fluído varia com a velocidade de cisalhamento. A razão para esses desvios é que os fluídos de interesses não são fluídos simples como a água ou xarope, mas sistemas coloidais ou dispersos, incluindo emulsões, suspensões e géis (AULTON et al., 2005). Os sistemas não-newtonianos podem assumir vários comportamentos e serem classificados em plásticos, pseudoplásticos e dilatantes. O fluxo plástico não se inicia até que a força correspondente a certo valor seja aplicada. A curva de fluxo plástico não passa pela origem, mas faz intersecção com o eixo da força de cisalhamento em um ponto chamado de valor de cedência (*yield value*). Este tipo de fluxo está associado à presença de partículas floculadas em suspensões concentradas. Materiais pseudoplásticos não apresentam o valor de cedência, portanto apresentam fluxo logo que uma força é aplicada. Com o aumento da força de cisalhamento, a velocidade de cisalhamento aumenta e a inclinação da curva diminui gradualmente com o aumento da velocidade de cisalhamento. Este tipo de comportamento é fácil de ser encontrado em dispersões de colóides hidrofílicos no estado de sol, como metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose e ácido poliacrílico. Várias formulações farmacêuticas e cosméticas apresentam este comportamento, especialmente géis, emulsões e

suspensões constituídas com partículas de diâmetros inferiores a $1\mu\text{m}$ (ALVES, 2006). Materiais dilatantes são aqueles em que o volume aumenta quando submetidos ao atrito, e a viscosidade aumenta com o aumento da velocidade de cisalhamento. Este comportamento é típico de pastas e de certas suspensões e unguentos contendo elevado percentual de sólidos insolúveis suspensos (ALLEN et al., 2007; AULTON et al. 2005; MARTIN et al., 2008; NETZ E ORTEGA, 2002).

Uma propriedade importante em formas farmacêuticas líquidas e semi-sólidas que permite obter um medicamento mais consistente quando em repouso, mas de elevada fluidez quando agitado, é a tixotropia. Tixotropia trata-se de uma transformação gel-sol reversível. Quando em repouso, uma rede de gel se forma, fornecendo uma matriz rígida que estabiliza suspensões e géis, já quando submetida a uma força (pela agitação), a matriz relaxa e forma um sol, sendo que essa quebra da estrutura não se reestrutura de imediato após a remoção ou diminuição da tensão de cisalhamento e assim apresenta as características de uma forma farmacêutica líquida e de fácil administração. Antitixotropia ou tixotropia negativa não devem ser confundidos com dilatância ou reopexia. Reopexia é o fenômeno pelo qual um sólido forma mais facilmente um gel se agitado suavemente ou cisalhado de outra forma, do que se deixado em repouso. Sistemas dilatantes são defloculados e normalmente contêm mais de 50% (v/v) de fase sólida, enquanto que os sistemas antitixotrópicos contêm baixo conteúdo de sólidos (1 a 10%) e são flocculados. Em um sistema reopéxico o gel representa a forma em equilíbrio, enquanto que na antitixotropia, é o sol o estado de equilíbrio (ALLEN et al., 2007; AULTON et al., 2005; MARTIN et al., 2008; NETZ E ORTEGA, 2002).

Existem vários instrumentos de medida das viscosidades e estes devem ser selecionados com cuidado devido à ampla variedade de comportamentos reológicos dos sistemas não-newtonianos. O viscosímetro capilar, também conhecido como viscosímetro de Ostwald, que é um instrumento com velocidade de cisalhamento simples, apropriados para materiais newtonianos, e mede o tempo necessário para um líquido passar entre duas marcas enquanto flui, pela ação da gravidade, através

de um tubo capilar vertical. O tempo de fluxo do líquido analisado é comparado com o tempo requerido por um líquido, cuja viscosidade é conhecida (geralmente água), para passar pelas duas marcas. Já para ambos os sistemas, newtonianos e não-newtonianos é comum encontrar a utilização de viscosímetros rotatórios ou reômetros. O princípio da medição deste tipo de viscosímetro baseia-se na resistência ao fluxo observada quando um corpo rotatório, geralmente cilíndrico, gira imerso no líquido ou semi-sólido. A maior vantagem desses instrumentos é a ampla faixa de velocidades de cisalhamento que podem ser obtidas. Um exemplo é o Viscosímetro Brookfield, que é um viscosímetro rotatório e que pode possuir vários *spindles* (corpos rotatórios) de diversas geometrias. Este tipo de viscosímetro é bastante popular em laboratórios de controle de qualidade de produtos farmacêuticos e permite obter dados reológicos científicos para líquidos newtonianos e não-newtonianos, assim como medições empíricas de viscosidade de pastas e de outros materiais semi-sólidos (AULTON et al., 2005; MARTIN et al., 2008; NETZ E ORTEGA, 2002).

