

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

**Associação de cumestrol à
hidroxipropil- β -ciclodextrina: desenvolvimento, caracterização,
avaliação da permeação cutânea e do efeito cicatrizante**

SARA ELIS BIANCHI

Porto Alegre, 2014

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

**Associação de cumestrol à
hidroxipropil- β -ciclodextrina: desenvolvimento, caracterização,
avaliação da permeação cutânea e do efeito cicatrizante**

Dissertação apresentada por **Sara
Elis Bianchi** para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Valquiria Linck Bassani

Porto Alegre, 2014

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 16.03.2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Letícia Scherer Koester

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Martin Steppe

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Universidade Federal de Pernambuco

Bianchi, Sara Elis

Associação de cumestrol à hidroxipropil-β-ciclodextrina: desenvolvimento, caracterização, avaliação da permeação cutânea e do efeito cicatrizante / Sara Elis Bianchi. -- 2014.

141 f.

Orientadora: Valquiria Licnk Bassani.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Cumestrol. 2. Ciclodextrina. 3. Cumestrol e permeação cutânea. 4. Cicatrização e cumestrol. I. Bassani, Valquiria Licnk, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG) do Departamento Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da UFSC, na cidade de Florianópolis, com o apoio financeiro de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, junto à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

“Lógica e racionalidade não guiam o coração humano, embora possam explicar suas paixões.”

Immanuel Kant

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Valquiria Linck Bassani, pela oportunidade, orientação, dedicação e amizade. Por toda a paciência e confiança em mim depositada. Pela tranquilidade, mesmo nos momentos difíceis e por todos os conselhos e ensinamentos. Fico imensamente grata pelo auxílio e apoio imediato sempre que necessitei.

À professora Kellen Cristhinia Borges de Souza por me acompanhar durante a graduação, ao apoio e incentivo durante os momentos difíceis e a quem hoje posso chamar de amiga.

Aos meus pais, Clair e Alzira, pelas inúmeras ligações, pelo constante incentivo, amor e apoio em todos os momentos. Em especial, por nunca me deixarem desistir, mesmo quando achei que não conseguiria.

Ao meu irmão Artur pelo realismo, parceria e amizade.

Aos professores Letícia Koester, Helder Teixeira, George Ortega e Pedro Petrovick pelos ensinamentos e amizade.

Às minhas tias, Gelvazia e Carmen, pelas visitas, pelos momentos em família e pela alegria que sempre traziam.

A todos os meus colegas, amigos e parceiros do Laboratório de Desenvolvimento Galênico, em especial Cristiane, Débora, Francini, Juliana Bidone, Juliana Carini, Pedro, Samuel, Giovanni, sem os quais a realização dessa dissertação teria sido bem mais difícil.

A grande amizade das especiais Letícia, Bruna e Marina desde que nos conhecemos na seleção de mestrado.

À Cláudia e à Bárbara, mais que amigas, irmãs e confidentes de todos os momentos.

À Andréia, uma das melhores coisas que me aconteceram durante a graduação, uma grande parceira, divertida, amiga e conselheira.

A todos que de alguma maneira colaboraram, torceram ou incentivaram o meu crescimento durante estes dois anos.

RESUMO

O cumestrol pertence à classe dos coumestanos e está presente em várias plantas, tais como a soja, alfafa, trevo amarelo e trevo vermelho. Diversos estudos relatam sua afinidade pelos receptores estrogênicos de onde decorre sua classificação como fitoestrógeno. O cumestrol também tem sido referido como uma substância com atividade antioxidante e anti-inflamatória marcantes. No entanto, não há relatos sobre uma possível atividade cicatrizante. O cumestrol é uma molécula que apresenta reduzida hidrossolubilidade o que representa uma limitação, tanto para o desenvolvimento tecnológico de produtos de aplicação na pele, bem como para a expressão de sua atividade biológica. Neste sentido, a sua associação com ciclodextrina representa uma estratégia interessante para a promover a sua hidrossolubilidade, bem como a sua penetração cutânea. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a permeação cutânea do cumestrol, na sua forma livre ou associada à hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), a partir de uma base hidrofílica de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). Para avaliar o teor de cumestrol nas formulações e nas diversas camadas da pele foi desenvolvido um método bioanalítico indicativo de estabilidade utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência. O cumestrol mostrou-se instável frente à exposição contínua à luz UVC e em meio básico (NaOH 1M), e a reação de degradação obedeceu, respectivamente, cinética de ordem zero e primeira ordem. O método bioanalítico mostrou-se linear, específico, exato, preciso e robusto para quantificação de cumestrol nas diferentes camadas da pele. Os estudos *in vitro* de permeação cutânea (célula de Franz, utilizando pele de orelha de suínos) realizados a partir de hidrogéis e os estudos *in vitro* de atividade cicatrizante (cultura de fibroblastos), revelaram que a HP β CD determinou um efeito promotor, tanto da penetração do cumestrol na pele, bem como de seu efeito cicatrizante nos fibroblastos. Tais resultados são inéditos e evidenciam o potencial uso do cumestrol em preparações destinadas à prevenção do envelhecimento cutâneo e à promoção da cicatrização.

Palavras-chave: cumestrol, ciclodextrina, cumestrol e permeação cutânea, cicatrização e cumestrol.

ABSTRACT

Coumestrol belongs to the class of coumestans and is present in many plants, such as soybeans, alfalfa, yellow clover and red clover. Several studies have reported their affinity for estrogen receptors resulting in its classification as phytoestrogen. Coumestrol has also been referred as a substance with remarkable antioxidant and anti-inflammatory activity. However, there are no reports about a possible wound healing activity. Coumestrol is a molecule that has reduced water solubility, resulting in a limitation for technological development of products applied on the skin as well as the expression of its biological activity. In this sense, its association with cyclodextrin represents an interesting strategy to promote water solubility, and its skin penetration. Therefore, this work aims to evaluate the coumestrol skin permeation, either in its free form or associated with hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD), from a hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) hydrophilic base. To assess the coumestrol concentrations in formulations and in various skin layers it was developed a bioanalytical method that is indicative stability using high performance liquid chromatography. Coumestrol proved to be unstable after continuous exposure to UVC light and in basic medium (1 M NaOH), and the degradation reaction followed, respectively, zero-order and first order kinetics. The bioanalytical method was linear, specific, accurate, precise and robust for coumestrol quantitation in different skin layers. *In vitro* skin permeation studies (Franz cell using porcine ear skin) performed with hydrogels and *in vitro* wound healing effects (fibroblast cultures) showed that the HP β CD determined the promoter effect, both coumestrol skin penetration and its healing effect on fibroblasts. These new results show the potential use of coumestrol in preparations for prevention aging skin and promoting healing.

Key words: coumestrol, cyclodextrin, coumestrol and permeation, wound healing and coumestrol.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Table 1.	Intra- and inter-day precision and accuracy determinations for coumestrol using the optimized conditions.....	81
Table 2.	Recovery (%) of the coumestrol in hydrogel, skin samples, and tape strip.....	82
Table 3.	Degradation kinetics of coumestrol in base media and UVC light.....	83

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1.	Estrutura química das principais subclasses dos isoflavonóides: isoflavona, isoflavonona, isoflavana, pterocarpano e coumestano.....	41
Figura 2.	Estrutura química do COU.....	45
Figura 3.	Possíveis posições do COU na ligação com receptores ER α e ER β e a energia livre (ΔG) envolvida. Fonte: CHANDSAWANGBHUWANA & BAKER (2014, p. 38).....	50
Figura 4.	Interação de COU na posição 1 com ERs. (A) Contato entre ER α e anéis A e D do COU. (B) Contato entre ER α e anéis B e C do COU. (C) Contato entre ER β e anéis A e D do COU. (D) Contato entre ER β e anéis B e C do COU.....	51
Figura 5.	Estrutura química da hidroxipropil- β -ciclodextrina.....	55

CAPÍTULO II

Figure 1.	Chemical structures of COU.....	70
Figure 2.	Analytical curve of COU concentration <i>versus</i> peak area.....	77
Figure 3.	LC chromatograms obtained for (A) COU spiked with hydrogel/skin/tape strip components, (B) chromatogram of skin sample, (C) chromatogram of tape strip, and (D) chromatogram of blank hydrogel.....	79
Figure 4.	LC chromatograms obtained for COU submitted to different stress conditions.....	80

CAPÍTULO III

Figure 1.	Phase-solubility diagram of COU/HP β CD at 37.0 \pm 0.1°C....	98
Figure 2.	Photomicrographs obtained by scanning electron microscopy of (A) COU, (B) HP β CD, (C) COU/HP β CD physical mixture (1:1), (D) COU/HP β CD association (1:1).....	99

Figure 3.	The Differential scanning calorimetry curves of (A) COU, (B) HP β CD, (C) COU/HP β CD physical mixture (1:1), (D) COU/HP β CD association (1:1).....	100
Figure 4.	X-ray diffractograms of (A) COU, (B) HP β CD, (C) COU/HP β CD physical mixture (1:1), (D) COU/HP β CD association (1:1).....	100
Figure 5.	FTIR spectrum (A) COU, (B) HP β CD, (C) COU/HP β CD physical mixture (1:1), (D) COU/HP β CD association (1:1).....	101
Figure 6.	(a) ¹ H NMR complex of COU and HP β CD (1:1); (b) Region of 2D-ROESY contour map containing COU/HP β CD association (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	103
Figure 7.	(I) Ascendent and descendent curves of HPMC, with shear thinning behavior.....	104
Figure 8.	Evaluation of COU retention in different skin layers from hydrogels containing 0.1% (w/w) COU.....	105
Figure 9.	Photomicrographs of COU skin permeation (8h) from hydrogel formulations.....	107
Figure 10.	Fluorescent microscope images employed for the evaluation of wound healing activity by the scratch assay, using a confluent monolayer of human gingival fibroblasts.....	108
Figure 11.	Effects of tested samples on the migration and proliferation of human gingival fibroblasts by the scratch assay after 16 h of incubation (37°C; 5% CO ₂).....	109

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
Referências.....	25
OBJETIVOS	
Objetivo Geral.....	29
Objetivos Específicos.....	29
CAPÍTULO I – Revisão da Literatura	
Pele: estrutura, propriedades de envelhecimento e cicatrização.....	33
Flavonoides e atividade estrogênica.....	39
Flavonoides e atividade cicatrizante.....	43
Cumestrol (COU).....	45
Ciclodextrinas.....	52
Hidrogéis de Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).....	56
Referências.....	58
CAPÍTULO II – Development and Validation of a Stability-Indicating Liquid Chromatography Method for Coumestrol Quantification in Skin Permeation Studies	
Abstract.....	69
Introduction.....	70
Experimental.....	71
Chemical and materials.....	71
Apparatus and procedures.....	72
Preparation of coumestrol hydrogel.....	72
Method validation.....	73
Stability indicating tests.....	76
Results and Discussion.....	76
Method validation.....	77
Stability indicating tests.....	82
Conclusion.....	83
References.....	84
CAPÍTULO III – Association of coumestrol/hydroxypropyl-β-cyclodextrin: characterization, skin delivery and wound healing studies	
Abstract.....	89

Introduction.....	90
Experimental.....	91
Chemical and materials.....	91
Cell line, chemicals and biochemical.....	91
Liquid chromatography analysis.....	91
Phase-solubility study.....	92
Preparation of coumestrol/HP β CD association.....	92
Preparation of coumestrol/HP β CD physical mixture.....	93
Characterization of coumestrol associations.....	93
Preparation and characterization of the hydrogel.....	94
Coumestrol skin permeation.....	95
Scratch assay.....	97
Statistical analyses.....	97
Results and Discussion.....	97
Characterization of coumestrol/HP β CD association.....	97
Characterization of HPMC hydrogel.....	103
Coumestrol skin permeation.....	104
Histological analysis.....	106
Evaluation of wound healing effects.....	107
Conclusion.....	109
Acknowledgments.....	110
References.....	110
DISCUSSÃO GERAL.....	115
CONCLUSÕES.....	123
REFERÊNCIAS.....	127

Nos últimos anos, os estudos de avaliação da potencialidade terapêutica de extratos, frações e/ou compostos isolados de origem vegetal têm crescido de maneira considerável (SIMÕES *et al.*, 2010). Diversos fatores tem concorrido para esse crescimento, entre os quais o interesse pela descoberta de moléculas ativas visando novos alvos terapêuticos, da busca de alternativas mais vantajosas para a farmacoterapia existente, e também, do grande avanço tecnológico das técnicas de separação e análise de matrizes complexas.

Entre as classes de constituintes de interesse terapêutico destacam-se os flavonoides, que estão presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários das plantas. Nesta classe inserem-se os isoflavonóides, os quais tem sido objeto de intensas pesquisas devido as suas propriedades biológicas para a promoção da saúde humana. Os isoflavonóides apresentam distribuição taxonômica restrita no reino vegetal e subdividem-se em diferentes subclasses, incluindo a dos coumestanos (ZUANAZZI & MONTANHA, 2010).

Os coumestanos são frequentemente incluídos no grupo das isoflavonas devido a sua semelhança estrutural e de atividade, representando uma versão completamente oxidada dos flavonoides pterocarpanos (AL-MAHARIK & BOTTING, 2004; GANRY, 2005; MLYNARCZUK *et al.*, 2011). O cumestrol, principal representante desta classe, é um composto que tem sido isolado principalmente da família *Fabaceae*. Estudos destacam sua potente atividade antioxidante atribuída à doação de hidrogênio/elétrons das hidroxilas fenólicas (ZUANAZZI & MONTANHA, 2010; LEE *et al.*, 2007; MITCHELL *et al.*, 2007). Além destas, o cumestrol é também classificado como um fitoestrógeno devido ao fato de possuir características estruturais semelhantes às dos estrogênios naturais (NOGOWSKI, 1999; HAVSTEEN, 2002; MLYNARCZUK *et al.*, 2011).

Dois subtipos de receptores de estrogênio, ER α e ER β , estão presentes no ser humano. Na pele humana, os ER β são mais comumente distribuídos do que os ER α , sendo que o ER β é amplamente expresso na epiderme, especialmente nos queratinócitos, nos vasos sanguíneos e nos fibroblastos dérmicos (THORNTON *et al.*, 2003; HALL E PHILLIPS, 2005; MLYNARCZUK *et al.*, 2011).

Neste contexto, as propriedades biológicas apresentadas pelo cumestrol, especialmente, as atividades antioxidante e estrogênica, revelam o interesse desta molécula para o desenvolvimento de formulações destinadas ao uso tópico sobre

a pele, visando a prevenção do envelhecimento cutâneo, sem descartar a sua potencialidade para outras aplicações. Contudo, a incorporação de moléculas de reduzida hidrossolubilidade, como é o caso do cumestrol, em formas farmacêuticas de uso tópico representa um desafio farmacotécnico.

Por sua vez, estudos têm demonstrado que as ciclodextrinas são adjuvantes promotores da hidrossolubilidade de flavonoides, bem como da biodisponibilidade, através da formação de complexos com os mesmos (BUVARI-BARCZA *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2007; BORGHETTI *et al.*, 2009; DONG *et al.*, 2013; PINHO *et al.*, 2014). Além deste efeito, no uso tópico sobre a pele, as ciclodextrinas têm sido utilizadas como promotores da permeação de moléculas bioativas, devido a sua capacidade de associar-se a lipídios presentes no estrato córneo causando sua desorganização (CHALLA *et al.*, 2005). Em nosso grupo de pesquisa, estudos preliminares indicaram que o cumestrol incorporado em gel, como mistura física ou complexado à β -ciclodextrina, apresentava melhor permeação cutânea, do que na sua forma livre. No entanto, tais testes foram realizados empregando-se a β -ciclodextrina, o que representa uma limitação para testes *in vitro*, devido a toxicidade deste adjuvante às células: morte celular por apoptose (caspase dependente) em queratinócitos humanos com depleção de colesterol da membrana (SCHÖNFELDER *et al.*, 2006; FRANCO, 2007). Assim, o presente trabalho propõe o avanço e aprofundamento do estudo de permeação cutânea do cumestrol, associando-o a uma ciclodextrina isenta de efeito citotóxico, a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), determinando a concentração do flavonoide nas diversas camadas da pele (célula de Franz, utilizando pele de orelha de suínos) e avaliando seu efeito cicatrizante *in vitro* em cultura de fibroblastos.

Neste panorama, a presente dissertação de mestrado tem como objetivo preparar e caracterizar associações de cumestrol com HP β CD, na forma associada/complexada ou em simples mistura, incorporá-las em hidrogel e avaliar a permeação em pele de orelha suína, comparativamente a formulação contendo cumestrol livre, além do seu efeito cicatrizante em fibroblastos.

A dissertação está estruturada em três capítulos:

- O capítulo I trata da revisão da literatura acerca do tema da dissertação, resumindo os aspectos relevantes para o desenvolvimento do trabalho: aspectos da pele e envelhecimento cutâneo, atividades biológicas dos flavonoides/coumestanos, ciclodextrinas e sua utilização para via tópica, permeação cutânea, bem como a atividade cicatrizante *in vitro* frente à fibroblastos (*scratch*);
- O capítulo II apresenta os resultados da validação de metodologia bioanalítica indicativa de estabilidade do cumestrol, por cromatografia líquida de alta eficiência, visando sua quantificação nas preparações e diferentes camadas da pele;
- O capítulo III apresenta os resultados obtidos nos estudos de desenvolvimento de hidrogel contendo cumestrol livre ou associado à hidroxipropil- β -ciclodextrina, da permeação cutânea em pele de orelha de suíno, bem como do efeito cicatrizante, *in vitro*, do cumestrol livre ou associado, em cultura de fibroblastos.

REFERÊNCIAS

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

BORGHETTI, G. S. *et al.* Quercetin/ β -Cyclodextrin solid complexes prepared in aqueous solution followed by spray-drying or by physical mixture. **AAPS Pharm Sci Tech**, v. 10, p. 235-242, 2009.

BUVARI-BARCZA, A.; BARCZA, L. Changes in the solubility of β -cyclodextrin inclusion complexes. **J Incl Phenom Macro**, v. 36, p. 355-370, 2000.

CHALLA, R. *et al.* Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review. **AAPS Pharm Sci Tech**, v. 6, n. 2, p. 329-357, 2005.

DONG, L. *et al.* Solubilities of quercetin in three β -cyclodextrin derivative solutions at different temperatures. **J Mol Liq**, v. 177, p. 204-208, 2013.

FRANCO, C. **Associação do coumestrol com β -ciclodextrina: caracterização e avaliação da penetração cutânea.** Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

GANRY, O. Phytoestrogens and protatic cancer risk. **Prev Med**, France, v. 41, p. 1-6, 2005.

HALL, G; PHILLIPS, T. J. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. **J Am Acad Dermatol**, v. 53, p. 555-68, 2005.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medicinal significance of the flavonoids. **Pharmacol Therapeut**, v.96, p. 67-202, 2002.

LEE, S. H. *et al.* Enhanced bioavailability of soy isoflavonas by complexation with β -cyclodextrin in rats. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 71, p. 2927-2933, 2007.

MITCHELL, A. E. *et al.* Ten-year comparison of the influence of organic and conventional crop management practices on the content of flavonoids in tomatoes. **J Agr Food Chem**, p. 1-15, 2007.

