

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

**Associação da isoflavona genisteína com β -ciclodextrina: avaliação da
penetração cutânea**

CLARISSA RUARO XAVIER

PORTO ALEGRE, 2006.

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

**Associação da isoflavona genisteína com β -ciclodextrina: avaliação da
penetração cutânea**

Dissertação apresentada por
Clarissa Ruaro Xavier para
obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas.

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 29 de agosto de 2006, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Eliana Lima

Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. George González Ortega

Universidade Federal Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pedro Ros Petrovick

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

X3a Xavier, Clarissa Ruaro

Associação da isoflavona genisteína com β -Ciclodextrina: avaliação da penetração cutânea / Clarissa Ruaro Xavier – Porto Alegre: UFRGS, 2006. – 149 p.: il., gráf., tab.

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

1. Isoflavonas. 2. Genisteína 3. β -ciclodextrina. 4. Antienvelhecimento. 5. Penetração cutânea. I. Bassani, Valquiria Linck. II. Mayorga Borges, Paulo Eduardo. III. Título.

CDU: 615.4

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira

Este trabalho foi subvencionado pela CAPES e desenvolvido no Laboratório 405 e no Laboratório de Desenvolvimento Galênico da Faculdade de Farmácia desta Universidade, com a colaboração do Prof. Dr. Rubem Sinisterra e da aluna Ivana Lula, do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

*“Todos esses que aí estão
atravancando meu caminho,
eles passarão...
eu passarinho!”*

Mário Quintana

Aos meus pais, meus alicerces.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Professora Valquíria Link Bassani e ao Professor Paulo Mayorga pela orientação e as sugestões na realização deste trabalho.

Ao professor Rubem Sinisterra e à aluna Ivana Lula, do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, pelos estudos de RMN.

Aos colegas de laboratório Cabral Pavei e Ana Paula Cappra Silva que tanto auxiliaram nas primeiras etapas do desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do Laboratório 405 e do Laboratório de Desenvolvimento Galênico pela assistência e apoio prestados.

Aos amigos: Dani, Fer, Maria, Letícia, Marina, Ana Guedes, Carla, Cris, pelo companheirismo nos momentos difíceis e por compartilharem idéias e conhecimentos.

À UFRGS por oferecer esta importante oportunidade, a CAPES pelo apoio financeiro.

Ao meu irmãozinho Murilo por ter se tornado o meu norte, o motivo para eu buscar um futuro melhor e continuar a crescer.

E principalmente ao meu pai Júlio e à minha mãe Zélia pelo apoio incondicional, sem eles o cumprimento dessa etapa não seria possível.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xix
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo geral	7
2.2 Objetivos específicos	7
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
3.1 Envelhecimento cutâneo	11
3.1.1 Envelhecimento intrínseco	11
3.1.2 Envelhecimento extrínseco	13
3.1.3 Indução da degradação dérmica pela radiação ultravioleta	14
3.2 Isoflavonas	18
3.2.1 Propriedades físico-químicas das isoflavonas	20
3.2.2 Propriedades farmacológicas	20
3.2.3 Toxicidade	22
3.2.4 Benefícios da genisteína à pele	23
3.2.5 Atividade inibidora de proteínas tirosina-quinase	25
3.2.6 Atividade antioxidante	26
3.2.7 Atividade estrogênica	28
3.3 Hidrogéis de hidróxi propilmetilcelulose	31
3.4 Promoção da penetração cutânea	32
3.5 Ciclodextrinas	34
3.5.1 Ciclodextrinas no transporte transdérmico	36
3.5.2 Uso de ciclodextrinas em produtos cosméticos	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Materiais	47
4.1.1 Matérias-primas	47
4.1.2 Aparelhos e equipamentos	47
4.1.3 Solventes e outros materiais	47
4.2 Métodos	48
4.2.1 Validação do método analítico para quantificação da genisteína	48
4.2.1.1 Linearidade	48

4.2.1.1.1 Curva Padrão da genisteína	48
4.2.1.2 Precisão	48
4.2.1.3 Exatidão	49
4.2.1.4 Especificidade	49
4.2.1.5 Limite de detecção	50
4.2.1.6 Limite de quantificação	50
4.2.2 Associação da aglicona com β -ciclodextrina	50
4.2.2.1 Diagrama de Solubilidade (HIGUCHI E CONNORS, 1965)	50
4.2.2.2 Preparação do complexo genisteína- β -ciclodextrina em meio líquido (GEN: β CD)	51
4.2.2.3 Secagem por liofilização do complexo	51
4.2.2.4 Preparação da simples mistura genisteína/ β -ciclodextrina (GEN/ β CD) ..	51
4.2.3 Caracterização do complexo (GEN: β CD) e da simples mistura (GEN/ β CD).	51
4.2.3.1 Doseamento da genisteína por cromatografia líquida de alta eficiência .	51
4.2.3.2 Calorimetria diferencial exploratória	52
4.2.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho	52
4.2.3.4 Ressonância magnética de próton	52
4.2.4 Avaliação do perfil de penetração cutânea da genisteína e das dispersões sólidas	52
4.2.4.1 Solubilidade da genisteína no meio acceptor	52
4.2.4.2 Determinação do coeficiente de partição octanol/água (<i>Log P</i>)	53
4.2.4.3 Preparação da pele de orelha de suíno para os experimentos de permeação cutânea <i>in vitro</i>	53
4.2.4.4 Avaliação do perfil de penetração intrínseco da genisteína	54
4.2.4.5 Experimento de permeação cutânea <i>in vitro</i>	54
4.2.4.6 Determinação dos parâmetros de permeabilidade cutânea da genisteína.	54
4.2.4.7 Determinação dos parâmetros de permeabilidade cutânea da genisteína a partir de gel de HPMC 3 %.....	55
4.2.4.8 Determinação da quantidade de genisteína acumulada na pele de suíno.....	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 Validação do Método Analítico	59
5.1.1 Linearidade	59
5.1.2 Precisão	61
5.1.3 Exatidão	61