Permeação/retenção cutânea

A propriedade de barreira da pele é baseada principalmente na camada mais externa da epiderme, chamada estrato córneo. O estrato córneo apresenta como papel fisiológico a hidratação cutânea, a proteção do meio interno, a proteção contra agentes externos, a permeabilidade seletiva aos agentes externos, entre outros. É uma região complexa, rica em lipídios como ceramidas, colesterol, ésteres de colesterol, ácidos graxos e uma pequena fração de sulfato de colesterol em forma de bicamadas que cercam os corneócitos (FERNANDEZ et al., 2000; FOLDVARI, 2000). Sendo assim, regiões hidrofílicas e lipofílicas são encontradas no interior desta matriz tornando o estrato córneo a principal barreira na absorção percutânea de fármacos aplicados topicamente (ALVES et al., 2007; SHAH, 1994; YLMAZ & BORCHERT, 2006).

A penetração de fármacos através da pele, nas diferentes camadas, pode ser descrita pelas leis da difusão e a partição do fármaco na interface formada entre a formulação e a camada córnea, sendo este um determinante físico dominante no controle da absorção (HADGRAFT et al., 2005). Durante a difusão de moléculas pelo estrato córneo, há dois caminhos que podem ser identificados: a rota lipídica intercelular entre os corneócitos e a rota através dos corneócitos e dos lipídios. Sendo que, a principal via de permeação cutânea é a intercelular. Dessa forma, a substância permeante difundirá obrigatoriamente pela matriz lipídica, reconhecida como a maior determinante do transporte percutâneo (ILLEL, 1997; POTTS e GUY, 1992).

A integridade do estrato córneo, a idade da pele, o fluxo sanguíneo, o metabolismo, as características físico-químicas das substâncias ativas, como pH, viscosidade, grau de lipofilia e coeficiente de partição, além do veículo e da forma farmacêutica ou cosmética também influenciam a penetração/absorção (AULTON, 2005). A penetração e a permeação de diferentes componentes ativos de baixa absorção podem ser aumentadas através de algumas alternativas como a adição de promotores específicos na formulação ou, como correntemente relatadas nos últimos anos, o uso de sistemas de liberação como as nanoemulsões. A inclusão de promotores químicos, usualmente solventes orgânicos, é geralmente associados à irritação, toxicidade e sensibilização da pele (RABINOVICHGUILATT et al., 2004).

Sendo assim, nanoemulsões têm sido amplamente descritas como um veículo para a liberação de fármacos pouco hidrossolúveis na pele, para vários fins, como por exemplo, tendo efeito na superfície (protetores solares, cosméticos e antiinflamatórios), efeito cutâneo (corticoesteroides) e efeito sistêmico (antiinflamatórios não esteroidais) (JUNYAPRASERT et al., 2009). Tais sistemas podem representar uma estratégia para a redução da toxicidade sistêmica, reduzindo efeitos colaterais de diversos fármacos potentes (YLMAZ & BORCHERT, 2006), e, ao mesmo tempo, restringindo os efeitos desejados para tecidos específicos

(BONINA et al., 1995). Além disso, podem aumentar a taxa de permeação na pele e melhorar a ação tópica devido a sua associação com a superfície da pele e ao pequeno tamanho de partícula, prolongando o tempo de permanência devido à sua grande área superficial e à baixa tensão superficial das gotículas de óleo (FASOLO et al., 2007; SILVA et al., 2007; SILVA et al., 2009).

As propriedades físico-químicas das nanoemulsões formadas, como diâmetro de partícula, carga de superfície, tensão superficial e viscosidade, podem exercer influência na velocidade e extensão da permeação na pele (BENITA, 1999). O seu reduzido diâmetro de gotícula apresenta-se como vantagem em relação aos sistemas convencionais de uso tópico, pois permite a aplicação de um depósito uniforme na pele resultando numa elevada superfície de contato do sistema com este órgão.

A quantificação dos fármacos e das moléculas que se difundem das nanoemulsões até a superfície cutânea, conseqüentemente sofrem partição e absorção nas camadas da pele, pode ser obtida através de algumas técnicas, sendo que a mais corrente usada é a difusão em células de Franz (ALVES et al., 2007; FASOLO et al., 2007; SILVA et al., 2007; SILVA et al., 2009). Difusão em células de Franz é um método *in vitro* para avaliação da absorção percutânea de fármacos e moléculas. Nestes estudos, normalmente utiliza-se a pele de orelha suína por esta ser semelhante à pele humana quanto à composição lipídica, permeabilidade e coeficiente de partição.