MLYNARCZUK, J.; WRÓBEL, M. H.; KOTWICA, J. Adverse Influence of Coumestrol on Secretory Function of Bovine Luteal Cells in the First Trimester of Pregnancy. **Environ Toxicol**, v. 10, p. 1-8, 2011.

NOGOWSKI, L. Effects of phytoestrogen: coumestrol on lipid and carbohydrate metabolism in Young ovariectomized rats may be independent of its estrogenicity. **J Nutr Biochem**, v. 10, p. 664-9, 1999.

PINHO, E. *et al.* Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydr Polym**, v. 101, p. 121-135, 2014.

SCHÖNFELDER, U. *et al.* Cyclodextrin induced apoptosis in human keratinocytes is caspase-8 dependent and accompanied by mitochondrial cytochrome c release. **Exp Dermatol**, v. 15, p. 883-90, 2006.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 6.ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC e UFRGS, 2010.

THORNTON, M. J. *et al.* Oestrogen receptor beta is the predominant oestrogen receptor in human scalp skin. **Exp Dermatol**, v. 12, p. 181-90, 2003.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 6.ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC e UFRGS, 2010. p. 577-614. il.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar associações de cumestrol com hidroxipropil- β -ciclodextrina, avaliando a sua permeação cutânea (*in vitro*), bem como o efeito cicatrizante em cultura de fibroblastos.

Objetivos específicos

- Desenvolver e validar metodologia bioanalítica indicativa de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação da concentração de cumestrol incorporado em hidrogel e nas diferentes camadas da pele.
- Realizar o estudo de solubilidade da associação cumestrol:HP β CD;
- Caracterizar a associação cumestrol:HP β CD;
- Realizar estudo de permeação cutânea (*in vitro*) do cumestrol nas diferentes formas, livre ou associada (mistura física ou em associação à HP β CD), incorporadas em hidrogel;
- Avaliar o efeito de cicatrização do cumestrol nas diferentes formas: livre, simples mistura ou em associação com HP β CD.

CAPÍTULO I

Revisão da literatura

Pele: estrutura, envelhecimento e cicatrização

A pele é o maior órgão de revestimento do corpo humano em extensão e peso. É composta por três camadas principais (epiderme, derme e hipoderme) e por quatro tipos de tecidos (epiteliais, conjuntivos, musculares e nervosas). A pele, em conjunto com os seus derivados (glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, cabelo e unhas) e estruturas complementares (vasos sanguíneos e nervos), faz parte do sistema tegumentar. Além da função de revestimento da superfície externa do corpo, protegendo-o de agressores do ambiente externo (proteção física, química e antimicrobiana), esse órgão possui outras funções como o controle da desidratação, regulação da temperatura corporal, capacidade elétrica, de cicatrização, de perspiração, absorção da radiação ultravioleta, síntese de vitamina D, bem como a absorção e eliminação de substâncias químicas (GENNARO, 2005; BAUMANN, 2009; LIGHT, 2009).

A epiderme é a camada mais superficial da pele. É um tecido epitelial multiestratificado, isto é, formado por várias camadas de células justapostas denominadas queratinócitos, células dendríticas imunocompetentes de Langerhans e melanócitos (responsáveis pela produção de melanina). Os queratinócitos constituem aproximadamente 95% do volume de células e contém a principal proteína, a queratina, responsável pelo suporte estrutural do tecido e proteção. Em relação a sua morfologia, a epiderme tem sido convencionalmente dividida em cinco camadas de células diferentes: a camada espessa de células basais (camada basal germinativa), a camada espessa de células espinosas (camada espinosa), a camada de células granulares (estrato granuloso) com várias células, a camada de células de transição e, por fim, as camadas de células cornificadas (estrato córneo) contendo de 10 a 30 camadas de células. Basicamente as células da camada basal germinativa, após divisão celular, migram para a superfície da pele onde ocorre simultânea maturação e diferenciação para formar os corneócitos do estrato córneo. A diferenciação dos queratinócitos para corneócitos está associada a mudanças no conteúdo de organelas intracelulares, metabolismo lipídico, expressão de queratina e do conteúdo elementar das células (HERNANDEZ *et al.*, 1999; ALBANO, 2004; BAUMANN, 2009).

O estrato córneo é a estrutura essencial de barreira da pele, constituído por lipídeos e proteínas, identificado como a principal defesa contra a difusão de substâncias, incluindo a água. Geralmente, é composto por cerca de 20 camadas de corneócitos densamente queratinizados, rodeados por uma matriz. Essa matriz é composta de filagrina (proteína responsável pela associação de filamentos de queratina) e seus derivados, além de corpos lamelares ricos em lipídeos. A composição lipídica lamelar intercelular é constituída por ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres, que contribuem para a função de barreira de água e outros solutos (ALBANO, 2004). O estrato córneo como um todo protege o organismo em relação aos danos físicos e entrada ou saída de substâncias. Dentre suas funções destacam-se: o retardamento da perda de água dos tecidos inferiores, diminuição da penetração da luz ultravioleta e a barreira contra a entrada de microrganismos, medicamentos e substâncias tóxicas (HERNANDEZ *et al.*, 1999; MAGNUSSON *et al.*, 2001; WILLIAMS *et al.*, 2004; GENNARO, 2005).

A derme, por sua vez, localiza-se abaixo da epiderme é constituída pela camada papilar e a camada reticular. A fina camada papilar consiste em um tecido conjuntivo frouxo contendo colágeno, fibras de elastina e receptores responsáveis pela percepção do toque e dor, chamados de papilas dérmicas. A camada reticular é mais profunda e espessa, caracterizada pela presença de tecido conjuntivo denso, que contém uma combinação de colágeno, fibras de elastina, fibras proteicas, vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas, órgãos sensoriais, glândulas sudoríparas e sebáceas, além de outros anexos como pelos e unhas. Esta camada reticular confere resistência à pele, no entanto, a elasticidade diminui com a idade, devido à perda ou endurecimento das fibras de colágeno e fibras elásticas. A derme, com espessura de cerca de 250 µm, fornece nutrientes e oxigênio à epiderme por difusão, a qual é desprovida de vasos sanguíneos (HERNANDEZ *et al.*, 1999; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; ALBANO, 2004; RIBEIRO, 2010).

A hipoderme, também chamada de tecido subcutâneo, é a última camada da pele. Tecnicamente exerce funções de proteção e é constituída por um tecido conjuntivo frouxo, rico em fibras e células que armazenam gordura, chamadas adipócitos. Dentre as funções da hipoderme destacam-se a sua atuação como reserva energética, proteção contra choques mecânicos, isolamento térmico e a

sustentação e união das camadas celulares superiores ao restante do corpo. Para que isto ocorra, as fibras de colágeno da derme penetram por entre as células de gordura acumuladas, resultando em conexões entre as camadas superficiais da pele e a camada subcutânea (HERNANDEZ *et al.*, 1999; GENNARO, 2005).

O envelhecimento cutâneo é resultado de mudanças pequenas e contínuas causadas por processos naturais, individuais e gradativos, como consequência de um conjunto de transformações decorrentes de fatores intrínsecos e extrínsecos, que acabam por alterar o aspecto da pele. No envelhecimento causado por fatores intrínsecos, também conhecido como envelhecimento cronológico, há redução da renovação celular e da função imunológica, diminuindo as funções vitais do corpo (REBELLO, 2005). Outro fator ligado ao envelhecimento intrínseco é a redução do hormônio estrogênico em mulheres no período pós-menopausa. A reposição hormonal reduz estes efeitos característicos da menopausa, aumentando os níveis de colágeno e a espessura dérmica, além de aumentar a hidratação e a atividade das glândulas sebáceas (PHILLIPS *et al.*, 2001; SATOR *et al.*, 2001; RAINE-FENNING *et al.*, 2003). Os fatores extrínsecos, que causam danos, na maioria das vezes permanentes à pele, são frequentemente apontados como promotores do envelhecimento cutâneo. São exemplos, a poluição, o fumo, abuso do álcool, alimentação inadequada e, principalmente, exposição exagerada à radiação solar (REBELLO, 2005; RIBEIRO, 2010). São associados à formação de radicais livres que, de um modo geral, ocasionam o envelhecimento cutâneo com redução significativa da capacidade de cicatrização (ALBANO, 2004; REBELLO, 2005).

Na pele, o estrogênio exerce sua ação através de sua ligação aos receptores estrogênicos. O 17β -estradiol é um esteroide cuja produção é regulada pelo eixo hipotálamo-pituitária integrada aos ovários. Na terapia de reposição hormonal, aumenta o conteúdo de colágeno da pele, retardando o envelhecimento e o fotoenvelhecimento, efeito importante em mulheres durante e após a menopausa (KANG *et al.*, 2003; HALL E PHILLIPS, 2005). No processo de envelhecimento cutâneo, a redução desse hormônio altera as atividades celulares nos fibroblastos como síntese de colágeno, elastina e ácido hialurônico (SATOR *et al.*, 2004). Os dois subtipos de receptores estrogênicos ($ER\alpha$ e $ER\beta$) podem ser encontrados na pele, no entanto, os receptores $ER\beta$ são mais comumente distribuídos do que os $ER\alpha$. Ambos são expressos nas glândulas sebáceas, no entanto, sabe-se que $ER\beta$

são mais amplamente expressos nos fibroblastos dérmicos, epiderme, vasos sanguíneos e folículos pilosos. Na epiderme, os ER β são expressos nos queratinócitos da camada basal e camada espinosa, e em menor intensidade, no estrato granuloso. Já os ER α são expressos em queratinócitos epidérmicos, predominantemente no estrato basal e camada espinhosa (THORNTON *et al.*, 2003; HALL & PHILLIPS, 2005).

No entanto, não há plena unanimidade quanto a sua distribuição, por exemplo, THORNTON e colaboradores (2003) descreveram que o ER β é o receptor predominante na pele, já VERDIER-SÉVRAIN (2007) relata a ocorrência de ambos receptores, além de um outro receptor de membrana na epiderme. Além disso, diferentes funções na pele são atribuídas a esses receptores. Os ER α estão principalmente envolvidos na promoção da proliferação celular, enquanto ER β tem um efeito de citoproteção (HALL & PHILLIPS, 2005).

A expressão desses receptores (ER α e ER β) em fibroblastos dérmicos humanos sugere que o 17 β -estradiol age através da regulação direta da função de fibroblastos mediada por ERs. No entanto, os mecanismos do aumento de colágeno induzido pelo 17 β -estradiol ainda são pouco conhecidos. A regulação dos níveis do fator transformador de crescimento β (TGF- β), que promove a produção de colágeno, parece desempenhar um papel importante. Além disso, sugere-se que o 17 β -estradiol acelera a cicatrização de feridas através do aumento do nível de produção de TGF- β 1 pelos fibroblastos dérmicos (VERDIER-SÉVRAIN, 2007).

A cicatrização na pele também parece ser afetada pela quantidade de estrogênio. A deficiência estrogênica aliada aos efeitos da menopausa são importantes no processo de cicatrização cutâneo. Este fato, conforme citado anteriormente, fundamenta-se no princípio de que existem receptores estrogênicos em várias células da pele, contudo se há diminuição dos níveis de estrogênio ocorre redução na proliferação celular e produção de colágeno no processo de cicatrização (VERDIER-SÉVRAIN, 2007).

A espessura total de um ferimento comumente conduz à formação de cicatrizes e à perda substancial de anexos da pele. A formação de cicatrizes cutâneas com frequência é a causa de graves problemas estéticos, funcionais e psicológicos. O processo de cicatrização da pele adulta é um processo biológico bastante complexo, que envolve várias linhagens de células, matrizes e moléculas

de sinalização, que atuam de forma hierárquica para atingir a perfeita regeneração. A cicatrização normal engloba três estágios sobrepostos, mas distintos, ou seja, inflamação, proliferação e remodelação. Cada fase contribui para o efeito de cura da ferida. No entanto, a fase de inflamação tem um impacto significativo sobre os resultados de cicatrização de feridas. Após a lesão, células inflamatórias, incluindo neutrófilos, macrófagos e mastócitos se infiltram no local da ferida de maneira gradual. Os neutrófilos aparecem logo após a lesão e são essenciais para evitar a proliferação de bactérias e eliminar restos celulares e sujeiras, enquanto que os macrófagos produzem fatores de crescimento inflamatórias e angiogênicos, os quais desempenham papéis críticos para a cicatrização de feridas promovendo a formação de fibroblastos. Os mastócitos, por sua vez, migram para as feridas e liberam fatores de crescimento pró-inflamatórias como o fator ativador de plaquetas (PAF), derivados do ácido araquidônico e uma série de citocinas, iniciando assim a formação de cicatrizes. A migração de queratinócitos na epiderme e folículos pilosos, seguido pela proliferação destas células na borda da ferida, são observados no início da formação de tecido novo, chamada de fase de re-epitelização. Além disso, os fibroblastos são importantes na reparação da derme na ferida, através da sua proliferação e migração, sintetizando uma nova matriz extracelular (MARTIN & LEIBOVICH, 2005; SCHAFER & WERNER, 2007; GURTNER *et al.*, 2008). Em idosos, esse processo é mais lento e o estrogênio tem sido apontado por demonstrar papel crucial na cicatrização de feridas (HALL & PHILLIPS, 2005). ASHCROFT e colaboradores (1997) demonstraram melhora da cicatrização de feridas em homens e mulheres idosos tratadas com estrogênio via tópica, com aumento dos níveis de colágeno e rigidez cutânea.

A cicatrização de feridas pode ser avaliada *in vitro* através de ensaios de cicatrização em cultura de fibroblastos. Essa técnica consiste na criação de uma lacuna artificial nas monocamadas celulares, chamada de “*scratch*”, com auxílio de um objeto pontiagudo. Como resposta ao rompimento do contato célula-célula, ocorre um aumento da concentração de fatores de crescimento e citocinas que iniciam a proliferação e migração celular de queratinócitos e fibroblastos. O ensaio é realizado em lamelas individuais ou em uma placa de multipoços. A recuperação da monocamada e a conseqüente cicatrização de feridas ocorre num processo que pode ser observado ao longo do tempo. Esse processo ocorre de maneira

padronizada, no qual as células tendem a migrar e fechar a ferida, podendo ser monitorado por imagem ou pela microscopia de *time-lapse*, que consiste em analisar fotografias tiradas com certa frequência (LIANG *et al.*, 2007). Embora o ensaio de cicatrização da ferida seja um método simples e econômico, cuidados com a natureza inerente ao *scratch* devem ser tomados para evitar danos às células da monocamada, o que poderia causar fugas de conteúdos intracelulares para a ferida, dificultando a interpretação de dados (SCHAFER & WERNER, 2007; GURTNER *et al.*, 2008).

No que se refere à avaliação da permeação de estrogênios na pele, estudos de permeação cutânea (estudos *in vitro*), com o uso de pele excisada de animais de experimentação ou pele humana retirada por procedimentos cirúrgicos estéticos tem sido otimizadas em modelos experimentais. Sistemas que utilizam células de difusão do tipo Franz são frequentemente empregados para avaliar a permeação de substâncias na pele devido ao baixo custo, relativa rapidez e reprodutibilidade (BRONAUGH *et al.*, 2005). A técnica consiste em colocar uma dose de concentração conhecida da substância ativa sobre a membrana ou pele (compartimento doador) e sua difusão é então medida pela concentração da substância numa solução do lado oposto da mesma (compartimento receptor). Neste último compartimento encontra-se o fluido receptor, o qual deve ter uma capacidade suficiente para solubilizar a substância de teste, sendo mantido em contato com a membrana/pele. A formulação permanece na pele por um período especificado, referente ao potencial tempo da exposição humana. O fluido receptor é amostrado em períodos de tempo ao longo do experimento para determinar a possível taxa de penetração da substância através da pele. No final do estudo, a dose que se deslocou da formulação, ou seja, a quantidade que permeou nas camadas da pele e a quantidade que alcançou o fluido receptor é determinada (OECD, 2004). Quando se utiliza pele de animais ou humana é possível quantificar a substância ativa nas diferentes camadas: estrato córneo, epiderme e derme. As células de Franz permitem o uso no compartimento doador de formulações líquidas, ou semissólidas, na presença ou ausência de agentes promotores de permeação (MAGNUSSON *et al.*, 2001).

A pele de suínos é comumente utilizada devido a sua semelhança com a pele humana, em termos de morfologia e de permeabilidade, principalmente a pele da

orelha e do abdômen, tornando-se uma alternativa prática. A utilização de peles de sobras cirúrgicas humanas ou pele de autópsias é permitida, respeitadas as exigências de ordem éticas, no entanto reconhece-se que nem sempre estão facilmente disponíveis. A principal limitação é a necessidade de repetir os experimentos com peles de diferentes doadores, para diminuir problemas decorrentes das variações de permeabilidade entre indivíduos. Considerando esses aspectos, a utilização de pele de animais tem se mostrado mais viável para testes iniciais (SARTORELLI *et al*, 2000; SEKKAT *et al*, 2002; OECD, 2004).

A permeação de fármacos através da pele é um processo bastante complexo que envolve múltiplos fatores. Ocorre principalmente por difusão através da epiderme e pelos apêndices cutâneos, como os folículos pilosos e glândulas sudoríparas. Inicialmente, a partição do fármaco ao estrato córneo é necessária e, subsequentemente, que este consiga se difundir do ambiente lipofílico para o ambiente hidrofílico atingindo a circulação sanguínea. Existem duas rotas possíveis para difusão do fármaco através do estrato córneo: o transcelular, no qual o transporte é transversal aos corneócitos alternando entre estruturas hidrofílicas e lipofílicas; e no transporte intercelular (principal rota), no qual o fármaco segue a rota entre os corneócitos, através das lamelas lipídicas. No entanto, a permeação através do estrato córneo também é fortemente dependente da lipofilicidade e peso molecular da maioria dos compostos (LIGHT, 2009). As características físico-químicas das substâncias ativas, como grau de lipofilia e coeficiente de partição, além do veículo e da forma farmacêutica ou cosmética também influenciam a permeação/absorção. A integridade do estrato córneo, a idade da pele, o fluxo sanguíneo e o metabolismo são fatores que podem alterar a permeação de moléculas pela pele (AULTON, 2005). No presente trabalho, apenas uma ação local é objetivada, em que a distribuição do cumestrol fique circunscrita ao local de aplicação, sem efeito sistêmico.

Flavonoides e atividade estrogênica

Os flavonoides são metabólitos secundários produzidos por um grande número de espécies vegetais. Por consequência, têm recebido destaque nas investigações científicas devido às funções que exercem, dentre elas, proteção

contra radiação visível e ultravioleta, proteção contra fungos, bactérias, insetos, vírus; atividade antioxidante; regulação da ação de hormônios vegetais (podem regular o transporte de auxina, um hormônio vegetal, através da expressão de genes de transporte, ativação de fatores de regulação e/ou mecanismo de transporte celular); inibidores de enzimas e, em especial, pela importância das atividades biológicas e fisiológicas que têm sido demonstradas para os seres humanos. Os flavonoides apresentam esqueleto químico composto por dois anéis benzênicos unidos por uma cadeia de três átomos de carbono organizados na forma de um anel pirano, caracterizando uma estrutura polifenólica de baixo peso molecular. A síntese ocorre a partir da fenilalanina e derivados da benzo- γ -pirona (TAYLOR *et al.*, 2005; BRUNETON, 2008; ZUANAZZI & MONTANHA, 2010; ROUSTRAY *et al.*, 2011).

