

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

**Nanoemulsões contendo genisteína:
estudo de formulação e permeação cutânea**

ANA PAULA CAPPRA SILVA

Porto Alegre, 2006.

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

**Nanoemulsões contendo genisteína:
estudo de formulação e permeação cutânea**

Dissertação apresentada por **Ana
Paula Cappra Silva** para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Helder F. Teixeira

Porto Alegre, 2006.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 20 de abril de 2006, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Edison Santana Carvalho
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pedro Ros Petrovick
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Simone Cardoso Gonçalves
Universidade Federal de Santa Maria

S586n Silva, Ana Paula Cappra
Nanoemulsões contendo genisteína: estudo de formulação e permeação cutânea / Ana Paula Cappra Silva – Porto Alegre : UFRGS, 2006. - 95 p.: il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Nanoemulsões. 2. Genisteína. 3. Permeação cutânea. I. Teixeira, Helder Ferreira. II. Título.

CDU: 615.4

Bibliotecária responsável:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico da
Faculdade de Farmácia da UFRGS.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira, pelos ensinamentos, dedicação, amizade e compreensão.

Ao Prof. Dr. Paulo Mayorga, pela disponibilidade e constantes contribuições durante a realização de todo o trabalho.

Aos professores do Laboratório de Desenvolvimento Galênico, Prof. Dr. George G. Ortega, Prof^a. Dr. Valquíria L. Bassani e Prof. Dr. Pedro R. Petrovick pelos momentos de convívio e exemplo profissional.

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento Galênico, Angélica, Bárbara, Cabral, Camila, Clarissa, Cleverson, Daniel, Fabiana, Francilene, Gizele, Greice, Gustavo Borré, Gustavo Petrovick, Juliana, Liege, Lísias, Maria, Mariana Meurer, Mariana Petry, Maribete, Olívia, Rafael, Renata, Roberta, Simone, Thiago, Tiago e Vinícius pelos grandes momentos de convívio descontraído, amizade, ajuda e companheirismo durante todo o trabalho.

Aos colegas do Laboratório 405, em especial Clarissa, Daniela, Eduardo, Érico, Helen, Lali, Leandro, Letícia Colomé, Sandra, Scheila e Vitória pela ajuda e amizade.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação, pela amizade, convívio e companheirismo.

Ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico (CDTF) por depositar total confiança no meu trabalho.

Aos funcionários da Faculdade de Farmácia, pelo auxílio e amizade.

Aos professores e colegas do Departamento de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica na Universidade Federal de Minas Gerais, em especial à Prof^a. Dr. Mônica Cristina de Oliveira e a mestranda Berta Nunes pela amizade e apoio dedicado.

Aos meus pais, irmãs e sobrinhos pelo amor e compreensão nos momentos de ausência.

Ao Paulo pelo amor, estímulo e apoio que muitas vezes me fez ver as situações por outra maneira e que me foram indispensáveis.

Ao Vicente que está chegando e já faz parte desta história, agradeço pelo amor e força de finalizar este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	7
Objetivo geral	9
Objetivo específico	9
REVISÃO	11
Pele e envelhecimento cutâneo	13
Isoflavonas e genisteína	17
Atividade antioxidante	20
Atividade estrogênica	22
Atividade inibidora da tirosina quinase	24
Nanoemulsões	25
Permeação cutânea	31
MATERIAIS E MÉTODOS	37
Materiais	39
Matérias-primas	39
Reagentes e solventes	39
Equipamentos	39
Métodos	41
Validação da metodologia para quantificação da genisteína.....	41
Linearidade	42
Limite de detecção e quantificação	42
Avaliação da repetibilidade e precisão intermediária	42
Exatidão	43
Especificidade.....	43
Determinação da solubilidade da genisteína nos óleos	43

Preparação das nanoemulsões	44
Caracterização das nanoemulsões	44
Determinação do diâmetro de gotícula	44
Determinação do pH.....	45
Determinação do potencial zeta	45
Determinação da viscosidade	45
Quantificação da genisteína nas nanoemulsões	46
Caracterização da genisteína por Calorimetria Diferencial Exploratória ..	47
Avaliação do perfil de penetração cutânea da genisteína <i>in vitro</i>	47
Células de difusão	48
Cinética de permeação	48
Quantificação da genisteína remanescente na pele após permeação cutânea.....	49
Análise estatística.....	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
Validação de metodologia para a quantificação da genisteína	53
Desenvolvimento de nanoemulsões contendo genisteína	62
Permeação cutânea da genisteína <i>in vitro</i>	70
CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química da genisteína	18
Figura 2.	Espectro de absorção da genisteína na região do ultravioleta e do visível	53
Figura 3.	Perfil cromatográfico da genisteína em 270 nm e 327 nm	55
Figura 4.	Representação gráfica da curva padrão da GEN obtida por CLAE utilizando detecção em 270 nm e 327 nm.....	57
Figura 5.	Estrutura química do triglicérido de cadeia média e octildodecanol	66
Figura 6.	Termogramas da análise da genisteína, mistura triglicérido de cadeia média/genisteína e triglicérido de cadeia média .	68
Figura 7.	Termogramas da análise da genisteína, octildodecanol e mistura octildodecanol/genisteína	68
Figura 8.	Termogramas da análise da genisteína, lecitina e mistura lecitina/genisteína	69
Figura 9.	Cinética de permeação intrínseca da genisteína	71
Figura 10.	Cinética de permeação da genisteína a partir dos núcleos oleosos	72
Figura 11.	Cinética de permeação da genisteína a partir das nanoemulsões	73
Figura 12.	Quantificação da genisteína total detectada na pele após experimento de fluxo intrínseco e a partir dos óleos e das nanoemulsões	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição final das nanoemulsões contendo genisteína	44
Tabela 2.	Tempo de retenção da genisteína e dos componentes das nanoemulsões em 270 nm e 327 nm.....	54
Tabela 3.	Parâmetros de linearidade das curvas padrão da genisteína por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	56
Tabela 4.	Limites de detecção e quantificação da genisteína em 270 nm e 327 nm	58
Tabela 5.	Precisão inter-dia para a quantificação da genisteína em 270 nm.....	59
Tabela 6.	Precisão inter-dia para a quantificação da genisteína em 327 nm.....	60
Tabela 7.	Precisão intra-dia para a quantificação da genisteína em 270 e 327 nm.....	60
Tabela 8.	Exatidão do método para a quantificação da genisteína em 327 nm.....	61
Tabela 9.	Propriedades físico-químicas das nanoemulsões contendo genisteína e seus controles.....	62
Tabela 10.	Taxa de associação da genisteína com as nanoemulsões em função do tempo de armazenamento.....	65
Tabela 11.	Solubilidade da genisteína em triglicerídeo de cadeia média e octildodecanol	66
Tabela 12.	Comparação dos parâmetros fluxo e tempo de latência da genisteína a partir das diferentes preparações estudadas.....	74

RESUMO

Estudos recentes têm demonstrado o efeito das isoflavonas da soja, em especial da genisteína (GEN), aplicada topicamente, na prevenção do envelhecimento cutâneo. Esse efeito tem sido relacionado com as suas atividades inibidora de tirosina quinase, antioxidante e estrogênica. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver nanoemulsões de uso tópico contendo GEN. Em uma primeira etapa, foi validada metodologia para a quantificação da GEN por CLAE, utilizando um sistema isocrático com detecção no UV em 327 ou 270 nm. Na segunda etapa, nanoemulsões constituídas de GEN, lecitina de gema de ovo, triglicerídeos de cadeia média (TCM_{GEN}) ou octildodecanol (ODD_{GEN}) e água foram preparadas por emulsificação espontânea. Esse procedimento conduziu à obtenção de nanoemulsões monodispersas com diâmetro de gotícula de 263 e 282 nm, viscosidade de 1,5 e 1,8 cP e potencial zeta de -44 e -42 mV, para TCM_{GEN} e ODD_{GEN}, respectivamente. A quantidade de GEN associada com ambas as formulações foi próxima de 100 % (para 1 mg/mL). A reduzida solubilidade da GEN no TCM e ODD (230 e 138 µg/g, respectivamente) sugere o efeito da lecitina na sua associação com as nanoemulsões. Considerando que os estudos de DSC demonstraram a interação da GEN com TCM, ODD e lecitina, a GEN parece estar localizada tanto no núcleo oleoso como na interface das nanoemulsões. Em uma última etapa, foi realizado o estudo de permeação cutânea da GEN a partir das formulações utilizando células de difusão de Franz. Foi demonstrada a reduzida permeação da GEN (~ 7,5 µg.cm⁻².h⁻¹). Existe uma redução significativa da permeabilidade da GEN a partir dos núcleos óleos (~ 3,5 – 5 µg.cm⁻².h⁻¹) ou nanoemulsões (~ 3 – 3,5 µg.cm⁻².h⁻¹), indicando a afinidade da GEN pelos veículos utilizados. O conjunto dos resultados obtidos demonstra a influência dos componentes das formulações sobre as propriedades físico-químicas das nanoemulsões, bem como no perfil de permeação cutânea da GEN.

Palavras-chave: genisteína, nanoemulsões, permeação cutânea

ABSTRACT

Nanoemulsions containing genistein: formulation and skin permeation study

Recent studies have shown the effect of soy isoflavones, especially genistein (GEN), topically administrated, in preventing skin aging. This effect has been related to tyrosine kinase inhibition, antioxidant and estrogenic activities. In this context, the aim of the present work was the development of topic nanoemulsions containing GEN. First, it has been validated an isocratic method to quantify GEN by HPLC with UV detection at 327 and 270 nm. In a second step, nanoemulsions composed by GEN, egg lecithin, medium chain triglycerides (TCM_{GEN}) or octyldodecanol (ODD_{GEN}) and water were prepared by spontaneous emulsification. This procedure yielded monodisperse emulsions with a typical mean droplet size of 263 and 282 nm, viscosity of 1.5 and 1.8 cP and ζ -potential -44 and -42 mV, for TCM_{GEN} and ODD_{GEN}, respectively. The amount of GEN associated with both formulations was close to 100 % (to 1 mg/mL). The low solubility of GEN in TCM and ODD (230 and 138 $\mu\text{g/g}$, respectively) suggests the role of lecithin on their association with nanoemulsions. Since DSC experiments have demonstrated GEN interactions with TCM, ODD and lecithin, GEN molecules seem to be located in to the oil core and at the interface of nanoemulsions. In a last step, the permeation of GEN from formulations using ear pigskin mounted in Franz diffusion cells was performed. It was shown that GEN permeation was low ($\sim 7.5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$). There was a significant reduction of the GEN permeability from oils ($\sim 3.5 - 5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) or nanoemulsions ($\sim 3 - 3.5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$), showing the affinity of GEN to the vehicles. In conclusion, the overall results show the effect of the nanoemulsion components on both physicochemical properties of the nanoemulsions and GEN skin permeation profile.

Keywords: genistein, nanoemulsions, skin permeation

INTRODUÇÃO

O envelhecimento cutâneo é o resultado de um conjunto de fatores extrínsecos e intrínsecos que afetam diversos elementos estruturais da pele. O envelhecimento intrínseco ou cronológico está associado a fatores genéticos e afeta a pele da mesma forma que atinge os órgãos internos do corpo humano. O declínio dos níveis de hormônios sexuais, principalmente de estrógenos, com o avançar da idade, é acompanhado por uma diminuição no conteúdo total de colágeno e ácido hialurônico na pele (EL-DOMYATI *et al.*, 2002). Em contrapartida, o envelhecimento extrínseco é influenciado por fatores ambientais, como a poluição, o tabaco e radiações, através, principalmente, da produção de radicais livres, os quais provocam modificações deletérias em vários componentes celulares (KOHEN, 1999).

Dentre os fatores ambientais, a radiação com comprimento de onda na região do espectro ultravioleta é provavelmente a principal responsável pelos danos causados nas estruturas da pele (SAIJA *et al.*, 1998; BENITA, 1999; PINNEL, 2003). Essa radiação é capaz de desencadear uma série de respostas moleculares que envolvem receptores de superfície celulares, proteínas e fatores de transcrição, levando tanto à estimulação da síntese de enzimas envolvidas na degradação de proteínas estruturais dérmicas (como o colágeno), como inibindo a síntese de precursores destas (FISCHER *et al.*, 2000; 2002).

Nos últimos anos, extratos vegetais têm sido utilizados com o objetivo de evitar as conseqüências nocivas do sol sobre a pele (PINNEL, 2003). Alguns estudos relacionam essa atividade com a presença de compostos polifenólicos como os flavonóides (LIGGINS *et al.*, 2000; SARTOR *et al.*, 2002). Entre estes se encontram as isoflavonas, que pertencem à classe dos isoflavonóides, com ocorrência predominante na família *Leguminosae* (DIXON e FERREIRA, 2002). A soja (*Glycine max*) é uma fonte alimentar rica nesses compostos, sendo que a genisteína, a daidzeína e seus heterosídeos, são as isoflavonas mais abundantes nas sementes deste vegetal (HO *et al.*, 2002).

Diversas atividades biológicas têm sido descritas para as isoflavonas, em especial, a genisteína e a daidzeína (DIXON e FERREIRA, 2002). Elas

pertencem a um grupo de compostos derivados de vegetais, denominados fitoestrógenos, capazes de produzir efeitos semelhantes aos estrógenos fisiológicos do corpo humano (TAPIERO *et al.*, 2002). Além de mimetizar a ação de estrógenos endógenos, as isoflavonas possuem uma expressiva atividade antioxidante (RECORD *et al.*, 1995; WEI *et al.*, 2002). Ainda, a isoflavona genisteína, em particular, possui a capacidade de inibir proteínas com atividade tirosina-quinase, as quais participam da modulação de respostas em vários níveis moleculares das células.

Recentemente, a administração tópica de extratos vegetais contendo isoflavonas (especialmente o de soja) tem sido considerada. Diversas formulações contendo isoflavonas estão disponíveis no mercado, utilizadas tanto na prevenção do fotoenvelhecimento como para amenizar as alterações cutâneas, que acompanham o envelhecimento cronológico. Contudo, as isoflavonas livres (agliconas) caracterizam-se por uma reduzida hidrossolubilidade e a sua incorporação em formas farmacêuticas/cosméticas de natureza hidrofílica necessita de uma elaborada etapa de desenvolvimento farmacotécnico, visando à sua incorporação homogênea e estável (dispersão e/ou solubilização) no produto final.

As nanoemulsões têm sido consideradas como um potencial sistema para administração tópica de moléculas de reduzida hidrossolubilidade (DUNCAN *et al.*, 1990; FRIEDMAN *et al.*, 1995; PIEMI *et al.*, 1999). Esses sistemas podem ser classicamente definidos como uma dispersão nanométrica de gotículas oleosas em uma fase aquosa externa, estabilizada por um sistema tensoativo adequado. Apresentam-se como líquidos de aspecto leitoso, reduzido diâmetro de gotícula e baixa viscosidade, sendo que as moléculas veiculadas encontram-se preferencialmente dispersas e/ou adsorvidas no núcleo oleoso da nanoestrutura. Alguns autores têm descrito a influência da composição e das propriedades físico-químicas das nanoemulsões (i.e. diâmetro de partícula, carga de superfície e viscosidade) sobre a velocidade e extensão da liberação/permeação de moléculas insolúveis em água, através da modulação da sua solubilidade e/ou coeficiente de difusão (BARRY, 1987; BENITA, 1998; BENITA, 1999; BOUCHEMAL *et al.*, 2004).

Neste contexto, levando-se em consideração as atividades biológicas, recentemente atribuídas as isoflavonas, bem como as potencialidades da sua administração tópica, a presente dissertação visa desenvolver nanoemulsões de uso tópico contendo a isoflavona mais abundante na soja, a genisteína.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Preparação, caracterização e avaliação da permeação cutânea de nanoemulsões contendo a isoflavona genisteína.

Objetivos específicos

- Validar uma metodologia analítica para quantificação da genisteína através de cromatografia líquida de alta eficiência;
- Preparar e caracterizar as propriedades físico-químicas das nanoemulsões contendo genisteína, obtidas através do procedimento de emulsificação espontânea;
- Avaliar o perfil de permeação cutânea da genisteína *in vitro*, utilizando células de difusão de Franz.

REVISÃO

Pele e envelhecimento cutâneo

A pele é o órgão que reveste o corpo humano limitando o seu contato com o meio externo. Ela desempenha diversas funções vitais como a prevenção da perda de água e a proteção frente a agressões químicas, físicas e microbiológicas do meio externo (HADGRAFT, 2001). Caracteriza-se como uma membrana muito heterogênea, sendo que a principal camada que controla a absorção é a camada mais externa, o estrato córneo. Este apresenta uma espessura de 15-20 μm , contudo, proporciona uma efetiva barreira de penetração, além de ser responsável pela prevenção da perda de água. O estrato córneo é composto por um feixe de queratinas insolúveis cercado por células estabilizadas por proteínas interligadas e limitado por diversos lipídeos, tais como, ceramidas, colesterol, ácidos graxos e seus derivados e (HADGRAFT, 2001; SHIM *et al.*, 2004).

O envelhecimento cutâneo é um fenômeno biológico complexo que afeta diferentes elementos da pele, alterando a sua estrutura e características de permeação. Existem basicamente dois processos de envelhecimento que afetam a pele simultaneamente. O primeiro é inato ou envelhecimento intrínseco, cronológico, que afeta a pele da mesma maneira que afeta os órgãos internos, isto é, a degeneração lenta e irreversível dos tecidos. O segundo processo é o envelhecimento extrínseco, também denominado fotoenvelhecimento, resultante da exposição de elementos externos, principalmente à radiação UV (SAIJA *et al.*, 1998; BENITA, 1999; KOHEN, 1999; De ROSA *et al.*, 2000; AUNER *et al.*, 2005).

O envelhecimento intrínseco caracteriza-se por uma depleção geral da matriz extracelular com diminuição da síntese tanto de colágeno como de elastina. A pele envelhecida pode apresentar um aumento na profundidade das marcas de expressão e uma diminuição na elasticidade. A síntese de colágeno é reduzida e o tecido elástico é perdido primariamente na fina camada subepidermal, então a derme reticular, rede elástica, é irregularmente espessada, fragmentada e desorganizada (EL-DOMYATI *et al.*, 2002).

No envelhecimento extrínseco existe o desencadeamento de uma complexa seqüência de respostas moleculares específicas na derme da pele danificada, principalmente desencadeada pela radiação ultravioleta. Estudos histológicos têm revelado que as maiores alterações no fotoenvelhecimento da pele estão localizadas no tecido conectivo (derme). Esta é composta principalmente por colágeno do tipo I e II, elastina, proteoglicanos e fibronectina. Os diferentes danos externos são manifestados primeiramente na desordem das fibras de colágeno da derme e acumulação de elastina anormal e amorfa, conduzindo a uma redução da resistência da pele (FISHER *et al.*, 2000). O fotoenvelhecimento apresenta várias manifestações clínicas, que incluem desde aspereza, rugas, telangiectasia, pigmentação irregular até neoplasmas malignos (EL-DOMYATI *et al.*, 2002).

Os efeitos da radiação ultravioleta sobre a pele têm sido amplamente estudados. Em termos epidemiológicos, a exposição crônica à radiação solar desde a infância tem sido considerada como sendo a maior causa de câncer de pele. O espectro da luz ultravioleta consiste das radiações UVA (320-400nm), UVB (280-320 nm) e UVC (200-280 nm). Porém, a exposição aos efeitos nocivos da radiação UVA e UVB é mais preocupante, visto que a radiação UVC chega somente parcialmente a terra e é absorvida pelas camadas superficiais da pele (SAIJA *et al.*, 2003). O aumento da exposição à radiação UVB tem se tornado mais preocupante para a saúde principalmente devido à destruição da camada de ozônio (WEI *et al.*, 2002; ICHIHASHI *et al.*, 2003).

Os processos moleculares envolvidos no fotoenvelhecimento têm origem na capacidade da radiação UV em induzir processos envolvidos na regulação de respostas das células frente à estimulação fisiológica. Estes mecanismos incluem receptores de superfície, proteína quinase de transcrição de sinal, fatores de transcrição e enzimas que apresentam função de sintetizar e degradar a estrutura das proteínas na derme. Os mecanismos celulares que danificam a derme são principalmente iniciados pela geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (FISHER *et al.*, 2000; EL-DOMYATI, *et al.*, 2002; FISHER *et al.*, 2002).