A formulação é colocada no compartimento doador e permanece diretamente em contato com a pele (estrato córneo). A pele separa o compartimento doador do receptor. No compartimento receptor é colocado um fluido receptor que normalmente é uma solução fisiológica na qual a substância teste é solúvel a fim de garantir condição *sink*. Esta solução é mantida sob agitação, normalmente com o uso de agitadores magnéticos a 700rpm, e aquecimento (~37°C). As coletas são realizadas a partir do fluido receptor em tempos pré-determinados para a quantificação da amostra que normalmente é feita por cromatografia líquida de alta

eficiência (HPLC). O meio do compartimento receptor é sempre repostado após a coleta (WHO, 2005). Técnicas complementares podem ser realizadas para a quantificação das substâncias ativas na pele como, por exemplo, o *tape-stripping*, em que se utiliza fitas adesivas para separar o estrato córneo da epiderme e avaliar a quantidade de substância presente na fita (referente à quantidade que permaneceu no estrato córneo) através de técnicas de doseamento (ALVES et al., 2007; PRIMO et al., 2008). A homogeneização de tecido em solvente apropriado também é outra técnica utilizada para quantificação de ativos na derme e epiderme (FANG et al., 2004; PRIMO, et al., 2008).

Além dos estudos com permeação em pele, esse dispositivo é utilizado na avaliação do perfil de liberação de fármacos a partir de formas farmacêuticas tópicas através de membranas sintéticas, como as de celulose. Os experimentos com membranas sintéticas são realizados com o intuito de apresentar indicativos da avaliação da difusão de fármacos, fornecendo modelos úteis para avaliação da absorção cutânea (OECD, 2004). Teeranachaideekul e colaboradores (2007) realizaram esta técnica para nanoemulsão contendo 3,4% de coenzima Q10, 7,6% de mygliol® como núcleo oleoso e 1,8% de tego® care 450 como tensoativo. O volume da fase receptora foi de 6,0ml e era constituído de solução aquosa com 5% de labrasol pH 5 agitado por barra magnética (700rpm). Amostras de 100µL da nanoemulsão foram colocada no compartimento doador sobre a membrana. Amostras de 500µL foram coletadas em tempos pré-estabelecidos por 24h e analisadas por HPLC. Os resultados indicaram uma liberação de aproximadamente 550 µg/cm² de coenzima Q10 da nanoemulsão, valor este relativamente maior do que para outras formulações testadas por este mesmo grupo contendo carreadores lipídicos nanoestruturados.

FERNANDEZ e colaboradores (2000) compararam o perfil de permeação cutânea *in vitro* da benzofenona-3 incorporada em três formulações, sendo duas emulsões convencionais e uma nanoemulsão composta pelos óleos TCM e óleo de coco e pelos estabilizantes: estearato de sorbitano, monooleato de sorbitano e ou

sepigel. Os resultados demonstraram que a nanoemulsão aumentou mais de três vezes a concentração de benzofenona-3 na pele após 8h de experimento, em comparação com as outras formulações. Logo, neste estudo, as nanoestruturas lipídicas atuaram como promotores de permeação cutânea da benzofenona-3.

RUKTANONCHAI e colaboradores (2009) realizaram estudo de permeação *in vitro* do ácido alfa lipóico (1%), um antioxidante, incorporado em nanoemulsão contendo 9% de migliol como núcleo oleoso e 2,5% de pluronic® f68 como tensoativo. Para avaliar a quantidade de ácido alfa lipóico liberado da formulação foi utilizado como fluido receptor (14mL) uma solução aquosa de tampão fosfato (PBS) pH 5,5 e 20% de etanol e mantido sob agitação (700 rpm) com barra magnética. Amostras de 1g da formulação foram colocadas sobre uma membrana de ultrafiltração. Alíquotas de 0,5ml foram coletadas em tempos pré-estabelecidos. As amostras coletadas foram analisadas por HPLC. Os resultados mostraram que em até 72h foi liberado 62% de ácido alfa lipóico da nanoemulsão, duas a três vezes mais do que quando comparado com outras formulações testadas por este mesmo grupo (nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados).

SILVA e colaboradores (2009) desenvolveram nanoemulsões contendo 0,1% de genisteína incorporada em 8% de TCM ou ODD e 2% de lecitina de ovo como tensoativo. A permeabilidade percutânea das nanoemulsões foi avaliada utilizando células de difusão de Franz. Solução metanólica (50% v/v) foi utilizada como fluido receptor. O reservatório volátil (acetona) e as nanoemulsões foram testadas na concentração de 1mg de genisteína, no compartimento doador. O experimento foi mantido em temperatura de 37°C por 8h. Alíquotas de 2,0ml foram coletadas em tempos pré-determinados e analisadas por CLAE. Após 8 h, a quantidade total de genisteína permeada a partir do reservatório volátil foi de aproximadamente 60 mg/cm² com um fluxo de 13 mg/cm²/h. Independente do núcleo oleoso testado a permeação na pele da genisteína a partir de nanoemulsão foi mais lenta do que a partir da acetona (permeabilidade intrínseca). A incorporação de genisteína em nanoemulsões parece reduzir o valor de fluxo da mesma na pele, isto que pode ser