A classe dos flavonoides possui um grande número de derivados que são frequentemente relatados na literatura. Os isoflavonóides, por exemplo, possuem cadeia arila-C3-arila, tipo difenil-1,2-propano e se dividem em mais de quatro subclasses, dentre elas, isoflavonas, isoflavanonas, pterocarpanos, isoflavanas e coumestanos (Figura 1). Grande parte dos isoflavonóides apresenta atividade antifúngica e antimicrobiana, ou seja, são produzidos nas plantas em resposta a infecções causadas por agentes patogênicos; assim essas substâncias comportam-se como fitoalexinas, produzidas na defesa da planta (BRUNETON, 2008; ZUANAZZI & MONTANHA, 2010; ANTONELLI *et al.*, 2005; ROUSTRAY *et al.*, 2011).

A diversidade estrutural dos isoflavonóides pode ser decorrente de substituições do tipo hidroxilação, glicosilação, metilação, acilação e prenilação no esqueleto de carbono. No entanto, apresentam-se no reino vegetal como agliconas, glicosídeos, malonilglicosídeos e acetilglicosídeos, possuindo distribuição taxonômica restrita (BRUNETON, 2008; ZUANAZZI & MONTANHA, 2010; ANTONELLI *et al.*, 2005; ROUSTRAY *et al.*, 2011). As isoflavonas e coumestanos destacam-se, por sua vez, pelas propriedades estrogênicas, devido a sua semelhança estrutural ao hormônio natural estradiol (GANRY, 2005; BRUNETON, 2008; ZUANAZZI & MONTANHA, 2010). Com isso, esses compostos são comumente referenciados como fitoestrógenos, por produzirem efeitos análogos

aos hormônios estrogênicos em humanos (MUELLER, 2002; GANRY, 2005; BRUNETON, 2008).

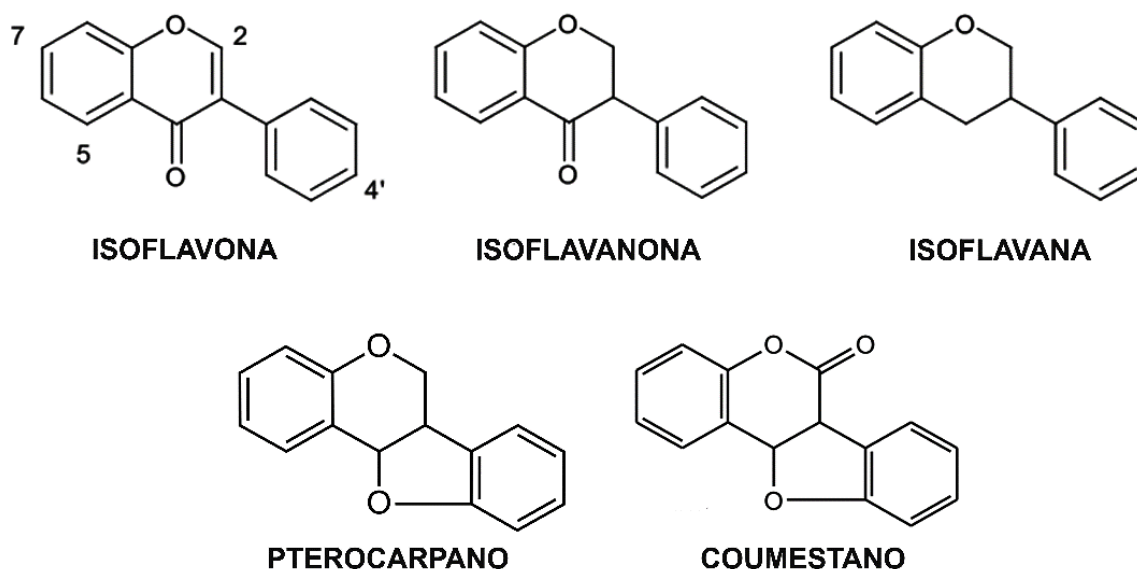


Figura 1. Estrutura química das principais subclasses dos isoflavonóides: isoflavona, isoflavanona, isoflavana, pterocarpano e coumestano.

Além da atividade estrogênica, as isoflavonas e os coumestanos apresentam atividades antioxidante, anti-inflamatória, antitrombótica, antimicrobiana, antialérgica, antitumoral, antiasmática e são capazes de inibir enzimas como transcriptase reversa, proteína C quinase, tirosina quinase, calmodulina, ornitina decarboxilase, hexoquinase, aldose redutase, fosfolipase C e topoisomerase II (TRUEBA, 2003; BRUNETON, 2008). A semelhança estrutural dos isoflavonóides e coumestanos com a estrutura esteroidal os torna capazes de interagir com receptores estrogênicos na maioria dos sistemas biológicos (SETCHELL *et al.*, 2005), fato este que lhes confere um papel importante na prevenção dos sintomas da menopausa, osteoporose, câncer de mama e de próstata, além de doenças cardiovasculares (KAUMAR *et al.*, 2004; JOU *et al.*, 2005; PEETERS *et al.*, 2005; ROUSTRAY *et al.*, 2011).

No entanto, os isoflavonóides podem atuar como agentes estrogênicos ou antiestrogênicos, ou seja, são capazes de modular o efeito do estrogênio endógeno ao competir pela ligação nos receptores estrogênicos. Assim acabam por atuar como antiestrógenos ao impedir que esses hormônios exerçam seus efeitos. No entanto, na ausência do 17 β -estradiol (estrogênio endógeno) essas substâncias se

ligam aos receptores e apresentam efeitos estrogênicos, e como resultado há uma redução de sintomas decorrentes da falta de estrogênio, como o alívio dos sintomas indesejáveis da menopausa (KURZER & XU, 1997; PEETERS *et al.*, 2005; ROUTRAY *et al.*, 2011).

A diminuição de estrogênio endógeno na menopausa resulta em sintomas que vão desde aumento da sudorese, ondas de calor excessivo acompanhadas de rubor no rosto (fogachos) até, com o passar dos anos, mudanças no aspecto da pele, tornando-se mais fina, enrugada, menos elástica e com as unhas frágeis (CUTLER, 2009). Diversos autores têm evidenciado que mulheres que consomem uma dieta rica em fitoestrógenos apresentam menor intensidade e frequência de sintomas vasomotores, característicos do período pós-menopausa (BECK *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2007; BORELLI & ERNST, 2010; ROUTRAY *et al.*, 2011; LEUNER *et al.*, 2012; ANDERSON *et al.*, 2013; BEDELL *et al.*, 2014). ATTERITANO e colaboradores (2008) descrevem a redução de biomarcadores citogenéticos pela isoflavona genisteína em mulheres na pós-menopausa. O efeito protetor deste fitoestrógeno (administração diária de 54 mg de genisteína) frente a danos no genoma parece ser uma ferramenta particularmente promissora na redução do risco de câncer. Já OCCHIUTO e colaboradores (2007) descreveram os efeitos estrogênicos dos isoflavonóides de trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.), observados com administração diária de cerca 20-40 mg/dia em ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas. Os autores ainda inferem que a ingesta diária de fitoestrógenos genisteína, daidzeína, formononetina e biochanina A oriundos do trevo vermelho estavam relacionadas à diminuição da osteoporose pós-menopausa devido a atividade desses isoflavonóides frente a receptores estrogênicos (ER α e ER β). Sob esta ótica, a população chinesa e japonesa, que ingere cerca de 77 mg/dia na forma de alimentos como a soja, tem sido referidas por apresentarem efeitos da menopausa bem menos pronunciados que as mulheres ocidentais, principalmente rubores e problemas ósseos (LAGARI & LEVIS, 2013).

No que se refere ao cumestrol, este tem demonstrado ação estrogênica e citoprotetora na pele em baixas concentrações (<10⁻⁶M) e ação antiestrogênica e citotóxica em concentrações elevadas (>10⁻⁶M) (MAGGIOLINI *et al.*, 2001; LAZENNEC *et al.*, 2001). Apesar da afinidade de ligação dos fitoestrogênios aos ERs ser cerca de 1000 a 10000 vezes mais fraca do que a do 17 β -estradiol,

pequenas concentrações nos tecidos pode ser suficiente para ativar as vias de transdução de sinal através destes receptores (VERDIER-SÉVRAIN, 2007).

É importante salientar que os isoflavonóides são comumente encontrados na natureza na forma de heterosídeo, ou seja, ligados a uma molécula de açúcar através de uma ligação 7- β -D-glicosídica ou 6'- θ malonilglicosídica. A diferença entre a forma glicosídica e aglicona deve-se ao fato de que a forma glicosídica das isoflavonas é inativa, sendo necessário à hidrólise da ligação heterosídica e a liberação da aglicona para exercer atividades biológicas (LEE *et al.*, 2007; BRUNETON, 2008). Na administração oral, isto ocorre pela ação das glicosidases intestinais, em que seu grupo glicosídico é removido permitindo assim, a rápida absorção e distribuição periférica das agliconas. Uma vez liberadas, as agliconas são conjugadas ao ácido glicurônico e/ou sulfato para formar derivados solúveis facilmente excretados pela bile ou via sistema renal (KULLING *et al.*, 2002; GRYNKIEWICZ *et al.*, 2005). No entanto, na administração cutânea de isoflavonóides, a forma molecular glicosilada não é biologicamente ativa, uma vez que a pele não dispõe de enzimas capazes de causar hidrólise da ligação heterocíclica o que implica em preparações farmacêuticas que deverão conter os isoflavonóides na forma de aglicona (IOVINE *et al.*, 2012).

Flavonoides e atividade cicatrizante

A capacidade do corpo de substituir células lesadas ou mortas e de proceder ao reparo dos tecidos após a inflamação pode ocorrer através da regeneração, que é a substituição do tecido lesado, ou pela cicatrização, que é o processo pelo qual a perda tecidual é substituída por uma cicatriz não funcional. Na cicatrização de lesões cutâneas, em especial, há um processo biológico que envolve hemostasia (vasoconstrição e formação de coágulo), fase inflamatória (recrutamento de macrófagos e neutrófilos), fase proliferativa ou de granulação e a fase de remodelação da matriz extracelular (SHIMIZU, 2005).

A utilização de plantas e preparações derivadas para acelerar os processos de cicatrização não é nenhuma novidade e geralmente está relacionada com a medicina popular, com comprovação científica ou não, sobretudo no que se refere aos compostos ativos ou ao mecanismo de ação (REUTER *et al.*, 2009; SCHIMIDT

et al., 2009). MURALIDHAR e colaboradores (2013) avaliaram a atividade cicatrizante de uma fração de flavonoides obtida através de extrato etanólico da casca de *Butea monosperma* (Lam). Neste estudo, o modelo de cicatrização utilizado foi via subcutânea, na pele dorsal lombar de ratos Wistar albinos. A fração contendo flavonoides apresentou atividade cicatrizante significativa atribuída principalmente às isoflavonas genisteína e prunetina. Em outro estudo, AMBIGA e colaboradores (2007) isolaram o flavonoide kaempferol e seu derivado glicosilado (3-O-â-D) a partir das flores de *Ipomoea carnea*, e avaliaram a atividade cicatrizante em modelos de feridas excisadas realizadas em ratos Wistar machos. A atividade observada para ambos foi comparável ao controle sulfatiazol.

Alguns fatores podem interferir no processo cicatricial, no entanto, provavelmente a causa mais comum desse atraso seja a infecção da ferida. A presença de bactérias prolonga a fase inflamatória e interfere na epitelização, contração e deposição de colágeno. As endotoxinas presentes estimulam a fagocitose e a liberação de colagenase, contribuindo para a degradação do colágeno e a destruição do tecido vizinho previamente saudável. Neste sentido, o mecanismo de ação dos flavonoides tem mostrado ser capaz de inibir uma grande variedade de enzimas, como prostaglandinas-sintetases. Estas enzimas participam da biossíntese de eicosanóides, que tem papel fundamental na inflamação, sensação dolorosa e reparo tissular. Além disso, atuam inibindo a enzima hialuronidase, mantendo os proteoglicanos do tecido conjuntivo, prevenindo assim a disseminação bacteriana ou metástases tumorais (HAVSTEEN, 2002).

Em estudo realizado com genisteína administrada pela via intraperitoneal, d'ACAMPORA e colaboradores (2007) estudaram a cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar; com auxílio de microscopia, observaram uma melhora na re-epitelização nos grupos tratados com esta isoflavona em relação ao controle. Os autores demonstraram ainda que as margens de incisão estavam mais aproximadas e havia menor separação entre as fibras musculares subcutâneas no grupo tratado. Os flavonoides luteolina e apigenina também apresentaram atividade cicatrizante em ratos Wistar albinos diabéticos, com a presença de fibras de colágeno e fibroblastos maduros (LODHI & SINGHAI, 2013).

Cumestrol (COU)

Os coumestanos são compostos aromáticos oxigenados naturais que possuem em suas estruturas o anel 6H-benzofuro [3,2-c] benzopiran-6-ona. Nesta classe de composto, o cumestrol, principal representante desse grupo, é designado pelos seguintes nomes químicos: 3,9-dihidroxi-6H-benzofuro-[3,2-c][1]-benzopiran-6-ona; ácido 2-(2,4-dihidroxifenil)-6-hidroxi-3-benzofurancarboxílico δ -lactona e 7'6-dihidroxicoumarino (3',4',3,2) coumarona (THE MERCK INDEX, 2006).

O cumestrol (Figura 2) foi identificado e caracterizado por BICKOFF, em 1958, e apresenta-se na forma de cristais, que sublimam em 325°C. Sua fórmula molecular é $C_{15}H_8O_5$ e possui peso molecular de 268,23 g/mol. Apresenta máximos de absorção na região ultravioleta (em metanol) em 208, 243 e 343 nm e exibe fluorescência azul em meio alcalino forte (BICKOFF *et al*, 1958; THE MERCK INDEX, 2006). Segundo o Software Scifinder Scholar (2007), apresenta ponto de fusão entre $406,0 \pm 24,0^\circ\text{C}$ e seu ponto de ebulição é $561,9 \pm 40,0^\circ\text{C}$ sob pressão de 760 Torr. A densidade do cumestrol é de $1,602 \pm 0,06 \text{ g/cm}^3$, em temperatura de 20°C e pressão de 760 Torr; o seu pKa é de $8,25 \pm 0,20$ e o log P de $2,819 \pm 1,269$, ambos em temperatura de 25°C. A solubilidade do cumestrol é descrita como: praticamente insolúvel em água em pH ácido ou neutro e em éter de petróleo; pouco solúvel em água em pH alcalino (pH 11-12); ligeiramente solúvel em metanol, clorofórmio e éter e; levemente solúvel em tetracloreto de carbono e em benzeno (THE MERCK INDEX, 2006).

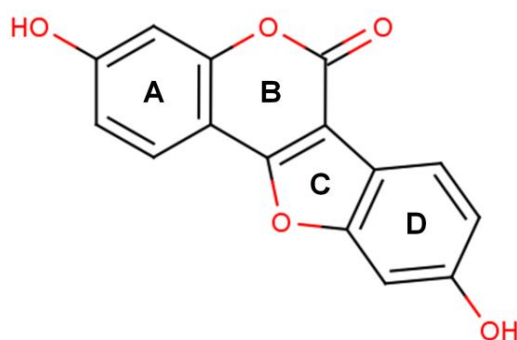


Figura 2. Estrutura química do COU.

Nas plantas, a biossíntese do cumestrol ocorre a partir dos fenilpropanóides: Fenilalanina → ácido p-hidroxicinâmico Co-A → 7,4'-hidroxiflavanona → daidzeína → composto intermediário → cumestrol (BRUNETON, 2008; ZUANAZZI & MONTANHA, 2010). As fontes vegetais de cumestrol incluem muitas frutas, grãos, sementes, brotos (feijão, ervilha, soja, alfafa, trevo amarelo) e folhas (alfafa, trevo vermelho) (LYMAN *et al.*, 1959; LAPCIK *et al.*, 2003; ANTONELLI *et al.*, 2005; PATRI *et al.*, 2006; KONAR *et al.*, 2012). PATRI e colaboradores (2006) encontraram 5611 mg/Kg de cumestrol no trevo vermelho (*Trifolium pratense*) enquanto que LEUNER e colaboradores (2012) obtiveram 105 mg/kg no trevo amarelo (*Melilotus officinalis*). Nas alfafas (*Medicago sativa*, Leguminosae) as concentrações encontradas foram de 1,2 mg/Kg, e ainda maiores nos brotos, atingindo concentrações de 720 mg/Kg (PATRI *et al.*, 2006). Essas concentrações podem ser alteradas nas plantas pelas condições do processamento (germinação, fermentação, hidrólise enzimática ou química) e exposição à fatores externos (estresse ambiental, contaminação por fungos e bactérias), que resultam no aumento das concentração de cumestrol, como forma de proteção da planta (JEON *et al.*, 2012; KONAR *et al.*, 2012).

Apesar de ser encontrado em várias espécies vegetais, a purificação do cumestrol a partir de plantas inclui várias etapas (PATRI *et al.*, 2006; LEUNER *et al.*, 2012) e seu rendimento varia de acordo com as condições empregadas. No que se refere a sua síntese, AL-MAHARIK & BOTTING (2004) propuseram um método rápido e fácil em duas etapas: a primeira de condensação de um acetato de fenila e um cloreto de benzoila, seguida de etapa de dimetilação, com subsequente ciclização intramolecular.

Dentre as diversas propriedades biológicas apresentadas pelo cumestrol, destacam-se as atividades antioxidante e estrogênica (CHANDSAWANGBHUWANA & BAKER, 2014). Embora a atividade estrogênica seja moderada, mostra-se maior que outras classes de flavonoides como: flavonas, flavanonas, dihidroflavonóis, isoflavonas, biflavanonas (BURDA & OLESZEK, 2001). A atividade antioxidante do cumestrol está relacionada à sua capacidade de sequestrar radicais livres, através da inibição enzimática de oxidases diretamente envolvidas em processos oxidativos, pela inibição de enzimas envolvidas

indiretamente nesses processos, além de prevenir a peroxidação lipídica e de hidrogênio induzida por espécies reativas de oxigênio (TRUEBA, 2003; JEON *et al.*, 2012).

LEE e colaboradores (2006) compararam a atividade antioxidante do cumestrol com a apresentada pela genisteína e daidzeína, utilizando substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) para avaliar a oxidação mediada por Cu^{+2} . A atividade antioxidante do cumestrol foi 20 vezes maior em relação a estas duas isoflavonas. Mais recentemente, JEON e colaboradores (2012) avaliaram a capacidade sequestrante de radicais livres do cumestrol em espécies reativas de oxigênio induzida por peróxido de hidrogênio (ROS) investigada em células HepG2, o qual apresentou atividade cerca de 5 vezes maior em relação à genisteína e daidzeína. Muito embora existam algumas divergências quanto a sua maior ou menor atividade oxidante, há convergência sobre o mecanismo envolvido, que ocorre através da doação de hidrogênio/elétrons das hidroxilas fenólicas do cumestrol. Desta atividade decorre o seu potencial sequestrante de radicais livres, prevenindo danos oxidativos e podendo até inibir o desenvolvimento de algumas doenças (LEE *et al.*, 2012). Porém, a potencial atividade antioxidante não descarta a possibilidade do mesmo apresentar, em concentrações mais elevadas, efeito pró-antioxidante, por meio da redução de íons de metais que geram radicais livres (JEON *et al.*, 2012).