5.1.4 Especificidade	62
5.1.5 Limite de detecção	62
5.1.6 Limite de quantificação	62
5.2 Associação da genisteína com β -ciclodextrina	63
5.2.1 Diagrama de Solubilidade	63
5.2.2 Preparação do complexo genisteína- β -ciclodextrina em meio líquido (GEN: β CD)	65
5.2.3 Secagem por liofilização do complexo em meio líquido	65
5.2.4 Obtenção da simples mistura	66
5.3 Caracterização das dispersões sólidas genisteína- β -ciclodextrina	66
5.3.1 Doseamento físico-químico da genisteína por cromatografia líquida de alta eficiência	66
5.3.2 Calorimetria diferencial exploratória	66
5.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho	67
5.3.4 Ressonância magnética de próton	69
5.4 Avaliação do perfil de penetração cutânea da genisteína e das associações genisteína- β -ciclodextrina	74
5.4.1 Solubilidade da genisteína no meio acceptor	74
5.4.2 Determinação do coeficiente de partição octanol/água (<i>Log P</i>)	74
5.4.3 Avaliação do perfil de penetração intrínseco da genisteína em pele de suíno	75
5.4.4 Experimento de permeação cutânea <i>in vitro</i>	76
5.4.4.1 Determinação dos parâmetros de permeabilidade cutânea da genisteína	76
5.4.4.2 Avaliação da interferência da β -ciclodextrina da permeação cutânea da genisteína a partir de gel de HPMC 3 %	78
5.4.4.3 Determinação da quantidade de genisteína acumulada na pele	83
6 CONCLUSÕES	87
7 REFERÊNCIAS	91
8 ANEXOS	109

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas das isoflavonas mais freqüentes	18
Figura 2. Ligação de hidrogênio intramolecular na genisteína	20
Figura 3. Similaridade estrutural entre estradiol e genisteína	30
Figura 4. Perfil cromatográfico da genisteína obtido por cromatografia líquida de alta eficiência	59
Figura 5. Curva padrão da genisteína obtida por CLAE	60
Figura 6. Diagrama de solubilidade da genisteína em presença de β -ciclodextrina	64
Figura 7. Termogramas obtidos a partir de calorimetria diferencial exploratória	67
Figura 8. Espectros infravermelho da β CD, complexo GEN: β CD, simples mistura GEN/ β CD e genisteína	69
Figura 9. Espectro de ^1H -RMN da β CD	70
Figura 10. Espectro de ^1H -RMN da simples mistura GEN/ β CD	72
Figura 11. Espectro de ^1H -RMN da simples mistura GEN: β CD	72
Figura 12. Espectro de ^1H -RMN ROESY do complexo	73
Figura 13. Permeabilidade intrínseca da genisteína em pele de orelha de suíno	76
Figura 14. Perfil de penetração da genisteína 0,1% a partir de gel de HPMC 3%	77
Figura 15. Comparação entre as porcentagens de genisteína permeada na penetração intrínseca da genisteína e da genisteína a 0,1 % a partir de gel de HPMC 3%	78
Figura 16. Perfil de penetração da simples mistura GEN/ β CD, a partir de gel de HPMC 3 %	79
Figura 17. Perfil de penetração do complexo GEN: β CD, a partir de gel de HPMC 3%	80
Figura 18. Comparação entre as porcentagens de genisteína permeada quando aplicada em amostra volátil e de géis de HPMC 3% contendo genisteína pura, complexo GEN: β CD, e a simples mistura GEN/ β CD	81
Figura 19. Hipóteses para liberação da genisteína a partir do gel de HPMC 3 %	82
Figura 20. Quantidade total de genisteína acumulada na pele de suíno na presença ou ausência de β CD, após a permeação a partir de gel de HPMC 3%	84
Figura 21. Quantidade total de genisteína % do total aplicado (1mg), acumulada na pele de suíno; quantidade permeada; quantidade remanescente na base	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolo para ensaio de exatidão na a análise de genisteína por CLAE	49
Tabela 2. Proporções de GEN e β CD empregadas na obtenção do diagrama de solubilidade de HIGUCHI E CONNORS (1965)	50
Tabela 3. Repetibilidade para a análise de genisteína por CLAE*	61
Tabela 4. Precisão intermediária para a análise de genisteína por CLAE	61
Tabela 5. Exatidão da análise de genisteína por CLAE	62
Tabela 6. Incrementos de solubilidade da genisteína em função da concentração molar de β -ciclodextrina	63
Tabela 7. Deslocamentos químicos (d_6 -DMSO) a partir de espectro de ^1H -RMN antes da associação das duas substâncias	70
Tabela 8. Deslocamentos químicos ($\Delta\delta$) da genisteína antes e após a associação com β -ciclodextrina	71
Tabela 9. Deslocamentos químicos ($\Delta\delta$) da β -ciclodextrina antes e após a associação com genisteína	71

RESUMO

Associação da isoflavona genisteína com β -ciclodextrina: avaliação da penetração cutânea

A genisteína é uma isoflavona da soja que vem sendo investigada pelo seu potencial antienvhecimento, baseado nas suas atividades antioxidante, estrogênica e inibidora de proteínas tirosina-quinase. A associação da genisteína com β -ciclodextrina com a formação de um complexo elevou a hidrossolubilidade da isoflavona. A permeabilidade intrínseca da genisteína foi avaliada, bem como sua permeabilidade quando aplicada a partir de gel de hidróxi propilmetilcelulose (HPMC) a 3 %, pelo método de célula de Franz. As associações com β -ciclodextrina, em géis de HPMC 3 %, também foram avaliadas e foi observado um incremento da penetração em favor do complexo produzido em meio aquoso. Devido ao seu alto coeficiente de partição ($\log P$) - 4,36 - a genisteína demonstrou a capacidade de formar reservatórios nas estruturas internas da pele favorecendo sua ação antienvhecimento na pele.

Palavras-chave: genisteína, β -ciclodextrina, complexos de inclusão, penetração cutânea, célula de Franz.