Para uma reação fotoquímica ocorrer na pele, a radiação ultravioleta deve ser absorvida por um grupamento cromóforo, iniciando assim uma série de reações fotoquímicas (PINNEL, 2003; WEI, *et al.*, 1998). Existem muitos alvos potenciais nas camadas da pele, os quais podem servir de candidatos aos danos oxidativos, incluindo lipídeos, proteínas e DNA. (ZEEVI *et al.*, 1994; SHYONG *et al.*, 2002; WEI *et al.*, 2002; PINNEL *et al.*, 2003; ICHIHASHI *et al.*, 2003). Algumas espécies reativas podem iniciar um processo de peroxidação tanto nos lipídeos como nas proteínas. Dentre os vários metabólitos aos quais a pele está exposta, os radicais superóxido, peróxido de hidrogênio, ácido hipoclorídrico, radical hidroxila, radical óxido nítrico e oxigênio singlete são provavelmente os mais estudados. Estas espécies podem, por si só, causarem danos biológicos ou servir como fonte para mais espécies reativas e nocivas (KOHEN, 1999).

Os organismos vivos estão continuamente expostos a ERO exógenos e endógenos ou radicais que causam diferentes danos celulares. Diversas reações oxidativas podem modificar proteínas e lipídeos, resultando na mudança da função, levando ao envelhecimento cutâneo (PINNEL, 2003). Para competir com o fluxo contínuo dos nocivos metabólitos reativos, a pele apresenta várias linhas de defesa. Enquanto a pele não pode controlar a exposição externa a espécies reativas, ela pode reduzir a produção de fontes internas, através da alteração da atividade de enzimas que produzem metabólitos de oxigênio. O principal mecanismo utilizado para manipular os danos oxidativos destes componentes é o reparo do sistema e o mais importante mecanismo de defesa é o sistema antioxidante. Este sistema desenvolveu uma resposta para ao aumento da concentração de oxigênio e foi designado para interagir diretamente com as ERO, a fim de prevenir o ataque aos sítios biológicos. O sistema antioxidante de defesa pode ser classificado em dois grandes grupos: o grupo de enzimas (superóxido desmutase, catalase, peroxidase glutathion reductase) e as moléculas antioxidantes de baixo peso molecular presentes na pele (KOHEN, 1999; SAIJA *et al.*, 2003).

A fonte endógena de ERO tem origem no mecanismo de fosforilação oxidativa, no qual o oxigênio é reduzido à água através de quatro etapas de adição de elétrons. A fonte exógena consiste em agentes físicos ou químicos. Quando a capacidade de seqüestrar ERO intracelulares é superada, o DNA representa o último alvo para as ERO. O DNA pode absorver radiação UVB, induzindo diretamente mudanças entre as bases pirimídicas adjacentes no filamento de DNA. Um grande número de modificações de base de DNA tem sido detectado em células de mamíferos, nos quais sua presença desempenha um papel na mutagênese, carcinogênese e envelhecimento (SALLES *et al.*, 1999; SAIJA, *et al.*, 2003).

Existem basicamente duas rotas que são responsáveis pelo impacto das ERO no envelhecimento: (1) rotas que simulam a quantidade de ERO em todo o organismo ou em tecidos estratégicos do organismo; e (2) rotas que reparam as estruturas danificadas (DNA, lipídeos e proteínas) por estas ERO. A primeira classe subdivide-se em subclasses: rotas produtoras de ERO (metabolismo aeróbico) e rotas seqüestrantes de ERO (moléculas antioxidantes como α -tocoferol, vitamina C e enzimas antioxidantes como a superóxido desmutase). O balanço entre estas duas rotas, produção e seqüestro de ERO, determina o nível absoluto de estresse oxidativo. Conforme a teoria do envelhecimento por radicais livres/estresse oxidativo, os níveis de danos oxidativos de biomoléculas aumenta com a idade, devido ao aumento da produção de ERO, decréscimo de seqüestrantes de ERO, ou redução do reparo de biomoléculas danificadas (BOKOV *et al.*, 2004).

Estudos *in vitro* indicam que a radiação UV ativa o fator de crescimento e os receptores de citocinas das células superficiais, mimetizando desta forma a ação dos receptores ligantes. A ativação do fator de crescimento e dos receptores de citocinas estimula as proteínas quinases (MAP). Estas famílias de MAP existem em células de mamíferos: ERK (quinase regulada por sinais extracelulares), JNK (quinase c-Jun amino-terminal) e p38, cada uma formando uma modulação de sinal. Cada quinase modulada é acoplada em receptores na superfície da pele. A ERK está associada com a ativação dos receptores do

fator de crescimento, enquanto que a JNK e p38 estão associadas com a ativação dos receptores de citoquinase com o estresse celular, incluindo a radiação UV. Um aumento na fosforilação destas enzimas está diretamente relacionado com a promoção do envelhecimento cutâneo (FISHER *et al.*, 1998).

O aumento da radiação solar ultravioleta e as mudanças no estilo de vida forçaram a necessidade de procurar medidas preventivas contra os efeitos nocivos causados pela intensa ou prolonga exposição à luz UV. A pele é a primeira região do corpo humano a ter contato com a radiação solar UV e então outras áreas são presumidamente afetadas através da circulação. Quando a pele é excessivamente exposta ao estresse oxidativo, como a radiação ultravioleta, o sistema antioxidante endógeno não é capaz de prevenir os danos oxidativos. Neste caso, a administração exógena de antioxidantes deve ser considerada (BENITA, 1999). A administração tópica e sistêmica de antioxidantes (naturais ou sintéticos) representa uma estratégia de sucesso para prevenção da ocorrência para redução dos severos efeitos deletéricos relacionados à radiação UV (SAIJA *et al.*, 2003).

Isoflavonas e genisteína

As isoflavonas são compostos polifenólicos pertencentes à classe dos isoflavonóides, os quais possuem uma distribuição taxonômica restrita, com ocorrência predominante na família *Leguminosae* (DIXON e FERREIRA, 2002). Os isoflavonóides são particularmente abundantes em certos legumes, como na soja, lentilha e no grão-de-bico, os quais são componentes tradicionais das dietas asiática e africana (BREINHOLT *et al.*, 2000).

As isoflavonas mais comumente encontradas na natureza são: genisteína, daidzeína, gliciteína, formononetina e biochanina A, sendo que as duas últimas são derivados 4'-metoxilados da daidzeína e genisteína, respectivamente. Elas apresentam-se predominantemente em suas formas heterosídicas, ou seja, ligadas a uma molécula de açúcar através de uma ligação 7- β -D-glicosídica ou 6"- θ -malonilglicosídica (LEE *et al.*, 2005).

A aglicona mais abundante na soja é a genisteína (4', 5, 7 - triidróxiisoflavona) (figura 1). (HUTABARAT *et al.*, 1998; KULLING *et al.*, 2002; PINNELL, 2003).

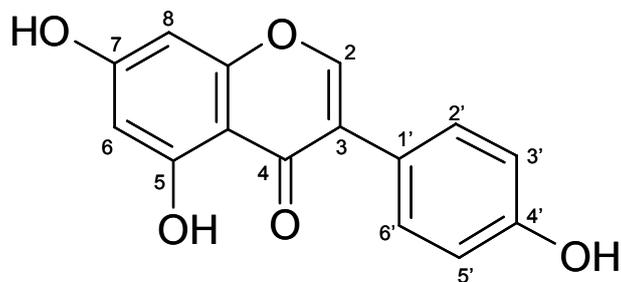


Figura 1. Estrutura química de genisteína.

Dentre as isoflavonas, a daidzeína e a genisteína são as mais investigadas. No grão de soja, há a predominância dessas duas substâncias em suas formas glicosídicas, sendo que malonil-genistina encontra-se em maior abundância, seguida, em ordem decrescente, por malonil-daidzina, genistina, daidzina, genisteína e daidzeína (HO *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2004). Entretanto, a forma glicosídica das isoflavonas é inativa, sendo necessária à hidrólise da ligação heterosídica e a liberação da aglicona para exercer a sua atividade biológica. As agliconas são geralmente liberadas de sua forma heterosídica durante o processo de digestão por ação da flora bacteriana intestinal (LEE *et al.*, 2004). Nos enterócitos, ocorre glicuronidação das agliconas, que são então liberadas para a corrente sangüínea e transportadas até o fígado, onde sofrem conjugação com ácido glicurônico e sulfatos, e excretadas na bile e urina (KULLING *et al.*, 2002).

Os benefícios para a saúde de produtos ricos em isoflavonas têm sido vastamente investigados. Em estudos animais, o consumo de soja ou de produtos ricos em genisteína está associado a efeitos benéficos em vários tipos de câncer, como: o de mama, cólon, fígado, pulmão, próstata, pele e rins

(BARNES, 1995). Além disso, as isoflavonas encontradas na soja parecem reduzir o risco de osteoporose (ARJMANDI *et al.*, 1998), diminuir o colesterol plasmático (HO *et al.*, 2000), possuir atividade anti-ateroesclerótica (DAMASCENO *et al.*, 2000), diminuir o risco de doenças coronárias (LUCAS *et al.*, 2001), trazer benefícios para pacientes com doença renal crônica (RANICH *et al.*, 2001) e diminuir sintomas do climatério em mulheres pós-menopausa (CHIECHI *et al.*, 2003; CRISAFULLI *et al.*, 2004).

Os efeitos das isoflavonas estão associados às várias atividades biológicas atribuídas a essa classe de isoflavonóides. A genisteína, por exemplo, possui a propriedade de bloquear a ação da DNA topoisomerase II, de proteínas tirosina-quinase e da quinase ribossomal S6 *in vitro*, o que poderia explicar os efeitos observados no ciclo celular e na proliferação, diferenciação e apoptose celular induzidos pela mesma (LIGGINS *et al.*, 2000; WEI *et al.*, 2003). A genisteína também inibe fortemente a produção de certas citocinas e a síntese de eicosanóides através da sua atividade inibitória de tirosina-quinase, sugerindo a sua capacidade de modular as respostas inflamatórias comumente envolvidas no estágio de promoção tumoral. Esta isoflavona também demonstrou capacidade em inibir a expressão de protooncogenes e metástases de melanomas em modelos animais (WEI *et al.*, 2003).

Além disso, as isoflavonas possuem uma atividade antioxidante expressiva e a capacidade de se ligar a receptores estrogênicos, produzindo efeitos agonistas ou antagonistas nas células-alvo (TAPIERO *et al.*, 2002). Os benefícios associados às propriedades biológicas das isoflavonas também se refletem no âmbito da dermatologia. Existem diversos estudos que demonstram que a administração tópica de isoflavonas sobre a pele, principalmente da genisteína, possui a capacidade de prevenir o fotoenvelhecimento e aumentar a síntese de elementos estruturais dérmicos, como colágeno e ácido hialurônico, na pele envelhecida (MIYAZAKI *et al.*, 2002; KANG *et al.*, 2003). Esses benefícios são atribuídos ao fato da genisteína, em particular, possuir atividade inibidora de proteínas tirosina-quinase (WEI *et al.*, 1998; DIXON *et al.*, 2002; SHYONG *et al.*, 2002; WEI *et al.*, 2002; PINNEL *et al.*, 2003; McCLAIN *et*

al.,2005b) e das isoflavonas, em geral, demonstrarem ação antioxidante (SHYONG *et al.*, 2002; WEI *et al.*, 2002; PINNEL *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2003; SCHIMID *et al.*, 2003; SONEE *et al.*, 2004; McCLAIN *et al.*, 2005b; SIMÃO *et al.*,2005) e estrogênica (DIXON *et al.*, 2002; FITZPATRICK *et al.*, 2002; PINNEL *et al.*, 2003; SCHIMID *et al.*, 2003; ZÜLLI, 2003; McCLAIN *et al.*, 2005a; McCLAIN *et al.*, 2005b).

Atividade antioxidante

A pele é a primeira camada de proteção do corpo humano de todos os tipos de agressões, acumulando com o passar do tempo, danos crônicos que levam a sinais visíveis da idade. O sistema reparador endógeno humano é o responsável pela defesa da pele antes das mudanças externas ocorrerem (YAROSHO *et al.*, 1995). A exposição à luz solar tem um efeito profundo na pele, produzindo alterações aceleradas de envelhecimento consistindo em formação de rugas, ressecamento e anomalias pigmentares, incluindo sardas assim como hipermelanose ou hipomelanose. A hiperpigmentação e a hipopigmentação são extremamente comuns no fotoenvelhecimento cutâneo (PINNEL *et al.*, 2003). De fato, a radiação UV está na origem da formação das espécies reativas de oxigênio, podendo produzir danos profundos no tecido cutâneo. Muitas destas espécies reativas de oxigênio têm vida curta e reagem com uma série estruturas celulares. Seus danos são oriundos da inibição de uma cadeia de reações de oxidação, como elétrons de radicais livres que são transferidos de uma molécula a outra (YAROSHO *et al.*, 1995).

A epiderme apresenta antioxidantes de defesa que são capazes de absorver estas espécies reativas de oxigênio e romper a cadeia de transferência de elétrons incluindo, entre estes, moléculas pequenas como ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E) e glutathione, e enzimas maiores como superóxido-desmutase e catalase. Infelizmente, estas defesas são facilmente saturadas pelo estresse oxidativo decorrente da radiação solar, agentes do meio ambiente e ainda pelo fato de que muitas doenças de pele

são caracterizadas por uma deficiência na capacidade antioxidante (YAROSHO *et al.*, 1995).

Os antioxidantes oriundos de produtos naturais podem representar uma possibilidade de tratamento e prevenção das doenças mediadas por estresse oxidativo. Algumas enzimas e compostos de plantas superiores têm demonstrado efeitos protetores contra os danos oxidativos pela inibição ou extinção dos radicais livres e das espécies reativas de oxigênio (RÖPKE *et al.*, 2002). Alguns flavonóides demonstraram potenciais propriedades antioxidantes quando usados topicamente na pele (PINNEL *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, os antioxidantes naturais, flavonóides e isoflavonóides, têm recebido uma considerável atenção. Muitos esforços têm sido feitos para elucidar a relação entre a estrutura e a atividade destes compostos. Estudos sugerem que o anel B de flavonóides e isoflavonóides é o centro da atividade antioxidante, sendo atribuído a esse centro a capacidade de seqüestrar radicais livres. Além deste, as isoflavonas apresentam a propriedade de quelar metais, dependente da posição da hidroxila fenólica. A genisteína tem três grupamentos hidroxílicos fenólicos com diferentes ações antioxidantes. A ação antioxidante da genisteína contra os radicais peroxila está diretamente relacionada com a presença da hidroxila fenólica na posição C4' (ZHANG *et al.*, 2003; SIMÃO *et al.*, 2005). Contudo, apesar do grande número de estudos existentes sobre a atividade antioxidante, através de parâmetros indiretos como a inibição de danos oxidativos a lipídios, proteínas e DNA, o mecanismo antioxidante pelo qual as isoflavonas atuam não foi completamente elucidado (GUO *et al.*, 2002).

Em estudo utilizando lipossomas multilamelares, constituídos por fosfatidilcolina e contendo de genisteína em uma concentração de 25 nmol/mg de fosfatidilcolina, observou-se inibição de 50 % na oxidação desses lipossomas quando expostos à radiação UVA e UVB ou a outros sistemas nos quais o peróxido de hidrogênio foi o agente oxidante. O estudo sugere que o

mecanismo antioxidante parece estar relacionado com a captura de peróxido de hidrogênio (RECORD *et al.*, 1995).

Recentemente, foi demonstrado que a genisteína inibe o eritema de pele em humanos e o carcinoma de pele induzido por UVB em camundongos (SHYONG *et al.*, 2002). Investigou-se o possível mecanismo de ação fotoprotetora da genisteína *in vivo*. Quando ratos foram expostos à radiação UVB, houve um aumento significativo do nível de H₂O₂. Pesquisas comprovaram que a aplicação tópica de genisteína na pele dorsal de ratos inibiu significativamente a produção de H₂O₂ induzida pela radiação UVB entre 40-50 % na exposição aguda ao UVB (WEI *et al.*, 2002).

Outro mecanismo possível para explicar a atividade antioxidante das isoflavonas pode ser a capacidade em estabilizar as membranas através da diminuição da fluidez das mesmas. Estes autores sugeriram que os isoflavonóides distribuem-se no interior hidrofóbico das membranas celulares, causando diminuição drástica na fluidez dessa região da membrana, podendo impedir estericamente a difusão de radicais livres e diminuir a cinética das reações promovidas por esses compostos (ARORA *et al.*, 2000).

Atividade estrogênica

Grandes alterações são detectadas na pele de mulheres no período pós-menopausa, ocasionando mudanças que incluem o afinamento, a redução da elasticidade e formação de rugas. Este envelhecimento cutâneo é consequência da diminuição da produção de colágeno e de elastina, responsáveis pela sustentação e elasticidade da pele. De fato, os receptores de estrógenos, como fibroblastos e queratinócitos, têm sido identificados na pele humana e os hormônios sexuais exercem um papel importante na proliferação e estimulação da síntese protéica nessas células. Contudo, a questão de como o envelhecimento cutâneo é induzido pela redução de estrógeno na pós-menopausa permanece em discussão (URANO *et al.*, 1995; ZÜLLI *et al.*, 2003; PINNEL *et al.*, 2003; SATOR *et al.*, 2004).

A genisteína apresenta um caráter estrutural semelhante ao do estrógeno 17 β -estradiol, particularmente, com referência à presença do anel fenólico e a distância entre os grupamentos OH em 4' e 7. Este caráter confere habilidade para ligar a receptores estrogênicos e, desta forma, poder exercer tanto atividade estrogênica como anti-estrogênica, pela posterior competição com a ligação dos receptores de estradiol (DIXON *et al.*, 2002; MCCLAIN *et al.*, 2005b). Clinicamente, os isoflavonóides podem comportar-se como um modulador seletivo de receptores estrogênicos. Desta maneira, a aplicação de isoflavonas pode ter decisiva vantagem sobre a terapia clássica de reposição hormonal (PINNEL *et al.*, 2003; MCCLAIN *et al.*, 2005b).

Dois tipos de receptores estrogênicos, α e β , já foram identificados na pele. A genisteína tem 30 vezes maior afinidade para β -receptores do que para α -receptores. Entretanto, estudos relatados mostram que a genisteína tem maior atividade agonista α -receptora do que β -receptora. Em comparação, o estradiol tem 700 vezes mais atividade α -receptora e 45 vezes mais atividade β -receptora do que a genisteína (FITZPATRICK *et al.*, 2002; PINNEL *et al.*, 2003; MCCLAIN *et al.*, 2005a).

Alguns estudos mostram que a terapia com estrógenos preserva o conteúdo de colágeno, as propriedades da elastina e a espessura da pele em mulheres na pós-menopausa. Em trabalhos utilizando fibroblastos da pele, a genisteína aumentou a produção de colágeno (PINNEL *et al.*, 2003). O tratamento tópico com estrogênios mostrou reverter o envelhecimento cutâneo da pós-menopausa. Os compostos estrogênicos reduziram a profundidade das rugas e aumentam o tônus e a hidratação cutânea (ZÜLLI *et al.*, 2003). Estes pesquisadores realizaram testes *in vitro* com genisteína na qual estimulou a síntese de colágeno e diminuiu a matriz reguladora de metaloproteinase. Por esta razão a aplicação tópica das isoflavonas não somente é benéfica para pele pós-menopausa, onde há perda de estrógeno endógeno, mas também na pele sadia quando usada para tratamento de celulite ou para a tonicidade da pele em geral (ZÜLLI *et al.*, 2003).

Atividade inibidora da tirosina-quinase

Estudos epidemiológicos revelaram que a incidência de morte por câncer é significativamente inferior na população asiática. Uma diferença entre as populações pode estar relacionada ao fato de que os asiáticos consomem 20-50 vezes mais produtos derivados de soja do que os americanos, por exemplo. Em um estudo epidemiológico recente, realizado em Singapura e na China, com 420 mulheres saudáveis e 200 com câncer de mama, indicou que o consumo de soja pode estar diretamente relacionado com a redução do risco de câncer. Esse efeito foi mais estreitamente relacionado com a dieta e do que com fatores de base genética. Os isoflavonóides encontrados nos produtos de soja foram considerados como os agentes responsáveis pela redução do risco de câncer, sendo independente das suas atividades estrogênicas. A inibição da indução de tumores mamários, epidérmicos e hepáticos tem sido relacionada com uma dieta rica em produtos derivados de soja (DIXON *et al.*, 2002; SHYONA *et al.*, 2002; WEI *et al.*, 2002).

A genisteína inibe a topoisomerase DNA e a tirosina-quinase protéica, assim como o processo antioxidante e a atividade inibidora do ciclo celular. A inibição da quinase, geralmente considerada como sendo específica é um potente e inibidor da fosforilação da tirosina do fator de crescimento epidermal, necessário para a regulação da divisão celular. Esta fosforilação tem efetivamente um papel indutivo na proliferação e na transformação celular. A genisteína inibe significativamente a carcinogênese química induzida por espécies reativas de oxigênio, danos oxidativos do DNA e a expressão da protooncogênese. Recentemente, foi demonstrado que a genisteína inibe o carcinoma de pele induzido por UVB em camundongos e o eritema de pele em humanos induzido por UVB (WEI *et al.*, 1998; DIXON *et al.*, 2002; SHYONA *et al.*, 2002; WEI *et al.*, 2002; PINNEL *et al.*, 2003; McCLAIN *et al.*, 2005).