Em relação à prevenção de doenças, a ação inibitória do cumestrol sobre a enzima do citocromo P450 aromatase resulta na atividade antioxidante que o revela como um provável agente de prevenção ou tratamento de câncer. Isto somente é possível devido a atividade desta enzima, que é responsável pela transformação de androstenediona e testosterona em estrona e 17β -estradiol, respectivamente. Sendo assim, com a enzima do citocromo P450 aromatase inativa as concentrações de estrógenos no sangue reduzem, o que resulta na diminuição do crescimento celular quando dependente de hormônios estrogênicos (HONG *et al.*, 2007).

Quanto à atividade estrogênica, o cumestrol age da mesma maneira que os isoflavonóides, ou seja, predominantemente como agonista estrogênico, apresentando maior afinidade de ligação pelos receptores de estrogênio do que a genisteína. No entanto, a exemplo do que ocorre com os demais fitoestrógenos,

também exibe atividade anti-estrogênica dose-dependente, pois compete com o estrogênio (17 β -estradiol) pela ligação com os ER, bloqueando-os. Decréscimo da atividade estrogênica tem sido observado com o aumento dos níveis de cumestrol (BUROW *et al.*, 2001; BENASSAYAG *et al.*, 2002; PINNEL, 2003).

A afinidade deste fitoestrogênio em relação ao tipo de receptor ER α ou ER β é variável, mas ainda é menor se comparado ao 17 β -estradiol. Estudos revelaram que o cumestrol apresenta afinidade pelos receptores estrogênicos tanto ER α , como em ER β , contudo sua afinidade por ER β é cerca de 20 a 30 vezes maior do que para ER α (BENASSAYAG *et al.*, 2002, MUELLER *et al.*, 2002).

O estudo realizado por KUIPER e colaboradores (1998), avaliou o efeito de diferentes fitoestrogênios em culturas celulares nas quais a resposta estrogênica aguda foi induzida por co-transfecção com DNA recombinante humano de receptores ER α e ER β . Observou-se que a afinidade por ER α e ER β do cumestrol foi menor à do 17 β -estradiol. Comparativamente com a genisteína, o cumestrol apresentou maior atividade pelo ER α do que a isoflavona.

Outra atividade atribuída ao cumestrol é sua capacidade de inibir a ligação de 17 β -estradiol aos receptores estrogênicos neuronais. O efeito foi observado na regulação dos receptores de oxitocina localizados no núcleo ventromedial do hipotálamo, onde existem apenas receptores ER α , aos quais o cumestrol é capaz de ligar-se. Observou-se também a existência de receptores ER β no núcleo paraventricular, local em que a ação foi mais intensa (PATISAUL *et al.*, 1999; WHITTEN *et al.*, 2002).

É importante salientar que pesquisas que envolvem estudos de afinidade de ligação de fitoestrógenos com os ER são bastante controversas, inclusive quando comparadas ao 17 β -estradiol. O efeito estrogênico dos isoflavonóides deve considerar a concentração de hormônio 17 β -estradiol circulante, a disponibilidade dos receptores no tecido alvo, o tipo de receptor e a afinidade do composto, além da concentração administrada (HUNTLEY & ERNST, 2004).

Os estrogênios endógenos tem impacto significativo sobre a proliferação celular e nas respostas imunes e autoimunes humorais (HUNTLEY & ERNST, 2004). Neste contexto, NDEBELE e colaboradores (2010) avaliaram a proliferação, o ciclo celular e apoptose em células de câncer de útero (células HeLa) sob o efeito do cumestrol, dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) e 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-

dioxina. O cumestrol e os demais compostos inibiram a proliferação de células HeLa de forma dose dependente (20 – 120 nM), sugerindo um efeito citotóxico. Em especial, o cumestrol acumulou células HeLa na fase mitótica e, subsequentemente induziu apoptose. Um efeito semelhante foi observado para o estrogênio endógeno, enquanto que para o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) e 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina não ocorreu indução da apoptose. Como resultado, o cumestrol foi capaz de afetar a viabilidade e induzir a morte celular.

Em contrapartida, SAKAMOTO e colaboradores (2010), investigaram a atividade do cumestrol no crescimento e ciclo celular, bem como na apoptose de células de câncer de mama (MCF-7). O cumestrol apresentou atividade moderada no crescimento dessas células, mas não apoptose, independentemente da presença de 17β -estradiol. Já a daidzeína e a genisteína, também avaliadas neste trabalho, apresentaram efeito supressor parcial sobre o crescimento celular.

SAIJO e colaboradores (2011) relataram uma nova atividade do cumestrol na inibição da inflamação na microglia cerebral, através da ligação aos receptores $ER\beta$. Neste estudo foi observado que o complexo formado entre cumestrol- $ER\beta$ recrutou proteínas de ligação C-terminal co-repressora (CtBP), que ativam promotores da proteína-1 (AP-1) dependentes, inibindo assim a inflamação na microglia cerebral. A inflamação mediada por microglia é importante numa variedade de doenças, incluindo a esclerose múltipla, pois são células residentes (macrófagos) que funcionam como um escudeiro defendendo o cérebro de doenças.

Mais recentemente, CHANDSAWANGBHUWANA & BAKER, em 2014, construíram um modelo tridimensional de cumestrol com os receptores $ER\alpha$ e $ER\beta$ e compararam com modelos de ERs/estradiol, também com o intuito de avaliar a inibição da inflamação em microglia cerebral. As quatro posições que o cumestrol pode assumir na ligação aos receptores $ER\alpha$ e $ER\beta$ estão apresentadas na figura 3. Os autores observaram que apenas na posição 1 o cumestrol apresentou a mesma orientação em $ER\alpha$ e $ER\beta$.

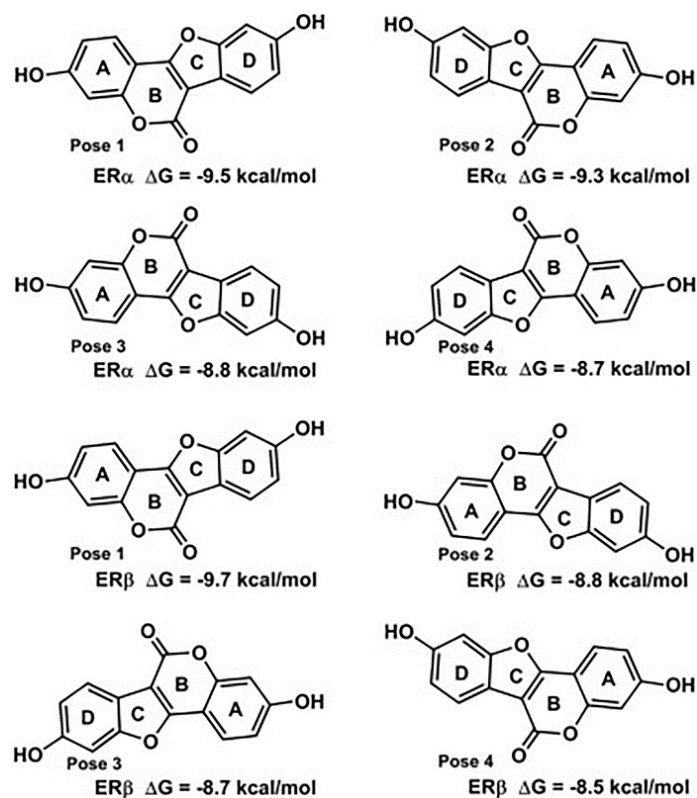


Figura 3. Possível posições do COU na ligação com receptores ER α e ER β e a energia livre (ΔG) envolvida. Fonte: CHANDSAWANGBHUWANA & BAKER (2014, p. 38).

De fato, das quatro possíveis posições do cumestrol em receptores ER α e ER β , a orientação 1 obteve a aproximação dos anéis do cumestrol mais favorável frente aos aminoácidos presentes nos dois receptores, conforme mostrado na Figura 4. Embora seja possível que o cumestrol também assuma a orientação 2, o maior contato com os aminoácidos dos ERs foi observado na orientação 1. No entanto, todas as orientações apresentaram interações do tipo forças de van der Waals semelhante entre os aminoácidos e o cumestrol. Este modelo mostrou-se capaz de identificar a melhor conformação cumestrol/receptores estrogênicos, com o intuito de tratar doenças inflamatórias no cérebro ou ser um agente neuroprotetor (CHANDSAWANGBHUWANA & BAKER, 2014). Além disso, o modelo pode ser bastante promissor para estudos de interações do cumestrol em outros tecidos que possuam os mesmos receptores, ER α e ER β .

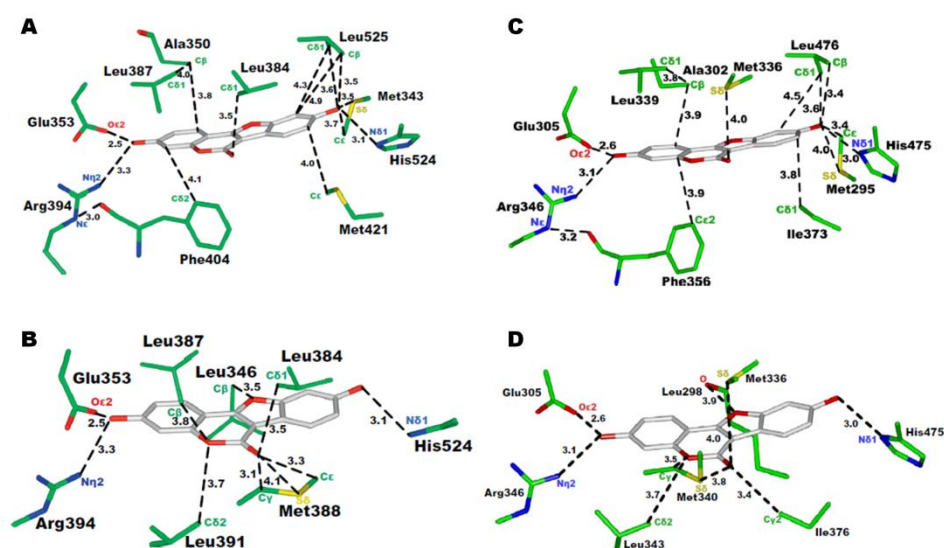


Figura 4. Interação de COU na posição 1 com ERs. **(A)** Contato entre ER α e anéis A e D do COU. **(B)** Contato entre ER α e anéis B e C do COU. **(C)** Contato entre ER β e anéis A e D do COU. **(D)** Contato entre ER β e anéis B e C do COU. Fonte: Adaptado de CHANDSAWANGBHUWANA & BAKER (2014, p. 39-40).

Em relação à pele, foi testada a viabilidade do cumestrol promover a síntese de colágeno, produzir ATP, inibir a glicação, a biossíntese de cicloxigenase (COX-2) e a produção de prostaglandinas E2 (PGE2) em cultura de células fibroblastos humanos. O cumestrol apresentou um aumento de 29% (1,0 μ M) na produção de colágeno em relação ao controle, diminuiu a glicação de proteínas, relacionadas com o envelhecimento e comprometimento do colágeno, e aumentou a produção de ATP. Em relação a COX-2 e a PGE2, o cumestrol inibiu a produção dessas em 89,0% (0,01 μ M) e 38,2% (1,0 μ M), respectivamente (JEON *et al.*, 2013). Tais resultados demonstram o potencial desta molécula bioativa para o melhoramento da elasticidade, cicatrização, promoção da regeneração cutânea e sua potencial atividade anti-inflamatória.

Em suma, há subsídios científicos consistentes sobre a afinidade do cumestrol aos receptores estrogênicos presentes em vários tecidos, entre eles a pele. As consequências desta ação estrogênica ainda constituem-se objeto de investigação, uma vez que um dos mecanismos envolvidos resulta na proliferação celular decorrente, justamente, da resposta à ligação deste composto aos receptores estrogênicos. As demais atividades atribuídas à molécula com vistas a explorar seu potencial como agente antioxidante, antitumoral e anti-inflamatório constituem-se objeto de investigação, podendo estarem ou não inter-relacionadas.

Em relação à toxicidade do cumestrol, alguns estudos podem ser destacados. KULLING & METZLER (1997) relataram que o cumestrol exerce efeito mutagênico (sobre o locus HPRT do cromossomo X) e genotóxico (pela indução de micronúcleos em células V79). Em concentrações de 5-50 μM a frequência de mutação aumentou até 10 vezes em relação ao controle. Além disso, o cumestrol induziu quebras de DNA em células V79 (25 - 100 μM de cumestrol). Em outro trabalho o cumestrol revelou indução da apoptose em células de ovário de ratas adultas, após a exposição diária (durante 21 dias) em doses crescentes no período lactacional. Além disso, a redução no peso dos ovários ocorreu em paralelo com o aumento da apoptose (MOON *et al.*, 2009).

Não foram encontrados relatos na literatura científica especializada sobre a toxicidade do cumestrol administrado pela via cutânea, assim como sobre a sua utilização visando a prevenção do envelhecimento cutâneo, exceto os de nosso grupo de pesquisa, ou ainda da atividade cicatrizante (FRANCO *et al.*, 2009; ARGENTA *et al.*, 2011; OLIVEIRA, 2012).

Ciclodextrinas

As ciclodextrinas são oligômeros cíclicos de glicose unidos por ligação α -(1,4), amplamente utilizados como adjuvantes farmacêuticos por sua capacidade de formar complexos de inclusão com diferentes substâncias resultando em aumento de sua hidrossolubilidade. São obtidos a partir da degradação do amido pela ação da enzima ciclodextrinaglicosiltransferase (CGTase) produzida pelo microrganismo *Bacillus macerans* (LOFTSSON & MÁSSON, 2001; DEL VALLE, 2004). A estrutura da ciclodextrina é caracterizada pela presença de uma cavidade hidrofóbica, constituída de átomos de carbono e oxigênio, e de uma face externa com características hidrofílicas, composta por hidroxilas (LOFTSSON & BREWSTER, 1996; SINGH *et al.*, 2002; MUNRO *et al.*, 2004). As principais ciclodextrinas naturais são α , β e γ , as quais possuem seis, sete e oito unidades de glicose, respectivamente (LOFTSSON & BREWSTER, 1996; BIBBY *et al.*, 2000). De fato, as ciclodextrina têm a capacidade de modificar as características de molécula hóspedes de diferentes formas como, por exemplo, aumentando a solubilidade de fármacos lipofílicos, estabilizando-os contra possíveis degradações (frente ao

oxigênio, calor e luz visível ou ultravioleta), mascarando sabores e odores desagradáveis, entre outros efeitos (LOFTSON & MÁSSON 2001; DEL VALLE, 2004; PINHO *et al.*, 2014).

A β -ciclodextrina, bastante disponível e de baixo custo, possui limitada solubilidade em água, devido à formação de ligações de hidrogênio intramoleculares entre as hidroxilas secundárias, resultando na redução do número de OH capazes de fazer ligações de hidrogênio com as moléculas de água do meio. Essa característica de solubilidade da β -ciclodextrina permite a observação da ocorrência de precipitação dos complexos sólidos resultantes da sua associação com moléculas lipofílicas. Existem vários métodos para a obtenção de complexos de inclusão entre ciclodextrinas e moléculas. A seleção do método deve considerar as propriedades da molécula, a facilidade de incorporação e o custo envolvido (MARQUES, 2010). Os métodos mais comuns são os em solução, suspensão, *kneading* (método em pasta) e co-precipitação (HEDGES, 1998). Entretanto há outros métodos também citados na literatura como: complexação rápida (*slurry*), complexação por extrusão, mistura a seco, co-evaporação, liofilização, micro-ondas, granulação e nebulização (LOFTSSON & BREWSTER, 1996; GIORDANO *et al.*, 2001; DEL VALLE, 2004).

O processo de inclusão de uma molécula hóspede na cavidade da ciclodextrina ocorre em nível supramolecular, havendo uma substituição de moléculas de água (de elevada entalpia) da cavidade, pela molécula hóspede ou parte desta, sem a quebra de ligações covalentes ou formação de novos compostos (MANAKKER *et al.*, 2009; MARQUES, 2010). A complexação é mantida através das interações hidrofóbicas e forças de van der Waals, além de outros fatores, como diminuição da tensão do anel, modificações na superfície solvente e ligações de hidrogênio que tornam o complexo mais energeticamente estável (DEL VALLE, 2004; MANAKKER *et al.*, 2009). A molécula hóspede é separada das demais por dissolução, deslocada por um hóspede mais adequado ou transferida a uma matriz pela qual tem maior afinidade (MANAKKER *et al.*, 2009).

A toxicidade das ciclodextrinas pode diferir conforme a via de administração. Sabe-se que a β -ciclodextrina, por exemplo, induz limitada toxicidade por via oral, no entanto, quando administrada por via subcutânea, ou parenteral, pode causar nefrotoxicidade e hemólise. Esta característica também limita seu uso em testes

biológicos envolvendo cultura de células (LOFTSSON & BODOR, 1989; OLIVIER *et al.*, 1991; BELLRINGER *et al.*, 1995).

Como estratégia para elevar a solubilidade das ciclodextrinas naturais, bem como prover outras propriedades convenientes, tais como a redução da toxicidade, vários derivados têm sido sintetizados. Estes derivados são geralmente obtidos por reações de substituição nas hidroxilas primárias e secundárias, seja por aminação, esterificação ou eterificação. Essas substituições resultam na alteração do volume da cavidade hidrofóbica, no entanto, mantendo sua habilidade de incluir moléculas e aumentar a sua solubilidade, além de muitas vezes estabilizá-las (DEL VALLE, 2004). Um derivado amplamente empregado é a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), de fórmula molecular $C_{42}H_{70}O_{35}$ $(C_3H_6O)_x$ (em que x é igual a 7 substituições molares). A massa molecular do derivado é dependente do grau de substituição (KIBBE, 2009).

Devido à ausência de toxicidade a HP β CD (Figura 5) tem sido indicada especialmente como agente solubilizante para moléculas hidrofóbicas para as vias parenteral, ocular e pulmonar. Além disto, ao contrário da β -ciclodextrina, a maior solubilidade em água e baixa toxicidade da HP β CD permitem a sua utilização em ensaios que envolvem cultura de células.

A formação de complexos de inclusão de moléculas hóspedes com ciclodextrinas pode ser caracterizada por meio de técnicas analíticas como: calorimetria diferencial exploratória (DSC), análise térmica diferencial (DTA), análise de gases emanados (EGA), fluorimetria, espectroscopia no infravermelho (IR, FTIR, Raman-IR), cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectroscopia de massas (MS), ressonância magnética nuclear (RMN), espectrofotometria no ultravioleta e visível (UV-VIS), diagrama de solubilidade, difração de raios-X, microscopia eletrônica de varredura (MEV), termogravimetria (TG), entre outros (GIORDANO *et al.*, 2001; CALABRÒ *et al.*, 2004; CUPRI *et al.*, 2007).