ABSTRACT

Association of genistein with β -cyclodextrin: skin penetration evaluation

Genistein is a soy isoflavone that has been investigated for its antiaging potencial, based on antioxidant, estrogenic and proteins tirosin-kinase inhibitor activities. The association of genistein with β -cyclodextrin resulted in a complex formation enhanced the isoflavone hidrosolubity. Genistein instrinsic permeability was evaluated, as well permeability from hydroxypropyl methylcelullose (HPMC) 3 % gel, wtih Franz cell method. The associations with β -cyclodextrin, in HPMC 3 % gels were also evaluated with the observation of na enhancing effect of cyclodextrin in the complex produced in aqueous media. Because its high partition coefficient (*log P*) - 4,36 - genistein was able to form reservoir in the internal skin layers, favorable to its antiagin action.

Keywords: genistein, β -cyclodextrin, inclusion complexes, skin penetration, Franz cell.

O principal interesse das isoflavonas da soja (*Glycyne max*) na terapêutica está relacionado ao fato destes metabólitos secundários vegetais apresentarem atividade estrogênica (SCHIMDT *et al.*, 1996; DUNN *et al.*, 1997; ADLERCREUTZ, 1999; TAPIERO *et al.*, 2001; CHIECHI *et al.*, 2002; HUNTLEY *et al.*, 2003; SATOR *et al.*, 2004), atividade antioxidante (PATEL, *et al.*, 1995; ARORA, *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2000; HEIJNEN *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2005) e atividade inibidora de enzimas reguladoras do ciclo celular (BROBERG AND HEINO, 1996; BOOS *et al.*, 2000; LEVITZKI *et al.*, 2002). Diversos estudos atestam a eficácia das isoflavonas na terapia de reposição hormonal pela sua atividade estrogênica leve, visando à redução dos fogachos na menopausa (SCHIMID *et al.*, 2001), a estimulação da renovação celular óssea (SOMEKAWA *et al.*, 2001), a prevenção da osteoporose, e melhora da lubrificação vaginal (SCHIMID *et al.*, 2001). Além dessas atividades farmacológicas, a atividade antioxidante atribuída às isoflavonas impulsionou estudos relacionados a sua utilização na terapia contra vários tipos de câncer (BARNES, 1995) e na redução do colesterol plasmático (PATEL *et al.*, 2001).

Nos dias atuais, também a preocupação com a aparência física tem alavancado a utilização de extratos de soja em produtos cosméticos destinados à prevenção do envelhecimento cutâneo. Relatos na literatura têm demonstrado que as isoflavonas, devido ao seu potencial antioxidante, associado à atividade estrogênica leve, e ainda à atividade inibidora de enzimas ajudam a promover a saúde da pele e contribuem para retardar o envelhecimento cutâneo (ZULLI *et al.*, 2001).

Apesar da diversidade estrutural encontrada para as isoflavonas (SIMÕES *et al.*, 2000), a genisteína e a daidzeína são as mais estudadas, sendo que a primeira possui atividade biológica mais pronunciada e também é a mais abundante nas fontes vegetais (DIXON E FERREIRA, 2002).

Atualmente, encontram-se disponíveis no mercado uma variedade de produtos cosméticos contendo extrato de soja em sua composição o Novadiol, da L'Oréal, o Golden Care, da Adcos, o Chronos, da Natura e o Renew, da Avon.

Contudo, os extratos comumente incorporados a esses produtos apresentam as isoflavonas, na maior parte, na forma de heterosídeo. No entanto, esta forma conjugada é desprovida de atividade biológica. Já quando as isoflavonas apresentam-se na forma de aglicona, sua hidrossolubilidade é reduzida (ZULLI, *et al.*, 2002), o que pode dificultar sua incorporação em bases para administração tópica sobre a pele.

Com base na importância da genisteína, isoflavona com atividade biológica mais relevante na prevenção do envelhecimento cutâneo e face as suas características de baixa hidrossolubilidade, o presente trabalho propõe estudar sua associação com β -ciclodextrina, e verificar o efeito desta associação sobre a hidrossolubilidade da molécula, bem como sobre a sua penetração na pele. Assim, para o presente trabalho, as seguintes perguntas foram formuladas:

- a genisteína, na forma de aglicona, é capaz de penetrar na pele?
- ocorre a formação de complexo entre a genisteína e a β -ciclodextrina?
- a complexação prévia, entre a genisteína e a β -ciclodextrina, exerce influência na promoção da penetração cutânea?

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral estudar a associação da genisteína com a β -ciclodextrina, verificando o efeito desta associação sobre a hidrossolubilidade da isoflavona e sobre a sua penetração na pele.

2.2 Objetivos específicos:

- verificar a ocorrência ou não da formação de complexo entre a genisteína e a β -ciclodextrina e caracterizar as associações obtidas;
- avaliar o efeito da β -ciclodextrina na hidrossolubilidade da genisteína;
- avaliar a permeabilidade da genisteína através de pele suína;
- avaliar o efeito da sua associação com β -ciclodextrina, com complexação prévia ou por simples mistura, sobre a capacidade da genisteína em permear a pele a partir de gel hidrofílico.

3.1 Envelhecimento Cutâneo

O envelhecimento da pele é comumente associado com o aumento de rugas, com a perda da firmeza e da elasticidade, mas quanto às razões básicas para essas mudanças, é importante distinguir entre os efeitos biológicos e os fatores ambientais, como por exemplo, a exposição ao sol.

O envelhecimento intrínseco é fortemente determinado por fatores genéticos e é clinicamente associado com o aumento da fragilidade, perda da elasticidade e alterações na cor natural (GILCHEREST, 1982). Todas as estruturas cutâneas e suas funções fisiológicas regredem inevitável e continuamente com o tempo. Esta deterioração progressiva do tecido é estimulada pelos efeitos decorrentes da ação de fatores ambientais, ou extrínsecos, podendo ocorrer a sobreposição destes aos fatores biológicos. Fatores químicos, físicos e mecânicos podem danificar a pele de forma prematura.

A exposição à luz solar contribui para o envelhecimento cutâneo tanto pela ação da radiação ultravioleta, quanto da infravermelha. A principal responsável pelos danos causados à pele exposta à luz solar é a radiação UV. Essa radiação pode desencadear reações geradoras de radicais livres (BONINA *et al.*, 1996), danificar e degradar componentes celulares, como lipídios, proteínas e estruturas do DNA, e componentes não-celulares, como fibras de colágenos e elastina (SARASIN, 1999; SALIOU *et al.*, 1999; SAIJA *et al.*, 2000).