atribuído as interações entre a genisteína e o fosfolípido da lecitina de ovo da formulação. Os resultados também mostraram que a permeação através da pele da genisteína incorporada em ODD foi maior que a incorporada em TCM ($21\text{mg}/\text{cm}^2$ e $15\text{mg}/\text{cm}^2$, respectivamente), de fato o valor de fluxo foi 1,4 vezes maior para a nanoemulsão com ODD. Em continuidade, recentemente, VARGAS e colaboradores (2012) demonstrou a retenção preferencial da genisteína na epiderme de orelha suína, em comparação com o estrato córneo e derme. Uma menor permeação e maior retenção da genisteína foi observada para as formulações constituídas de um núcleo de triglicerídeos de cadeia média quando comparado com octildodecanol. Além disso, foi observado que a dispersão das nanoemulsões em hidrogéis de carbopol[®] conduz a um aumento significativo da retenção da genisteína na epiderme, sugerido pelo espessamento da epiderme observados nos cortes histológicos.

FASOLO e colaboradores (2009) desenvolveram nanoemulsões contendo outros flavonóides, quercetina (Q) e 3-O-metilquercetina (MQ), compostas de ODD como fase oleosa e lecitina de ovo como tensoativo além da inclusão de brometo de cetiltrimetilamonio (CTAB) como tensoativo juntamente com a lecitina para as nanoemulsões carregadas positivamente, e então avaliaram o perfil de permeação destas moléculas na pele através da utilização de células de Franz. Para este ensaio utilizou-se pele de orelha de suína, a qual foi hidratada com tampão fosfato pH 7,4 por 12h a 37°C , após a solução no compartimento receptor foi substituída por uma solução hidroetanólica (50%, v/v). As amostras de nanoemulsão foram colocadas no compartimento doador e continham uma concentração teórica dos flavonóides de 1,0mg. O fluido receptor foi mantido a 37°C e sob agitação durante o experimento (8h), e as amostras foram coletadas em tempos pré-determinados e analisadas por HPLC. Os resultados indicaram que, independente da formulação a permeação da Q e MQ é reduzida, e estas moléculas acumularam-se na pele, e que a permeação dos flavonóides a partir de nanoemulsão carregada positivamente apresentou um aumento significativo em relação a nanoemulsão carregada negativamente.

ARGENTA e colaboradores (2011) desenvolveram nanoemulsões contendo cumestrol incorporado em 8% de TCM e uma mistura de 2% de lecitina de ovo mais 1% de polissorbato 80 como tensoativo, através do procedimento de emulsificação espontânea. Essas formulações apresentaram-se monodispersas com diâmetro médio de partícula entre 200-300nm. As nanoemulsões foram incorporadas em hidroxietilcelulose e estudos de permeação/retenção cutânea foram realizados utilizando células de difusão de Franz e pele de orelha suína. O fluido receptor (etanol:PBS 50:50) foi mantido a 37°C sob agitação. Cerca de 500 mg de coumestrol associado às nanoemulsões foram colocados no compartimento doador, contendo ou não hidroxietilcelulose. Amostras de 1 mL foram retiradas em intervalos pré-estabelecidos, e o mesmo volume de fluido do compartimento receptor retirado foi adicionado para manter um volume constante. No final do experimento, a pele foi retirada da célula e limpa com um cotonete. A epiderme foi separada da derme submergindo fatias de pele em água aquecida a 60 ° C por 45 segundos, em seguida, usando um bisturi. A derme foi cortada em pedaços pequenos e as camadas foram pesadas e colocadas em tubo de ensaio. Em seguida, coumestrol foi extraído usando 5 mL de metanol e, posteriormente, as amostras foram submetidas a ultra-som por 30 minutos. A quantidade de coumestrol permeado e retido nas camadas da pele foram determinados por CLAE. Coumestrol foi detectado preferencialmente na epiderme, além disso, a dispersão das nanoemulsões em hidroxietilcelulose conduziu a um aumento significativo do coumestrol nas camadas da pele em especial na epiderme, sugerindo que o efeito oclusivo da nanoemulsão espessada poderia gerar uma hidratação da pele o que favoreceria a retenção do coumestrol nas camadas da pele.

REFERÊNCIAS

- ADLERCREUTZ, H.; GORBACH, S.; GOLDIN, B. Dietary phyto-oestrogens and the menopause in Japan. **Lancet**, v. 339, p.1233, 1992.
- ALLEN, L. V. Jr.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8° ed, São Paulo: Artmed, 775 p, 2007.