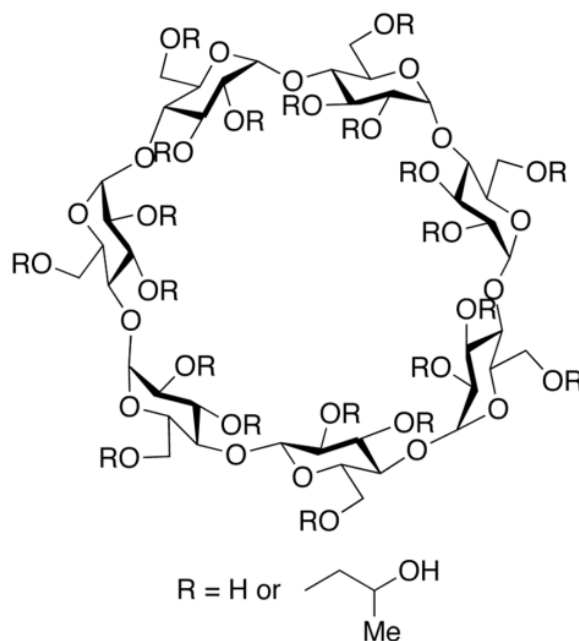


Figura 5. Estrutura química da hidroxipropil- β -ciclodextrina.

A complexação de fármacos com HP β CD é bastante descrita na literatura, entretanto, há poucos estudos disponíveis sobre a associação de moléculas naturais bioativas, como flavonoides, principalmente visando à aplicação cutânea. Estudos de nosso grupo de pesquisa relatam a complexação de fitoestrógenos como o cumestrol, a daidzeína e a genisteína à β -ciclodextrina e a incorporação das associações em hidrogéis para aplicação cutânea (FRANCO *et al.*, 2009; XAVIER *et al.*, 2010; BORGHETTI *et al.*, 2011) visando a promoção da permeação pelo adjuvante (LEGENDRE *et al.*, 1995). Em geral, as ciclodextrinas são moléculas relativamente grandes (PM 1000-2000), portanto, só podem aumentar a liberação de fármacos administrados topicamente em meio aquoso graças ao equilíbrio dinâmico que se forma entre os complexos e as moléculas de água do meio (TANAKA, *et al.*, 1995, RAJEWSKI & STELLA, 1996). Assim, são capazes de solubilizar substâncias lipofílicas em sistemas aquosos e, subsequentemente, liberam estas moléculas na superfície do estrato córneo para permear a pele (LOFTSSON & MÁSSON, 2001). Dessa maneira, acredita-se que as ciclodextrinas atuem como carreadores de substâncias lipofílicas complexadas em solução, por torná-las mais disponíveis na superfície cutânea, uma vez que a dissolução de substâncias insolúveis é um pré-requisito para sua permeação e/ou absorção (LOFTSSON, 1998; MÁSSON *et al.*, 1999).

A ação promotora da permeação cutânea de substâncias pelas ciclodextrinas pode ocorrer, também, pela sua capacidade de extração de lipídios do estrato córneo (IRIE & UEKAMA, 1997). Entretanto outras investigações revelam que os lipídios da pele podem competir com as moléculas de fármaco ou constituintes do veículo pela cavidade central das ciclodextrinas (LOFTSSON & MÁSSON, 2001).

Geralmente, as ciclodextrinas e seus complexos são pouco absorvidos através da pele, isto é, apenas uma pequena fração livre que está em equilíbrio com a fração complexada do fármaco, pode estar disponível para absorção percutânea. De forma controversa, ARIMA e colaboradores (1990) relataram que DM β CD e HP β CD são capazes de permear a pele, particularmente quando aplicadas sob condições oclusivas. VOLLMER e colaboradores (1993), no entanto, demonstraram que a HP β CD se distribui homogeneamente pela epiderme e derme depois da aplicação de uma solução aquosa contendo HP β CD sobre a pele de ratos sob condições não oclusivas. Estes resultados sugerem que, a HP β CD pode afetar a transferência de fármacos através da pele via absorção na forma de complexo, mesmo que em pequena escala. Sendo assim, as controversias relativas ao comportamento de permeação cutânea das ciclodextrinas propriamente ditas evidenciam a necessidade de estudos adicionais para a compreensão mais precisa do mecanismo pelo qual esta ocorre (LOFTSSON *et al.*, 2006).

Hidrogéis de Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)

Os géis são amplamente utilizados em formulações tópicas por apresentarem vantagens em relação aos outros tipos de formulação no que diz respeito, por exemplo, a produção, envase e aplicação. Geralmente proporcionam um aspecto mais agradável e de boa aceitação pelo consumidor, além da sua facilidade de administração e baixo custo de produção (BARREIRO-IGLESIAS *et al.*, 2001).

Os géis hidrofílicos, por sua vez, têm sido muito utilizados como bases dermatológicas, pois possuem boa espalhabilidade, não são gordurosos e podem veicular várias substâncias ativas hidrossolúveis e lipossomas. A hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), também designada como hipromelose, (DCB, 04736) pertence à família dos polímeros hidrofílicos não-iônicos e é amplamente

empregada em formulações destinadas à administração oral e tópica (EL-KATTAN *et al.*, 2000).

Além disso, os polímeros hidrófilos, tais como a HPMC, são conhecidos por aumentar a eficácia complexação de uma ampla variedade de moléculas hóspedes e de aumentar a solubilidade aquosa de ciclodextrinas naturais (LOFTSSON, 1998) e de fármacos livres (LOFTSSON & BREWSTER, 1996). Assim, a inclusão de um polímero hidrofílico em meio contendo ciclodextrina pode aumentar a disponibilidade do medicamento complexado (CESCHEL *et al.*, 2002).

CESCHEL e colaboradores (2002) avaliaram uma estratégia alternativa para a administração transdérmica de dehidroepiandrosterona (DHEA), um agente promissor no tratamento de doenças relacionadas com a idade (osteoporose, aterosclerose), disfunções imunológicas e câncer. Estudos de permeação cutânea foram realizados em pele de suíno utilizando hidrogel de HPMC contendo o complexo α -ciclodextrina com DHEA, demonstrando melhora na permeação de DHEA, em relação à formulação contendo apenas o fármaco.

Em outro estudo realizado por SCHWINGE e colaboradores (2008), a 3-O-metilquercetina (3-MQ), um flavonoide com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes moderadas, foi complexada à β -ciclodextrina para posteriormente ser incorporada em uma formulação de hidrogel de HPMC. Surpreendentemente, foi observado que, quando inserida na matriz hidrofílica, o fluxo de permeação da 3-MQ foi superior ao flavonoide livre. Assim, pode-se observar que a HPMC tem efeito sobre a permeação, provavelmente devido à partição favorável entre hidrogel e estrato córneo, e este efeito, juntamente com a utilização de ciclodextrina, permitiu a absorção de 3-MQ na pele.

Além disso, os géis de HPMC são de fácil manipulação, baixo custo e possuem grande capacidade de geleificação quando em meio aquoso. Em relação à variabilidade na massa molecular e grau de substituição, são capazes de produzir géis com diferentes viscosidades. A HPMC é bastante utilizada como agente espessante em formulações tópicas, sendo amplamente utilizado em produtos cosméticos. É considerado um material não tóxico e não irritante (KIBBE, 2009).

REFERÊNCIAS

- AL-MAHARIK, N.; BOTTING, N. P. A new short synthesis of coumestrol and its application for the synthesis of [6,6a-11a-¹³C₃] coumestrol. **Tetrahedron**, v. 60, p. 1637-42, 2004.
- ALBANO, R. E. **Skin, Hair, and Nails: Structure and Function**. New York: Marcel Dekker, p. 469, 2004.
- AMBIGA, S. *et al.* Evaluation of wound healing activity of flavonoids from *Ipomoea carnea* Jacq. **Anc Sci Life**, v. 26, n. 3, p.45-51, 2007.
- AMOREPACIFIC CORPORATION. Hee Young Jeon *et al.* **Cosmetic Composition Comprising coumestrol or a bean extract containing coumestrol for skin care**. US 2013/0071342 A1, 31 mar. 2011, 21 mar. 2013. Disponível em: <<http://www.freshpatents.com/-dt20130321ptan20130071342.php>>. Acesso em: 11 jan. 2014.
- ANDERSON, L. N. *et al.* Phytoestrogen intake from foods, during adolescence and adulthood, and risk of breast cancer by estrogen and progesterone receptor tumor subgroup among Ontario women. **Int J Cancer**, v. 132, p. 1683-1692, 2013.
- ANTONELLI, M. L. *et al.* Simultaneous quantification of free and conjugated phytoestrogens in Leguminosae by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 66, p. 1025-33, 2005.
- ARGENTA, D. F. *et al.* LC analysis of coumestrol incorporated into topical lipid nanoemulsions. **Pharmazie**, v.66, n. 12, p. 929-32, 2011.
- ARIMA, H. *et al.* Enhancement of antiinflammatory effect of ethyl 4-biphenyl acetate in ointment by β -cyclodextrin derivatives: increased absorption and localized activation of the prodrug in rats. **Pharm Res**, v. 7, p. 1152–1156, 1990.
- ASHCROFT, G. S. *et al.* Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF- β 1 levels. **Nat Med**, v. 3, p. 1209–1215, 1997.
- ATTERITANO, M. *et al.* Effects of phytoestrogen genistein on cytogenetic biomarkers in postmenopausal women: 1 year randomized, placebo-controlled study. **Eur J Pharmacol**, v. 589, p. 22-6, 2008.
- AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: ArtMed, Cap. 33. p. 504-536, 2005.
- BARREIRO-IGLESIAS, R.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCGHEIRO, A. Incorporation of small quantities of surfactants as a way to improve the rheological and diffusional behavior of carbopol gels. **Journal of Controlled Release**, v. 77, p. 59-75, 2001.
- BAUMANN, L. **Cosmetic dermatology: principles and practice**. 2.ed. Miami: McGraw-Hill, p.365, 2009.

- BECK, V.; ROHR, U.; JUNGBAUER, A., Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to estrogen replacement therapy? **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v. 94, p. 499–518, 2005.
- BEDELL, S.; NACHTIGALL, M.; NAFTOLIN, F. The pros and cons of plant estrogens for menopause. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 139, p. 225-36, 2014.
- BELLRINGER, M.E. *et al.* β -Cyclodextrin: 52-Week toxicity studies in the rat and dog. **Food Chem Toxicol.**, v. 33, n. 5, p. 367-376, 1995.
- BENASSAYAG, C.; PERROT-APPLANAT, M.; FERRE, F. Phytoestrogens as modulator of steroid action in target cells. **J Chromatogr B**, v. 777, p. 233-48, 2002.
- BIBBY, D. C.; DAVIES, N. M.; TUCKER, I. G. Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. **Int J Pharm**, v.197, p. 1-11, 2000.
- BICKOFF, E. M. *et al.* Characterization of coumestrol, a naturally occurring plant estrogen. **Western Utilization Res Develop Div – Agr Res Ser**, v. 80, p.3969-71, 1958.
- BORELLI, F., ERNST, E. Alternative and complementary therapies for the menopause. **Maturitas**, v. 66, p. 333-343, 2010.
- BORGHETTI, G. S. *et al.* Daidzein/cyclodextrin/hydrophilic polymer ternary systems. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 37, p. 886-893, 2011.
- BRONAUGH, R. L. Determination of Percutaneous Absorption by In Vitro Techniques. In: BRONAUGH, R. L. *et al.* **Percutaneous Absorption: Drugs–Cosmetics–Mechanisms–Methodology**. 4.ed. New York: Taylor & Francys, 2005. p. 265-268. il.
- BRUNETON, J. **Pharmacognosy: Phytochemistry Medicinal Plants**. 2. ed. New York: Editions Ted & Doc, 2008.
- BROZIC, P. *et al.* Phytoestrogens as inhibitors of the human progesterone metabolizing enzyme AKR1C1. **Mol Cell Endocrinol**, v. 259, p. 30-42, 2006.
- BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids, **J Agri Food Chem**, v.6, p.49, 2001.
- BUROW, M. E. *et al.* Phytochemical glyceollins, isolated from soy, mediate antihormonal effects through estrogen receptor α and β . **J Clin Endocr Metab**, v. 86, n. 4, p. 1750-8, 2001.
- BUVARI-BARCZA, A.; BARCZA, L. Changes in the solubility of β -cyclodextrin inclusion complexes. **J Incl Phenom Macro**, v. 36, p. 355-370, 2000.
- CALABRÒ, M.L. *et al.* Effects of α - and β -cyclodextrin complexation on the physicochemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones. **J Pharmaceut Biomed**, v. 35, p. 365-377, 2004.

CESCHEL, G. C. *et al.* Skin permeation study of dehydroepiandrosterone (DHEA) compared with its α -cyclodextrin complex form. **J Pharm Sci**, v. 91, n. 11, p. 2399-2407, 2002.

CHANDSAWANGBHUWANA, C.; BAKER, M. E. 3D models of human ER α and ER β complexed with coumestrol. **Steroids**, v. 80, p. 37-43, 2014

CUPRI, V. *et al.* UV-vis and FTIR-ATR spectroscopic techniques to study the inclusion complexes of genistein with β -cyclodextrins. **J Pharmaceut Biomed**, v. 44, n. 1, p. 110-117, 2007.

CUTLER, W. B. **Hormones and Your Health: The Smart Woman's Guide to Hormonal and Alternative Therapies for Menopause**. New Jersey: John Wiley & Sons, p. 325, 2009.

d'ACAMPORA, A. J. *et al.* Efeitos da quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos Wistar. **Arq Cat Med**, v. 36, n. 1, p. 69-75, 2007.

DEL VALLE, E. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochem**, v. 39, p. 1033-46, 2004.

EL-KATTAN, A. F., ASBILL C. S.; MICHNIAK, B. B. The effect of terpene enhancer lipophilicity on the percutaneous permeation of hydrocortisone formulated in HPMC gel systems. **Int J Pharm**, v. 198, n. 2, p. 179-89, 2000.

FRANCO, C. *et al.* Studies on coumestrol/ β -cyclodextrin association: Inclusion complex characterization. **Int J Pharm**, v. 369, p. 5-11, 2009.

GANRY, O. Phytoestrogens and protatic cancer risk. **Prev Med**, v. 41, p. 1-6, 2005.

GENNARO, A. R. **Remington – The Science and Practice of Pharmacy**. 21.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J. R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. **Thermochim Acta**, v. 380, p. 123-51, 2001.

GRYNKIEWICZ, G. *et al.* Chromatographic Quantification of Isoflavones (Why and How). **Acta Chromatogr**, v. 15, n. 8, p. 31-65, 2005.

GURTNER, G.C., *et al.* Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, p. 314–321, 2008.

HALL, G; PHILLIPS, T. J. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. **J Am Acad Dermatol**, v. 53, p. 555-68, 2005.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medicinal significance of the flavonoids. **Pharmacol Therapeut**, v.96, p. 67-202, 2002.

HEDGES, A. R. Industrial applications of cyclodextrins. **Chem Rev**, v.98, n. 5, p. 2035–2044, 1998.

HERNANDEZ, M. *et al.* **Manual de Cosmetologia**. Capítulos 3 e 4. 3ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999.

HONG, Y. *et al.* Molecular basis for the interaction of four different classes of substrates and inhibitors with human aromatase. **Biochem Pharmacol**, v. 75, p. 1161-1169, 2007.

HUNTLEY, A. L.; ERNST, E. Soy for the treatment of perimenopausal symptoms – a systematic review. **Maturitas**, v. 47, p. 1-9, 2004.

IOVINE, A *et al.* Comparative Analysis of the Photo-Protective Effects of Soy Isoflavones in Their Aglycone and Glucoside Forms. **Int J Mol Sci**, v. 13, p.16444-16456, 2012.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. **J Pharm Sci**, v. 86, n. 2, p. 147-62, 1997.

JEON, H. Y. *et al.* Effect of *Aspergillus oryzae*-Challenged Germination on Soybean Isoflavone Content and Antioxidant Activity. **J Agric Food Chem**, v. 60, p. 2807–2814, 2012.

JOU, H. J.; LING, P. Y.; WU, S. C. Comparasion of 70 mg and 35 mg isoflavone soya supplement for menopause symptoms. **Int J Gyneco Obstet**, v. 90, p. 159-160, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 9 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, cap.18, p. 303-314, 1999.

KANG, S. *et al.* Topical n-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet-light-induced signaling that leads to photoaging in human skin *in vivo*. **The J Invest Dermat.** v.120, p. 835-841, 2003.

KAUMAR, N. B. *et al.* The especific role of isoflavonas in reducing prostate cancer risk. **Prostate**. v. 59, p. 141-147, 2004.

KIBBE, A. H. **Handbook of Pharmaceutical excipients**, 6.ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 2009.

KONAR, N. *et al.* Effect of different sample preparation methods on isoflavone, lignin, coumestan and flavonoid contents of various vegetables determined by triple quadrupole LC-MS/MS. **J Food Comp Anal**, v. 26, p. 26-35, 2012.

KUIPER, G. J. M. *et al.* Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β . **Endocrinology**, v. 139, p. 4252-4263, 1998.

KULLING, S. E.; METZLER, M. Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogens coumoestrol. **Food Chem Toxicol**, Germany, v. 35, p. 605-13, 1997.

KULLING, S. E.; LEHMANN, L.; METZLER M. Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** v. 777, p. 211-8, 2002.

KURZER, M. S.; XU, X. Dietary Phytoestrogens. **Annu Rev Nutr**, v. 17, p. 353–381, 1997.

LAGARI; V. S.; LEVIS, S. Phytoestrogens in the Prevention of Postmenopausal Bone Loss. **J Clin Densitome.**, v. 16, n. 4, p. 445-449, 2013.

LAPCIK, O. *et al.* Synthesis of hapten and conjugates of coumestrol and development of immunoassay. **Steroids**, Czech Republic, v. 68, p. 1147-55, 2003.

LAZENNEC, G. *et al.* ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells **Endocrinology**, v. 142, n. 9, p. 4120-4130, 2001.

LEE, J. H. *et al.* LDL-Antioxidant Pterocarpanes from Roots of *Glycine max* (L.) Merr. **J Agric Food Chem**, v. 54, p. 2057-2063, 2006.

LEE, S. H. *et al.* Enhanced bioavailability of soy isoflavones by complexation with β -cyclodextrin in rats. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 71, p. 2927-2933, 2007.

LEE, H. I. *et al.* Effect of Soybean Coumestrol on *Bradyrhizobium japonicum* Nodulation Ability, Biofilm Formation, and Transcriptional Profile. **Appl Environ Microb**, v. 78, n. 8, p. 2896–2903, 2012.

LEGENDRE, J.Y. *et al.* Effects of β -cyclodextrins on skin: implications for the transdermal delivery of piroxicam and a novel cognition enhancing-drug, S-9977. **Eur J Pharm Sci**, v.3, p.311–322, 1995.

LEUNER, O. *et al.* Distribution of isoflavones and coumestrol in neglected tropical and subtropical legumes. **J Sci Food Agr**, v. 93, n. 3, p. 575-9, 2012.

LIANG, C.C., *et al.* In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Protoc** 2, p. 329–333, 2007.