3.1.1 Envelhecimento Intrínseco

O envelhecimento cronológico aparece em decorrência das reações naturais fisiológicas que afetam tanto a pele como os órgãos internos do corpo humano, ocasionando uma degeneração tecidual lenta e irreversível (EL-DOMYATI *et al.*, 2002). O estrato córneo permanece relativamente inalterado, sendo que os danos mais significativos tem lugar na epiderme e na derme (JENKINS, 2002). Uma teoria criada por DUHRAM (1956), propõe que o estresse oxidativo causado por um desequilíbrio entre a ação de radicais livres, produzidos em excesso pelo metabolismo aeróbico mitocondrial, e as defesas antioxidantes, manifestado por

danos a proteínas, DNA e lipídios de membranas, seria o responsável pelo envelhecimento (BOKOV *et al.*, 2004).

Segundo essa teoria, os danos celulares provocados pela ação das espécies reativas de oxigênio são cumulativos e têm influência direta no envelhecimento intrínseco. A cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria é responsável pela maioria do oxigênio metabolizado pelas células, e as espécies produzidas por intermédio dessa cadeia (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila) são fontes potenciais de danos para a própria mitocôndria e outros compartimentos celulares (BOKOV *et al.*, 2004).

O acúmulo de estruturas danificadas na pele, as quais perderam sua função fisiológica, leva à atrofia, tanto da derme quanto da epiderme levando ao achatamento da interface entre estas duas camadas cutâneas (BOKOV *et al.*, 2004).

As células cutâneas, com o passar do tempo, perdem a capacidade de reprodução, a habilidade de diferenciação e de mudanças fenotípicas. Este processo é denominado senescência celular e as células senis acumulam-se na pele envelhecida (DIMRI, 1995). Esta redução no crescimento celular se deve, em parte, à repressão seletiva da expressão de genes regulatórios importantes para a divisão celular e da síntese de DNA (SESADRI E CAMPISI, 1990). Estas células também se tornam resistentes ao processo de apoptose (WANG, 1995) e exibem alterações nas funções de diferenciação (CAMPISI, 1996). O acúmulo destas células senis com a alteração da expressão gênica leva ao declínio da integridade e da função tecidual (CAMPISI, 1997).

A matriz extracelular também sofre a influência dos processos biológicos de oxidação. Uma depleção geral dessa matriz com a diminuição da síntese de colágeno, de elastina (SCAHHFETTER-KOCHANNEK *et al.*, 2000; EL-DOMYATI *et al.*, 2002) e de glicosaminoglicanos, como o ácido hialurônico (MANUSKIATTI *et al.*, 1996; VUILLERMOZ *et al.*, 2005) é observada. Num estado anterior à senescência celular dérmica, a atividade das metaloproteinases matriciais, enzimas responsáveis pela degradação dos componentes estruturais da matriz dérmica, collagenase (MMP1) e estromelina (MMP3), é baixa em consequência da ação de seus inibidores (TIMP1 e TIMP3). Em contraste, nos fibroblastos senis acontece uma

inversão deste quadro, com um aumento da expressão das metaloproteinases e a redução da expressão dos inibidores enzimáticos (CAMPISI, 1996). O comprometimento da biossíntese também contribui para a redução e desorganização do colágeno matricial, conduzindo à atrofia dérmica (JENKINS, 2002).

Dessa maneira, o processo associado ao envelhecimento dérmico intrínseco resulta de uma combinação de eventos que incluem a redução da capacidade proliferativa das células cutâneas; decréscimo da síntese dos componentes da matriz dérmica, aumento da expressão de enzimas que degradam o colágeno e outros componentes estruturais da matriz extracelular (JENKINS, 2002) e danos oxidativos ocasionados por EROs, geradas por reações fisiológicas (BOKOV *et al.*, 2004).

3.1.2 Envelhecimento Extrínseco

A ação de fatores externos sobre o organismo humano também leva à produção de substâncias nocivas. A poluição do ar, o tabagismo, exercícios físicos exagerados, inflamações, exposição a certas substâncias químicas, metais pesados e radiações são agentes responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio, sendo que, entre os fatores externos, a radiação ultravioleta é o principal agente capaz de provocar danos à pele (FISHER *et al.*, 2002).

O fotoenvelhecimento, induzido pela influência da radiação solar, da mesma forma que o cronológico, é também caracterizado pelo acúmulo de estruturas cutâneas danificadas. O que diferencia os dois processos, é o fato de o fotoenvelhecimento depender, primariamente, do grau de exposição solar e do pigmento da pele do indivíduo. Pessoas de pele clara, que se expõem a longos períodos de tempo à luz solar, principalmente em locais onde a incidência da radiação é mais pronunciada, ficam mais suscetíveis ao fotoenvelhecimento (FISHER *et al.*, 2002).

A pele envelhecida pela exposição crônica à radiação ultravioleta apresenta características similares à pele cronologicamente degenerada. No entanto, a pele fotoenvelhecida apresenta determinadas características histológicas exclusivas, como, por exemplo, a elastose dérmica, que consiste no aumento seletivo de uma

forma alterada de elastina, que se apresenta sob a forma de estruturas emaranhadas, amorfas e grosseiras. Acredita-se que esse aumento do material elástico aconteça como resultado direto da danificação causada pela radiação UV aos fibroblastos da derme, os quais passam a produzir uma elastina com características anormais, ou, ainda, que seja o resultado da digestão da matriz extracelular por proteases induzidas por mediadores inflamatórios. Outra característica própria da pele fotoenvelhecida é a desorganização e a degeneração da rede de colágeno circundante e, também, o aumento na deposição de ácido hialurônico entre as fibras de colágeno e elastina (MANUSKIATTI *et al.*, 1996). Além disso, também pode ser observado o aumento de células inflamatórias, como mastócitos e neutrófilos (SCARFFETTER-KOCHANNEK *et al.*, 2000; EL-DOMYATI *et al.*, 2002).