Quinases estão envolvidas no processo de comunicação intracelular. Na pele, elas são componentes essenciais na transmissão de sinais que é ativada

por radicais e citocinética antiinflamatória. Além disso, promovem a expressão de degradação enzimática de colágeno e elastina. Estas enzimas, denominadas metaloproteinases, são extremamente importantes no envelhecimento cutâneo. A genisteína pode bloquear este sinal e os radicais e a citocinética antiinflamatória não ter efeito no metabolismo do colágeno e da elastina (SCHIMID *et al.*, 2003).

WEI e colaboradores (2002) analisaram o efeito da genisteína na carcinogênese e no envelhecimento causado pela radiação UVB. Queratinócitos foram incubados com genisteína por um período de duas horas, e, em seguida, foram expostos à radiação UVB. Verificou-se que a presença de genisteína no meio celular inibiu a fosforilação de EGF-R e das MAO-quinases de maneira dose-dependente. Acredita-se que esta fosforilação e a ativação enzimática provoquem a estimulação dos fatores de transcrição nucleares, ativando as metaloproteinases matriciais responsáveis pela degradação da matriz dérmica. Neste mesmo estudo, foi avaliado o mecanismo através do qual a genisteína é responsável pela prevenção do fotoenvelhecimento. Foi observado que a genisteína, na concentração de 1 %, administrada topicamente, na pele de voluntários por 24 horas antes da exposição à luz UV, inibiu em 98 % a fosforilação e a ativação de EGF-R. Este resultado é explicado pelo fato do EGF-R possuir atividade tirosina-quinase intrínseca e a genisteína ser uma potente inibidora da tirosina-quinase.

Nanoemulsões

Nanoemulsões de uso tópico têm sido empregadas como veículo de moléculas de baixa hidrossolubilidade, visando tanto uma atividade sistêmica como local. Nanoemulsões podem ser definidas como sistemas heterogêneos que consistem em uma fase oleosa finamente dividida em água, através da adição de um tensoativo adequado. As moléculas de reduzida hidrossolubilidade estão preferencialmente distribuídas na fase oleosa e/ou adsorvidas na interface óleo/água das nanoestruturas (WASHINGTON, 1996;

TROTTA *et al.*, 2001; SONNEVILLE – AUBRUN *et al.*, 2004). Além disso, a liberação modificada de moléculas de reduzida hidrossolubilidade pode ser obtida através da sua veiculação nesse tipo de sistema (TROTTA *et al.*, 2001; ROLAND *et al.*, 2003).

Nanoemulsões apresentam um número adicional de vantagens, em comparação aos sistemas convencionais, na obtenção de produtos de uso tópico, principalmente, relacionadas ao seu reduzido diâmetro de gotícula. Essa propriedade permite um depósito uniforme na pele e apresenta conseqüentemente, elevada superfície de contato do sistema com este órgão. Esses sistemas também podem promover a penetração de substâncias de interesse através da fluidização natural da pele na presença dos componentes das formulações como óleos e tensoativos (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; SONNEVILLE – AUBRUN *et al.*, 2004).

O núcleo oleoso das nanoemulsões utilizadas como sistemas de liberação de uso tópico varia entre 5 e 20 % da composição final das formulações. A seleção do núcleo oleoso é geralmente realizada com base nas propriedades físico-químicas desejadas e estabilidade das formulações. Óleos de origem vegetal ou semi-sintética, constituídos de triglicerídeos de cadeia média (TCM) e longa (TCL), têm sido correntemente empregados no desenvolvimento de nanoemulsões (KLANG e BENITA, 1998). Contudo, especialmente em relação ao uso tópico, recentemente, núcleos oleosos constituídos de octildodecanol (YILMAZ *et al.*, 2005) ou alfa-tocoferol (BOUCHEMAL *et al.*, 2004) têm sido descritos.

No que se refere à interface das nanoemulsões, o uso de lecitinas têm sido correntemente descrito. As lecitinas naturais têm sido um dos mais promissores e adequados agentes capazes de modular a penetração da pele. Mesmo em altas concentrações, as lecitinas não são tóxicas e não apresentam problemas dermatológicos. Além disso, devido a sua estrutura molecular anfifílica e as suas propriedades físico-químicas, a lecitina é capaz de formar estruturas polimoleculares como micelas ou invertidas ou fase hexagonal,

cúbicas e lamelares, contribuindo para produção de formulações tópicas inovadoras. As lecitinas de ovo, por exemplo, são adequadas para estabilizar as emulsões, e contém aproximadamente 80% de fosfatidilcolina, uma pequena quantidade de lipídeos ácidos, que leva a uma alta carga de superfície em pH neutro. As emulsões lipídicas estabilizadas com fosfolipídeos têm propriedades adequadas como carreadoras de fármacos (BONINA *et al.*, 1994; WASHINGTON, 1996; BRINON *et al.*, 1999; TROTTA *et al.*, 2001).

Diferentes fatores podem afetar o comportamento físico das lecitinas, como por exemplo, a saturação das cadeias acila influencia a temperatura de transição e o comportamento de superfície. Geralmente os lipídeos bisaturados têm temperatura de transição acima da temperatura ambiente. A introdução de ligações insaturadas causa uma redução na temperatura de transição (-8°C). O comprimento das cadeias acila influencia a temperatura de transição. Com o aumento das cadeias, aumenta a temperatura de fusão. A natureza do grupo da cabeça é importante na ionização dos lipídeos. A porção polar é predominantemente colina e etanolamina, conduzindo a estruturas neutras em pH fisiológico. Serina e glicerol produzem lipídeos ácidos, que são carregados negativamente em pH 7, como é o ácido fosfatídico não esterificado. Estes lipídeos ácidos estão presentes em pequena quantidade (1-2 %). Sua concentração é suficiente para conferir uma carga de superfície de -40 a -60mV nas gotículas da emulsão, da qual resulta na sua estabilidade (WASHINGTON *et al.*, 1996).

Diversos procedimentos têm sido descritos para a produção de nanoemulsões. Esses geralmente utilizam equipamentos como homogeneizadores de alta pressão ou microfluidizadores (BENITA, 1999). Nanoemulsões obtidas através do uso de homogeneizadores de alta pressão e microfluidizadores têm sido as mais descritas na literatura. A preparação de nanoemulsões através desses procedimentos pode ser dividida em duas fases distintas. Em uma primeira etapa, as fases aquosa e oleosa, contendo os componentes hidro ou lipofílicos, respectivamente, são aquecidas separadamente ($\sim 70^{\circ}\text{C}$) e emulsionadas através do uso de homogeneizadores de alta velocidade (como Ultraturrax® e Politron®). A emulsão primária obtida

apresenta um diâmetro de gotícula submicrométrico, influenciado pelo equipamento utilizado e pelas condições operacionais. Após resfriamento, na segunda etapa, o diâmetro de gotícula é progressivamente reduzido até valores compreendidos entre 100 e 300 nm através da utilização de homogeneizadores de alta pressão (BENITA, 1999; YILMAZ *et al.*, 2005).

A preparação de nanoemulsões através de emulsificação espontânea tem sido recentemente descrita na literatura (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2006). Através desta técnica é possível preparar nanoemulsões com propriedades similares àquelas obtidas por métodos físicos, com a vantagem de ser uma técnica simples, de menor custo, rápida, e que permite preparar pequenos lotes de formulação em temperaturas inferiores àquelas utilizadas pelas outras técnicas. Baseia-se na emulsificação espontânea de uma fase oleosa contendo tensoativos. A fase oleosa é dissolvida em solvente orgânico, e, após, vertida em uma fase aquosa, sob agitação. O solvente orgânico é então removido por evaporação sob pressão reduzida. A formação das gotículas ocorre quando a fase orgânica é vertida na fase aquosa, provocando uma turbulência interfacial que ocorre durante a difusão do solvente na água. Após a adição da fase orgânica na água, é observado um rápido espalhamento da interface, como resultado da difusão mútua entre os solventes, o que fornece energia suficiente para a formação das gotículas (BOUCHEMAL *et al.*, 2004).

Dentre as principais propriedades dos sistemas multifásicos, como as nanoemulsões, encontram-se a distribuição e diâmetro médio das gotículas da fase interna. Nanoemulsões apresentam geralmente uma distribuição unimodal e diâmetro médio compreendido entre 100 e 300 nm (HASKELL *et al.*, 1998). Vários métodos têm sido empregados com o propósito de avaliar o diâmetro de gotículas de nanoemulsões, sendo que o valor esperado é o principal critério para a seleção do método a ser utilizado (WESTESEN e WEHLER, 1993). Espectroscopia de correlação de fótons, também denominada de espalhamento de luz dinâmica, e técnicas complementares de microscopia, como transmissão, varredura e criofatura têm sido correntemente utilizadas para esta avaliação (BENITA e LEVY, 1993; HASKELL, 1998; TIAN e LI, 1998).

Diversos fatores podem influenciar o grau de distribuição e o diâmetro médio de gotícula de nanoemulsões, em especial, a composição quali e quantitativa das formulações e as condições experimentais utilizadas nas técnicas de preparação (BENITA, 1999; BOUCHEMAL *et al.*, 2004).

O potencial zeta reflete a composição da interface das nanoemulsões, seja em relação aos tensoativos formadores do filme interfacial ou em relação à presença de moléculas com carga localizadas na interface. A determinação do potencial zeta é geralmente realizada através de técnicas eletroforéticas específicas. Um elevado valor de potencial zeta, em módulo, ($> 30\text{mV}$) é um importante indicativo para a estabilidade físico-química das emulsões, uma vez que forças repulsivas tendem a evitar possíveis agregações da fase interna (BENITA e LEVY, 1993; KLANG e BENITA, 1998; ROLAND *et al.*, 2003). A maior parte das nanoemulsões de uso tópico é composta por fosfolipídeos, que apresentam ionização dependente do pH do meio. Os fosfolipídeos purificados tendem a originar nanoemulsões de potencial zeta tendendo a nulo em pH 7,4, enquanto que as lecitinas, de gema de ovo ou de soja, conduzem a nanoemulsões de potencial zeta negativo. De fato, as lecitinas são misturas heterogêneas de fosfolipídeos neutros e ácidos, sendo que estes últimos apresentam carga negativa em pH neutro (BENITA e LEVY, 1993).

A avaliação da viscosidade de nanoemulsões líquidas tem sido pouco descrita na literatura, contudo, essa propriedade reveste-se de especial importância no desenvolvimento de nanoemulsões. Diferentes parâmetros como a concentração da fase interna (JUMAA e MÜLLER, 1998), o diâmetro de gotícula (SILVANDER *et al.*, 2003, SILVA *et al.*, 2004) e a viscosidade do óleo formador do núcleo oleoso (JUMAA e MÜLLER, 1998; CHUNG *et al.*, 2001) podem influenciar a viscosidade de nanoemulsões. A viscosidade de nanoemulsões líquidas apresenta geralmente um comportamento reológico do tipo newtoniano (ISHII *et al.*, 1990; ROLAND *et al.*, 2003; SILVANDER *et al.*, 2003).

Benita (1999) descreveu a veiculação do diclofenaco em nanoemulsões, posteriormente incorporados em cremes. Esta formulação apresentou 20 % de

fase oleosa, contendo triglicerídeos de cadeia média e lecitina de ovo, dispersa em fase aquosa através do uso de tensoativo não-iônico polioxietileno. A eficácia desta formulação tópica foi avaliada usando modelo de edema em pata de rato induzido por carragenina, comparando com o produto comercial Voltaren® Emulgel®. O creme contendo as nanoemulsões foi absorvido na pele entre 2 a 3 minutos, apresentando uma significativa redução do volume do edema em comparação com o produto comercial (BENITA, 1998).

Outra emulsão submicrométrica contendo Coenzima Q10, muito usada para produtos dermatológicos como um agente antienvhecimento, com baixa solubilidade em água, foi preparada com 5 % de fase oleosa: TCM como núcleo oleoso, lecitina como emulsificante e polissorbato 80 como tensoativo para uso tópico. Esta formulação apresentou tamanho reduzido de partícula (106 ± 52 nm) e mostrou ser estável à temperatura ambiente pelo período analisado de 6 meses. Outras substâncias usadas em produtos de cuidado da pele como antioxidantes e vitaminas como tocoferóis (vitamina E), retinóis (vitamina A) têm sido igualmente incorporadas com sucesso em formulações deste tipo na forma de loções, géis ou cremes (BENITA, 1998).

Recentemente, Alves e colaboradores (2006) desenvolveram nanoemulsões de uso tópico contendo o antiinflamatório nimesulida, através do procedimento de emulsificação espontânea. O sistema desenvolvido apresentou diâmetro inferior a 300 nm e taxa de associação do fármaco próxima a 100%. Essas formulações foram incorporadas em bases semi-sólidas (hidrogéis) apresentando um comportamento não-newtoniano de características pseudoplásticas.

O diazepam, um fármaco lipofílico com atividade no SNC, tem servido de modelo para avaliar a eficácia das nanoemulsões como veículo transdérmico. O diazepam foi formulado em vários cremes tópicos e nanoemulsões apresentando diferentes composições. As formulações foram aplicadas topicamente e a proteção contra efeito convulsivante induzido por pentametileno-tetrazol foi monitorado. A eficácia do diazepam aplicado topicamente na emulsão foi fortemente dependente do tamanho de gotícula de

óleo formado. A preparação da emulsão com TCM resultou em uma redução importante no tamanho da gotícula, ocasionado por meio disto, um significativo aumento da atividade transdérmica do diazepam. Uma simples aplicação do diazepam em nanoemulsão em pele de camundongo proporcionou uma pronunciada liberação transdérmica e uma atividade prolongada de 6 horas (SCHWARZ *et al*, 1995)

Na área de produtos cosméticos, o tamanho muito reduzido da gotícula da nanoemulsões proporciona propriedades características, na qual podem ser facilmente valorizadas na cosmética. Um estudo comparativo do poder de hidratação de três diferentes produtos foi realizado: uma nanoemulsão, um leite corporal e uma água corporal. Após 1 hora, o poder de hidratação da nanoemulsão foi muito mais alto que o poder de hidratação dos outros dois produtos. A medida feita após 24 horas mostrou o longo efeito duradouro comparado ao leite corporal e a água corporal. (SONNEVILLE – AUBRUN *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de produtos nanoemulsionados contendo filtros solares também foi descrito por ZEEVI e colaboradores (1994). Os autores descreveram a formulação de nanoemulsões partindo da hipótese de que a incorporação do octil metoxicinamato em nanoestruturas carregadas positivamente poderia aumentar a penetração e retenção do filtro solar na pele. O trabalho demonstrou a obtenção de nanoemulsões estáveis contendo o filtro solar de diâmetro próximo a 200-300 nm, confirmado por microscopia de transmissão com criofratura.

Permeação cutânea

A pele humana funciona como uma barreira bi-direcional, controlando a perda de água e outros constituintes do corpo, e prevenindo a entrada de substâncias nocivas do meio externo. A camada mais externa da epiderme, o estrato córneo é conhecido como um fator contribuinte para a função de barreira da pele humana para permeação de muitos fármacos. A permeação percutânea implica em diversos passos. Quando uma formulação é aplicada na

pele, ela irá distribuir no estrato córneo. A passagem através da pele envolve a dissolução do fármaco no veículo, a difusão da solubilidade do fármaco do veículo para a superfície da pele, e a penetração do fármaco através das camadas da pele, principalmente o estrato córneo. A extensão deste processo de permeação dependerá das propriedades físico-químicas do fármaco combinado com a influência do veículo em alterar a permeação do fármaco. A camada mais externa da pele tem sido reconhecida como a membrana que atua predominantemente como uma barreira lipofílica (BENITA, 1998; SAIJA *et al.*, 1998).

Desta forma, a partição é um determinante físico-químico no controle da absorção. Existe um número de rotas na qual uma molécula pode atravessar o estrato córneo, elas são: intercelular, transcelular e pelos anexos (glândulas sudoríparas ou folículos pilosos). Sob condições normais a via anexa não é considerada muito significativa, em parte é devido à baixa área de superfície ocupada por estes anexos. Uma maneira de aumentar a baixa permeabilidade do fármaco através da pele humana é utilizando promotores de permeação, na qual podem mudar a estrutura lipídica da pele e fazer canais na barreira cutânea. Entretanto, a inclusão de promotores químicos, usualmente solventes orgânicos, está geralmente associada de algum modo, com irritação, toxicidade e sensibilização cutânea. Para apresentar resultados seguros, somente alguns promotores químicos têm sido usados em produtos comerciais, e por esta razão, a pesquisa de promotores eficientes e seguros é continua (BONINA *et al.*, 1994; BENITA, 1998; SAIJA *et al.*, 1998; BENITA, 1999; BRINON *et al.*, 1999; HADGRAFT, 2001; RÖPKE *et al.*, 2002; SHIM *et al.*, 2004; SINICO *et al.*, 2005).

A liberação tópica de substâncias bioativas é, de fato, uma estratégia para reduzir a toxicidade sistêmica e, ao mesmo tempo, restringir os efeitos desejados para tecidos específicos. Por esta razão, sistemas que conduzem a uma alta concentração de agentes ativos nos níveis cutâneos e subcutâneos podem ser de grande interesse para propostas terapêuticas para tratamento e prevenção de distúrbios da pele. Diversas substâncias são ineficientes quando aplicadas sobre a pele por apresentarem completa deficiência para penetrar na

pele. O principal obstáculo para a liberação de substâncias bioativas através da pele está, de fato, na constituição das propriedades da barreira do estrato córneo, que impede os compostos ativos de atingir mais profundamente este estrato (BONINA *et al.*, 1994).

Muitos estudos têm descrito o potencial uso dos flavonóides como seqüestradores de radicais livres para prevenir os danos oxidativos na pele e sua aplicação tópica tem demonstrado interessante. Saija e colaboradores avaliaram a habilidade dos flavonóides, quando aplicados topicamente na pele, de reduzir o eritema de pele induzido por UVB, em voluntários humanos. Este trabalho apresentou também estudos de permeação cutânea destes flavonóides e o D-limoneno e lecitina foram usadas como promotores de absorção. Estes promotores aumentaram a permeação cutânea da hesperetina e naringenina, provavelmente devido ao aumento do coeficiente de difusão destes fármacos de alta lipofilicidade. Já estes promotores não foram capazes de aumentar a permeação cutânea da quercetina através da pele, podendo ser explicada pela reduzida hidrossolubilidade da quercetina, esta propriedade físico-química desempenha um papel tão importante como a lipofilicidade no processo de permeação cutânea, especialmente para fármacos lipofílicos (SAIJA *et al.*, 1998).

Auner e colaboradores (2005) estudaram a atividade antioxidante, assim como as propriedades hemolíticas e citotóxicas *in vitro* de alguns flavonóides depois de permearem através da pele. Os resultados mostraram que todos os flavonóides analisados foram capazes de permear na pele de suíno, especialmente, os que apresentam maior solubilidade em água, os glicosídeos florizina e naringina, mostraram maior acúmulo permeado que o acumulado na pele. Já as suas agliconas mais lipofílicas, floretina e naringenina, o resultado foi inverso, elas ficaram retidas em maior concentração na pele que a quantidade permeada acumulada. Enquanto a alta permeação dos glicosídeos pode ser explicada pela alta solubilidade na fase aceptora, a alta retenção na pele das agliconas pode ser explicada pela alta solubilidade nos lipídeos da pele.

Amplios estudos têm sido conduzidos na liberação de agentes terapêuticos e promotores de absorção percutânea. Os métodos de absorção percutânea incluem promotores químicos de alta afinidade com os lipídeos da pele, na qual alteram, quimicamente ou fisicamente, a estrutura do estrato córneo e dispositivos de liberação, e que são capazes de permear o estrato córneo (SHIM *et al.*, 2004). Em particular, tem se mostrado que as moléculas promotoras de absorção podem mudar tanto a composição e/ou a organização lipídica intercelular. Por outro lado, o uso de promotores de permeação é muitas vezes limitado devido ao seu potencial tóxico; isto pode ser lembrado que muitas funções fisiológicas da pele estão diretamente associadas com a manutenção da zona de proteção do estrato córneo (BONINA *et al.*, 1994).