LIGHT, D. **The Human Body: How it Works - Cells, Tissues, and Skin.** 2.ed. New York: Chelsea House, p. 157, 2009.

LODHI, S.; SINGHAI, A. K. Wound healing effect of flavonoid rich fraction and luteolin isolated from *Martynia annua* Linn. on streptozotocin induced diabetic rats. **Asian Pac J Trop Med**, v. 13, n. 6, p. 253-9, 2013.

LOFTSSON, T.; BODOR, N. Effects of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on the aqueous solubility of drugs and transdermal delivery of 17 beta-estradiol. **Acta Pharm Nord**, v. 1, n. 4, p. 185-94, 1989.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. **J Pharm Sci**, v. 85, n. 10, p. 1017-25, 1996.

LOFTSSON, T. Increasing the cyclodextrin complexation of drugs and drug bioavailability through addition of water-soluble polymers. **Pharmazie**, v. 53, p. 733-740, 1998.

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **Int J Pharm**, v. 225, p. 15–30, 2001.

LOFTSSON, T.; Konrádsdóttir, F.; MASSON, M. Influence of aqueous diffusion layer on passive drug diffusion from aqueous cyclodextrin solutions through biological membranes. **Pharmazie**, v. 61, n. 2, p. 83-9, 2006.

LYMAN, R. L. *et al.* Detection of coumestrol in leguminous plants. **Arch Biochem and Biophys**, v. 80, p. 61-67, 1959.

MAGGIOLINI, M. *et al.* Estrogen receptor alpha mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. **Mol Pharmacol**, v. 60, n. 3, p. 595-602, 2001.

MAGNUSSON, B. M.; WALTERS, K. A.; ROBERTS, M. S. Veterinary drug delivery: potential for skin penetration enhancement. **Adv Drug Deliver Rev**, v. 50, p. 205-27, 2001.

MANAKKER, F. *et al.* Cyclodextrin-based polymeric materials: Synthesis, properties, and pharmaceutical/biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 12, p. 3157–3174, 2009.

MARQUES, H. M. C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour Frag J**, v. 25, n. 5, p. 313–326, 2010.

MARTIN, P., LEIBOVICH, S.J. Inflammatory cells during wound, repair: the good, the bad and the ugly. **Trends Cell Biol**, v. 15, p. 599–607, 2005.

MÁSSON, M. *et al.* Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and in vitro testing. **J Contr Re**, v. 59, p. 107–118, 1999.

MATSUDA, H.; ARIMA, H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. **Adv Drug Deliver Rev**, v. 36, p. 81-99, 1999.

MLYNARCZUK, J.; WRÓBEL, M. H.; KOTWICA, J. Adverse Influence of Coumestrol on Secretory Function of Bovine Luteal Cells in the First Trimester of Pregnancy. **Environ Toxicol**, v. 10, p. 1-8, 2011.

MOON, H.J. *et al.* Lactational Coumestrol Exposure Increases Ovarian Apoptosis in Adult Rats. **Arch Toxicol**, v. 83, p. 601–608, 2009.

MUELLER, S. O. Overview of in vitro tools to assess the estrogenic and antiestrogenic activity of phytoestrogens. **J Chromatogr B-Biomed**, v. 777, p. 155-165, 2002.

MUNRO, I. C. *et al.* Safety assessment of γ -cyclodextrin. **Regul Toxicol Pharm**, v. 39, p. S3-S23, 2004.

MURALIDHAR, A. *et al.* Wound healing activity of flavonoid fraction isolated from the stem bark of *Butea monosperma* (Lam) in albino wistar rats. **Eur J Exp Biol**, v.3, n.6, p. 1-6, 2013.

NDEBELE, K.; GRAHAM, B.; TCHOUNWOU, P. B. Estrogenic Activity of Coumestrol, DDT, and TCDD in Human Cervical Cancer Cells. **Int J Environ Res Public Health**, v.7, p. 2045-2056, 2010.

OCCHIUTO, F. *et al.* Effects of Phytoestrogenic Isoflavones from Red Clover (*Trifolium pratense* L.) on Experimental Osteoporosis. **Phytother Res**, v. 21, p. 130–134, 2007.

OECD. Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment. Paris, France: Organization for Economic Co-operation and Development, 2004.

OLIVEIRA, L. K. **Nanoemulsões de cumestrol incorporadas em hidrogéis: Efeito de materiais gelificantes sobre a retenção cutânea e atividade antioxidante.** Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

OLIVIER, P.; VERWAERDE, F; HEDGES, A. R. Subchronic Toxicity of Orally Administered Beta-Cyclodextrin in Rats. **Int J Toxicol**, v. 10, p. 407-419, 1991.

PATISAUL, H.B.; WHITTEN, P.L.; YOUNG, L. J. Regulation of estrogen receptor beta mRNA in the brain: opposite effects of 17beta-estradiol and the phytoestrogen, coumestrol. **Mol Brain Res**, v. 67, p. 65 - 71, 1999.

PATRI, G.; SILANO, V.; ANTON, R. Plants in Cosmetics: Potentially harmful components. **Council of Europe**, v. 3, p. 37-38, 2006.

PEETERS, P. H. M. *et al.* Phytoestrogens and breast cancer risk. **Breast Cancer Res Treat**, v. 77, p. 171-183, 2003.

PETRY, M.; BORGHETTI, G.S.; BASSANI, V. L. Influência de ciclodextrinas e polímero hidrofílico sobre a hidrossolubilidade de diferentes formas polimórficas de quercetina. **Latin Am J Pharma**, v. 26, p. 831-836, 2007.

PHILLIPS, T. J.; DEMIRCAZ Z.; SAHU M. Hormonal effects on skin aging. **Clin Geriatr Med**, v. 17, p. 661–672, 2001.

PINHO, E. *et al.* Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydr Polymers**, v. 101, p. 121– 135, 2014

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

RAINE-FENNING, N. J.; BRINCAT, M. P.; MUSCAT-BARON, Y. Skin aging and menopause: implications for treatment. **Am J Clin Dermatol**, v. 4, p. 371–378, 2003.

RAJEWSKI, R. A., STELLA, V. J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. **J Pharm Sci**, v. 85, n.11, p. 1142-69, 1996.

REBELLO, T. **Guia de Produtos Cosméticos**, 6 ed. São Paulo: Senac, p. 131-132, 2005.

REUTER, J. *et al.* Botanicals in dermatology and skin health. In: Cooper, R., KRONENBERG, F. (Eds.), **Botanical medicine**. From bench to bedside. New York: Mary Ann Liebert Inc., p. 33–65, 2009 il.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia Aplicada a Dermoestética**, 2 ed. São Paulo: Pharmabooks, p. 17-26; 206-212, 2010.

ROUTRAY, W.; ORSAT, V. Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. **Food Bioprocess Technol**, v. 5, p. 409-424, 2011.

SAIJO, K. *et al.* An ADIOL-ERbeta-CtBP transrepression pathway negatively regulates microglia-mediated inflammation. **National Institutes of Health**, v. 145, p. 584-95, 2011.

SAKAMOTO, T. *et al.* Effects of diverse dietary phytoestrogens on cell growth, cell cycle and apoptosis in estrogen-receptor-positive breast cancer cells. **J Nutr Biochem**, v. 21, p. 856-864, 2010.

SARTORELLI, P. *et al.* Percutaneous penetration studies for risk assessment. **Environ Toxicol Phar**, v. 8, p. 133-52, 2000.

SATOR, P. G. *et al.* The influence of hormone replacement therapy on skin ageing. A pilot study. **Maturitas**, v. 39, p. 43–55, 2001.

SCAMBIA, G. *et al.* Clinical effects of a standardized soy extract in postmenopausal women: a pilot study. **Menopause**, v. 7, p. 105-111, 2000.

SCHAFER, M., WERNER, S. Transcriptional control of wound repair. **Annu Rev Cell Dev Bi**, v. 23, p. 69–92, 2007.

SCHIMIDT, C. *et al.* Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. **J Ethnopharmacol**, v. 122, p. 523–532, 2009.

SCHWINGEL, L. C. *et al.* Association of 3-O-methylquercetin with β -cyclodextrin: complex preparation, characterization and ex vivo skin permeation studies. **J Inclusion Phenom Macrocyclic Chem**, v. 62, p. 149-159, 2008.

SEKKAT, N.; KALIA, Y.N.; GUY, R. H. Biophysical study of porcine ear skin *in vitro* and its comparison to human skin *in vivo*. **J Pharm Sci**, v. 91, p. 2376-81, 2002.

SETCHELL, K. D. R. *et al.* Pharmacokinetics of a Slow-Release Formulation of Soybean Isoflavones in Healthy Postmenopausal Women. **J Agric Food Chem**, v. 53, p. 1938-1944, 2005.

SHIMIZU, T. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the skin. **J Dermatol Sci**, v. 37, p. 65-73, 2005.

SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U. C. Biotechnological applications of cyclodextrins. **Biotechnol Adv**, v. 20, p. 341-59, 2002.

SOFTWARE CHEMBIO OFFICE, editon 2007. ChemBio 3D and ChemBio Draw Ultra versão 9.0. Cambridge Soft.

TANAKA, M. *et al.* Effect of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on percutaneous absorption of methyl paraben. **J Pharm Pharmacol**, v. 47, n. 11, p. 897-900, 1995.

TAYLOR, L. P.; GROTEWOLD, E. Flavonoids as developmental regulators. **Curr Opin Plant Biol**, v. 8, p. 317-23, 2005.

THORNTON, M. J. *et al.* Oestrogen receptor beta is the predominant oestrogen receptor in human scalp skin. **Exp Dermatol**, v. 12, p. 181-90, 2003.

TRUEBA, G. P. Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. **Rev Cuba Investig Bioméd**, v. 22, p. 48-57, 2003.

THE MERCK INDEX, **An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**. 14.ed. New Jersey: Merck & CO Inc. 2006.

VERDIER-SÉVRAIN, S. Effect of estrogens on skin aging and the potential role of selective estrogen receptor modulators. **Climacteric**, v. 10, p. 289-297, 2007.

VOLLMER, V. *et al.* In vivo skin pharmacokinetics of liarozole: percutaneous absorption studies with different formulations of cyclodextrin derivatives in rats. **Int J Pharm**, v. 99, p. 51-58, 1993.

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

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Adv Drug Deliver Rev**, v. 56, p. 603-18, 2004.

WU, J. *et al.* A thermosensitive hydrogel based on quaternized chitosan and poly(ethylene glycol) for nasal drug delivery system. **Biomaterials**, v. 28, p. 2220-2232, 2007.

XAVIER, C. R. *et al.* Improvement of genistein content in solid genistein/cyclodextrin complexes β . **Quím Nova**, v. 33, p. 587-590, 2010.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 6.ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC e UFRGS, 2010. p. 577-614. il.

CAPÍTULO II

Development and Validation of a Stability-Indicating Liquid Chromatography Method for Coumestrol Quantification in Skin Permeation Studies

Development and Validation of a Stability-Indicating Liquid Chromatography Method for Coumestrol Quantification in Skin Permeation Studies

Sara E. Bianchi¹, Maribete H. Holzschuh¹, Helder F. Teixeira¹, Valquiria L. Bassani¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

Este capítulo propõe uma nova metodologia bioanalítica para quantificação do cumestrol nas formulações e em diferentes camadas da pele (estrato córneo, epiderme e derme). A etapa contemplou não somente o desenvolvimento, mas a validação do método para as matrizes complexas que seriam objeto de análise. A conhecida instabilidade de flavonoides frente a luz e pH alcalino também motivou um estudo indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência (exposição ao calor, luz ultravioleta e meios ácido, básico e oxidativo). Os parâmetros cromatográficos utilizados para as análises foram estabelecidos a partir de experimentos prévios e com base em estudos anteriores de quantificação deste composto em veículo farmacêutico.

CAPÍTULO III

**Association of coumestrol/hydroxypropyl- β -cyclodextrin:
characterization, skin delivery and wound healing studies**

Association of coumestrol/hydroxypropyl- β -cyclodextrin: characterization, skin delivery and wound healing studies

Sara E. Bianchi¹, Ivana S. Lula², Rubén D. Sinisterra², Lara Persich ³, Fabiana C. Geller³, Débora Argenta¹, Helder F. Teixeira¹, Cláudia M. O. Simões³, Valquiria L. Bassani¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

²Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

³Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil

Neste capítulo foi avaliado o potencial do cumestrol como um agente de prevenção do envelhecimento cutâneo e promotor da cicatrização da pele. O trabalho pautou-se, basicamente, no desenvolvimento de formulações com este objetivo. No que se refere ao desenvolvimento tecnológico, a reduzida hidrossolubilidade do cumestrol representava um fator limitante ao seu emprego em formulações biofarmacêuticas e cosméticas. Com base em estudos preliminares do grupo de complexação com a β -ciclodextrina (β CD), optou-se pela associação do cumestrol com a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), com vistas em melhorar a hidrossolubilidade desta substância, sem inviabilizar o estudo em cultura de células.

DISCUSSÃO GERAL

O 17 β -estradiol é um hormônio de ocorrência natural nos seres humanos, sendo o seu aporte endógeno reduzido em mulheres no período pós-menopausa. Na pele, estão presentes os receptores estrogênicos ER α e ER β , que distribuem-se em diversos tipos de células. Os receptores ER β são encontrados preferencialmente em queratinócitos, fibroblastos dérmicos, folículos capilares e glândulas sebáceas, enquanto que os ER α são expressos em queratinócitos, no estrato basal e camada espinhosa. O 17 β -estradiol exerce sua ação na pele via ligação à estes receptores estrogênicos, podendo produzir efeitos agonistas ou antagonistas de forma concentração-dependente (HALL e PHILLIPS, 2005).

Os fitoestrogênios são constituintes não esteroidais de origem vegetal, capazes de se ligarem aos receptores estrogênicos, desencadeando respostas biológicas características do estrogênio. Neste contexto, o cumestrol ganha destaque devido a sua grande similaridade estrutural com a molécula do 17 β -estradiol e conseqüente atividade estrogênica, despertando interesse em avaliar seu potencial, tanto na prevenção do envelhecimento cutâneo, quanto cicatricial cutâneo.

Neste sentido, a pele é uma via de fácil acesso, não-invasiva, que permite a aplicação cutânea de produtos desenvolvidos não apenas para fins cosméticos, mas também para fins terapêuticos. Para tanto, as propriedades biológicas da substância aplicada topicamente devem ser avaliadas, uma vez que esta deve penetrar na pele em concentrações ativas, além de ser capaz de alcançar o sítio de ação. Especificamente neste trabalho, a principal proposta foi estudar a penetração cutânea do cumestrol com vistas ao desenvolvimento de produtos visando a prevenção do envelhecimento cutâneo, bem como o efeito cicatrizante do cumestrol aplicado topicamente. Com estes objetivos a dissertação foi organizada em três capítulos.

O primeiro capítulo deste trabalho foi dedicado à revisão bibliográfica do tema em questão. Para contextualizar o estudo de penetração cutânea e cicatricial do cumestrol proposto no presente trabalho, foi apresentado um breve histórico sobre os aspectos da pele, envelhecimento cutâneo e os processos envolvendo a cicatrização. Em seguida, foram abordadas as atividades biológicas dos flavonoides/coumestanos e os dados existentes a respeito das diferentes aplicabilidades do fitoestrogênio cumestrol. Ademais, foi discutida a utilização de

ciclodextrinas com a finalidade de aumentar a hidrossolubilidade e de promover a permeação cutânea de substâncias de interesse. O capítulo forneceu subsídios que demonstraram, claramente, que para alcançar um efeito estrogênico e cicatrizante, é necessária a promoção da permeação do cumestrol até a camada basal e derme, com a finalidade de alcançar o maior número de receptores de estrogênio. Trabalhos preliminares do grupo forneceram subsídios para testar a utilização de ciclodextrina como agente de promoção da penetração cutânea do cumestrol. A HP β CD foi a ciclodextrina de escolha, com vistas a viabilizar os ensaios de efeito cicatricial, em cultura de fibroblastos. Assim, três aspectos inéditos se colocaram em evidência ao final do capítulo: o uso de HP β CD para a associação com cumestrol, o estudo de permeação cutânea do mesmo, com a sua quantificação nas diferentes camadas da pele, associado ou não à HP β CD, e o estudo do efeito cicatricial em cultura de fibroblastos.

No segundo capítulo, uma nova metodologia bioanalítica para quantificação do cumestrol nas formulações e em diferentes camadas da pele (estrato córneo, epiderme e derme) foi desenvolvida. A etapa contemplou não somente o desenvolvimento, mas a validação do método para as matrizes complexas que seriam objeto de análise. A conhecida instabilidade de flavonoides frente a luz e pH alcalino também motivou um estudo indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência (exposição ao calor, luz ultravioleta e meios ácido, básico e oxidativo). Os parâmetros cromatográficos utilizados para as análises foram estabelecidos a partir de experimentos prévios e com base em estudos anteriores de quantificação deste composto em veículo farmacêutico (ARGENTA *et al.*, 2011).

O método bioanalítico desenvolvido mostrou-se específico e indicativo de estabilidade para cumestrol frente a exposição ao calor, luz ultravioleta e meios ácido, básico e oxidativo. Como esperado, o cumestrol apresentou instabilidade quando exposto a luz ultravioleta (UVC) e em meio básico, exibindo cinética de ordem zero e primeira ordem, respectivamente, e os produtos de degradação apresentaram picos com tempos de retenção diferentes do pico correspondente ao cumestrol, não interferindo em sua quantificação. Os resultados indicaram a importância da proteção do cumestrol contra a exposição à luz ultravioleta e pH alcalino. A base hidrofílica em que foi incorporado o cumestrol, as tiras de fita adesiva utilizadas para remover o estrato córneo e os componentes da pele

apresentaram tempos de retenção diversos ao do cumestrol, não interferindo em sua análise. Tais características revelaram a excelente especificidade do método.

Além disso, o método foi validado segundo os compêndios oficiais, FDA (2001) e ICH (2005), mostrando-se linear, exato, preciso e robusto na faixa de 0,04 a 10 mg/mL. Em conclusão o capítulo descreve um método por CLAE que mostrou-se adequado para a quantificação de cumestrol em estudos de permeação de formulações de hidrogel em pele de orelha suína.

Após a validação bioanalítica da metodologia, avançou-se para o Capítulo III, onde os passos dados foram em direção à hipótese de o cumestrol ser um potencial agente de prevenção do envelhecimento cutâneo e promotor da cicatrização da pele. O trabalho pautou-se, basicamente, no desenvolvimento de formulações com este objetivo. Os testes biológicos não faziam parte inicialmente do projeto devendo constituir-se objeto de investigação subsequente. No entanto, a colaboração com a Dra Cláudia Simões da UFSC, no âmbito da Rede de Nanobiotecnologia da CAPES (NanoFito) propiciou a realização do estudo do efeito cicatricial em cultura de fibroblastos, o que resultou em achados inéditos para a molécula.