A pele sujeita à exposição crônica à luz ultravioleta apresenta-se mais frágil, com menor capacidade de cicatrização (SCARFFETTER-KOCHANNEK *et al.*, 2000). Essa exposição excessiva pode levar a alterações clínicas que culminam no aparecimento de rugas, no aumento da espessura e na diminuição da oleosidade da pele, alterações na pigmentação e, em casos mais graves, em uma variedade de neoplasmas benignos ou malignos (EL-DOMYATI *et al.*, 2002; PINNEL, 2003).

3.1.3 Indução da Degradação Dérmica pela Radiação UV

Por ser composta por radiações de diferentes comprimentos de onda, a luz do sol pode interagir com diferentes células localizadas em camadas distintas da pele (BERNEBURG *et al.*, 2000), e assim interferir no sistema celular, de extrema complexidade. O conjunto de reações que compõe este fenômeno engloba receptores de superfície, transdução de sinais regulada por proteínas quinases, fatores de transcrição e enzimas que sintetizam e degradam proteínas estruturais dérmicas responsáveis pela elasticidade e resistência da pele (FISHER *et al.*, 2002).

Na pele, a radiação ultravioleta é absorvida por grupamentos cromóforos presentes no DNA ou no ácido trans-urocânico, desencadeando uma série de reações fotoquímicas que danificam vários componentes celulares (PINNEL, 2003). A radiação UVB, de pequeno comprimento de onda (280-320 nm) é predominantemente absorvida na camada mais externa e afeta células da epiderme,

os queratinócitos (BERNEBURG *et al.*, 2000). Essa radiação é absorvida diretamente pelo DNA, induzindo alterações entre bases de pirimidina adjacentes, o que pode provocar mutações e carcinoma, quando os mecanismos de reparo intracelulares não são suficientes (PINNEL, 2003). A radiação UVA (320-400nm) atinge regiões mais profundas da pele, afetando tanto queratinócitos quanto fibroblastos na derme (BERNEBURG *et al.*, 2000). A radiação UVA é absorvida preferencialmente pelo ácido trans-urocânico, um produto de degradação da filagrina. Por ser fotossensível, essa molécula absorve fótons de luz UVA originando espécies reativas de oxigênio (EROs), dentre elas o ânion superóxido e o oxigênio singleto (SCAHFFETTER-KOCHANNEK *et al.*, 2000; FISHER *et al.*, 2002; PINNEL, 2003).

O ânion superóxido, gerado na epiderme durante a exposição à luz UVA, é convertido a peróxido de hidrogênio por uma enzima antioxidante endógena, a superóxido dismutase. O peróxido de hidrogênio pode ainda ser convertido ao radical hidroxila, altamente reativo e tóxico. Tanto o oxigênio singleto quanto o radical hidroxila podem dar início a peroxidação lipídica das membranas celulares, alterando sua fluidez e diminuindo a eficiência de seu transporte transmembrana, e oxidar proteínas e o DNA nuclear e mitocondrial (SCAHFFETTER-KOCHANNEK *et al.*, 2000; PINNEL, 2003).

Tais espécies reativas de oxigênio (EROs), além de acarretar modificações químicas prejudiciais a vários componentes celulares, são os agentes desencadeantes de uma seqüência de respostas moleculares que levam à oxidação e conseqüente inibição de enzimas cruciais na manutenção da homeostase intracelular (FISHER *et al.*, 2002).

Ao atingir os queratinócitos, mesmo após uma exposição de curta duração, a radiação UV ativa receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFR) e das citocinas interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (FISHER *et al.*, 1998). A exposição da pele humana à radiação UV resulta numa rápida fosforilação dos resíduos de tirosina dos receptores de fator de crescimento epidérmico, dependente da atividade tirosina-quinase intrínseca destes receptores. A adição de grupamentos fosfato aos resíduos de tirosina, ou seja, a auto-fosforilação desses receptores, caracteriza-se como o evento bioquímico inicial de sua ativação

funcional, seguido pela ligação de moléculas responsáveis pela propagação de sinais pela célula (FISHER *et al.*, 2002). Para o equilíbrio interno das células, entre os resíduos de tirosina fosforilados e desfosforilados, as proteínas tirosina-fosfatases têm a função de remover os grupamentos fosfato dos receptores ativados. No entanto, as EROs geradas pela exposição à radiação UV têm a capacidade de oxidar e inibir a atividade das proteínas tirosina-fosfatases que antagonizam a atividade tirosina-quinase intrínseca dos EGFR (GROSS *et al.*, 1999). Em virtude da redução da atividade das fosfatases, os resíduos de tirosina fosforilados acumulam-se e acabam por desencadear todo um mecanismo bioquímico responsável pelo fotoenvelhecimento (KANG *et al.*, 2003).

Moléculas sinalizadoras são acionadas quando os receptores EGFR são auto-fosforilados, sendo que as mais importantes são as proteínas *ras* ligantes de GTP, que atingem níveis elevados, após uma exposição solar aguda (FISHER *et al.*, 1998). O envolvimento das proteínas *ras* nessa transdução de sinal resulta no estímulo de uma cascata enzimática mediada por proteínas quinase, as MAP quinases. A atividade desse grupo de enzimas é estimulada por um grande número de estímulos extracelulares, além da radiação ultravioleta. Existem três tipos de MAP quinases nas células dos mamíferos: ERK (quinase regulada por sinais extracelulares), JNK (quinase *c-Jun* amino-terminal ativada por estresse) e p38, sendo que cada uma dessas enzimas induz cascatas distintas de sinais, levando à ativação de fatores de transcrição nucleares, também distintos (KARIN E HUNTER, 1995). A ação conjunta dessas enzimas forma um complexo protéico que tem papel fundamental na expressão de enzimas proteolíticas envolvidas na degradação da matriz extracelular cutânea (TREMBLE *et al.*, 1995; FISHER *et al.*, 1997).