A liberação tópica e transdérmica podem aumentar a taxa de permeação, devido à promoção do efeito tópico pelo tempo prolongado na superfície das camadas da pele. Propriedades oclusivas devido à formação de filme na superfície da pele, na qual reduz a perda transepidermal de água, tem sido estudada. A oclusão pode promover a penetração de fármacos através do estrato córneo pelo aumento da hidratação. (BENITA, 1999; LIPPACHER *et al.*, 2001). A penetração e permeação de componentes ativos de baixa absorção podem ser aumentadas pela adição de promotores específicos na formulação, através do uso de sistemas de liberação coloidais, ou através do uso de emulsões submicrômicas. Este último sistema de liberação foi testado pelo teste de irritação primária em humanos por 48 horas. A baixa irritabilidade e a excelente aceitação humana foram observadas, fazendo desta forma, o desenvolvimento de um veículo submicrométrico emulsionado muito atraente. Entretanto, a interação das emulsões submicrométricas com a pele também depende de diversos fatores na qual incluem a carga elétrica superficial da gotícula, a composição destas emulsões e as propriedades físico-químicas da pele (BENITA, 1999; SHIM *et al.*, 2004).

Recentemente foi demonstrado que as nanoemulsões promovem a liberação tópica de diversos fármacos incorporados em cremes

nanoemulsionados preparados com diferentes componentes da fase oleosa. A atividade do fármaco teve um aumento de 1,5 para 3,0 para fármacos antiinflamatórios (esteroidais e não-esteroidais), diazepam, atropina e anestésicos locais formulados com nanoemulsões. A prolongada atividade do fármaco das nanoemulsões pode ser atribuída ao aumento da permeação das gotículas nanométricas de óleo através do estrato córneo da pele e a melhor associação do fármaco com o aumento da superfície de contato das partículas nanométricas (BENITA, 1998).

A observada melhora da eficácia da formulação submicrométrica pode ser explicada baseada na estrutura da pele. Devido ao estrato córneo apresentar diversas camadas de células mortas epiteliais e um espaço intracelular no qual é preenchido com lipídeos não-polares, estas camadas lipídicas lamelares compreende um primeiro obstáculo à penetração de compostos exógenos. O uso de fosfolipídeos na estabilização das nanoemulsões pode sugerir um mecanismo de penetração similar aos lipossomas. A penetração de nanoestruturas lipídicas, particularmente as contendo fosfolipídeos, nas camadas lipídicas do estrato córneo, pode conduzir à mudança de estrutura e da composição das barreiras lipídicas. Esta fluidização pode aumentar, desordenar e interromper a continuidade da barreira. A formação de espaços e fendas, devido a significativa hidratação, pode permitir a penetração de partículas SME através do estrato córneo. É possível também que diante destas circunstâncias, outras vias como folículos pilosos, canal sebáceo, poros ou vias paracelulares possam representar vias de penetração (BENITA, 1998). Diversos fatores afetam a liberação de fármacos de formulações nanoemulsionadas, incluindo a afinidade do fármaco com a fase interna da nanoemulsão. Os componentes das nanoemulsões reduzem a barreira do estrato córneo, aumentando o gradiente de concentração da pele e a ação de distribuição da fase como um reservatório, na qual é possível manter uma concentração constante na fase contínua (CHEN *et al.*, 2004).

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Matérias-primas

- Genisteína 98 % (SIGMA–ALDRICH);
- Lecitina de gema de ovo (Lipoid E-80[®] LIPOID);
- Octildodecanol (Eutanol G[®] COGNIS);
- Triglicerídeos de cadeia média (MCT LIPOID).

Reagentes e solventes

- Acetona PA (QUIMEX)
- Acetonitrila (Lichrosolv[®] MERCK)
- Etanol PA (QUIMEX)
- Metanol (Lichrosolv[®] MERCK)

Equipamentos

- Banho termostático E11 (HAAKE);
- Banho de ultrassom Transsonic 460 (ELMA);
- CLAE acoplado a detector no UV SPD-10 (SHIMADZU);
- DSC DSC-2910 Modulated (TA INSTRUMENTS);
- Espectrofotômetro 8452A[®] (HEWLETT PACKARD);
- Evaporador rotatório R-114 (BÜCHI);
- Potenciômetro modelo DM-20 (DIGIMED);
- Termomisturador compacto (EPPENDORF);
- Ultracentrífuga MR 23i (JOUAN);
- Zetasizer 3000HS (MALVERN)

Métodos

Validação da metodologia para quantificação da genisteína por CLAE

Em uma primeira etapa do desenvolvimento do método, o espectro de absorção da genisteína no UV (200 – 400 nm) foi obtido por meio da análise de uma solução de genisteína em metanol, na concentração de 100 µg/mL em espectrofotômetro. Os parâmetros de validação selecionados para o doseamento da genisteína seguiram as normas de validação dos procedimentos analíticos e de metodologias do *International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use – Validation of analytical procedures: definitions and terminology* (ICH, 1996), bem como as especificações estabelecidas no Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), contida na RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (Brasil, 2003).

Todo o estudo de validação foi realizado em cromatógrafo líquido de alta eficiência com injeção automática, utilizando o sistema Shimadzu. O fluxo de fase móvel utilizado foi de 1,0 mL/min, detecção no UV em 270 nm ou 327 nm, coluna cromatográfica (Phenomenex[®] Synergi Fusion – RP 80 Å, 250 x 4,60 mm, 4µ), presença de pré-coluna (Phenomenex[®], com mesmo enchimento), e um volume de injeção de 20 µl. A fase móvel foi composta de metanol: água: acetonitrila (70:25:5 m/m/m). Os solventes foram pesados separadamente em balança semi-analítica e misturados. A mistura foi filtrada sob vácuo por membrana hidrofílica HVLP04700 com 0,45 µm de poro e 47 mm de diâmetro (Millipore[®]) e em seguida degaseificada em banho de ultra-som por 15 minutos.

Desta forma, foram avaliados os parâmetros de linearidade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade, precisão intermediária, especificidade e exatidão.

Linearidade

Para determinar a faixa de linearidade da genisteína foram preparadas três curvas de calibração a cada dia, por três dias consecutivos, cada uma delas contendo cinco pontos. Uma solução-mãe de genisteína na concentração de 100 µg/ml foi obtida pela dissolução de 2,5 mg, exatamente pesados, em 25 mL de metanol em balão volumétrico. Para 270 nm, foi preparada uma curva padrão com 5 concentrações: 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 50,0 µg/mL. Para 327 nm, soluções contendo 25; 37,5; 50; 62,5 e 75 µg/mL foram preparadas. Em ambos os casos, metanol foi utilizado como solvente nas diluições.

A linearidade foi determinada através da construção de curvas de calibração com soluções padrão de genisteína. A inclinação e outros parâmetros estatísticos das curvas de calibração foram calculados por regressão linear.

Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados matematicamente utilizando-se o desvio padrão do valor do intercepto com o eixo do Y e inclinação de três curvas de calibração (ICH, 1996). No caso dos experimentos em 270 nm, os limites de detecção e quantificação foram avaliados em uma curva de calibração específica na faixa de 0,5 a 5,0 µg/mL.

Avaliação da repetibilidade e precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada por meio da análise de curvas de calibração em três dias diferentes, em cada um dos dois comprimentos de onda utilizados, e expressa em coeficiente de variação (CV %) das áreas obtidas em cada ponto da curva. A repetibilidade foi avaliada por meio da concordância entre os resultados de nove determinações de uma mesma concentração, expressa em coeficiente de variação (CV %) das áreas obtidas.

Exatidão

A exatidão ou recuperação do método foi realizada a partir da determinação de quantidades conhecidas de genisteína previamente adicionadas em soluções de nanoemulsões brancas (apresentadas posteriormente nesse trabalho). Foram adicionadas quantidades crescentes de genisteína às nanoemulsões brancas constituídas de lecitina de gema de ovo e TCM ou ODD, originando respectivamente, as concentrações baixa, média e alta de exatamente cerca de 25,0; 50,0 e 75,0 $\mu\text{g/mL}$. A genisteína foi quantificada por CLAE em 327 nm.

Especificidade

A especificidade do método foi avaliada por meio da análise das preparações de nanoemulsões em ausência de genisteína, comparativamente às formulações que continham genisteína em 270 nm e 327 nm. Para tanto, uma alíquota de cada nanoemulsão (500 μL) foi adicionada a um balão volumétrico de 10 mL e dissolvida em metanol. As amostras foram injetadas conforme condições cromatográficas descritas anteriormente.

Determinação da solubilidade da genisteína em óleos

Para determinar a solubilidade da genisteína nos óleos selecionados para a preparação das nanoemulsões, foi pesado exatamente cerca de 1 mg de genisteína, transferido para eppendorfs e adicionou-se 1 mL de cada tipo óleo (TCM ou ODD). As suspensões formadas foram deixadas sob agitação por 24 horas, sob temperatura de 37 °C e 800 rpm. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, 21 °C de temperatura por 15 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi então retirada e diluída em metanol e a genisteína quantificada por CLAE em 327 nm. Os resultados foram expressos em ($\mu\text{g/mL}$) e representam a média de 3 experimentos independentes para cada óleo testado.

Preparação das nanoemulsões

As nanoemulsões foram preparadas através do procedimento de emulsificação espontânea, conforme descrito por Martini (2005). Nesse procedimento, os constituintes da fase oleosa são solubilizados em etanol e os da fase aquosa, em água. Após, a fase orgânica é vertida sobre a fase aquosa, através de um funil calibrado, sob agitação moderada e constante durante 15 minutos. Esta etapa é seguida da retirada do solvente através de destilação sob pressão reduzida em evaporador rotatório, a 40°C, até o volume final desejado, resultando em uma concentração teórica final de genisteína de 1 mg/mL. A proporção de solvente orgânico: água foi de 3:6 (mL) para a preparação de 1 mL de formulação final.

A composição final das formulações está apresentada na tabela 1. Todas as formulações foram preparadas em triplicata e seus respectivos controles isentos de GEN.

Tabela 1. Composição final (% , m/m) das nanoemulsões contendo genisteína.

	NE _{TCM}	NE _{ODD}
Genisteína	0,10	0,10
Lecitina de gema de ovo	2,00	2,00
Triglicerídeos de cadeia média	8,00	-
Octildodecanol	-	8,00
Água q.s.p.	100,00	100,00

Caracterização das nanoemulsões

Determinação do diâmetro de gotícula

As diferentes formulações foram caracterizadas em termos de diâmetro médio de gotícula através de espectroscopia a laser de autocorrelação. Essa determinação foi realizada observando o espalhamento a 90° após diluição das amostras em água purificada, previamente filtrada em membrana de 0,22 µm

(Millipore®). O índice de polidispersão é determinado pelo equipamento. Os resultados foram expressos como média de três determinações de três lotes preparados de cada formulação.

Determinação do pH

A determinação do pH das nanoemulsões foi realizada diretamente nas formulações através da utilização de potenciômetro calibrado com pH 4,01 e 6,86 antes e após a determinação dos pH das nanoemulsões. Os resultados foram expressos como média de três determinações dos três diferentes lotes preparados de cada formulação.

Determinação do potencial zeta

O potencial zeta das nanoemulsões foi determinado através da mobilidade eletroforética das gotículas. As medidas foram realizadas após calibração com uma solução padrão a -55 mV (látex poliestireno caboxilato). Essa determinação foi realizada após diluição das amostras em água purificada, previamente filtrada em membrana de $0,22$ μm (Millipore®). Os resultados foram expressos como média de três determinações de três lotes preparados de cada formulação.

Determinação da viscosidade

A viscosidade das amostras foi determinada através de viscosimetria capilar, conforme preconiza a Farmacopéia Brasileira 4ª. Edição, em viscosímetro de Ostwald. Para tanto, foi transferido para o viscosímetro, um volume de 5 mL de cada nanoemulsão. As análises foram realizadas à temperatura de 20 °C, levando-se em conta o tempo de escoamento da amostra através do capilar e a viscosidade relativa foi determinada através da equação 2:

$$\eta = k.t.\rho$$

(equação 2)

Onde: η = viscosidade absoluta (cP); k = constante do viscosímetro; ρ = densidade do fluido a temperatura de 20 °C (g/mL); t = tempo de escoamento (s).

O valor da constante de Ostwald (k) foi determinado experimentalmente ($k = 0,0212$), medindo-se o tempo de escoamento de um líquido padrão, neste caso a água, e aplicando-se na fórmula apresentada o valor da viscosidade da água a temperatura de 20°C (1,0087 cP). Para todas as amostras, a densidade foi determinada experimentalmente, através do uso de picnômetro. Os resultados foram expressos como média de três determinações dos três lotes preparados de cada formulação.

Quantificação da genisteína nas nanoemulsões

A quantidade total de genisteína foi determinada através da dissolução total das nanoemulsões em metanol e análise por CLAE. Para as diluições, foram transferidos 250 μ L das nanoemulsões a serem analisadas para balão volumétrico de 5 mL e o volume foi completado com metanol. A quantificação da genisteína foi realizada em 327 nm. Os resultados foram expressos em concentração de genisteína (μ g/mL). A avaliação da quantidade de genisteína livre foi determinada após a separação de uma fração da fase aquosa externa utilizando-se membranas de ultrafiltração-centrifugação (Ultrafree[®] - GMPC 10.000 NMWL, Millipore[®]). Alíquota de 200 μ L das nanoemulsões foi colocada sobre as membranas e centrifugadas a 14.000 rpm durante 90 minutos. A genisteína foi quantificada por CLAE, em 270nm.

A taxa de associação (%) da genisteína com as nanoemulsões foi determinada pela diferença entre a quantidade total de genisteína e aquela determinada no ultrafiltrado no tempo 0 e após 30, 60 e 90 dias de armazenamento a 4 °C, conforme a equação 3. Os resultados representam a média de três experimentos independentes.

$$TA = \frac{q_t - q_{UF}}{q_t} \cdot 100 \quad (\text{equação 3})$$

Onde: TA = Taxa de associação da GEN (%); q_i = quantidade de GEN inicial adicionada as nanoemulsões ($\mu\text{g/mL}$) e q_{UF} = quantidade de GEN recuperada no ultrafiltrado ($\mu\text{g/mL}$).

Caracterização da genisteína por Calorimetria diferencial exploratória

A fim de determinar o comportamento térmico da GEN isolada e em mistura com os componentes das nanoemulsões, análises por DSC foram realizadas utilizando-se amostras de GEN, TCM, ODD e lecitina isoladas, bem como as misturas binárias da GEN com cada uma das matérias primas (GEN-TCM, GEN-ODD e GEN-lecitina), na proporção da formulação.

As análises foram realizadas utilizando-se calorímetro exploratória diferencial com compensação de potência, com temperatura calibrada com índio ($156,63\text{ }^\circ\text{C}$). Para o preparo das amostras, soluções das matérias-primas foram obtidas a fim de formar um filme, com peso definido, no cadinho, através da evaporação dos solventes das soluções, em placa aquecedora. Foi pesado cerca de 0,2 a 4 mg, de cada amostra e acondicionadas em cadinhos selados. As condições de análise foram: faixa de aquecimento de -50 a $350\text{ }^\circ\text{C}$, velocidade de aquecimento de $5\text{ }^\circ\text{C/min}$ e fluxo de gás nitrogênio. A calibração da linha de base foi realizada diariamente antes das análises.

Avaliação do perfil de permeação cutânea da genisteína in vitro

Nesta etapa, foi determinada a cinética de permeação cutânea intrínseca da GEN, bem como a permeação a partir dos óleos formadores do núcleo oleoso e das nanoemulsões. Para tanto, foram utilizadas orelhas de porco, desprovidas de pêlos (obtidas através de doação da empresa Dália-Consuelo[®], Brasil) e armazenadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. As orelhas foram descongeladas à temperatura ambiente, a parte posterior da pele foi removida com bisturi, e

então foram feitos cortes circulares para possibilitar a montagem das mesmas nas células de difusão.

Células de difusão

Para a cinética de penetração cutânea foram utilizadas células de difusão tipo Franz com área interna de interface de 2,54 cm² e volume da fase aceptora de 9 mL. Os cortes circulares de pele de suíno, previamente preparados, foram colados com auxílio de cola acrílica na borda da fase aceptora. Estas peles foram utilizadas como interface entre o meio doador e o meio acceptor da célula de Franz, com a face interna da pele voltada para o interior da célula. As peles foram hidratadas com tampão fosfato pH=7,4 durante 12 horas sob refrigeração. Após 12 horas de hidratação, em todos os experimentos, retirou-se o tampão fosfato do meio acceptor e este foi substituído com solução metanólica 50 % (BRONAUGH, 1996) e as células foram mantidas sob agitação com barras magnéticas em banho termostático à temperatura de 37 °C.

Cinética de permeação

Para o estudo da permeação cutânea intrínseca foram pesados 6,0 mg de genisteína, que foram solubilizados em 1,2 mL de acetona e então 200 µL desta solução foram aplicados no meio doador de cada célula de difusão de Franz, perfazendo uma quantidade de 1 mg de genisteína aplicada por célula. A aplicação procedeu-se de forma que toda a superfície da pele estivesse recoberta. Após a evaporação do solvente, a cinética de permeação da genisteína foi iniciada e as amostras foram analisadas conforme descrito anteriormente.

Para o estudo da permeação cutânea da genisteína a partir dos núcleos oleosos das nanoemulsões (TCM e ODD) foram pesadas 6 mg de genisteína e dispersas em 3 mL de cada óleo avaliado. Foram aplicados 0,5 mL desta mistura no meio doador de cada célula de difusão de Franz a fim de que a quantidade aplicada de genisteína resultasse em 1 mg por célula. A aplicação

procedeu-se de forma que toda a superfície da pele estivesse recoberta. Para o estudo da permeação cutânea da genisteína a partir das nanoemulsões foram aplicados 1 mL de nanoemulsão na concentração de 1 mg/ml de genisteína no meio doador de cada célula de difusão de Franz a fim de que a quantidade aplicada de genisteína resultasse em 1 mg por célula. A aplicação procedeu-se de forma que toda a superfície da pele estivesse recoberta.

O fluxo da genisteína através da pele foi calculado determinando-se a concentração da genisteína na fase aceptora em 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas após a aplicação da amostra da fase doadora. A cada amostragem, retirou-se 2 mL da solução metanólica 50 % contida no meio acceptor e completou-se com o mesmo volume de uma nova solução metanólica 50 %. As alíquotas retiradas foram analisadas por CLAE com detecção no UV em 270 nm e expressos em quantidade de genisteína permeada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Cada experimento foi realizado em seis células de difusão. O gráfico obtido da quantidade de genisteína permeada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (h), permite a determinação do fluxo ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) de permeação cutânea da genisteína através da pele no estado estacionário, sendo este calculado através da inclinação da porção linear da reta e o tempo de latência (h) da difusão em regime estacionário é determinado através da interseção com o eixo da abscissa.

Quantificação da genisteína remanescente na pele após permeação cutânea

Para quantificar a quantidade de genisteína remanescente na pele suína utilizada para o estudo da permeação cutânea *in vitro*, a pele foi retirada da célula de Franz, após o término de cada cinética de permeação e lavada rapidamente com a solução metanólica 50 %. Após triturar as amostras de pele, adicionou-se quantidade de metanol necessário para extração da genisteína (2 mL) e submetem-se as mesmas a ultra-som por 20 minutos. A genisteína foi quantificada por CLAE em 270 nm e os resultados foram expressos em μg de genisteína por g de pele ($\mu\text{g}/\text{g}$).

Análise estatística

Para todos os experimentos de permeação cutânea os resultados obtidos foram avaliados através da Análise da Variância (ANOVA) e a comparação dos resultados obtidos entre as formulações foram analisados através de teste “t” de Student, considerando-se um nível de significância de 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação de metodologia para a quantificação da genisteína

Na última década, diversos trabalhos relataram o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para a quantificação de isoflavonas utilizando CLAE com detecção por UV (SUPKO e PHILLIPS, 1995; FUKUTAKE *et al.*, 1996; HUTABARAT *et al.*, 1998; KSYCIŃSKA *et al.*, 2004; KLEJDUS *et al.*, 2005). A maior parte dos estudos descreve a utilização de sistemas cromatográficos em gradiente visando à separação e quantificação das principais isoflavonas da soja - genisteína, daidzeína e seus heterosídeos - em produtos alimentícios e/ou fluídos biológicos.

Com base nesta literatura, em uma primeira etapa do trabalho, foi realizado o desenvolvimento e validação de metodologias para a quantificação da isoflavona genisteína nos sistemas nanoemulsionados e nos estudos de permeação cutânea, utilizando um sistema isocrático com detecção no UV. A figura 2 apresenta o espectro de absorção da genisteína no UV e visível em solução metanólica.