AL-MAHARIK, N.; BOTTING, N. P. A new short synthesis of coumestrol and its application for the synthesis of [6,6a-11a -13 C3] coumestrol. **Tetrahedron**, v. 60, p. 1637-42, 2004.

ALVES, M. P. formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea *in vitro*. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2006.

ALVES, M. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Pharmazie**, v. 60, p. 900-904, 2005.

ALVES, M. P.; SCARRONE, A. L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215-220, 2007.

AFAQ, F., & MUKHTAR, H. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** v. 63, p. 61–69, 2001.

AFAQ, F. Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 508, p. 144-151, 2011.

ARGENTA, D. F. Nanoemulsões de uso tópico contendo cumestrol: estudos de formulação e permeação cutânea. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2011.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2005. Cap. 33. p. 504-536.

BENASSAYAG, C.; PERROT-APPLANAT, M.; FERRE, F. Phytoestrogens as modulator of steroid action in target cells. **Journal of Chromatography B**, v. 777, p. 233-48, 2002.

BENDELL, J.J.; DORRINGTON, J. Estradiol-17 beta stimulates DNA synthesis in rat granulosa cells: action mediated by transforming growth factor-beta. **Endocrinology**, v. 5, p. 2663-2665, 1990.

BENITA, S. **Submicron Emulsion in Drug Targeting and Delivery**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 340, 1998.

BERNARDI, D. S.; PEREIRA, T. A.; MACIEL, N. R.; BORTOLOTO, J.; VIERA, G. Y. S.; OLIVEIRA, G. C.; ROCHA-FILHO, P. A. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. **Journal of Nanobiotechnology** 9:44, 2011.

BIANCHI, M. L. P., & ANTUNES, L. M. G. (1999) **Rev. Nutr., Campinas** v. 12(2), p. 123-130, 1999.

- BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International journal of pharmaceutics**, v. 280, p. 241-251, 2004.
- BROZIC, P.; SMUC, T.; GOBEC, S.; RIZNER, T. L. Phytoestrogens as inhibitors of the human progesterone metabolizing enzyme AKR1C1. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 259, p. 30-42, 2006.
- BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.6, p.49, 2001.
- BURROUGHS, C.D.; MILLS, K.T.; BERN, H.A. Reproductive abnormalities in female mice exposed neonatally to various doses of coumestrol. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 2, p. 105-22, 1990.
- CHUNG, H.; KIM, T. W.; KWON, M.; KWON, I. C.; JEONG, S.Y. Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsion as drug or gene delivery system. **Journal of Controlled Release**, v. 71, p. 339-350, 2001.
- CONTRI, R.V.; KATZER, T.; POHLMANN, A. R. chitosan hydrogel containing capsaicinoids-loaded nanocapsules: an innovative formulation for topical delivery. **Soft Materials**, v. 8(4), p. 370–385, 2010.
- DALAIS, F. S.; RICE, G. E.; WAHLQVIST, M. L.; GREHAN, M.; MURKIES, A. L.; MEDLEY, G.; AYTON, R.; STRAUSS, B. J. Effects of dietary phytoestrogens in postmenopausal women. *Climacteric*, v. 1, p. 124-129, 1998.
- DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITEB, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science** v. 36, p. 981–1014, 2011.
- DIÁAZ-BATALLA, L.; WIDHOLM, J. M.; FAHEY, G. C.; EDUARDO CASTANO-TOSTADO, E.; PAREDES-LOPEZ, O. Chemical Components with Health Implications in Wild and Cultivated Mexican Common Bean Seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). **J. Agric. Food Chem.** v. 54, p. 2045-2052, 2006.
- DIXON, R. A. Phytoestrogens. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 55, p.225–61, 2004.
- DU, H.; HUANG, Y.; TANG, Y. Genetic and metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 86, p. 1293-1312, 2010.
- FANG, J-Y.; LEU, Y-L; CHANG, C-C. Lipid nano/submicron emulsions as vehicles for topical flurbiprofen delivery. **Drug Delivery**, v.11, p. 97-105, 2004.
- FASOLO, D.; LIEGE, S.; HOLZSCHUH, M.; BASSANI, V.; TEIXEIRA, H. Validation of an isocratic LC method for determination of quercetin and methylquercetin in topical nanoemulsions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 1174-1177, 2007.
- FASOLO, D.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. Development of topical nanoemulsions containing quercetin and 3-O-methylquercetin. **Pharmazie**, v. 64, p. 726-730, 2009.