A MAP quinase JNK, ao ser fosforilada, é capaz de estimular a expressão do RNAm de *c-Jun*, resultando em um aumento na síntese de proteínas *c-Jun*, as quais ligam-se a outras proteínas, formando dímeros. Outra MAP quinase, ERK, é responsável pela expressão constitutiva de genes da proteína *c-Fos*, não recebendo influência significativa da radiação UV (KARIN E HUNTER, 1995; KARIN *et al.*, 1997; FISHER *et al.*, 1998). Entretanto, o aumento da transcrição do RNAm de *c-Jun*, disponibiliza um maior número de proteínas *c-Jun*, que irão formar um complexo heterodimérico com as proteínas *c-Fos* constitutivamente expressas. Este complexo é denominado AP-1 (KARIN *et al.*, 1997).

A formação deste complexo heterodimérico AP-1, formado por *c-Jun-c-Fos*, é responsável pela regulação dos genes que codificam as enzimas proteolíticas nos queratinócitos e fibroblastos. Essas enzimas são as metaloproteinases matriciais (MMP) e degradam o colágeno, a elastina e outras proteínas estruturais do tecido conjuntivo da pele (TREMBLE *et al.*, 1995; FISHER *et al.*, 1997). A exposição da pele humana à luz solar estimula a atividade de três tipos de metaloproteinases matriciais: a estromelina-1, a 92 kD gelatinase (MMP-9) e as colagenases. Em conjunto, a ação dessas enzimas acarreta a degradação completa do colágeno cutâneo (FISHER *et al.*, 1997). A degradação do colágeno é o principal fator que leva ao envelhecimento cutâneo uma vez que, essa proteína é a mais importante proteína estrutural do tecido conjuntivo da pele e também a mais abundante na pele humana, totalizando cerca de 90% da matriz extracelular (KANG *et al.*, 1997). A ativação de *c-Jun* pelo complexo AP-1, após exposição à radiação UV, leva também à inibição da síntese de pró-colágeno do tipo I e tipo III pela redução da expressão dos genes e codificadores destes peptídeos (FISHER *et al.*, 1997).

Uma vez no espaço extracelular, o colágeno maduro fica suscetível à ação deletéria de três tipos principais de colagenases: MMP-8 (colagenase 2), MMP-13 (colagenase 3) e MMP-1 (colagenase 1). Sendo que esta última é a principal enzima colagenolítica ligada à degradação do colágeno, induzida pela radiação UV (KANG *et al.*, 1997; BRENNAN *et al.*, 2003). A desnaturação do colágeno promovida por essas enzimas origina fragmentos chamados de gelatina, que será degradada em seguida por outras metaloproteinases matriciais: gelatinase (MMP-9) e estromelina (MMP-3) (KANG *et al.*, 1997).

Dessa maneira, a radiação UV danifica o tecido conjuntivo dérmico, entre outras ações deletérias, por degradar o colágeno maduro e inibir a síntese de pró-colágeno (FISHER *et al.*, 2000). Uma hipótese formulada por KANG e colaboradores (2003) sugere que a degradação enzimática do colágeno é seguida por uma tentativa de reparo da matriz dérmica. No entanto, o reparo não acontece perfeitamente levando à formação de uma estrutura falha que prejudica a organização do colágeno no espaço intracelular. Este defeito na matriz é, então, chamado de "microcicatriz solar", e o acúmulo destas fibras defeituosas origina macrocicatrizes que se manifestam clinicamente como as rugas.

3.2 Isoflavonas

As isoflavonas, ao contrário das outras classes de flavonóides, possuem distribuição taxonômica é restrita (SIMÕES *et al.*, 2000) principalmente à subfamília das *Papilionoideae* das *Leguminosae* (DIXON E FERREIRA, 2002). Sua variedade estrutural é surpreendentemente grande, os substituintes mais comuns são os grupamentos hidroxila, metoxila e metilenodioxila (SIMÕES *et al.*, 2000). As estruturas mais freqüentes de isoflavonas estão representadas na figura 1.

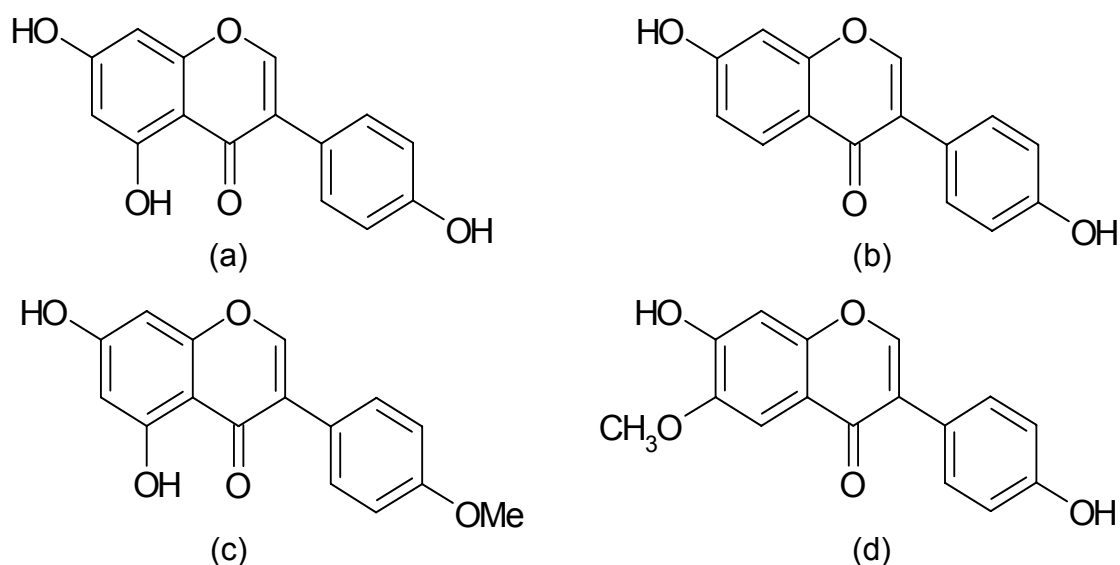


Figura 1. Estruturas das isoflavonas mais freqüentes. (a) genisteína; (b) daidzeína; (c) biochanina-A; (d) gliciteína.

São encontradas na natureza também sob a forma conjugada a açúcares. Os O-glicosídeos são os heterosídeos predominantes, porém existe também um número considerável de C-glicosídeos (DIXON e FERREIRA, 2002).