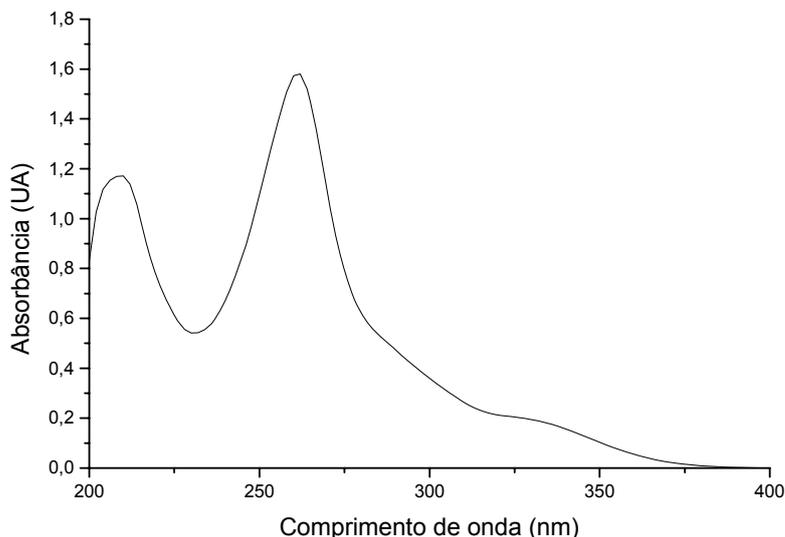


Figura 2. Espectro de absorção da genisteína no UV e visível

As isoflavonas apresentam espectros de absorção de UV determinados pelo núcleo comum da benzopirona, com dois máximos de absorção: 240-285

nm (banda II) e 300-400 nm (banda I). Como pode ser observado na figura 2, a genisteína apresenta um máximo de absorção de maior intensidade, em torno de 270 nm, de acordo com o descrito por outros autores (FUKUTAKE *et al.*, 1996; KSYCIŃSKA *et al.*, 2004). Além deste, relacionado à existência do anel B, a genisteína apresenta uma segunda banda de absorção característica, de menor intensidade a 327 nm, que pode ser relacionada ao anel A da isoflavona (HARBORNE *et al.*, 1975; ZUANAZZI e MONTANHA, 1999). Como conseqüência destes resultados, as determinações podem ser realizadas nestes dois máximos de absorção.

A especificidade de um método indica sua capacidade de avaliar sem equívoco o analito de interesse, mesmo em presença de outras substâncias, como impurezas, produtos de degradação e adjuvantes (ICH, 1996). Neste estudo de validação de uma metodologia para a quantificação da genisteína por CLAE, a especificidade foi realizada através da comparação dos tempos de retenção da genisteína e dos componentes das nanoemulsões desenvolvidas na segunda etapa do trabalho. A composição quali e quantitativa das formulações está descrita nos materiais e métodos (tabela 1). A tabela 2 apresenta os tempos de retenção da genisteína e dos componentes das formulações isentas de genisteína.

Tabela 2. Tempo de retenção (min) da genisteína e dos componentes das nanoemulsões em 270 e 327 nm.

	Comprimento de onda	
	270 nm	327 nm
GEN	4,400	4,400
TCM ^a	4,294	não detectado
ODD ^b	4,339	não detectado

(^a)TCM: nanoemulsão branca contendo triglicerídeos de cadeia média e lecitina e (^b) ODD: nanoemulsão branca contendo octildodecanol e lecitina.

A tabela 2 e a figura 3 indicam um tempo de retenção da genisteína de 4,4 minutos em ambos os comprimentos de onda. Contudo, pode-se concluir que houve interferência dos componentes da formulação das nanoemulsões na quantificação da genisteína, com possível sobreposição dos picos, em tempo de retenção próximo aquele detectado para a genisteína no 270 nm.

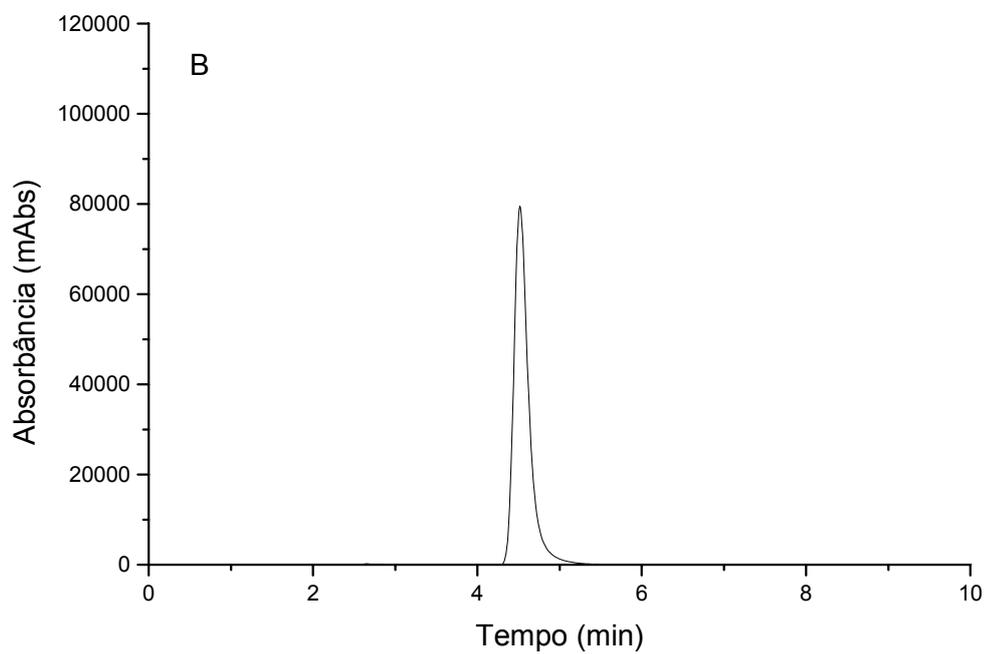
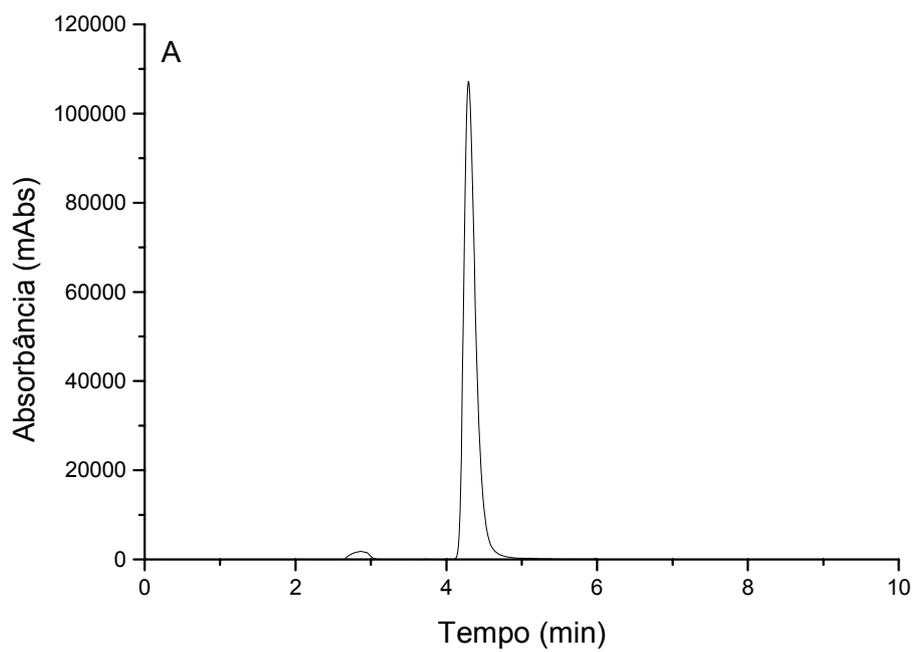


Figura 3: Perfil cromatográfico da GEN em $\lambda = 270$ nm (A) e 327 nm (B).

Após os resultados obtidos nesta etapa, diversas tentativas de otimização do sistema cromatográfico foram realizadas visando à quantificação da genisteína em 270 nm, contudo, sem sucesso, tendo em vista a escassa seletividade do método. Assim, optou-se por validar a quantificação da genisteína paralelamente em 327 nm a fim de viabilizar a quantificação do teor de genisteína na presença dos diferentes componentes das formulações. A fase móvel metanol-água-acetonitrila (70:25:5, m/m/m) e fluxo de 1 mL/min foram as condições consideradas otimizadas e foram utilizadas para a quantificação da genisteína em ambos os comprimentos de onda.

A linearidade pode ser definida como a capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise dentro de uma determinada variação. Representa a habilidade do método de produzir resultados que são diretamente proporcionais à concentração da substância na amostra, dentro de um intervalo especificado. Esta verificação é realizada através da elaboração de uma curva padrão e da análise estatística da linearidade, através da análise de regressão linear (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

A tabela 3 e a figura 4 apresentam, respectivamente, os parâmetros de linearidade e a representação gráfica das curvas obtidas em 270 e 327 nm.

Tabela 3. Parâmetros de linearidade das curvas padrão da genisteína por CLAE.

	Comprimento de onda	
	270 nm	327 nm
Equação da reta	$y=21254x + 21468$	$y=21254x - 9595,5$
Coefficiente de determinação (R^2)	0,9996	0,9999
Desvio padrão da intersecção (a)	31868,26	7337,42
Desvio padrão da inclinação (b)	1295,41	138,35

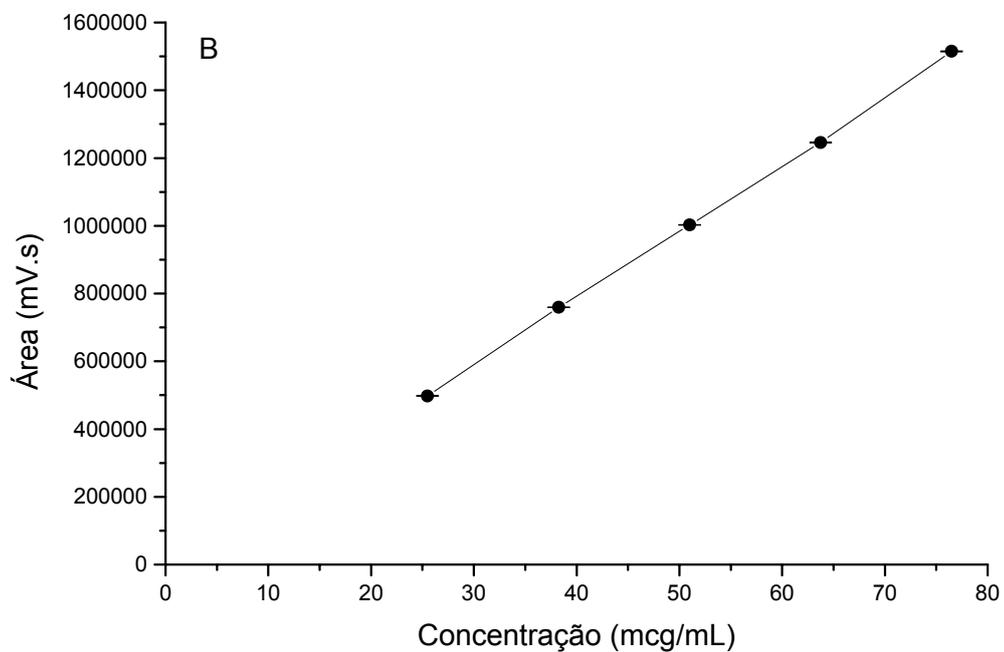
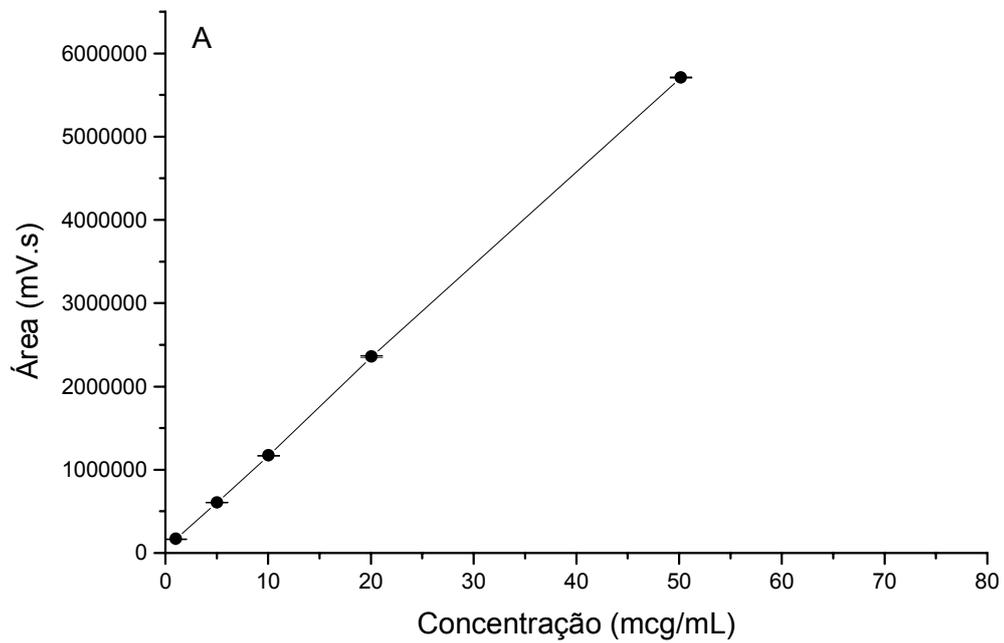


Figura 4. Representação gráfica da curva padrão da genisteína obtida por CLAE utilizando detecção em 270 nm (A) ou 327 nm (B).

As equações das retas obtidas por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de determinação para as curvas padrão (tabela 3), demonstram elevada relação linear existente entre a concentração da genisteína e a absorvância detectada. Os resultados obtidos demonstraram que a avaliação da linearidade é estatisticamente válida, pois apresentou regressão linear significativa ($p < 0,05$), com valores de $F_{\text{calculado}}$ iguais a 25537,45 e 36818,35, para 270 e 327 nm, respectivamente, e $F_{\text{crítico}}$ igual a 10,13.

A metodologia de quantificação da genisteína foi avaliada em relação a sua sensibilidade através da determinação dos limites de detecção e quantificação em ambos os comprimentos de onda. As curvas foram estabelecidas em dois diferentes intervalos de concentração: 1 - 50 e 25 - 75 $\mu\text{g/mL}$ para 270 e 327 nm. O limite de detecção pode ser definido como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, enquanto que, o limite de quantificação representa a menor concentração da substância analisada que pode ser determinada com precisão e exatidão (ICH, 1996; BRASIL, 2003). A tabela 4 apresenta os limites de detecção e quantificação da GEN em ambos os comprimentos de onda estudados.

Tabela 4. Limites de detecção e quantificação da genisteína em 270 e 327 nm.

	Comprimento de onda	
	270 nm	327 nm
Limite de detecção ($\mu\text{g/ml}$)	0,086	1,91
Limite de quantificação ($\mu\text{g/ml}$)	0,260	5,79

Como pode ser observado na tabela 4, os limites de detecção e quantificação, determinados a partir das curvas padrão obtidas em ambos os comprimentos de onda, apresentam diferenças significativas. Apesar da menor sensibilidade na detecção da genisteína em 327 nm, a validação da metodologia nesse comprimento permite a quantificação da genisteína total nas nanoemulsões em presença de todos os adjuvantes da formulação (resultados apresentados posteriormente).

A precisão do método avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). A precisão pode ser determinada pelo grau de reprodutibilidade, pela precisão intermediária e pela repetibilidade de um método analítico sob condições normais de operação. A primeira é avaliada através de resultados obtidos de uma amostra analisada em diferentes laboratórios, diferentes dias, por diferentes analistas e em diferentes equipamentos. Já a precisão intermediária é avaliada no mesmo laboratório, mas em dias diferentes, por exemplo. Por sua vez, a repetibilidade é medida em função dos valores encontrados através de várias reproduções do método, nas mesmas condições e em um curto intervalo de tempo (ICH, 1996).

A precisão intermediária do método (precisão inter-dia) foi avaliada através da comparação dos desvios padrões relativos em três dias consecutivos, pelo mesmo executor (ICH, 1996; BRASIL, 2003). Os resultados estão representados na Tabela 5, 6 e 7.

Tabela 5. Precisão inter-dia para a quantificação da genisteína em 270.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Dia 1 Área (mV.s; $X \pm s$)	Dia 2 Área (mV.s; $X \pm s$)	Dia 3 Área (mV.s; $X \pm s$)	CV (%)
1,00	109881,33 $\pm 1199,08$	114460 $\pm 914,16$	110127 $\pm 1624,75$	0,32
5,00	565036,67 $\pm 10416,26$	587459,33 $\pm 9770,98$	568256 $\pm 1788,36$	0,83
10,00	1179028 $\pm 25677,87$	1231679,67 $\pm 9446,33$	1158506 $\pm 3114,79$	1,02
20,00	2273724 $\pm 38309,91$	2526858,67 $\pm 1106,72$	2448150,33 $\pm 70673,88$	1,44
50,00	5522509,67 $\pm 108749,36$	6122524,33 $\pm 70520,78$	5741210,33 $\pm 18406,23$	0,78

Tabela 6. Precisão inter-dia para a quantificação da genisteína em 327.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	CV (%)
	Área (mV.s; $X \pm s$)	Área (mV.s; $X \pm s$)	Área (mV.s; $X \pm s$)	
25,00	532316,67 $\pm 280,27$	548212,33 $\pm 11103,25$	536316 $\pm 2048,63$	1,08
37,50	789345 $\pm 16403,39$	826223,67 $\pm 903,01$	816215 $\pm 5846,94$	0,98
50,00	1077680,67 $\pm 1559,07$	1077850,67 $\pm 1910,76$	1066240,33 $\pm 8379,89$	0,36
62,50	1322620,67 $\pm 2238,41$	1346978,33 $\pm 2186,33$	1322255,67 $\pm 43897,43$	1,57
75,00	1597784,33 $\pm 13965,95$	1598619,33 $\pm 31300,70$	1625450 $\pm 37841,85$	0,77

Quanto à repetibilidade (precisão intra-dia), esta pode ser representada pelo CV % das determinações de área de uma determinada concentração na curva de calibração com pelo menos nove repetições. Os resultados referentes à repetibilidade do método estão apresentados na tabela 6.

Tabela 7. Precisão intra-dia para a quantificação da genisteína em 270 e 327 nm.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Comprimento de onda	
	270 nm	327 nm
Área $\pm s$	1249638 \pm 14962	1084973 \pm 1806
CV%	1,19	0,17

Considerando-se que os CV % determinados indicaram valores inferiores a 5 % nos experimentos de precisão intra-dia e inter-dia, respectivamente, pode-se concluir que a metodologia desenvolvida para a quantificação da genisteína apresenta repetibilidade e precisão inter-dia dentro dos limites especificados nos códigos oficiais (ICH, 1996; THE UNITED, 1998; BRASIL, 2003).

A exatidão de um método corresponde à proximidade entre os resultados obtidos por um determinado método e o valor verdadeiro. A exatidão pode ser avaliada através de amostras contendo quantidades conhecidas da substância de referência sendo correntemente expressa como percentagem de recuperação. Os resultados de recuperação da genisteína estão apresentados na tabela 7.

Tabela 8. Exatidão do método para a quantificação da genisteína em 327 nm.

		Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	CV (%)
TCM ^a	25,00	24,17 \pm 0,06	96,68	0,25
	50,00	50,85 \pm 0,08	101,70	0,16
	75,00	75,23 \pm 0,11	100,30	0,14
ODD ^b	25,00	26,09 \pm 0,42	104,36	1,57
	50,00	53,31 \pm 0,08	106,62	0,15
	75,00	77,51 \pm 0,79	103,34	1,01

(^a)TCM: nanoemulsão branca contendo TCM e lecitina e (^b) ODD: nanoemulsão branca contendo ODD e lecitina.

A tabela 8 apresenta a taxa de recuperação da GEN em presença dos componentes da formulação das nanoemulsões. Os resultados obtidos demonstram uma recuperação média superior a 95 % com CV% inferior a 2 % para as três concentrações em ambas as formulações testadas, indicando que não existe interferência marcante dos componentes da formulação na quantificação da genisteína.

Desenvolvimento de nanoemulsões contendo genisteína

Nesta etapa do trabalho foram preparadas e caracterizadas nanoemulsões contendo genisteína através do procedimento de emulsificação espontânea. Os constituintes da fase interna das nanoemulsões contendo genisteína foram previamente solubilizados em uma fase orgânica e, posteriormente, emulsificados em água, seguido da retirada do solvente por destilação à pressão reduzida. As nanoemulsões são formadas espontaneamente apresentando-se como formas líquidas de aspecto leitoso.

A seleção das matérias-primas empregadas na composição das formulações - TCM ou ODD e lecitina de gema de ovo - foi baseada na adequação de suas propriedades para o desenvolvimento de produtos de uso tópico descritas na literatura. A formação das gotículas da fase interna das nanoemulsões ocorre durante a difusão do solvente orgânico na água, sendo que diversos parâmetros podem influenciar as propriedades físico-químicas das nanoemulsões obtidas, entre eles, as condições de emulsificação empregadas e a composição quali e quantitativa das formulações (BOUCHEMAL *et al.*, 2004). A tabela 9 apresenta a caracterização das propriedades físico-químicas das nanoemulsões contendo GEN (TCM_{GEN} e ODD_{GEN}) e seus respectivos controles (TCM e ODD).