- FERNANDEZ, C.; MARTI-MESTRES, G.; RAMOS, J.; MAILLOLS, H. LC analysis of benzophenone-3: II application to determination of in vitro and in vivo skin penetration from solvents, coarse and submicron emulsions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 155-165, 2000.
- FOLDVARI M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v.12, p. 417-425, 2000.
- FRONZA, T., CAMPOS, A., TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, n. 4, p. 558-556, 2004.
- HADGRAFT, J.; LANE, M.E. Skin permeation: the years of enlightenment. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 305, p. 2-12, 2005.
- HALL, G; PHILLIPS, T. J. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 53, p. 555-68, 2005.
- HATZIANTONIOU , S.; DELI , G.; NIKAS , Y.; DEMETZOS, C.; PAPAIOANNOU G. Scanning electron microscopy study on nanoemulsions and solid lipid nanoparticles containing high amounts of ceramides. **Microscopy in Nanobiotechnology**, v. 38, p. 819-823, 2007.
- HOWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 6 ed. London: Pharmaceutical Press, 2009.
- ILLEL B. Formulation for transfollicular drug administration: some recent advances. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.14, p.207-219, 1997.
- JUMMA, M.; MULLER, B.W. Physicochemical properties of chitosan-lipid emulsions and their stability of parenteral fat emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 163, p. 81-89, 1998.
- JUNQUEIRA, L. C.; & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 9 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, cap.18, p. 303-314, 1999.
- JUNYAPRASERT, V. B.; TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E. B.; BOONME, P. e MÜLLER, R. H. Q10-loaded NLC versus nanoemulsions: stability, rheology and in vitro skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, p. 207-214, 2009.
- KARKOLA, S.; WÄHÄLÄ, K. The binding of lignans, flavonoids and coumestrol to CYP450 aromatase: A molecular modelling study. **Molecular and Cellular Endocrinology**, V. 301, p. 235–244, 2009.
- KASTNER, U.; HOFFMANN, H.; DONGES, R.; EHRLER, R. Interactions between modified hydroxyethyl cellulose (HEC) and surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects** V. 112, P. 209-225, 1996.
- KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. **Facial Plast Surg Clin N Am** v.19, p.229–234, 2011.

- KOHL, E.; STEINBAUER, J.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R.-M. Skin ageing. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 25, p. 873-884, 2011.
- KLANG, V.; MATSKO, N.; RAUPASH, K.; EL-HAGIN, N.; VALENTA, C. Development of sucrose stearate-based nanoemulsions and optimisation through α -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v.79, p.58–67, 2011.
- KUIPER, G. J. M.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; CORTON, J. C.; SAFE, S. H.; SAAG, P. T.; BURG, B.; GUSTAFSSON, J. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β . **Endocrinology**, v. 139, p. 4252-4263, 1998.
- LEE, J. H.; LEE, B. W.; KIM, J. H.; JEONG, T. S.; KIM, M. J.; LEE, W. S.; PARK, K. H. LDL-Antioxidant Pterocarpanes from Roots of *Glycine max* (L.) Merr. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2057-2063, 2006.
- LEE, C. H.; MOTURI, V.; LEE, Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. **Journal of Controlled Release** v. 136, p. 88–98, 2009.
- LIN, J.-Y., SELIM, M. A., SHEA, C. R., GRICHNIK, J. M., OMAR, M. M., MONTEIRO-RIVIERE, N. A., AND PINNELL, S. R. **J am acad dermatol** 48:6, 2003.
- MARIN, F. R.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A.; SOLER-RIVAS, C. Isoflavones as functional food components. **Studies in Natural Products Chemistry**, v.32, 2006.
- MARTIN, A.N.; BUSTAMANTE, P.; CHUN, A.H.C. **Físico-farmácia e ciências farmacêuticas** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008
- MIYACHI, Y. Photoaging from an oxidative standpoint. **Journal of Dermatological Science** 9: 79-86, 1995.
- MITCHELL, J. H.; GARDNER, P. T.; MCPHAIL, D. B.; MORRICE, P. C.; COLLINS, A. R.; DUTHIE, G. G. Antioxidant Efficacy of Phytoestrogens in Chemical and Biological Model Systems, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 360, p. 142–148, 1998.
- MOON, H.J.; SEOK, J. H.; KIM, S. S.; RHEE, G. S.; LEE, R.; YANG, J. Y.; CHAE, S. Y.; KIM, S. H.; KIM, J. H.; CHUNG, J. Y.; KIM, J. M.; CHUNG, S. Y. Lactational Coumestrol Exposure Increases Ovarian Apoptosis in Adult Rats. **Archives of Toxicology** v.83, p. 601–608, 2009.
- MUELLER, S. O. Overview of in vitro tools to assess the estrogenic and antiestrogenic activity of phytoestrogens. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**. v. 777, p. 155-165, 2002.
- NAYLOR, E.; WATSON, R. E. B.; SHERRATT, M. J. Molecular aspects of skin ageing. **Maturitas**, v. 69, p. 249– 256, 2011.
- NETZ, P.; ORTEGA, G. G. **Fundamentos de físico-química**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development: Skin absorption: *in vitro* method, test guideline No 428. **Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris, OECD, v.1, p, 1-8, 2004.
- PATRI, G.; SILANO, V.; ANTON, R. **Plants in Cosmetics: Potentially harmful components**, Council of Europe Publishing, v. 3, p. 37-38, 2006.
- PHILLIPS T. J.; DEMIRCAZ Z.; SAHU M. Hormonal effects on skin aging. **Clinical Geriatric Medicine**, v. 17, p. 661–672, 2001.
- PIETTA, P. G. Flavonoids as Antioxidants. **J. Nat. Prod.** v. 63, p. 1035-1042, 2000.
- PINNEL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 48, p. 1-19, 2003.
- POTTS, R.O.; GUY, R.H. Predicting skin permeability. **Pharmaceutical Research**, v. 9, p. 663-669, 1992.
- PRAKASH, D.; UPADHYAY, G.; SINGH, B. N.; SINGH, H. B. **Food Chemistry**, v. 104, p. 783–790, 2007.
- PRIMO, F. L.; RODRIGUES, M. M. A.; SIMIONI, A. R.; BENTLEY, M. V. L. B.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsion loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in skin cancer treatment. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 320, p. 211–214, 2008.
- PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. Tecnologia farmacêutica, 6ed. Fundação Calouste Gulbenkian, 786p, 2003.
- RABINOVICHGUILATT, L.; DUBERNET, C.; GAUDIN, K.; LAMBERT, G.; COUVREU, P.; CHAMINADE, P. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 61, p. 69-76, 2005.
- RAINE-FENNING, N. J.; BRINCAT, M. P.; MUSCAT-BARON, Y. Skin aging and menopause: implications for treatment. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 4, p. 371–378, 2003.
- REBELLO, T. Guia de **Produtos Cosméticos**, 6 ed. São Paulo: Senac, p. 131-132, 2005.
- RIBEIRO, C. **Cosmetologia Aplicada a Dermoestética**, 2 ed. São Paulo: Pharmabooks, p. 17-26; 206-212, 2010.
- RICHARDS, J.S. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. **Physiological Reviews**, v. 60, p. 51-89, 1980.
- RUKTANONCHAI, U.; BEJRAPHA, P.; SAKULKHU, U.; OPANASOPIT, P.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; JUNYAPRASERT, V.; PUTTIPIPATKHACHORN, S. Physicochemical Characteristics, Cytotoxicity, and Antioxidant Activity of Three Lipid Nanoparticulate Formulations of Alpha-lipoic Acid. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, p. 227-234, 2009.