A genisteína é a isoflavona para a qual é encontrado o maior número de relatos de atividades biológicas, ocorrendo em uma grande variedade de frutas e grãos, sendo que a soja é a sua maior fonte. Porém, comparativamente aos teores de heterosídeos (genistina e malonil-genistina), forma em que é normalmente encontrada, a quantidade de aglicona presente em outros grãos é bastante menor (LIGGINS *et al.*, 2000). Em estudo realizado por LIGGINS e colaboradores (2000), foram analisadas 36 amostras de diferentes espécies de frutas e grãos. Os resultados demonstraram que outras leguminosas, como o grão-de-bico e a lentilha

(BREINHOLT *et al.*, 2000), e as passas de uvas continham quantidades irrisórias quando comparadas aos grãos de soja (LIGGINS *et al.*, 2000).

Produtos de soja fermentados, o misô e o tofu apresentam níveis mais elevados de genisteína na forma não conjugada. Assim, o nível de agliconas aumenta com a fermentação sugerindo que o glicosídeo é convertido para a forma de aglicona pelos microrganismos durante a fermentação (FUKUTAKE *et al.*, 1996). A hidrólise da ligação heterosídica é fundamental para que a aglicona seja absorvida e possa, assim, interagir com receptores celulares e sítios ativos de enzimas, uma vez que o glicosídeo não é capaz de exercer nenhum efeito em nível fisiológico (MIKSICEK, 1993; ZULLI, 2001). Após o consumo alimentar de soja, os heterosídeos são hidrolisados pelas bactérias da flora intestinal, permitindo que a forma livre das isoflavonas seja absorvida (FUKUTAKE *et al.*, 1996).

As isoflavonas são fitoestrógenos, compostos de origem vegetal que possuem similaridade estrutural e funcional com o estrógeno humano. Sua ação farmacológica é comparável a baixas concentrações de estrogênio endógeno, e pode apresentar tanto efeito estrogênico quanto anti-estrogênico. Foi relatado, com o auxílio de um ensaio de resposta transcricional de receptores de estrogênio, que a genisteína tem a maior potência estrogênica, comparativamente às demais isoflavonas (MIKSICEK, 1993). Diversos estudos epidemiológicos, que analisaram mulheres asiáticas em idade pós-menopausa, relataram que a incidência de distúrbios fisiológicos hormônio-dependentes, conhecidos como os sintomas da menopausa, era notavelmente menor nestas mulheres do que nas ocidentais. Esta característica foi relacionada à alimentação típica dos países orientais, na qual se observa uma variedade de alimentos à base de soja, portanto rica em isoflavonas. Dessa maneira, as isoflavonas ingeridas na alimentação poderiam prover um efeito de reposição hormonal (SIMONS *et al.*, 2000; BIRT *et al.*, 2001; BROUNS, 2002; McCLAIN *et al.*, 2006).

Assim como a grande maioria dos compostos polifenólicos, as isoflavonas, em especial a genisteína, apresentam expressiva atividade antioxidante tanto *in vivo* como *in vitro* (SIMÕES *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2005). A genisteína tem demonstrado uma variedade de mecanismos antioxidantes. Ela é capaz de captar espécies reativas de oxigênio (PATEL, *et al.*, 1995; ARORA, *et al.*, 2000), inibir a peroxidação

lipídica (FRITZ *et al.*, 2003), inibir a formação do ânion superóxido pela enzima xantina oxidase. Além de demonstrar, *in vivo*, o estímulo das enzimas de defesa antioxidantes endógenas superóxido dismutase, glutathiona peroxidase, catalase e glutathiona redutase (GUO *et al.*, 2002).

A genisteína também possui atividade inibidora de enzimas reguladoras do ciclo e da diferenciação celular, a topoisomerase II (BOOS E STOPPER, 2000) e proteínas tirosina-quinase (HUANG E DILLON, 2000).

3.2.1 Propriedades Físico-químicas das isoflavonas

A forma glicosilada é mais polar do que as agliconas, mas ainda pouco solúvel em água. Já as agliconas apresentam solubilidade muito reduzida em água e em óleo, podendo ser solubilizadas em etanol e metanol. As soluções etanólicas de genisteína, a adição de água precipita cristais de genisteína, com coloração esbranquiçada (ZULLI *et al.*, 2001; WEI *et al.*, 2002).

A genisteína tem três hidroxilas na sua estrutura. Uma ligação de hidrogênio intramolecular pode se formar na genisteína (figura 2), elevando sua hidrofobia, quando comparada às demais isoflavonas (BIRT *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2003).

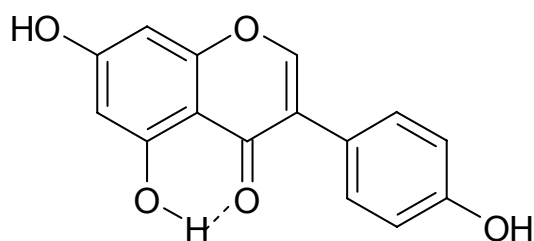


Figura 2. Ligação de hidrogênio intramolecular na genisteína.

A genisteína apresenta um máximo de absorção no comprimento de onda de 262 nm (WEI *et al.*, 2002; KANG *et al.*, 2003) com mais duas bandas de absorção em 254 e 270 nm.

A fusão da genisteína ocorre numa faixa de temperatura de 297 a 298°C, com uma leve decomposição térmica.

3.2.2 Propriedades farmacológicas

Estudos epidemiológicos atestam os benefícios da soja, e da genisteína, à saúde de um modo geral. 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 renal (BARNES, 1995; FRITZ *et al.*, 2003). Além disso, as isoflavonas parecem reduzir o risco de osteoporose (ARJMANDI *et al.*, 1998), diminuir o colesterol plasmático (HO *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2004), 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).