No que se refere ao desenvolvimento tecnológico, a reduzida hidrossolubilidade do cumestrol representava um fator limitante ao seu emprego em formulações biofarmacêuticas e cosméticas. Com base em estudos preliminares do grupo de complexação com a β -ciclodextrina (β CD), optou-se pela associação do cumestrol com a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), com vistas em melhorar a hidrossolubilidade desta substância, sem inviabilizar o estudo em cultura de células. Na proporção molar de 1:1, a HP β CD aumentou a solubilidade do cumestrol em 12 vezes, contudo, a eficiência de complexação foi baixa, o que requereu grande excesso de ciclodextrina para a obtenção da associação. Com a finalidade de estabelecer uma comparação, preparou-se uma simples mistura em fase sólida de cumestrol/HP β CD (mistura física).

Tanto a associação quanto a mistura física cumestrol/HP β CD (proporção molar 1:1) foram caracterizados utilizando-se microscopia eletrônica de varredura, calorimetria exploratória diferencial, espectroscopia no infravermelho, raio-X e análise de ressonância magnética nuclear. Apesar do aumento da solubilidade determinada pela associação em solução, as análises revelaram não ocorrer a formação de complexos de inclusão, tampouco foi evidenciada a formação de

complexos de não inclusão. Ao contrário do que foi observado por FRANCO e colaboradores (2009), em que a inclusão do cumestrol na cavidade da β CD pôde ser evidenciada, neste caso, a utilização de um derivado da β CD, não resultou em inclusão. Estudos com vistas ao aprofundamento deste fenômeno estão em curso.

Na sequência, os estudos trataram de medir a influência da HP β CD, sob a forma de mistura física ou em associação ao cumestrol, sobre a sua permeação cutânea. Ensaio *in vitro* foram realizados utilizando-se células de difusão tipo Franz e pele de orelha suína como membrana. Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho, denotaram que, o cumestrol incorporado em hidrogel foi capaz de chegar até o estrato córneo e a epiderme. Nas formulações contendo HP β CD, observou-se a presença de significativa concentração de cumestrol na derme, a partir da base hidrofílica de HPMC. O efeito promotor de permeação da HP β CD revelou-se maior a partir da associação do que para a mistura física. Tendo em vista que não foi observada complexação na associação, a possibilidade de esta diferença estar relacionada com a maior proporção de ciclodextrina na associação do que na mistura física é uma hipótese plausível. Em ambos os casos, associação e mistura física, a ciclodextrina parecem revelar seu efeito promotor de permeação pela interferência na organização do estrato córneo. No entanto, não se pode descartar, a possibilidade de promoção da disponibilidade do cumestrol para penetração decorrente do aumento de sua hidrossolubilidade na associação.

Por fim, a atividade cicatrizante (*scratch*) *in vitro* do cumestrol foi investigada em cultura de fibroblastos de gengiva humana. O efeito na capacidade de migração e proliferação a partir de uma lacuna artificial criada na monocamada celular foi avaliada para o cumestrol livre ou associado (mistura física ou associação). A associação cumestrol/HP β CD induziu a migração e proliferação celular comparativamente ao controlo positivo (PDGF). Resultados ligeiramente mais baixos foram obtidos com cumestrol dissolvido em DMSO. Por outro lado, o cumestrol dissolvido em DMSO (100 μ M) e/ou dissolvido em DMEM (50 μ M) reduziram a migração celular. O efeito negativo observado para o cumestrol dissolvido em DMSO em elevada concentração (100 μ M) pode ser devido a sua toxicidade ou como descrito em outros estudos, à diminuição na atividade de estrogênio em níveis elevados de cumestrol (BUROW *et al.*, 2001; BENASSAYAG *et al.*, 2002). Já para o cumestrol dissolvido em DMEM (50 μ M) pode-se observar

que este não estava completamente disperso no DMEM, devido à baixa solubilização desta substância neste meio. O tratamento com a mistura física de cumestrol/HP β CD aumentou moderadamente o número de células na lacuna artificial, evidenciando que a associação cumestrol/HP β CD, mesmo não se tratando de complexo de inclusão, apresenta melhores resultados no teste biológico.

Em resumo, o Capítulo III demonstrou o potencial da associação cumestrol/HP β CD incorporado em hidrogel de HPMC para um sistema de liberação cutâneo. Mesmo não se evidenciando a formação de complexo, esta associação mostrou claramente o efeito de HP β CD na solubilidade cumestrol e especialmente no aumento da permeabilidade da pele, atingindo a derme onde a presença de receptores de estrogênio (ER α e ER β) é maior.

O teste de efeito cicatricial (*scratch*) em cultura de fibroblastos avaliou, pela primeira vez, a potencialidade do cumestrol e suas associações com HP β CD. Neste teste biológico, a HP β CD mostrou ser uma alternativa para a utilização de DMSO para solubilizar o cumestrol em ensaios de culturas celulares *in vitro*. Além de viabilizar a realização do ensaio, a associação do cumestrol com HP β CD evidenciou, claramente, a potencialidade deste coumestano na promoção da cicatrização.

CONCLUSÕES

- A validação da metodologia bioanalítica indicativa de estabilidade para quantificação do cumestrol por CLAE mostrou-se linear, precisa, exata, específica e robusta nas condições testadas, cumprindo a sua finalidade para estudos de permeação cutânea a partir da formulação de hidrogel testada.
- O diagrama de solubilidade segundo Higuchi & Connors demonstrou um incremento de hidrosolubilidade do cumestrol em 12 vezes, quando associado à HP β CD, na proporção molar 1:1.
- A avaliação das combinações do coumestrol com HP β CD (associação e mistura física) por microscopia eletrônica de varredura, calorimetria diferencial exploratória, espectrofotometria no infravermelho e raio-X sugerem maior interação entre o coumestrol e HP β CD na associação. No entanto, a análise por RMN de ^1H não corroboraram a hipótese de formação de complexo de inclusão do cumestrol com a cavidade da ciclodextrina, apesar do incremento de solubilidade observado de 12 vezes.
- A formulação de hidropropilmetilcelulose apresentou comportamento do tipo não-Newtoniano pseudoplástico.
- A comparação entre a permeação cutânea do cumestrol livre, com a mistura física e associação cumestrol/HP β CD demonstrou que a maior permeação do cumestrol foi obtida a partir da associação, seguida pela mistura-física. Foi possível observar que a HP β CD influenciou positivamente no incremento da permeação de cumestrol, que neste caso alcançou a derme em maior concentração.
- O conjunto dos resultados obtidos neste estudo demonstrou a influência da HP β CD sobre a distribuição do cumestrol através das camadas da pele e a promoção de sua permeação.
- Na avaliação da atividade cicatrizante, a associação cumestrol/HP β CD induziu a maior migração e proliferação celular comparativamente ao controle positivo (PDGF). O cumestrol dissolvido em DMSO apresentou resultados ligeiramente mais baixos e o tratamento com a mistura física de cumestrol/HP β CD aumentou moderadamente o número de células na lacuna artificial.

- No teste de cicatrização em cultura de fibroblastos (*scratch*), a utilização de HP β CD mostrou ser uma alternativa ao uso DMSO para solubilizar o cumestrol, o que abre perspectivas também para outros testes com cultura de células.

REFERÊNCIAS

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

ALBANO, R. E. **Skin, Hair, and Nails: Structure and Function**. New York: Marcel Dekker, p. 469, 2004.

AMBIGA, S. *et al.* Evaluation of wound healing activity of flavonoids from *Ipomoea carnea* Jacq. **Anc Sci Life**, v. 26, n. 3, p.45-51, 2007.

AMOREPACIFIC CORPORATION. Hee Young Jeon *et al.* **Cosmetic Composition Comprising coumestrol or a bean extract containing coumestrol for skin care**. US 2013/0071342 A1, 31 mar. 2011, 21 mar. 2013. Disponível em: <<http://www.freshpatents.com/-dt20130321ptan20130071342.php>>. Acesso em: 11 jan. 2014.

ANDERSON, L. N. *et al.* Phytoestrogen intake from foods, during adolescence and adulthood, and risk of breast cancer by estrogen and progesterone receptor tumor subgroup among Ontario women. **Int J Cancer**, v. 132, p. 1683-1692, 2013.

ANTONELLI, M. L. *et al.* Simultaneous quantification of free and conjugated phytoestrogens in Leguminosae by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 66, p. 1025-33, 2005.

ARGENTA, D. F. *et al.* LC analysis of coumestrol incorporated into topical lipid nanoemulsions. **Pharmazie**, v.66, n. 12, p. 929-32, 2011.

ARIMA, H. *et al.* Enhancement of antiinflammatory effect of ethyl 4-biphenyl acetate in ointment by β -cyclodextrin derivatives: increased absorption and localized activation of the prodrug in rats. **Pharm Res**, v. 7, p. 1152–1156, 1990.

ASHCROFT, G. S. *et al.* Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF- β 1 levels. **Nat Med**, v. 3, p. 1209–1215, 1997.

ATTERITANO, M. *et al.* Effects of phytoestrogen genistein on cytogenetic biomarkers in postmenopausal women: 1 year randomized, placebo-controlled study. **Eur J Pharmacol**, v. 589, p. 22-6, 2008.

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

BACALONI, A.; CAVALIERE, C.; FABERI, A.; FOGLIA, P.; SAMPERI, R.; LAGANÀ, A. Determination of isoflavones and coumestrol in river water and domestic wastewater sewage treatment plants. **Anal. Chim. Acta**, v. 531, p. 229–237, 2005.

BARREIRO-IGLESIAS, R.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCGHEIRO, A. Incorporation of small quantities of surfactants as a way to improve the rheological and diffusional behavior of carbopol gels. **Journal of Controlled Release**, v. 77, p. 59-75, 2001.

BAUMANN, L. **Cosmetic dermatology: principles and practice**. 2.ed. Miami: McGraw-Hill, p.365, 2009.

BECK, V.; ROHR, U.; JUNGBAUER, A., Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to estrogen replacement therapy? **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v. 94, p. 499–518, 2005.

BEDELL, S.; NACHTIGALL, M.; NAFTOLIN, F. The pros and cons of plant estrogens for menopause. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 139, p. 225-36, 2014.

BELLRINGER, M.E. *et al.* β -Cyclodextrin: 52-Week toxicity studies in the rat and dog. **Food Chem Toxicol.**, v. 33, n. 5, p. 367-376, 1995.

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

BENTLEY, M.V.; VIANNA, R.F.; WILSON, S.; COLLETT, J.H. Characterization of the Influence of some Cyclodextrins on the Stratum Corneum from the Hairless Mouse. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 49, n. 4, p. 397-402, 1997.

BIBBY, D. C.; DAVIES, N. M.; TUCKER, I. G. Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. **Int J Pharm**, v.197, p. 1-11, 2000.

BICKOFF, E. M. *et al.* Characterization of coumestrol, a naturally occurring plant estrogen. **Western Utilization Res Develop Div – Agr Res Ser**, v. 80, p.3969-71, 1958.

BORELLI, F., ERNST, E. Alternative and complementary therapies for the menopause. **Maturitas**, v. 66, p. 333-343, 2010.

BORGHETTI, G. S. *et al.* Quercetin/ β -Cyclodextrin solid complexes prepared in aqueous solution followed by spray-drying or by physical mixture. **AAPS Pharm Sci Tech**, v. 10, p. 235-242, 2009.

BORGHETTI, G. S. *et al.* Daidzein/cyclodextrin/hydrophilic polymer ternary systems. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 37, p. 886-893, 2011.

BRONAUGH, R. L. Determination of Percutaneous Absorption by In Vitro Techniques. In: BRONAUGH, R. L. *et al.* **Percutaneous Absorption: Drugs–Cosmetics–Mechanisms–Methodology**. 4.ed. New York: Taylor & Francys, 2005. p. 265-268. il.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy: Phytochemistry Medicinal Plants**. 2. ed. New York: Editions Ted & Doc, 2008.

BROZIC, P. *et al.* Phytoestrogens as inhibitors of the human progesterone metabolizing enzyme AKR1C1. **Mol Cell Endocrinol**, v. 259, p. 30-42, 2006.

BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids, **J Agri Food Chem**, v.6, p.49, 2001.

BUROW, M. E. *et al.* Phytochemical glyceollins, isolated from soy, mediate antihormonal effects through estrogen receptor α and β . **J Clin Endocr Metab**, v. 86, n. 4, p. 1750-8, 2001.

BUVARI-BARCZA, A.; BARCZA, L. Changes in the solubility of β -cyclodextrin inclusion complexes. **J Incl Phenom Macro**, v. 36, p. 355-370, 2000.

CAL, K.; CENTKOWSKA, K. Use of cyclodextrins in topical formulations: Practical aspects. **Eur. J. Pharm. Biopharm**, v. 68, n. 3, p. 467-478, 2008.

CALABRÒ, M.L. *et al.* Effects of α - and β -cyclodextrin complexation on the physicochemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones. **J Pharmaceut Biomed**, v. 35, p. 365-377, 2004.

CAMPBELL, L.; Emmerson, E.; Davies, F.; Gilliver, S. C.; Krust, A.; Chambon, P.; Ashcroft, G. S.; Hardman, M. J. Estrogen promotes cutaneous wound healing via estrogen receptor β independent of its antiinflammatory activities. **J Exp Med**, v. 207, n. 9, p. 1825-1833, 2010.

CANNAVÀ, C.; CUPRI, V.; FICARRA, P.; GUARDO, M.; MAJOLINO, D.; STANCANELLI, R.; VENUTI, V. Physicochemical characterization of coumestrol/ β -cyclodextrins inclusion complexes by UV-vis and FTIR-ART spectroscopies. **Vib. Spectrosc**, v. 48, p.172-178, 2008.

CARINI, J. P.; KAISER, S.; ORTEGA, G. G. BASSANI, V. L. Development, Optimisation and Validation of a Stability-Indicating HPLC Method of Achyrobichalcone Quantification using Experimental Designs. **Phytochem Anal**, v. 24, n. 3, p. 193-200, 2013.

CESCHEL, G. C. *et al.* Skin permeation study of dehydroepiandrosterone (DHEA) compared with its α -cyclodextrin complex form. **J Pharm Sci**, v. 91, n. 11, p. 2399-2407, 2002.

CHALLA, R. *et al.* Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review. **AAPS Pharm Sci Tech**, v. 6, n. 2, p. 329-357, 2005.

CHANDSAWANGBHUWANA, C.; BAKER, M. E. 3D models of human ER α and ER β complexed with coumestrol. **Steroids**, v. 80, p. 37-43, 2014

CHEN, H.H.; HUANG, Y.C. Rheological properties of HPMC enhanced surimi analyzed by small- and large-strain tests—II: Effect of water content and ingredients. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n.2, p.313-22, 2008.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; ALMANSA-LÓPEZ, E.; EGEA-GONZÁLEZ, F. J.; CANO, M. L. C.; FRENICH, A. G.; MARTÍNEZ-VIDAL, J. L. Correction function on biased results due to matrix effects: Application to the routine analysis of pesticide residues. **Anal. Chim. Acta**, v. 478, p. 281-301, 2003.

CUPRI, V. *et al.* UV–vis and FTIR–ATR spectroscopic techniques to study the inclusion complexes of genistein with β -cyclodextrins. **J Pharmaceut Biomed**, v. 44, n. 1, p. 110-117, 2007.

CUTLER, W. B. **Hormones and Your Health: The Smart Woman's Guide to Hormonal and Alternative Therapies for Menopause**. New Jersey: John Wiley & Sons, p. 325, 2009.

d'ACAMPORA, A. J. *et al.* Efeitos da quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos Wistar. **Arq Cat Med**, v. 36, n. 1, p. 69-75, 2007.

DEL VALLE, E. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochem**, v. 39, p. 1033-46, 2004.

DONG, L. *et al.* Solubilities of quercetin in three β -cyclodextrin derivative solutions at different temperatures. **J Mol Liq**, v. 177, p. 204-208, 2013.

EL-KATTAN, A. F., ASBILL C. S.; MICHNIAK, B. B. The effect of terpene enhancer lipophilicity on the percutaneous permeation of hydrocortisone formulated in HPMC gel systems. **Int J Pharm**, v. 198, n. 2, p. 179-89, 2000.

FDA guidance for Industry: dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms, August 1997; extended release solid oral dosage forms: development, evaluation and application of in vitro/in vivo correlations, September 1997.

FELCYN, J. R.; DAVIS, J. C.; TRAN, L. H.; BERUDE, J. C.; LATCH, D. E. Aquatic photochemistry of isoflavone phytoestrogens: degradation kinetics and pathways. **Environ. Sci. Technol**, v. 46, p. 6698–6704, 2012.

FRANCO, C. **Associação do coumestrol com β -ciclodextrina: caracterização e avaliação da penetração cutânea**. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

FRANCO, C. *et al.* Studies on coumestrol/ β -cyclodextrin association: Inclusion complex characterization. **Int J Pharm**, v. 369, p. 5-11, 2009.

FRANKE, A. A.; CUSTER, L. J. High-performance liquid chromatographic assay of isoflavonoids and coumestrol from human urine. **J Chromatogr B**, v. 662, n. 1, p. 47-60, 1994.

GANRY, O. Phytoestrogens and prostate cancer risk. **Prev Med**, v. 41, p. 1-6, 2005.

GENNARO, A. R. **Remington – The Science and Practice of Pharmacy**. 21.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J. R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. **Thermochim Acta**, v. 380, p. 123-51, 2001.

GRYNKIEWICZ, G. *et al.* Chromatographic Quantification of Isoflavones (Why and

How). **Acta Chromatogr**, v. 15, n. 8, p. 31-65, 2005.

GURTNER, G.C., *et al.* Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, p. 314–321, 2008.

HALL, G; PHILLIPS, T. J. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. **J Am Acad Dermatol**, v. 53, p. 555-68, 2005.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medicinal significance of the flavonoids. **Pharmacol Therapeut**, v.96, p. 67-202, 2002.

HEDGES, A. R. Industrial applications of cyclodextrins. **Chem Rev**, v.98, n. 5, p. 2035–2044, 1998.

HERNANDEZ, M. *et al.* **Manual de Cosmetologia**. Capítulos 3 e 4. 3ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999.

HIGUCHI T.; CONNORS K. A. Phase-solubility techniques. **Adv. Anal. Chem. Instr.**, v. 4, p. 117-122, 1965.

HONG, Y. *et al.* Molecular basis for the interaction of four different classes of substrates and inhibitors with human aromatase. **Biochem Pharmacol**, v. 75, p. 1161-1169, 2007.

HUNTLEY, A. L.; ERNST, E. Soy for the treatment of perimenopausal symptoms – a systematic review. **Maturitas**, v. 47, p. 1-9, 2004.

International Conference on Harmonization (ICH). Guidance for industry: Bioanalytical method validation. 2001, 1-25.

International Conference on Harmonization (ICH). Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 2005, 1-13.

IOVINE, A *et al.* Comparative Analysis of the Photo-Protective Effects of Soy Isoflavones in Their Aglycone and Glucoside Forms. **Int J Mol Sci**, v. 13, p.16444-16456, 2012.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. **J Pharm Sci**, v. 86, n. 2, p. 147-62, 1997.

JEON, H. Y. *et al.* Effect of *Aspergillus oryzae*-Challenged Germination on Soybean Isoflavone Content and Antioxidant Activity. **J Agric Food Chem**, v. 60, p. 2807–2814, 2012.

JOU, H. J.; LING, P. Y.; WU, S. C. Comparison of 70 mg and 35 mg isoflavone soya supplement for menopause symptoms. **Int J Gyneco Obstet**, v. 90, p. 159-160, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 9 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, cap.18, p. 303-314, 1999.