- SAKULKU, U.; NUCHUCHUA, O.; UAWONGYART, N.; PUTTIPIATKHACHORN, S.; SOOTTITANTAWAT, A.; RUKTANONCHAIU. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, p. 105-111, 2009.
- SATOR, P. G.; SCHMIDT, J. B.; SATOR M. O.; HUBER, J. C.; HONIGSMANN, H. The influence of hormone replacement therapy on skin ageing. A pilot study. **Maturitas**, v. 39, p. 43–55, 2001.
- SCAMBIA, G.; MANGO, D.; SIGNORILE, P. G.; ANSEMI, R. A.; PALENA, C.; GALLO, D.; BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P.; RIVA, A.; MANCUSO, S. Clinical effects of a standardized soy extract in postmenopausal women: a pilot study. **Menopause**, v. 7, p. 105-111, 2000.
- SCHIMID, M.H.; KORTING, H.C. Liposomes for atopic dry skin: the rational for a promising approach. **Clinical Investigation**, v. 71, p. 649-653, 1993.
- SHINDE, A. N.; MALPATHAK, N.; FULZEL, D. P. Determination of isoflavone content and antioxidant activity in *Psoralea corylifolia* L. callus cultures. **Food Chemistry** v.118, p. 128–132, 2010.
- SCHWARZ, J. S.; WEISSPAPIR, M. R.; SHANI, A.; AMSELEM, S. Enhanced antiinflammatory activity of diclofenac in jojoba oil submicron emulsion cream. **Journal of Applied Cosmetology**, v. 14, p. 19-24, 1996.
- SILVA, A. P. C., KOESTER, L. S., MAYORGA, P., BASSANI, V, TEIXEIRA, H. F. Development and validation of a LC method for determination of genistein in topical nanoemulsions. **Die Pharmazie**, v.62, p.732 - 734, 2007.
- SILVA, A. P. C.; NUNES, B. R.; OLIVEIRA, M. C.; KOESTER, L.S.; MAYORGA, P.; BASSANI, L.; TEIXEIRA, H. F. Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein. **Pharmazie**, v. 64, p. 32-35, 2009.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 5ª edição. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC e UFRGS, 2004.
- TAGNE, J.B.; KAKUMANO, S.;NICOLOSI, R.J. Nanoemulsion Preparations of the Anticancer Drug Dacarbazine Significantly Increase Its Efficacy in a Xenograft Mouse Melanoma. **molecular pharmaceutics**, v. 5, p. 1055–1063, 2008.
- TAKEUCHI, S.; TAKAHASHI, T SAWADA, Y.; IIDA, M.; MATSUDA, T.; KOJIMA, H. Comparative Study on the Nuclear Hormone Receptor Activity of Various Phytochemicals and Their Metabolites by Reporter Gene Assays Using Chinese Hamster Ovary Cells. **Biol. Pharm. Bull**, v.32(2), p. 195—202, 2009.
- TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E. B.; JUNYAPRASERT, V. B.; MULLER, R. H. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q(10) - development, physicochemical characterization and in vitro release studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 141–148, 2007.