Tabela 9. Propriedades físico-químicas das nanoemulsões contendo genisteína e seus controles.

	Nanoemulsão			
	TCM	TCM _{GEN}	ODD	ODD _{GEN}
Diâmetro (nm)	237 ± 11	263 ± 6	270 ± 13	282 ± 3
Viscosidade (cP)	1,40 ± 0,10	1,50 ± 0,10	1,70 ± 0,02	1,80 ± 0,07
Potencial zeta (mV)	- 44,0 ± 2,0	- 44,8 ± 4,0	- 42,0 ± 4,0	- 42, ± 3,0
pH	7,0 ± 0,1	6,8 ± 0,3	6,9 ± 0,2	6,9 ± 0,2

TCM: nanoemulsão branca contendo triglicerídeos de cadeia média e lecitina; ODD: nanoemulsão branca contendo octildodecanol e lecitina, TCM_{GEN}: nanoemulsão contendo triglicerídeos de cadeia média, lecitina e genisteína; ODD_{GEN}: nanoemulsão contendo octildodecanol, lecitina e genisteína.

As nanoemulsões preparadas através do procedimento de emulsificação espontânea apresentaram-se monodispersas, conforme indicado pelo baixo índice de dispersão ($IP < 0,2$), com diâmetro de gotícula inferior a 300 nm (tabela 8). Esses resultados estão em acordo com os valores publicados por outros autores para formulações obtidas por emulsificação espontânea de composição qualitativa e quantitativa similar às empregadas neste estudo (YU *et al.*, 1993; SILVA *et al.*, 2006). Contudo, pode ser observada uma tendência ao aumento do diâmetro de gotícula das formulações compostas por ODD como núcleo oleoso. Esse resultado pode estar relacionado com as propriedades físico-químicas do ODD. Esse óleo apresenta uma viscosidade a 20 °C de 58-64 mPas (MELZER, 2000) superior aquela apresentada pelo TCM de 25-33 mPa s (WADE e WELLER, 1994). Essa propriedade pode exercer um efeito no aumento do diâmetro das gotículas uma vez que pode influenciar a velocidade de difusão da fase orgânica em água (WEHRLE *et al.*, 1995; BOUCHEMAL *et al.*, 2004).

As propriedades físico-químicas do núcleo oleoso também influenciaram a viscosidade das nanoemulsões. Como pode ser observado na tabela 8, independentemente da presença da genisteína, a viscosidade das nanoemulsões constituídas de TCM é inferior àquela determinada para as formulações obtidas a partir de ODD. Silvander e colaboradores (2003) relataram que a viscosidade de sistemas submicrométricos, como as nanoemulsões, caracteriza-se, geralmente, como um sistema de comportamento reológico do tipo newtoniano, sendo que a viscosidade é principalmente influenciada pela concentração de óleo da fase interna e pelo diâmetro das gotículas das formulações.

Contrariamente ao esperado, as diferenças de diâmetro de gotícula das formulações não influenciaram a viscosidade das nanoemulsões. Alguns autores têm relatado uma maior viscosidade para nanoemulsões de menor diâmetro, em decorrência de um aumento das interações interparticulares das gotículas da fase interna (ISHII *et al.*, 1990; SILVA *et al.*, 2006) Assim, neste estudo, a viscosidade deve estar relacionada com as propriedades físico-químicas do núcleo oleoso (TCM ou ODD) das nanoemulsões.

O potencial zeta das nanoemulsões pode ser influenciado pelo tipo e pela quantidade de tensoativo presente na superfície das gotículas, bem como pela extensão de ionização destas moléculas, a qual, como é descrito na literatura para as lecitinas, depende do pH das formulações (YANG e BENITA, 2000). Como pode ser observado na tabela 8, independentemente do tipo de núcleo oleoso empregado na formação das nanoemulsões, o potencial zeta é negativo, de cerca de - 43 mV. Esse resultado indica a localização da lecitina de gema de ovo na interface O/A das nanoemulsões. O valor negativo observado pode ser atribuído à presença de ácidos graxos livres e fosfolipídeos carregados negativamente presentes na lecitina de gema de ovo (Lipoid E-80[®]), como a fosfatidilserina, ácido fosfatídico e fosfatidilinositol (LI e TIAN, 2002; YANG e BENITA, 2000; CHANSIRI *et al.*, 1999). Estes lipídeos encontram-se sob a forma ionizada no pH final das formulações que é de aproximadamente 7,0. O potencial zeta não é influenciado pela adição de GEN às nanoemulsões (TCM_{GEN} e ODD_{GEN}).

Após a caracterização físico-química das nanoemulsões contendo genisteína, a avaliação da taxa de associação da genisteína com as nanoemulsões foi realizada através de um método utilizando-se membranas de ultrafiltração/centrifugação. A taxa de associação da genisteína com as nanoemulsões foi determinada indiretamente através da diferença entre a quantidade livre no ultrafiltrado obtido e a quantidade total presente nas formulações. O uso de membranas de ultrafiltração/ centrifugação tem sido correntemente descrito na literatura, uma vez que permite a obtenção de um filtrado límpido, sem a presença de interferentes (MARTINI, 2005).

A quantificação da genisteína total nas nanoemulsões (TCM_{GEN} e ODD_{GEN}) e no ultrafiltrado foi realizada por CLAE utilizando-se detecção em 327 e 270 nm, respectivamente, como discutido na primeira etapa deste trabalho. Os resultados obtidos para a taxa de associação da genisteína em função do tempo estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10. Taxa de associação da genisteína com as nanoemulsões em função do tempo de armazenamento.

Tempo (dias)	Taxa de associação (%)	
	TCM _{GEN}	ODD _{GEN}
0	99,50 ± 0,56	97,01 ± 0,29
30	97,66 ± 1,97	93,94 ± 1,57
60	96,03 ± 0,18	94,12 ± 1,10
120	95,16 ± 1,37	92,81 ± 1,43

TCM_{GEN}: nanoemulsão contendo triglicerídeos de cadeia média, lecitina e genisteína; ODD_{GEN}: nanoemulsão contendo octildodecanol, lecitina e genisteína

A genisteína é uma isoflavona que apresenta reduzida hidrossolubilidade devido a sua estrutura polifenólica, podendo ser considerada como praticamente insolúvel ou insolúvel em água, segundo a Farmacopéia Brasileira (F. Bras. IV, 1998). Como pode ser observado na tabela 10, existe pouca diferença entre a taxa de associação da genisteína nas nanoemulsões TCM_{GEN} e ODD_{GEN}, estando estas compreendidas entre 97 e 99 %. A associação de compostos polifenólicos, como as isoflavonas e flavonóides, com sistemas coloidais tem sido descrito por outros autores (SCHMID *et al.*, 2003; WEBBER, 2003). Além disso, observa-se que a taxa de associação da genisteína permanece superior a 95 e 92 % para as formulações TCM_{GEN} e ODD_{GEN}, respectivamente, mesmo após 120 dias de armazenamento, o que sugere adequada estabilidade do sistema formado.

Os resultados obtidos na tabela 10 indicam que a natureza do núcleo oleoso não exerce uma influência significativa na associação da genisteína com as nanoemulsões desenvolvidas. Visando obter informações a respeito da localização da GEN associada com as nanoemulsões, estudos de solubilidade em excesso da GEN nos dois núcleos oleosos utilizados na composição das nanoemulsões foram realizados. Os resultados estão apresentados na tabela 10.

Tabela 11. Solubilidade da genisteína em TCM e ODD.

	Núcleo oleoso	
	TCM	ODD
[GEN] ± s (µg/ml)	235,3 ± 2,2	137,9 ± 2,5
CV %	0,9	1,8

A tabela 11 indica que a solubilidade da GEN é cerca de 40 % menor no ODD que no TCM. Esse resultado pode estar relacionado com as propriedades físico-químicas dos óleos empregados. As estruturas químicas do TCM e ODD estão apresentadas na figura 5. O TCM é uma mistura de triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico (6 a 12 átomos de carbono) obtidos após esterificação com os ácidos graxos do óleo de coco com o glicerol. Por sua vez, o ODD é um álcool graxo sintético. Uma comparação interessante entre a solubilidade da genisteína e as propriedades físico-químicas dos óleos empregados está na sua correlação com o EHL dos óleos utilizados. O TCM e o ODD apresentam valores de EHL de cerca de 5 e 9, respectivamente (RIEGER, 2000; MELZER, 2000). Assim, pode-se sugerir que a genisteína é mais solúvel em óleos que apresentam menores valores de EHL, ou seja, em núcleos mais lipofílicos.

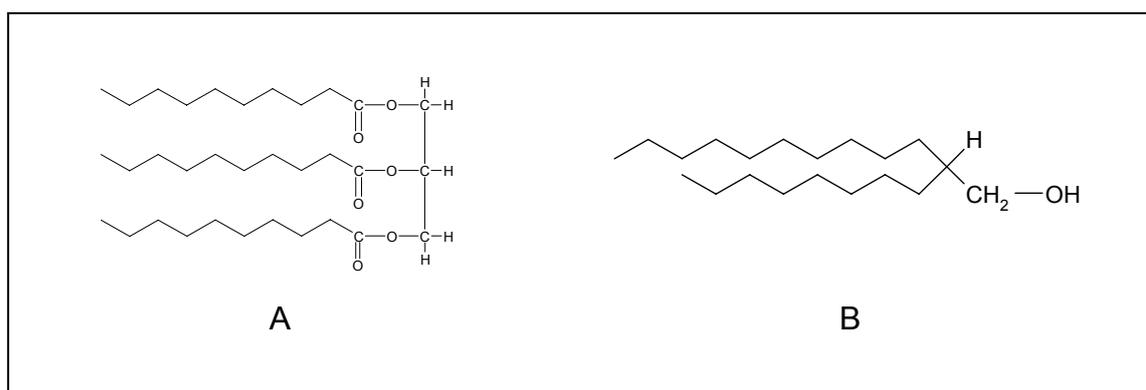


Figura 5. Estrutura química dos TCM (A) e ODD (B).

O conjunto dos resultados obtidos até o momento demonstra a viabilidade de incorporação da genisteína às nanoemulsões na concentração final de 1 mg/mL. Contudo, o estudo de solubilidade (tabela 10) indica claramente que a concentração de genisteína utilizada é superior ao seu limite de solubilidade no núcleo oleoso. Considerando-se as elevadas taxas de associação observadas (tabela 9), evidencia-se o efeito tensoativo da lecitina de gema de ovo na incorporação da genisteína à nanoestrutura. Assim, pode-se sugerir que a genisteína encontra-se distribuída tanto no núcleo oleoso como na interface O/A das nanoemulsões, através de diferentes interações com os componentes das formulações.

A avaliação de interações entre fármacos e adjuvantes pode ser realizada através de métodos térmicos. Dentre eles, a DSC permite verificar, rapidamente, a ocorrência de fenômenos físicos e/ou químicos (WELLS, 2002). Visando estudar possíveis interações da genisteína com os componentes das formulações, foram realizadas análises de DSC. Nas próximas figuras estão representados os termogramas da genisteína pura, do TCM puro e da mistura genisteína /TCM (figura 6) e da genisteína pura, do ODD puro e da mistura genisteína /ODD (figura 7).

A amostra de genisteína pura apresentou um pico endotérmico em 302 °C, que pode ser atribuído ao seu ponto de fusão. O TCM apresentou três picos endotérmicos em -11,73 °C, 218 °C em 258,47 °C e um pico exotérmico a 191,84°C. A adição de genisteína ao TCM levou a uma redução e alargamento do pico exotérmico em 125°C. Em relação aos picos endotérmicos, observa-se um intervalo de temperatura ocorrendo transições (190 °C a 225 °C). Nesta faixa observa-se o aparecimento de dois picos em 199 °C e 217 °C e o alargamento do pico endotérmico em 256 °C. O pico endotérmico referente à fusão da genisteína mostrou uma menor entalpia e um alargamento. Os resultados observados sugerem que a genisteína interage com o componente do núcleo oleoso das nanoemulsões (TCM). Todos os valores estão relacionados ao t_{onset} .

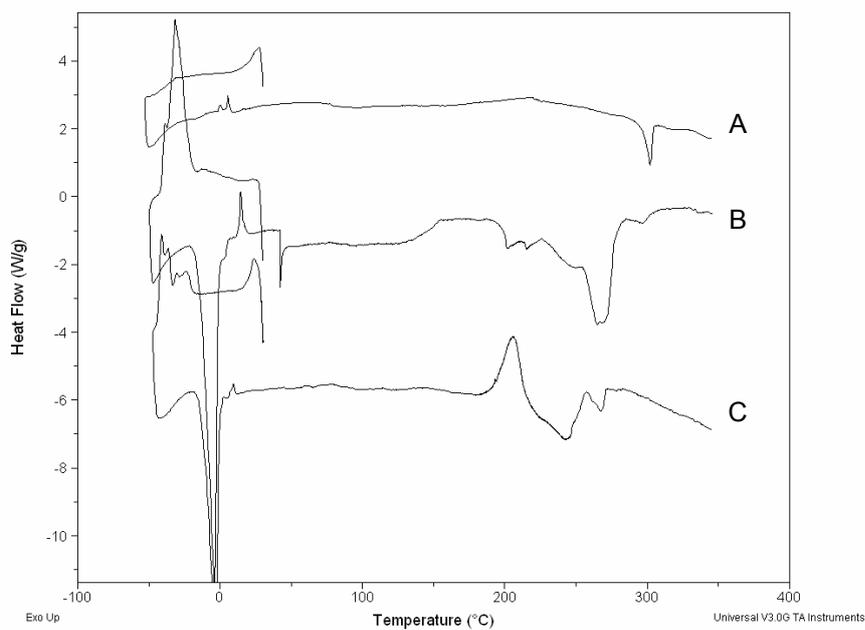


Figura 6. Termogramas da análise da genisteína (A), mistura TCM e genisteína (B) e TCM isolado (C).

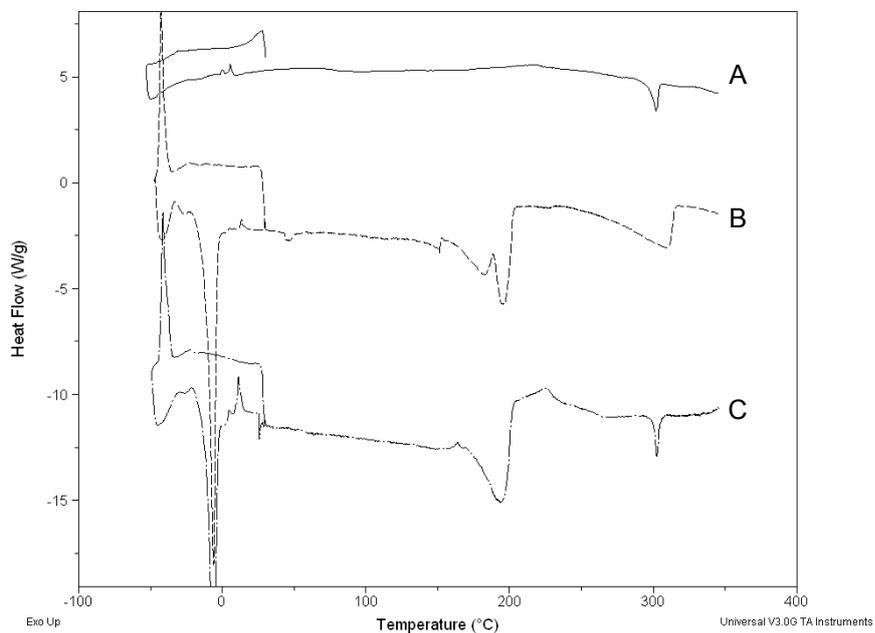


Figura 7. Termogramas da análise da genisteína (A), ODD isolado (B) e mistura ODD e genisteína (C).

A amostra de ODD apresentou quatro picos endotérmicos em $-6,01\text{ }^{\circ}\text{C}$, $147\text{ }^{\circ}\text{C}$, $169\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $190\text{ }^{\circ}\text{C}$. O pico em $-6,01\text{ }^{\circ}\text{C}$ pode ser atribuído à transição vítrea do ODD (MELZER, 2000). A adição de genisteína à amostra de ODD resultou no desaparecimento do pico endotérmico em $147\text{ }^{\circ}\text{C}$. Houve também o desaparecimento do pico a $169\text{ }^{\circ}\text{C}$, originando uma transição sob a forma de banda larga compreendida no intervalo de $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ em $200\text{ }^{\circ}\text{C}$. No entanto, o pico endotérmico referente à fusão da genisteína manteve-se constante. Estes resultados sugerem a presença de genisteína sob a forma solubilizada ou não na mistura genisteína e ODD. Desta forma, a fração genisteína solúvel parece interagir com o ODD modificando a temperatura das transições de fase.

A figura 8 apresenta os termogramas relativos à genisteína, lecitina e a mistura binária genisteína e lecitina.

genisteína

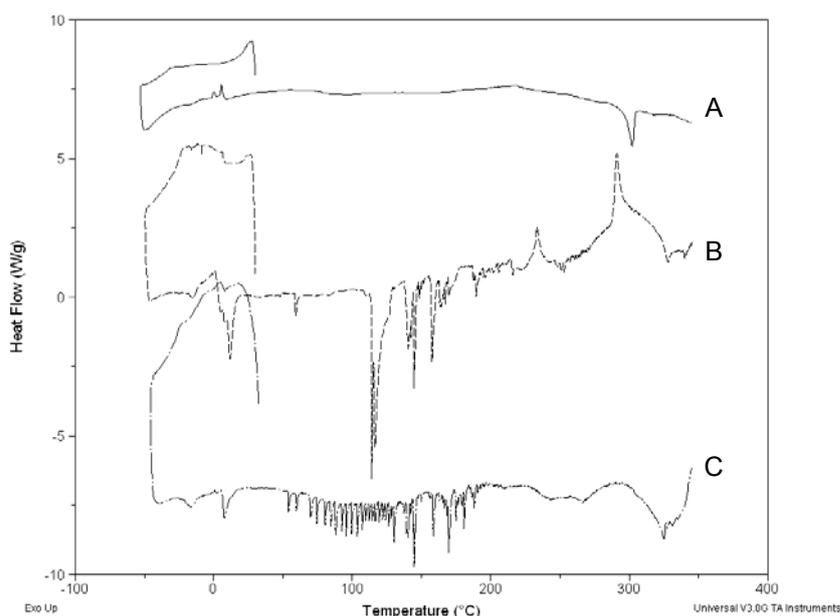


Figura 8. Termogramas da análise da genisteína (A), lecitina isolada (B) e mistura lecitina e genisteína.

Em uma última etapa foram analisadas as amostras de genisteína, lecitina e a mistura destes dois componentes na proporção das formulações desenvolvidas. A lecitina apresentou três picos endotérmicos em $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, $9,04$

°C e 56 °C. No intervalo de temperatura compreendido entre 100 e 220 °C ocorre uma série de eventos endotérmicos. Há também o aparecimento de duas transições exotérmicas em 232,22 °C e 287,53 °C e duas outras endotérmicas em 328 °C e 337 °C. Para a mistura genisteína-lecitina foi obtido um termograma cujo perfil das transições térmicas é diferente daqueles observados para as substâncias puras. Há o abaixamento da temperatura dos picos das duas primeiras transições térmicas para -17 °C e 6 °C, o aparecimento de uma série de transições endotérmicas no intervalo de temperatura compreendida entre 50 e 100 °C e o desaparecimento dos dois picos exotérmicos observados para a lecitina pura. Além disso, não é observada a transição térmica da genisteína em 302 °C. Portanto, estes resultados sugerem a existência de interação entre a genisteína e a lecitina. Evidências de interação de fosfolípidos com diferentes compostos polifenólicos, como a isoflavona daidzeína e os flavonóides quercetina, hesperidina e naringenina, levando à modificação da sua temperatura de transição de fase, têm sido descritas na literatura (SAIJA *et al.*, 1995; LEHTONEN *et al.*, 1996).

Permeação cutânea da genisteína *in vitro*

A literatura tem evidenciado as potencialidades da administração cutânea de isoflavonas como a genisteína através de diversos estudos relativos as suas atividades biológicas, i.e. antioxidante, estrogênica e inibidora de tirosina quinase. Em uma primeira etapa, foi avaliada a permeabilidade intrínseca da genisteína, que consistiu em avaliar a capacidade da molécula em permear a pele a partir de um depósito volátil. A capacidade de permeação intrínseca da genisteína foi determinada a partir de seu depósito volátil na pele de orelha de porco, sendo determinada a quantidade permeada em função do tempo (Figura 9).