KANG, S. *et al.* Topical n-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet-light-induced signaling that leads to photoaging in human skin *in vivo*. **The J Invest Dermat.** v.120, p. 835-841, 2003.

KAUMAR, N. B. *et al.* The specific role of isoflavonoids in reducing prostate cancer risk. **Prostate.** v. 59, p. 141-147, 2004.

KIBBE, A. H. **Handbook of Pharmaceutical excipients**, 6.ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 2009.

KOESTER, L. S.; XAVIER, C. R.; MAYORGA, P.; BASSANI, V. L. Influence of β -cyclodextrin complexation on carbamazepine release from hydroxypropyl methylcellulose matrix tablets. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 55, n.1, p. 85-91, 2003.

KONAR, N. *et al.* Effect of different sample preparation methods on isoflavone, lignin, coumestrol and flavonoid contents of various vegetables determined by triple quadrupole LC-MS/MS. **J Food Comp Anal**, v. 26, p. 26-35, 2012.

KUIPER, G. J. M. *et al.* Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β . **Endocrinology**, v. 139, p. 4252-4263, 1998.

KULLING, S. E.; METZLER, M. Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogens coumestrol. **Food Chem Toxicol**, Germany, v. 35, p. 605-13, 1997.

KULLING, S. E.; LEHMANN, L.; METZLER M. Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** v. 777, p. 211-8, 2002.

KURZER, M. S.; XU, X. Dietary Phytoestrogens. **Annu Rev Nutr**, v. 17, p. 353-381, 1997.

LAGARI; V. S.; LEVIS, S. Phytoestrogens in the Prevention of Postmenopausal Bone Loss. **J Clin Densitome.**, v. 16, n. 4, p. 445-449, 2013.

LAPCIK, O. *et al.* Synthesis of hapten and conjugates of coumestrol and development of immunoassay. **Steroids**, Czech Republic, v. 68, p. 1147-55, 2003.

LAZENNEC, G. *et al.* ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells **Endocrinology**, v. 142, n. 9, p. 4120-4130, 2001.

LEE, J. H. *et al.* LDL-Antioxidant Pterocarpanes from Roots of *Glycine max* (L.) Merr. **J Agric Food Chem**, v. 54, p. 2057-2063, 2006.

LEE, S. H. *et al.* Enhanced bioavailability of soy isoflavonoids by complexation with β -cyclodextrin in rats. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 71, p. 2927-2933, 2007.

LEE, H. I. *et al.* Effect of Soybean Coumestrol on *Bradyrhizobium japonicum* Nodulation Ability, Biofilm Formation, and Transcriptional Profile. **Appl Environ Microb**, v. 78, n. 8, p. 2896–2903, 2012.

LEGENDRE, J.Y. *et al.* Effects of β -cyclodextrins on skin: implications for the transdermal delivery of piri-bedil and a novel cognition enhancing-drug, S-9977. **Eur J Pharm Sci**, v.3, p.311–322, 1995.

LEUNER, O. *et al.* Distribution of isoflavones and coumestrol in neglected tropical and subtropical legumes. **J Sci Food Agr**, v. 93, n. 3, p. 575-9, 2012.

LI, M. **Organic Chemistry of Drug Degradation**. RSC Publication: London, 2012.

LIANG, C.C., *et al.* In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Protoc** 2, p. 329–333, 2007.

LIGHT, D. **The Human Body: How it Works - Cells, Tissues, and Skin**. 2.ed. New York: Chelsea House, p. 157, 2009.

LODHI, S.; SINGHAI, A. K. Wound healing effect of flavonoid rich fraction and luteolin isolated from *Martynia annua* Linn. on streptozotocin induced diabetic rats. **Asian Pac J Trop Med**, v. 13, n. 6, p. 253-9, 2013.

LOFTSSON, T.; BODOR, N. Effects of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on the aqueous solubility of drugs and transdermal delivery of 17 beta-estradiol. **Acta Pharm Nord**, v. 1, n. 4, p. 185-94, 1989.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. **J Pharm Sci**, v. 85, n. 10, p. 1017-25, 1996.

LOFTSSON, T. Increasing the cyclodextrin complexation of drugs and drug bioavailability through addition of water-soluble polymers. **Pharmazie**, v. 53, p. 733-740, 1998.

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **Int J Pharm**, v. 225, p. 15–30, 2001.

LOFTSSON, T.; Konrádsdóttir, F.; MASSON, M. Influence of aqueous diffusion layer on passive drug diffusion from aqueous cyclodextrin solutions through biological membranes. **Pharmazie**, v. 61, n. 2, p. 83-9, 2006.

LORAND, T.; VIGH, E.; GARAI, J. Hormonal action of plant derived and anthropogenic non-steroidal estrogenic compounds: phytoestrogens and xenoestrogens. **Curr Med Chem**, v. 17, p. 3542–3574, 2010.

LUNDH, T.J.; PETTERSSON, H.; KIESSLING, K. H. Liquid chromatographic determination of the estrogens daidzein, formononetin, coumestrol, and equol in bovine blood plasma and urine. **J. Assoc. Off. Analyt. Chem. Int**, v. 71, n.5, p. 938-941, 1988.

LYMAN, R. L. *et al.* Detection of coumestrol in leguminous plants. **Arch Biochem and Biophys**, v. 80, p. 61-67, 1959.

MAGGIOLINI, M. *et al.* Estrogen receptor alpha mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. **Mol Pharmacol**, v. 60, n. 3, p. 595-602, 2001.

MAGNUSSON, B. M.; WALTERS, K. A.; ROBERTS, M. S. Veterinary drug delivery: potential for skin penetration enhancement. **Adv Drug Deliver Rev**, v. 50, p. 205-27, 2001.

MANAKKER, F. *et al.* Cyclodextrin-based polymeric materials: Synthesis, properties, and pharmaceutical/biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 12, p. 3157–3174, 2009.

MARQUES, H. M. C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour Frag J**, v. 25, n. 5, p. 313–326, 2010.

MARTIN, P., LEIBOVICH, S.J. Inflammatory cells during wound, repair: the good, the bad and the ugly. **Trends Cell Biol**, v. 15, p. 599–607, 2005.

MÁSSON, M. *et al.* Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and in vitro testing. **J Contr Re**, v. 59, p. 107–118, 1999.

MATSUDA, H.; ARIMA, H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. **Adv Drug Deliver Rev**, v. 36, p. 81-99, 1999.

MITCHELL, A. E. *et al.* Ten-year comparison of the influence of organic and conventional crop management practices on the content of flavonoids in tomatoes. **J Agr Food Chem**, p. 1-15, 2007.

MLYNARCZUK, J.; WRÓBEL, M. H.; KOTWICA, J. Adverse Influence of Coumestrol on Secretory Function of Bovine Luteal Cells in the First Trimester of Pregnancy. **Environ Toxicol**, v. 10, p. 1-8, 2011.

MOON, H.J. *et al.* Lactational Coumestrol Exposure Increases Ovarian Apoptosis in Adult Rats. **Arch Toxicol**, v. 83, p. 601–608, 2009.

MUELLER, S. O. Overview of in vitro tools to assess the estrogenic and antiestrogenic activity of phytoestrogens. **J Chromatogr B-Biomed**, v. 777, p. 155-165, 2002.

MUELLER, S.O.; SIMON, S.; CHAE, K.; METZLER, M.; KORACH, K.S. Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ER alpha) and ER beta in human cells. **Toxicol Sci**, v. 80, p. 14–25, 2004.

MUNRO, I. C. *et al.* Safety assessment of γ -cyclodextrin. **Regul Toxicol Pharm**, v. 39, p. S3-S23, 2004.

MURALIDHAR, A. *et al.* Wound healing activity of flavonoid fraction isolated from

the stem bark of *Butea monosperma* (Lam) in albino wistar rats. **Eur J Exp Biol**, v.3, n.6, p. 1-6, 2013.

NDEBELE, K.; GRAHAM, B.; TCHOUNWOU, P. B. Estrogenic Activity of Coumestrol, DDT, and TCDD in Human Cervical Cancer Cells. **Int J Environ Res Public Health**, v.7, p. 2045-2056, 2010.

NOGOWSKI, L. Effects of phytoestrogen: coumestrol on lipid and carbohydrate metabolism in Young ovariectomized rats may be independent of its estrogenicity. **J Nutr Biochem**, v. 10, p. 664-9, 1999.

OCCHIUTO, F. *et al.* Effects of Phytoestrogenic Isoflavones from Red Clover (*Trifolium pratense* L.) on Experimental Osteoporosis. **Phytother Res**, v. 21, p. 130–134, 2007.

OECD. Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment. Paris, France: Organization for Economic Co-operation and Development, 2004.

OLIVEIRA, L. K. **Nanoemulsões de cumestrol incorporadas em hidrogéis: Efeito de materiais gelificantes sobre a retenção cutânea e atividade antioxidante.** Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

OLIVIER, P.; VERWAERDE, F; HEDGES, A. R. Subchronic Toxicity of Orally Administered Beta-Cyclodextrin in Rats. **Int J Toxicol**, v. 10, p. 407-419, 1991.

OSENI, T.; PATEL, R.; PYLE, J.; JORDAN, V.C. Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens. **Planta Med**, v. 74, p. 1656–1665, 2008.

PALEM, C. R.; CHOPPARAPU, K. S. C.; SUBRAHMANYAM, P.V.R.S.; YAMSANI, M. R. Cyclodextrins and their Derivatives in Drug Delivery: A Review. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 6, n.3, p.255-275, 2012.

PATISAUL, H.B.; WHITTEN, P.L.; YOUNG, L. J. Regulation of estrogen receptor beta mRNA in the brain: opposite effects of 17beta-estradiol and the phytoestrogen, coumestrol. **Mol Brain Res**, v. 67, p. 65 - 71, 1999.

PATRI, G.; SILANO, V.; ANTON, R. Plants in Cosmetics: Potentially harmful components. **Council of Europe**, v. 3, p. 37-38, 2006.

PEETERS, P. H. M. *et al.* Phytoestrogens and breast cancer risk. **Breast Cancer Res Treat**, v. 77, p. 171-183, 2003.

PETRY, M.; BORGHETTI, G.S.; BASSANI, V. L. Influência de ciclodextrinas e polímero hidrofílico sobre a hidrossolubilidade de diferentes formas polimórficas de quercetina. **Latin Am J Pharma**, v. 26, p. 831-836, 2007.

PHILLIPS, T. J.; DEMIRCAZ Z.; SAHU M. Hormonal effects on skin aging. **Clin Geriatr Med**, v. 17, p. 661–672, 2001.

PINHO, E. *et al.* Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydr Polymers**, v. 101, p. 121–135, 2014

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

PRASAIN, J. K.; ARABSHAHI, A.; MOORE, D. R.; GRENDAL, G. A.; WYSS, J. M.; BARNES, S. Simultaneous determination of 11 phytoestrogens in human serum using a 2 min liquid chromatography/tandem mass spectrometry method. **J Chromatogr B**, v. 878, n.13-14, p.944-1001, 2010.

RAINE-FENNING, N. J.; BRINCAT, M. P.; MUSCAT-BARON, Y. Skin aging and menopause: implications for treatment. **Am J Clin Dermatol**, v. 4, p. 371–378, 2003.

RAJEWSKI, R. A., STELLA, V. J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. **J Pharm Sci**, v. 85, n.11, p. 1142-69, 1996.

RASHEED, A.; KUMAR, A. C. K.; SRAVANTHI V. V. N. S. S. Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review. **Sci Pharm**. v. 76, p. 567–598, 2008.

REBELLO, T. **Guia de Produtos Cosméticos**, 6 ed. São Paulo: Senac, p. 131-132, 2005.

REUTER, J. *et al.* Botanicals in dermatology and skin health. In: Cooper, R., KRONENBERG, F. (Eds.), **Botanical medicine**. From bench to bedside. New York: Mary Ann Liebert Inc., p. 33–65, 2009 il.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia Aplicada a Dermoestética**, 2 ed. São Paulo: Pharmabooks, p. 17-26; 206-212, 2010.

RODRIGUEZ, L. G.; WU, X.; GUAN, J. L. Wound-healing assay. **Methods Mol Biol**. v.294, p. 23-9, 2005.

ROMANSKI, F.S., JAYJOCK, E., MUZZIO, F.J., TOMASSONE, M.S. Important Factors in the Size Reduction of Polymer-Stabilized Drug Particle Suspensions Using High-Pressure Homogenization. **J Pharm Innov**, v.6, n.2, p. 97-106, 2011.

ROUTRAY, W.; ORSAT, V. Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. **Food Bioprocess Technol**, v. 5, p. 409-424, 2011.

SAIJO, K. *et al.* An ADIOL-ERbeta-CtBP transrepression pathway negatively regulates microglia-mediated inflammation. **National Institutes of Health**, v. 145, p. 584-95, 2011.

SAKAMOTO, T. *et al.* Effects of diverse dietary phytoestrogens on cell growth, cell cycle and apoptosis in estrogen-receptor-positive breast cancer cells. **J Nutr Biochem**, v. 21, p. 856-864, 2010.

SARTORELLI, P. *et al.* Percutaneous penetration studies for risk assessment.

Environ Toxicol Phar, v. 8, p. 133-52, 2000.

SATOR, P. G. *et al.* The influence of hormone replacement therapy on skin ageing. A pilot study. **Maturitas**, v. 39, p. 43–55, 2001.

SCAMBIA, G. *et al.* Clinical effects of a standardized soy extract in postmenopausal women: a pilot study. **Menopause**, v. 7, p. 105-111, 2000.

SCHÖNFELDER, U. *et al.* Cyclodextrin induced apoptosis in human keratinocytes is caspase-8 dependent and accompanied by mitochondrial cytochrome c release. **Exp Dermatol**, v. 15, p. 883-90, 2006.

SCHIMIDT, C. *et al.* Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. **J Ethnopharmacol**, v. 122, p. 523–532, 2009.

SCHWINGEL, L. C. *et al.* Association of 3-O-methylquercetin with β -cyclodextrin: complex preparation, characterization and ex vivo skin permeation studies. **J Inclusion Phenom Macrocyclic Chem**, v. 62, p. 149-159, 2008.

SEKKAT, N.; KALIA, Y.N.; GUY, R. H. Biophysical study of porcine ear skin *in vitro* and its comparison to human skin *in vivo*. **J Pharm Sci**, v. 91, p. 2376-81, 2002.

SELINUMMI, J.; SEPPÄLÄ, J.; YLI-HARJA, O.; PUHAKKA, J. Software for quantification of labeled bacteria from digital microscope images by automated image analysis. **BioTechniques**, v.39, p. 859-863, 2005.

SETCHELL, K. D. R. *et al.* Pharmacokinetics of a Slow-Release Formulation of Soybean Isoflavones in Healthy Postmenopausal Women. **J Agric Food Chem**, v. 53, p. 1938-1944, 2005.

SHIMIZU, T. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the skin. **J Dermatol Sci**, v. 37, p. 65-73, 2005.

SCHAFER, M., WERNER, S. Transcriptional control of wound repair. **Annu Rev Cell Dev Bi**, v. 23, p. 69–92, 2007.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 6.ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC e UFRGS, 2010.

SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U. C. Biotechnological applications of cyclodextrins. **Biotechnol Adv**, v. 20, p. 341-59, 2002.

SOFTWARE CHEMBIO OFFICE, editon 2007. ChemBio 3D and ChemBio Draw Ultra versão 9.0. Cambridge Soft.

STEFFE, J. F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**. 2.ed. East Lansing (MI): Freeman Press , p. 418.

TANAKA, M. *et al.* Effect of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on percutaneous absorption of methyl paraben. **J Pharm Pharmacol**, v. 47, n. 11, p. 897-900, 1995.

TAYLOR, L. P.; GROTEWOLD, E. Flavonoids as developmental regulators. **Curr Opin Plant Biol**, v. 8, p. 317-23, 2005.

THORNTON, M. J. *et al.* Oestrogen receptor beta is the predominant oestrogen receptor in human scalp skin. **Exp Dermatol**, v. 12, p. 181–90, 2003.

TRUEBA, G. P. Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. **Rev Cuba Investig Bioméd**, v. 22, p. 48-57, 2003.

THE MERCK INDEX, **An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**. 14.ed. New Jersey: Merck & CO Inc. 2006.

UNGAR, Y.; OSUNDAHUNSI, O. F.; SHIMONI E. Thermal stability of genistein and daidzein and its effect on their antioxidant activity. **J Agric Food Chem**, v. 51, n.15, p. 4394-9, 2003.

VERDIER-SÉVRAIN, S. Effect of estrogens on skin aging and the potential role of selective estrogen receptor modulators. **Climacteric**, v. 10, p. 289–297, 2007.

VISWANATHAN, C. T.; BANSAL; S.; BOOTH, B.; DESTEFANO, A. J.; ROSE, M. J.; SAILSTAD, J.; SHAH, V. P.; SKELLY, J. P.; SWANN, P. G.; WEINER, R.; Quantitative Bioanalytical Methods Validation and Implementation: Best Practices for Chromatographic and Ligand Binding Assays. **AAPS J**. 2007, 9, E30.

VOLLMER, V. *et al.* In vivo skin pharmacokinetics of liarozole: percutaneous absorption studies with different formulations of cyclodextrin derivatives in rats. **Int J Pharm**, v. 99, p. 51–58, 1993.

XAVIER, C. R. *et al.* Improvement of genistein content in solid genistein/cyclodextrin complexes β . **Quím Nova**, v. 33, p. 587-590, 2010.

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

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Adv Drug Deliver Rev**, v. 56, p. 603-18, 2004.

WU, J. *et al.* A thermosensitive hydrogel based on quaternized chitosan and poly(ethylene glycol) for nasal drug delivery system. **Biomaterials**, v. 28, p. 2220-2232, 2007.

YATSU, F. K. J.; KOESTER, L. S.; LULA, I.; PASSOS, J. J.; SINISTERRA, R.; BASSANI, V. L. Multiple complexation of cyclodextrin with soy isoflavones present in an enriched fraction. **Carbohydr Polym**, v. 98, n.1, p.726–735, 2013.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. J. **Stability of Drugs and Dosage Forms**. Kluwer Academic Publishers: New York, 2002.

ZHENG, Y.; HAWORTH, I. S.; ZUO, Z.; CHOW, M. S. S; CHOW, A. H. L. Physicochemical and structural characterization of quercetin-b-cyclodextrin complexes. **J Pharm Sci-US**, v. 94, p. 1079–1089, 2005.

ZHU, Q. Y.; HOLT, R. R.; LAZARUS, S. A.; ENSUNSA, J. L.; HAMMERSTONE, J. F.; SCHMITZ, H. H.; KEEN, C. L. Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. **J Agric Food Chem**, v. 50, p 1700–1705, 2002.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O. et al.. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 6.ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC e UFRGS, 2010. p. 577-614. il.

ZVEZDANOVIC, J. B.; STANOJEVIC, J. S.; MARKOVIC, D. Z.; CVETKOVIC, D. J. Irreversible UV-induced quercetin and rutin degradation in solution, studied by UV-spectrophotometry and HPLC chromatography. **J Serb Chem Soc**, v. 77, n. 3, p. 297-312, 2012.