THE MERCK INDEX, **An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**. 12th edition, New Jersey: Merck & CO Inc. 1996.

THORNTON, M. J.; TAYLOR, A. H.; MULLIGAN, K.; AL-AZZAWI, F.; LYON, C. C.; O'DRISCOLL, J.; MESSENGER, A. G. Oestrogen receptor beta is the predominant oestrogen receptor in human scalp skin. **Experimental Dermatology**, v. 12, p. 181-190, 2003.

TRUEBA, G. P. Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. **Revista Cubana Investigaciones Biomédicas**, v. 22, p. 48-57, 2003.

VARGAS, B.A. ; BIDONE, J. ; OLIVEIRA, L. K. ; KOESTER, L. S. ; BASSANI, V. ; TEIXEIRA, H. F. Development of topical hydrogels containing genistein-loaded nanoemulsions. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, p. 1-7, 2012

WHITTEN, P. L.; PATISAUL, H. B.; YOUNG, L. J. Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavonoids in rodents. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 24, p. 47– 54, 2002.

WU, J., WEI, W., WANG, L-Y., SU, G-S., MA, G-H. A thermosensitive hydrogel based on quaternized chitosan and poly(ethylene glycol) for nasal drug delivery system. **Biomaterials**, 28:2220–2232, 2007.

YILMAZ, E.; BORCHERT, H-H. Design of a phytosphingosine-containing, positively charged nanoemulsion as a colloidal carrier system for dermal application of ceramides. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, p. 91-98, 2005.

YILMAZ, E.; BORCHERT, H. Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema – An in vivo study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, p. 232-238, 2006.

ZOUBOULIZ, C. C., MAKRANTONAKI, E. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. **Clinics in Dermatology**, v. 29, p. 3–14, 2011.

CAPÍTULO II
Parte experimental

O capítulo 2 da dissertação foi redigido na forma de artigo científico intitulado *Hydrogels containing coumestrol-loaded nanoemulsions. Formulation, skin retention and antioxidant studies* que será submetido a uma revista científica da área.

CONCLUSÕES

- As nanoemulsões desenvolvidas pelo procedimento de emulsificação espontânea apresentaram-se monodispersas com diâmetro de gotícula de 200-300nm, potencial zeta de cerca de -30mV e teor de cumestrol de 98%.
- A estrutura das nanoemulsões foi mantida após a incorporação em diferentes materiais gelificantes e o conteúdo de cumestrol nos hidrogéis manteve-se estável por até 90 dias.
- As formulações espessadas com diferentes materiais gelificantes apresentaram comportamento do tipo não-Newtoniano pseudoplástico e a viscosidade foi semelhante para todas as formulações.
- A revalidação da metodologia analítica para quantificação do cumestrol foi adequada para sua determinação nas camadas da pele de orelha suína, uma vez que se mostrou linear, precisa, exata e específica.
- Os perfis de cinética de liberação através das membranas de celulose foram influenciados pelo tipo de formulação e material gelificante usado. O hidrogel não iônico (hidroxietilcelulose) exibiu uma liberação mais lenta em comparação com hidrogéis aniônico e catiônico, carbopol e quitosana, respectivamente.
- Uma maior retenção do cumestrol nas camadas da pele, especialmente na epiderme, foi obtida após o espessamento das nanoemulsões. Carbopol 940 promoveu uma maior retenção do cumestrol na pele em comparação com os demais hidrogéis testados, resultado que pode ser correlacionado com a cinética de liberação.
- Fotomicrografias da pele após o estudo de permeação/retenção não mostraram evidências de danos ao tecido.
- As formulações apresentaram atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH.
- Os resultados obtidos demonstraram a influência dos materiais gelificantes sobre a retenção do cumestrol através da pele, bem como a viabilidade de preparo de hidrogéis contendo cumestrol incorporado em nanoemulsões para uso na prevenção cutânea dos danos causados por radicais livres.