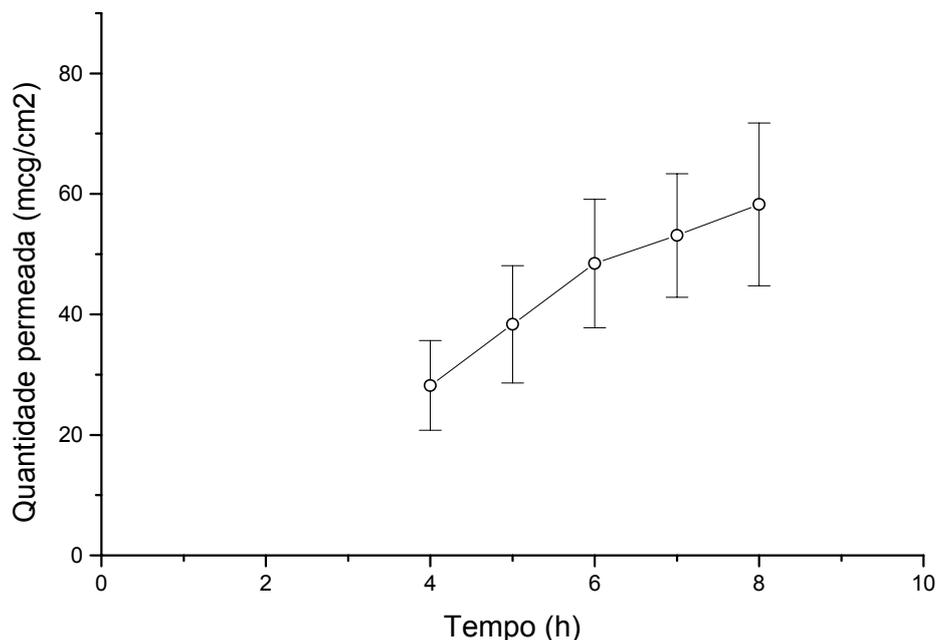


Figura 9. Cinética de permeação intrínseca da genisteína.

Como pode ser observado na figura 9, ao término de 8 horas, o total de genisteína permeada foi de cerca de 58,25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. PLESSIS e colaboradores (2001) descrevem que os mecanismos de permeação através da pele resultam de uma série de interações das moléculas permeantes com grupamentos funcionais dos lipídeos cutâneos presentes nos espaços intercelulares. Os autores sugerem que os fenômenos de difusão através da pele são determinados pelas suas propriedades dipolares e pela presença de hidrogênios ligantes. As mais freqüentes interações podem ser entre um hidrogênio do permeante e os grupamentos $-\text{COOH}$ dos ácidos graxos e $-\text{OH}$ dos grupos amida das ceramidas, existindo uma relação inversa entre o número de grupos H ligantes (grupos substituintes polares) e o coeficiente de difusão (PLESSIS *et al.*, 2002). A genisteína apresenta três grupamentos hidroxilas livres, podendo-se sugerir que estes grupamentos podem interagir com as estruturas dos constituintes das camadas cutâneas, influenciando assim a sua permeação.

A capacidade de uma molécula em permear através da pele e exercer um determinado efeito biológico depende tanto das suas propriedades físico-químicas como daquelas relacionadas ao veículo utilizado para a sua administração. Assim, a permeação da genisteína foi realizada a partir dos óleos que constituem os núcleos oleosos das formulações (TCM e ODD), bem como a partir das nanoemulsões TCM_{GEN} e ODD_{GEN} desenvolvidas na segunda etapa deste trabalho. Cabe ressaltar que devido à reduzida solubilidade da genisteína nos núcleos oleosos utilizados (tabela 11), a genisteína encontra-se acima do seu limite de solubilidade nos óleos ODD e TCM. As figuras 10 e 11 descrevem as cinéticas de permeação e a tabela 12 os fluxos e tempos de latência da genisteína a partir das diferentes preparações.

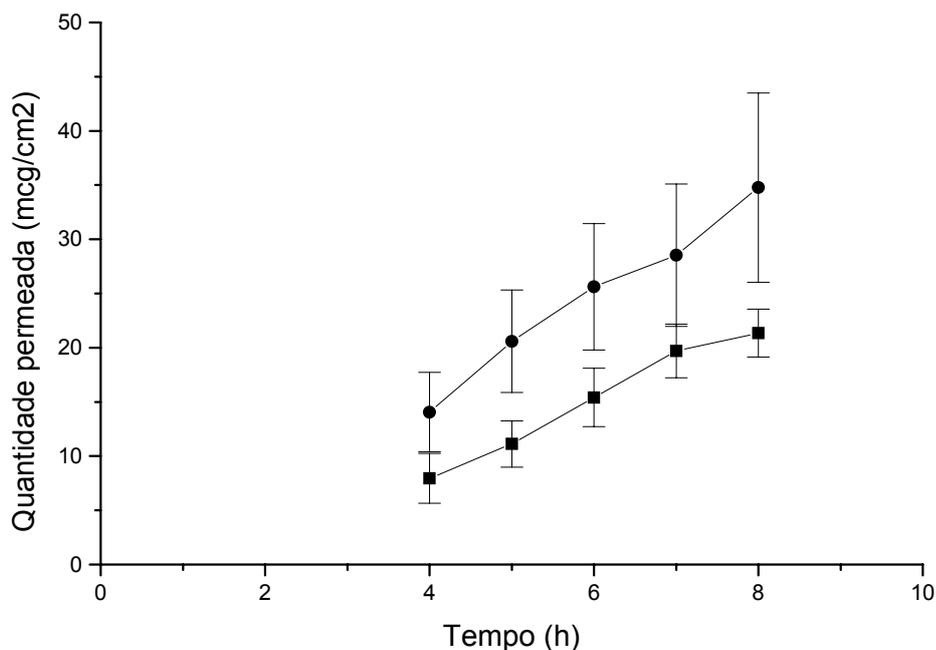


Figura 10. Cinética de permeação da genisteína a partir dos núcleos oleosos TCM (■) e ODD (●)

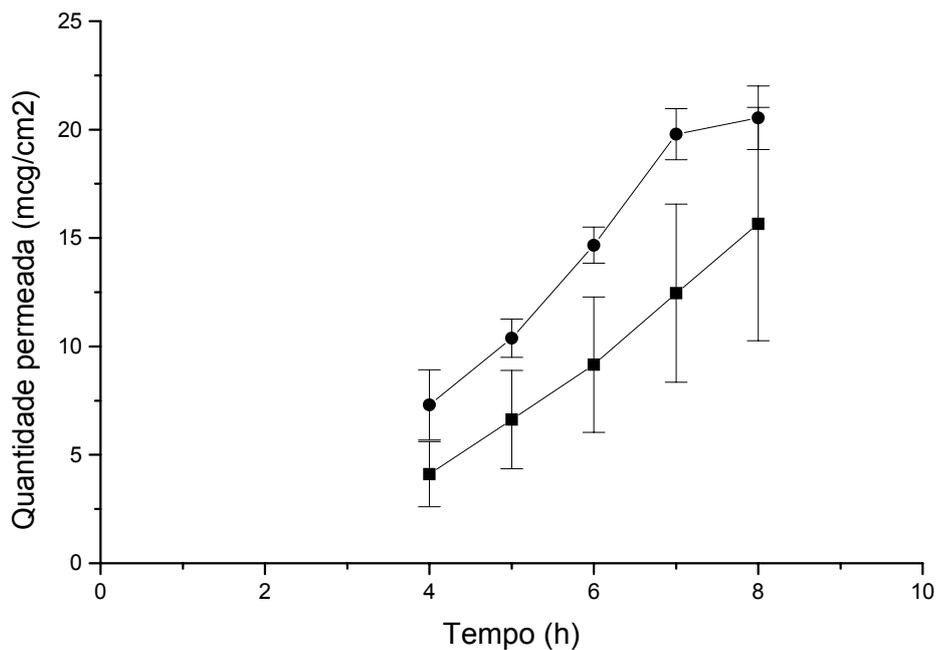


Figura 11. Cinética de permeação da genisteína a partir das nanoemulsões TCM_{GEN} (■) e ODD_{GEN} (●)

As figuras 10 e 11 demonstram a permeação percutânea da genisteína a partir da sua suspensão nos óleos ODD e TCM, bem como das nanoemulsões ODD_{GEN} e TCM_{GEN}. Uma primeira comparação dos valores médios obtidos indica que o total de genisteína permeada a partir dos óleos ODD e TCM (34,76 e 21,36 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente) e nanoemulsões ODD_{GEN} e TCM_{GEN} (20,55 e 15,64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente) é significativamente inferior em relação ao valor verificado para o fluxo intrínseco (58,25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Essas observações sugerem que existe uma maior afinidade da genisteína pelos veículos empregados reduzindo a sua permeação cutânea. Esse resultado torna-se interessante uma vez que tal fenômeno pode conduzir a um maior tempo de retenção da genisteína nas primeiras camadas da pele modulando a sua absorção e favorecendo, por conseqüência, a sua utilização tópica.

A influência da natureza do núcleo oleoso utilizado sobre a permeação da genisteína também pode ser verificada. Observa-se uma maior permeação da genisteína a partir do ODD (ODD e ODD_{GEN}) quando comparada aos

resultados obtidos com o TCM (TCM e TCM_{GEN}). Esses resultados podem estar relacionados com uma maior afinidade da genisteína pelo TCM do que ao ODD, conduzindo a uma maior permeação da genisteína a partir do ODD. De fato, contrariamente aos resultados obtidos para o ODD, foi demonstrada a maior solubilidade da genisteína em TCM e o desaparecimento completo do pico atribuído à fusão da genisteína nesta mistura por DSC, indicando a sua interação com esse componente. Assim, uma reduzida afinidade em relação ao ODD poderia deslocar o coeficiente de partição óleo/pele, em favor do processo de permeação. Contudo, não pode ser descartada a hipótese de que o efeito observado, de maior permeação da genisteína a partir do ODD, seja devido a sua maior eficiência como promotor de absorção que os TCM.

Um outro aspecto relevante a ser considerado nas cinéticas de permeação está relacionado com a influência da lecitina de gema de ovo sobre os parâmetros estudados. Independentemente do óleo empregado (TCM ou ODD), observa-se uma redução significativa da permeação da genisteína veiculada nas nanoemulsões. Esses resultados podem ser observados na tabela 12, através dos valores de fluxo.

Tabela 12. Comparação dos parâmetros fluxo e tempo de latência da GEN a partir das diferentes preparações estudadas.

	Parâmetro	
	Fluxo \pm s ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	Tempo latência \pm s (h)
Intrínseco	7,48 \pm 1,64	- 0,10 \pm 0,94
TCM	3,54 \pm 0,19	1,73 \pm 0,64
ODD	4,94 \pm 1,25	1,42 \pm 0,84
TCM _{GEN}	2,89 \pm 0,88	2,66 \pm 0,24
ODD _{GEN}	3,59 \pm 0,50	1,90 \pm 0,52

De fato, a tabela 12 demonstra que a presença da lecitina nas formulações (TCM_{GEN} e ODD_{GEN}) tende a reduzir o fluxo e aumentar o tempo de latência da GEN. Esses resultados podem ser atribuídos à interação da

genisteína com a lecitina como sugerido pelos dados da DSC. Resultado similar foi relatado por SAIJA e colaboradores (1998) que demonstraram a redução da permeação da quercetina quando em presença de lecitina. Por outro lado, observa-se que o tempo de latência entre os óleos ou nanoemulsões não varia de maneira significativa ($p < 0,05$), podendo sugerir que, no mesmo tipo de dispersão, a permeação é controlada pela afinidade da genisteína ao veículo estudado.

Levando em consideração o fato de que após aplicação tópica a atividade biológica esperada para a genisteína deve ocorrer nas diferentes camadas da pele, a última etapa deste trabalho, consistiu na determinação da quantidade total de GEN na pele, após 8 horas de permeação. Os resultados obtidos na quantificação da genisteína acumulada na pele após a realização de cada cinética (óleos e nanoemulsões) estão apresentados na figura 12.

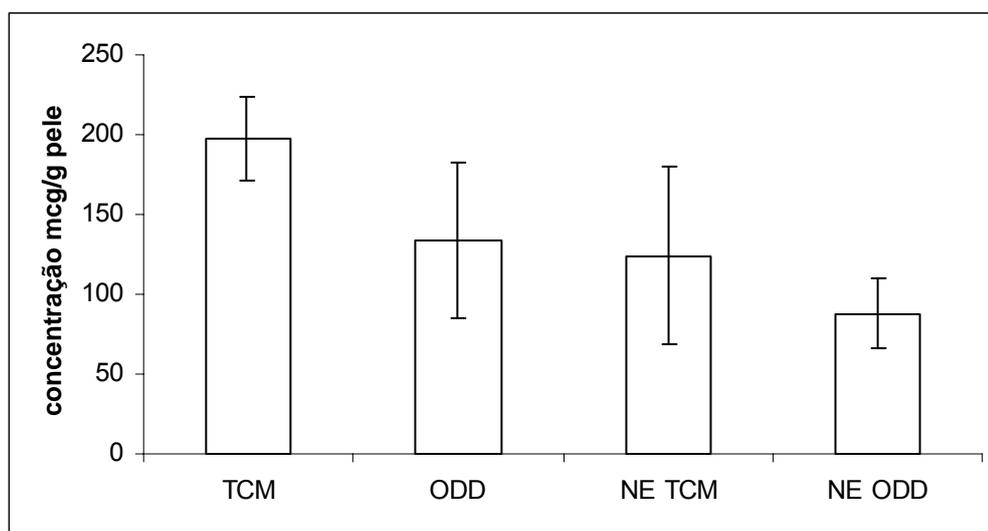


Figura 12. Quantidade total de genisteína acumulada na pele a partir de depósito dos óleos (TCM e ODD) e das nanoemulsões (TCM_{GEN} e ODD_{GEN}).

A figura 12 demonstra a influência dos componentes da formulação sobre a retenção da genisteína. Como pode ser observado, a retenção da genisteína na pele é superior a partir dos núcleos oleosos quando comparado as nanoemulsões, refletindo os resultados obtidos na cinética de permeação. Uma maior retenção da genisteína foi detectada quando esta foi veiculada nas

formulações contendo TCM, enquanto que a genisteína veiculada em ODD apresentou uma menor retenção na pele. Além disso, a nanoemulsão TCM_{GEN} apresentou um fluxo de permeação menor, podendo assim sugerir que a genisteína nesta formulação pode ter uma liberação mais lenta, fazendo com que a sua atividade seja prolongada. Desta forma, as nanoemulsões podem representar um reservatório para a liberação progressiva da genisteína na pele.

CONCLUSÕES

- A validação da metodologia de quantificação da genisteína por CLAE em 270 nm mostrou-se linear, precisa e específica na faixa de concentração estudada.
- A validação da metodologia de quantificação da genisteína por CLAE em 327 nm mostrou-se linear, precisa, exata e específica para a determinação do teor de genisteína nas nanoemulsões.
- O procedimento de emulsificação espontânea mostrou-se adequado à obtenção de nanoemulsões monodispersas com diâmetro de gotícula inferior a 300 nm.
- As propriedades físico-químicas das nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea foram influenciadas pelo tipo de núcleo oleoso (TCM ou ODD) utilizado.
- Independente do núcleo oleoso utilizado, a associação da genisteína as nanoemulsões é próxima a 100 %, sendo que esta parece estar distribuída tanto no núcleo como na interface da nanoestrutura.
- Os estudos *in vitro* referentes à permeação da genisteína demonstraram que os parâmetros avaliados, fluxo e tempo de latência, foram influenciados pelos componentes utilizados na preparação das nanoemulsões.
- Os baixos valores de fluxo percutâneo, bem como o fenômeno de acúmulo na estrutura cutânea apontam para uma possível utilização das formulações estudadas tendo em vista a sua aplicação cutânea.
- O conjunto dos resultados obtidos demonstra a influência dos componentes empregados na formulação das nanoemulsões sobre as interações com a GEN, sobre as propriedades físico-químicas das nanoestruturas obtidas, bem como no perfil de permeação cutânea da genisteína *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ARORA, A.; BYREM, T.M.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. **Archive of Biochemistry and Biophysics**, v. 373, p. 102-109, 2000.

ARJMANDI, B.H.; GETLINGER, M.J.; GOYAL, N.V.; ALEKEL, L.; HASLER, C.M.; JUMA, S.; DRUM, M.L.; HOLLIS, B.W.; KUKREJA, S.C. Role of soy protein with normal or reduced isoflavone content in reversing bone loss induced by ovarian hormone deficiency in rats. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 1358S-1363S, 1998.

AUNER, B.G.; WIRTH, M.; VALENTA, C. Antioxidante activity and cytotoxicity of four different flavonoids for dermal applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 15, p. 227-232, 2005.

BARNES, S. Effect of genistein on *in vitro* and *in vivo* models of cancer. **Journal of Nutrition**, 125(Suppl.), p. S777-783, 1995.

BARRY, B.W. Mode as action of penetration enhances in human skin. **Journal of Controlled Release**, v.6, p.85-97, 1987.

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

BENITA, S. **Submicron Emulsion in Drug Targeting and Delivery**. Harwood Academic, Cap. 6, p.153-1731998.

BENITA, S. Prevention of topical and ocular oxidative stress by positively charged submicron emulsion. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 53, p.193-206, 1999.

BOKOV, A.; CHAUDHURI, A.; RICHARDSON, A. The role of oxidative damage and stress in aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, p. 811-826, 2004.

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

BONINA, F.; LANZA, M.; MONTENEGRO, L. *et al.* Flavonoids as potencial protective agents against photo-oxidante skin damage. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v.145, p.87-94, 1996.

BOOS, G. and STOPPER, G. Genotoxicity of several clinically used topoisomerase II inhibitors. **Toxicology Letters**, v. 116, p. 7-16, 2000.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241-251, 2004.

BRAIN, K.R.; WALTERS, K.A.; GREEN, D.M.; BRAIN, S.; LORETZ, L.J.; SHARMA, R.K.; DRESSLER, W.E. Percutaneous penetration of diethanolamine through human skin in vitro: application from cosmetic vehicles. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 681-690, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, 02/06/2003.

BREINHOLT, V.; HOSSAINI, A.; SVENDSEN, G.W.; BROUWER, C.; NIELSEN, E. Estrogenic activity of flavonoids in mice. The importance of estrogenic receptor distribution, metabolism and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 555-564, 2000.

BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD, V.; DOUCET, J.; TRANCHANT, J-F.; COUARRAZE, G. Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases. **Journal of Controlled Release**, v. 60, p. 67-76, 1999.

BRONAUGH, R.L. **Methods for *in-vitro* percutaneous absorption**. In: MARZULLI F.N.; MAIBACH, H.I. (eds). *Dermatotoxicology*. 5.ed. Washington: Taylor and Francis, 1996. p. 317-324.

CHANSIRI, G.; LYONS, R.T.; PATEL, M. V.; HEM, S.L. Effect of surface charge on the stability of oil/water emulsions during steam sterilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, p. 454-458, 1999.

CHAIX, C.; PACARD, E.; ELAÏSSARI, A.; HILAIRE, J.F.; PICHROY, C. Surface functionalization of oil-in-water nanoemulsion with a reactive copolymer: colloidal characterization and peptide immobilization. **Colloid and Surfaces**, v. 29, p. 39-52, 2003.

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

CHIECHI, L.M.; PUTIGNANO, G.; GUERRA, V.; SCHIAVELLI, M.P.; CISTERNINO, A.M.; CARRIERO, C. The effect of soy rich diet on the vaginal epithelium in postmenopause: a randomized double blind trial. **The European Menopause Journal**, v. 45, n.4, p. 241-246, 2003.

CHUNG, H.; KIM, T. W.; KWON, M.; KWON, I. C.; JEONG, S.Y. Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsion as drug or gene delivery system. **Journal of Controlled Release**, v. 71; p. 339-350; 2001.

CRISAFULLI, A., MARINI, H., BITTO, A., ALTAVILLA, D., SQUADRITO, G., ROMEO, A., ADAMO, E.B., MARINI, R., D'ANNA, R., CORRADO, F., BARTOLONE, S.; FRISINA, N., SQUADRITO, F. Effects of genistein on hot flushes in early postmenopausal women: a randomized, double-blind EPT- and placebo-controlled study. **The Journal of the North American Menopause Society**, v. 11, n.4, p. 400-404, 2004.

DAMASCENO, N.R.T., GOTO, H., RODRIGUES, F.M.D., DIAS, C.T.S., OKAWABATA, F.S., ABDALLA, D.S.P., GIDLUND, M. Soy protein isolate reduces the oxidizability of LDL and the generation of oxidized LDL autoantibodies in rabbits with diet-induced atherosclerosis. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2641-2647, 2000.

DAVIS, S.R.; MURKIES, A.L.; WILCOX, G. Phytoestrogens in clinical practice. **Integrative Medicine**, v. 1, p. 27-34, 1998.

De ROSA, F.S.; MARCHETTI, J.M.; THOMAZINI, J.A.; TEDESCO, A.C.; LOPES, M.V.; BENTLEY, B. A vehicle for photodynamic therapy of skin cancer: influence of dimethylsulphoxide on 5-aminolevulinic acid in vitro cutaneous permeation and in vivo protoporphyrin IX accumulation determined by confocal microscopy. **Journal of Controlled Release**, v. 65, p. 359-366, 2000.

DÍEZ-SALES, O.; WATKINSON, A.C.; HERRÁEZ-DOMÍNGUEZ, M.; JAVALOYES, C.; HADGRAFT, J. A mechanistic investigation of the in vitro human skin permeation enhancing effects of Azone[®]. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 129, p. 33-40, 1996.

DIXON, R.A. and FERREIRA, D. Genistein. **Phytochemistry**, v. 60, p. 205-211, 2002.

DUFFY, R.; WISEMAN, H.; FILE, S.E. Improved cognitive function in postmenopausal woman after 12 weeks of consumption of a soya extract containing isoflavones. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 721-729, 2003.

DUNCAN, J.I.; PAYNE, S.N.L.; WINFIELD, A.J.; ORMEROD, A.D.; THOMSON, A.W. Enhanced percutaneous absorption of a novel topical cyclosporin A formulation and assessment of its immunosuppressive activity. **British Journal of Dermatology**, v.123, p. 631-640, 1990.

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

FARMACOPÉIA brasileira, 4^a ed. Andrei: São Paulo, 1988.

FISHER, G.J.; TALWAR, H.S.; LIN, J.; LIN, P.; McPHILLIPS, F.; WANG, Z.Q.; LI, X.; WAN, Y.; KANG, S.; VOORHESS, J.J. Retinoic acid induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathway in human skin in vivo. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, p. 1432-1440, 1998.

FISHER, G.J.; DATTA, S.; WANG, Z.Q.; LI, X-Y.; QUAN, T.; CHUNG, J.H.; KANG, S.; VOORHEES, J.J. c-Jun-dependent inhibition of cutaneous procollagen transcription following ultraviolet irradiation is reversed by all-trans retinoic acid. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, p. 663-670, 2000.

FISHER, G.J.; KANG, S.; VARANI, J.; BATA-CSORGO, Z.; WAN, Y.; DATTA, S.; VOORHEES, J.J. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. **Archives of Dermatology**, v. 138, p. 1462-1470, 2002.

FITZPATRICK, L.A. Soy isoflavones: hope or hype? **Maturitas**, v. 44, p. 21-29, 2003.

FRIEDMAN, D.I.; SCHWARZ, J.S.; WEISSPAPIR, M. Submicron emulsion vehicle for enhanced transdermal delivery of steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.84, p.324-329, 1995.

FRITZ, K.L.; SEPPANEN, C.M.; KURZER, M.S.; CSALLANY, A. S. The in vivo antioxidant activity of soybean isoflavones in human subjects. **Nutrition Research**, v. 23, p. 479-487, 2003.

FUKUTAKE, M.; TAKAHASHI, M.; ISHIDA, K.; KAWAMURA, H.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Quantification of genistein and genistin in soybean and soybeans products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, p. 457-461, 1996.

GRASSI, M.; COCEANI, N.; MAGAROTTO, L. Modelling partitioning of sparingly soluble drugs in a two-phase liquid system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 239, p. 157-169, 2002.

GUO, Q.; RIMBACH, G.; MOINI, H.; WEBER, S.; PACKER, L. ESR and cell culture studies on free radical-scavenging and antioxidant activities of isoflavonoids. **Toxicology**, v.179, p. 171-180, 2002.

GUY, R.H. and HADGRAFT, J. Selection of drug candidates for transdermal drug delivery. In: **Transdermal Drugs Delivery. Development issues and research initiatives**. Marcel Dekker, 1989, p. 59-81.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International journal of Pharmaceutics**, v. 224, p. 1-18; 2001.

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

HADGRAFT, J. and LANE, M.E. Skin permeation: the years of enlightenment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 305, p. 2-12, 2005.

HASKELL, R.J. Characterization of submicron systems via optical Methods. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 2, p. 125-129, 1998.

HO, H.M.; CHEN, R.Y.; LEUNG, L.K.; CHAN, F.L.; HUANG, Y.; CHEN, Z.Y. Difference in flavonoid and isoflavone profile between soybean and soy leaf. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 56, p. 289-295, 2002.

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

HUTABARAT, L.S.; MULHOLLAND, M.; GREENFIELD, H. Development and validation of an isocratic high-performance liquid chromatographic method for quantitative determination of phytoestrogens in soy bean. **Journal of Chromatography A**, v. 795; p. 377-382; 1998.

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

INTERNATIONAL Conference on Harmonization (ICH) **Validation of analytical procedures: definitions and terminology**. Rockville: FDA, 1996.

JUMMA, M.; MULLER, B.W. Physicochemical properties of chitosan-lipid emulsions and their stability of parenteral fat emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 163, p. 81-89, 1998.

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

KLEJDUS, B.; MIKELOVÁ, R.; PETRLOVÁ, J.; POTĚŠIL, D.; ADAM, V.; STIBOROVÁ, M.; HODEK, P.; VACEK, J.; KIZEK, R.; KUBÁŇ, V. Determination of isoflavonas in soy bits by fast column high-performance liquid chromatography coupled with UV-visible diode-array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1084, p. 71-79, 2005.

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

KSYCIŃSKA, H.; SOBIK, B.; POPIOLKIEWICZ, J.; POLKOWSKI, K.; KRZECZYŃSKI, P.; RAMZA, J.; PUCKO, W.; GRYNKIEWICZ. Determination of new derivatives of genistein in culture media by liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 799, p. 217-231, 2004.

KULLING, S.E.; LEHMANN, L.; METZLER, M. Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens. **Journal of Chromatography B**, v. 777, p. 211-218, 2002.

LEE, C.H.; YANG, L.; XU, J.Z.; YEUNG, S.Y.V.; HUANG, Y.; CHEN, Z-Y. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides. **Food Chemistry**, v. 90, p. 735-741, 2005.

LEHTONEN, J.Y.A.; ADLERCREUTZ, H.; KINNUNEN, P.K.J. Binding of daidzein to liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1285, p. 91-100, 1996.

LI, L.C. and TIAN, Y. Zeta potencial. In: James, S.; JAMES, C.B. (Ed.). **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2002.

LIGGINS, J.; BLUCK, J.C.; RUNSWICK, S.; ATKINSON, C.; ANDY COWARD, W.; BINGHAM, A. Daidzein and genistein content of fruits and nuts. **Journal of Nutritional Biochemistry**; v.11, p.326-331, 2000.

LIPPACHER, A.; MÜLLER, R. H.; MÄDER, K. Semisolid SLN dispersions for topical application: influence of formulation and parameters on viscoelastic properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 53, p. 155-160, 2002.

LIU, P.; NIGHTINGALE, J.A.S.; BERGSTROM, T.K. Variation of human skin permeation *in vitro*: ionic vs neutral compounds. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 90, p. 171-176, 1993.

LUCAS, E.A., KHALIL, D.A., DAGGY, B.P., ARJMANDI, B.H. Ethanol-extracted soy protein isolate does not modulate serum cholesterol in golden Syrian hamsters: a model of postmenopausal hypercholesterolemia. **Journal of Nutrition**, v.131, p.211-214, 2001.

MARTINI, E. Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: formulação e caracterização físico-química. **Dissertação de Mestrado**. PPGCF, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2005.

McCLAIN, R.M.; WOLZ, E. DAVIDOVICH, A.; PFANNKUCH, F.; BAUSCH, J. Subchronic and chronic safety studies with genistein in dogs. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 1461-1482, 2005a.

McCLAIN, R.M.; WOLZ, E. DAVIDOVICH, A.; BAUSCH, J. Genetic toxicity with genistein. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 42-55, 2005b.

MELZER, E. Herstellung und physikochemische Charakterisierung von w/o – Emulsionen unter Verwendung von Ethylcellulose als nichtionischen Polymeremulgator. **Tese de Doutorado**. Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina. Braunschweig, 2000.

MILÃO, D. Desenvolvimento tecnológico e avaliação biológica de formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas de diclofenaco. **Dissertação de Mestrado**. PPGCF, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2000.

MIYAZAKI, K.; HANAMIZU, T.; IIZUKA, R.; CHIBA, K. Genistein and daidzein stimulate hyaluronic acid production in transformed human keratinocyte culture and hairless mouse skin. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v.15, p. 175-183, 2002.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Eeviews**, v. 54, p. 131-155, 2002.

PARK, K.; LEE, M-K.; HWANG, K-J.; KIM, C-K. Phospholipid-based microemulsions of flurbiprofeno by the spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 183, p. 145-154, 1999.

PATEL, R.P.; BOERSMA, B.J.; CRAWFORD, J.H.; HOGG, N.; KIRK,M.; KALYANARAMAN, B.; PARKS, D.A.; BARNES, S.; DARLEY-USMAR, V. Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging. **Free Radical and Medicine**; v. 31; p. 1570-1581; 2001.

PLESSIS, J.D.; PUGH, W.J.; JUDEFEIND, A.; HADGRAFT, J. The effect of hydrogen bonding on diffusion across model membranes: consideration of the number of H-bonding group. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 13, p. 135-141, 2001.

PLESSIS, J.D.; PUGH, W.J.; JUDEFEIND, A.; HADGRAFT, J. Physico-chemical determinants of dermal drug delivery: effects of the number and substitution pattern of polar groups. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 107-112, 2002.

PIEMI, M.P.Y.; KORNER, D.; BENITA, S.; MARTY, J-P. Positively and negatively charged submicron emulsion for enhanced topical delivery of antifungal drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 58, p.177-187, 1999.

PINNEL, S. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, p. 1-19; 2003.

RANICH, T., BHATHENA, S.J., VELASQUEZ, M.T. Protective effects of dietary phytoestrogens in chronic renal disease. **Journal of Renal Nutrition**, v. 11, p. 183-193, 2001.

RECORD, I.R.; DREOSTI, I.E.; MCINERNEY, J.K. The antioxidant activity of genistein in vitro. **Nutritional Biochemistry**, v. 6, p. 481-485, 1995.

RIEGER, M. **Harry's cosmetology**. 8.ed. New York: Chemical, 2000, 221 p.

RIM, S.; AUDUS, K.L.; BORCHARDT, R.T. Relationship of octanol/buffer and octanol/water partition coefficients to transcellular diffusion across brain microvessel endothelial cell monolayers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 32, p. 79-84, 1986.

ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, p. 85-94, 2003.

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

SAIJA, A.; BONINA, F.; TROMBETTA, D.; TOMAINO, A.; MONTENEGRO, L.; SMERIGLIO, P.; CASTELLI, F. Flavonoid-biomembrane interactions: a calorimetric study on dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 124, p. 1-8, 1995a.

SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, p. 481-486, 1995b.

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

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; De PASQUALE, A.; UCCELLA, N.; BARBUZZI, T.; PAOLINO, D.; BONINA, F. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 199, p. 39-47, 2000.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; PELLEGRINO, M.L.; TITA, B.; MESSINA, C.; BONINA, F.P.; ROCCO, C.; NICOLOSI, G.; CASTELLI, F. 'In vitro' antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 167-174, 2003.

SALLES, B.; SATTLER, U.; BOZZATO, C.; CALSOU, P. Repair of oxidative DNA damage in vitro: a tool for screening antioxidative compounds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 1009-1014, 1999.

SARTOR, L.; PEZZATO, E.; DELL'AICA, I.; CANIATO, R.; BIGGIN, S.; GARBISA, S. Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insight for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. **Biochemical Pharmacology**, v. 64; p. 229-237; 2002.

SATOR, P.G.; SCHIMIDT, J.B.; RABE, T.; ZOUBOULIS, C.C. Skin aging and sex hormones in women-clinical perspectives for intervention by hormone replacement therapy. **Experimental Dermatology**, v. 13, p. 36-40, 2004.

SCHIMID, D.; MUGGLI, R.; ZÜLLI, F. dermatological application of soy isoflavones to prevent skin ageing in postmenopausal women. **Cosmetic and Toiletries Manufacture Worldwide**. disponível em: <http://www.ctmw.com>; acessado em 17/12/2002.

SCHMID, D.; ZÜLLI, F.; NISSEN, H-P.; PRIEUR, H. Penetration and metabolism of isoflavones in human skin. **Cosmetics and Toiletries Magazine**, v.118, p. 71-76. 2003.

SCHULZ, M. B.; DANIELS, R. Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) as emulsifier for submicron emulsions: influence of molecular weight and substitution type on the droplet size after high-pressure homogenization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 49, p. 231-236, 2000.

SCHWARZ, J.S.; WEISSPAPIR, M.R.; FRIEDMAN, D.I. Enhanced transdermal delivery of diazepam by submicron emulsion (SME) cream. **Pharmaceutical Research**, v.12, p. 687-692, 1995.

SHIM, J.; KANG, H.S.; PARK, W-S.; HAN, S-H.; KIM, J.K.; CHANG, I-S. Transdermal delivery of minoxidil with block copolymer nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 97, p. 477-484, 2004.

SHUKLA, A.; JANICH, M.; JAHN, K.; NEUBERT, R. H-H. Microemulsions for dermal drug delivery studied by dynamic light scattering: effect of interparticle interactions in oil-in-water microemulsions. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 92, p. 730-738, 2003.

SHYONG, E.Q.; LU, Y.; LAZINSKY, A.; SALADI, R.N.; PHELPS, R.G.; AUSTIN, L.M.; LEHWOHL, M.; WEI, H. Effects of the isoflavone 4', 5, 7-trihydroxyisoflavone (genistein) on psoralen plus ultraviolet A radiation (PUVA)-induced photodamage. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 317-321, 2002.

SILVA, C.A. DA; MARTINI, E.; TAVARES, G.; SILVEIRA, T.; OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, H.F. Caracterização físico-química de nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, p. 17-21, 2006.

SILVANDER, M.; HELLSTROM, A.; WARNHEIM, T.; CLAESSION, P. Rheological properties of phospholipid-stabilized parenteral oil-in-water emulsions-effects of electrolyte concentration and presence of heparin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 252, p. 123-132, 2003.

SIMÃO, A.N.C.; SUZUKAWA, A.A.; CASADO, M.F.; OLIVEIRA, R.D.; GUARNIER, F.A.; CECCHINI, R. Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage induced by 2, 2'-azobis (amidinopropane). **Life Sciences**, v. 78, p. 1202-1210, 2005.

SINICO, C.; MANCONI, M.; PEPPI, M.; LAI, F.; VALENTI, D.; FADDA, A.M. Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: in vitro evaluation of drug permeation and vesicle-skin interaction. **Journal of Controlled Release**, v. 103, p. 123-136, 2005.

SLOAN, J.B.; KOCH, S.A.M.; SIVER, K.G.; FLOWERS, F.P. Use of solubility parameters of drug and vehicle to predict flux through skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.87, p. 244-252, 1986

SONNE, M.; SUM, T.; WANG, C.; MUKHERJEE, S.K. The soy isoflavone, genistein, protects human cortical neuronal cells from oxidative stress. **Neuro Toxicology**, v. 25, p. 885-891, 2004.

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J.-T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsion: a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**. Article in press, 2004.

SU, S-J.; YEH, T-M.; CHUANG, W-J.; HO, C-L.; CHANG, K-L.; CHENG, H-L.; LIU, H-S.; CHENG, H-L.; HSU, P-Y.; CHOW, N-H. The novel target for anti-angiogenesis of genistein on human cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 307-318, 2005.

SUPKO, J.G.; PHILLIPS, L.R. High-performance liquid chromatographic assay for genistein in biological fluids. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 222, p. 157-167, 1995.

SURBER, C.; WILHELM, K.P.; MAIBACH, H.I. *In vitro* and *in vivo* percutaneous absorption of structurally related phenol and steroid analogs. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutical**, v. 39, p. 244-248, 1993.

SZNITOWSKA, M.; JANICKI, S.; DABROWSKA, E.; ZUROWSKA-PRYCZKOWSKA, K. Submicron emulsions as drug carriers studies on destabilization potential of various drugs. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 12, p. 175-179, 2001.

TAPIERO, H.; NGUYEN BA, G.; TEW, K.D. Estrogens and environmental estrogens. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 56, p.36-44, 2002.

TEIXEIRA, H.; MARTINI, E.; SILVEIRA, A.M. da; DUBERNET, C. Preparação e caracterização de nanoemulsões contendo oligonucleotídeos *antisense* através da técnica de emulsificação espontânea. **Caderno de Farmácia**, v. 18, p. 89-93, 2002.

THE UNITED States pharmacopeia. 24. rev. ed., Rockville: United States Pharmacopeial convention, Easton: Mack, 2000.

TIAN, Y.; LI, L.C. Light-scattering method in particle size analysis of parenteral emulsions. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 3, p. 275-280, 1998.

TRIMAILLE, T.; CHAIX, C.; DELAIR, T.; PICHOT, C.; TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Interfacial deposition of functionalized copolymers onto nanoemulsions produced by the solvent displacement method. **Colloid and Polymer Science**, v. 279, p. 784-792, 2001.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 53, p. 203-208, 2001.

TUO, Q-H.; WANG, C.; YAN, F-X.; LIAO, D-F. MAPK pathway mediates the protective effects of onychin on oxidative stress-induced apoptosis in ECV304 endothelial cells. **Life Science**, v. 76, p. 487-497, 2004.

URANO, R.; SAKABE, K.; SEIKI, K.; OHKIDO, M. Female sex hormone stimulates cultured human keratinocyte proliferation and its RNA-as protein-synthetic activities. **Journal of Dermatological Science**, v. 9, p. 176-184, 1995.

VÄNTTINEN, K. and MORAVCOVA, J. Transdermal absorption of phytoestrogens. **Pharmazie**, v. 56, p. 711-717, 2001.

WASHINGTON, C. Stability of lipid emulsion for drug delivery. **Advanced Drug Delivery**, v. 20; p. 131-145; 1996.

WADE, A. and WELLER, P.J. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 2.ed. London: Pharmaceutical, 1994.

WEBBER, C. Avaliação do perfil de penetração cutâneo da quercetina. **Dissertação de Mestrado**. PPGCF, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2003.

WELLS, J. Pharmaceutical preformulation: the physicochemical properties of drug substances. In: AULTON, M.E. (Ed.) **Pharmaceutics, the science of dosage form design**. 2.ed. London: Churchill Livingstone, 2002. p. 144-138.

WEI, H.; BOWEN, R.; ZHANG, X.; LEBWOHL, M. Isoflavone genistein inhibits the initiation and promotion of two-stage skin carcinogenesis in mice. **Carcinogenesis**, v. 18, p. 1509-1514, 1998.

WEI, H.; ZHANG, X.; WANG, Y.; LEBWOHL, M. Inhibition of light-induced oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by isoflavone genistein. **Cancer Letters**, v. 185, p. 21-29, 2002.

WEHRLÉ, P.; MAGENHEIM, P.; BENITA, S. The influence of process parameters on the PLA nanoparticle size distribution evaluated by means of factorial design. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 41, p. 19-26, 1995.

WESTESEN, K.; WEHLER, T. Particle size determination of a submicron-sized emulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 78, p. 125-132, 1993.

WOO, J.H.; KIM, J.H.; MOOK-JUNG, I.; KIM, H.S. Lipid products of phosphoinositide 3-kinase abrogate genistein-induced fusion inhibition in myoblast. **European Journal of Pharmacology**, v. 529, p. 84-94, 2006.

YANG, S.C.; BENITA, S. Enhanced absorption and drug targeting by positively charged submicron emulsion. **Drug Development Research**, v. 50, p. 476-486, 2000.

YAROSHO, D.; KLEIN, J. The role of liposomal delivery in cutaneous DNA repair. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 18, p. 325-333, 1995.

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

YU, W.; TABOSA DO EGITO, E.S.; BARRAT, G.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J.P.; PUISIEUX, F. A novel approach to the preparation of injectable emulsion by spontaneous emulsification process. **International journal of pharmaceutics**, v. 89, p. 139-146, 1993.

ZEEVI, A.; KLANG, S.; ALARD, V.; BROSSARD, F.; BENITA, S. The design and characterization of a positively charged submicron emulsion containing a sunscreen agent. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 106, p. 57-68, 1994.

ZHANG, H-Y.; WANG, L-F.; SUN, Y-M. Why B-ring is the active center for genistein to scavenge peroxy radical: a DFT study. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 909-911, 2003.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. rev. e ampl.. Porto Alegre, Florianópolis: Editora da UFSC, 2003. p. 577-614.

ZÜLLI, F.; SCHMID, D.; MUGGI, R.; HANAY, C. Cosmetics containing isoflavone aglycones. United States Patent Application, 2002. Disponível em <http://www.appft.uspto.gov>, acesso em 01/08/2003.