A genisteína, a isoflavona mais abundante, em conjunto com seus produtos de metabolização, apresenta atividade antioxidante numa variedade de condições experimentais *in vivo* ou *ex vivo* (FRITZ *et al.*, 2003). Sua atividade antioxidante, associada a outras atividades, estimula a investigação de suas propriedades anticancerígenas. GUO e colaboradores (2002) relatam que a capacidade de captar radicais livres das isoflavonas pode não contribuir significativamente com a atividade antioxidante apresentada por estes compostos, mas sugere que a atividade antioxidante das isoflavonas, possivelmente, seja incrementada pela capacidade dessas substâncias em diminuir a fluidez das membranas e de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes endógenas.

Diversos autores têm referido que a genisteína inibe o crescimento de células tumorais *in vitro*, efeito que tem sido atribuído à inibição de tirosina-quinase (BROBERG E HEINO, 1996; BOOS *et al.*, 2000; LEVITZKI *et al.*, 2002) e de topoisomerase II. Apesar dos diversos estudos que avaliam a atividade anticâncer da genisteína baseada na sua ação inibidora da topoisomerase II (RECORD *et al.*, 1995a; BOOS *et al.*, 2000; LIGGINS *et al.*, 2000), esta propriedade da genisteína ainda é controversa (RECORD *et al.*, 1995a).

A configuração estrutural das isoflavonas lembram a do estradiol (CHIECHI *et al.*, 2002; HUNTLEY *et al.*, 2003). No entanto, a potência estrogênica atribuída às isoflavonas é extremamente fraca, 10^3 a 10^5 vezes menor que a do 17- β -estradiol, que é o mais potente dos estrógenos naturais (DAVIS *et al.*, 1995). Acredita-se que os fitoestrógenos possuam atividade estrogênica e anti-estrogênica, atuando como moduladores seletivos dos receptores de estrogênio, ação que depende da quantidade circulante de hormônio e da disponibilidade de receptores (HUNTLEY *et*

al., 2003). A ocupação de receptores pode, potencialmente, bloquear o receptor e levar à atividade antiestrogênica (PINNEL *et al.*, 2003). Existem dois subtipos de receptores de estrogênio, ER- α e ER- β (HUNTLEY *et al.*, 2003). Muitos dos fitoestrógenos são seletivos pelos receptores de estrogênio ER- β e ligam-se a eles com afinidade maior que o estradiol. Por exemplo, a genisteína tem afinidade seis vezes maior pelos receptores ER- β que pelos ER- α (KUIPER *et al.*, 1998; CHIECHI *et al.*, 2002; HUNTLEY *et al.*, 2003; MUELLER *et al.*, 2004).

Diversos estudos epidemiológicos (BROUNS, 2002; CHIECHI *et al.*, 2003; NAHAS *et al.*, 2004; CRISAFULLI *et al.*, 2004; McCLAIN *et al.*, 2006) revelam que a ingestão consistente de isoflavonas provenientes da dieta é capaz de aliviar distúrbios fisiológicos hormônio-dependentes como os sintomas da menopausa, osteoporose e problemas cardiovasculares. Uma dieta rica em soja, contendo altos níveis de fitoestrógenos ativos, pode promover alguma proteção contra osteoporose pós-menopausa, porém, não tão efetiva quanto a Terapia de Reposição Hormonal. O efeito preventivo dos fitoestrógenos na perda óssea e na redução da reabsorção de cálcio é biologicamente plausível, considerando-se sua similaridade estrutural com o estradiol e a presença de altos níveis de ER- β nos ossos. Outros estudos relatam que a soja diminui a excreção de cálcio devido à reduzida quantidade de aminoácidos sulfurados neste vegetal. CHIECHI e colaboradores (2002) sugerem que uma dieta rica em soja possa prevenir a osteoporose em mulheres com menopausa assintomática.

3.2.3 Toxicidade

A genisteína inibe a atividade da topoisomerase II *in vitro* por agir na estabilização de complexos cliváveis que levam à quebra da fita de DNA. Ela age, presumivelmente, por ser um inibidor competitivo do ATP pela ligação com a topoisomerase II (BOOS *et al.*, 2000; KULLING *et al.*, 2002).

Porém, relatos na literatura científica referem que a genisteína induz à formação de micronúcleos, quebras da fita de DNA, com fraca mutagenicidade em células de rato com indução de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos (KULLING *et al.*, 2002). No entanto, as concentrações necessárias para que se verifique toxicidade genética são muito altas em comparação com outros inibidores

da topoisomerase II e não podem ser alcançadas nos tecidos alvo *in vivo*. Essa idéia dá suporte ao fato de que a genisteína, um constituinte natural da soja, presente na alimentação diária de muitos indivíduos, não pode ser considerada prejudicial, mas sim, presumivelmente, um quimiopreventivo (BOOS *et al.*, 2000; KULLING *et al.*, 2002).

Um estudo avaliou os efeitos de uma dieta rica em genisteína aplicada a ratas prenhes. Os resultados demonstraram que a genisteína na dieta perinatal não causa toxicidade significativa nos filhotes (FRITZ *et al.*, 1998). A duração da gestação, o número total filhotes e de filhotes vivos por ninhada, e a proporção de gênero não foram afetadas pela genisteína. Estudo realizado por KANG e colaboradores (2002) demonstrou que a exposição materna a baixas doses de genisteína, especialmente doses encontradas na dieta humana, durante a gestação e lactação, não induz a qualquer efeito adverso nos parâmetros reprodutivos. No entanto, ADLERCREUTZ (1999) afirma que a genisteína em altas doses na fase neonatal afeta o desenvolvimento folicular ovariano, mas que o tratamento com genisteína na pré-adolescência não afeta o trato reprodutivo nem o sistema endócrino. KANG e colaboradores (2002) não observaram nenhuma alteração na espermatogênese causada pela dose de isoflavona encontrada na dieta humana.

Os efeitos adversos mais freqüentemente relatados para a ingestão de soja são distúrbios gastrintestinais. Episódios de alergia à soja também foram observados. Um tratamento adicional com soja para combater os sintomas da menopausa, pelo menos em um curto período, parece não apresentar efeitos indesejáveis que comprometam a segurança do tratamento (KANG *et al.*, 2002).

3.2.4 Benefícios da Genisteína à Pele

As mulheres, após a menopausa, são submetidas a uma drástica redução da produção de hormônios femininos, um dos fatores intrínsecos do envelhecimento da pele. Essa redução nos níveis hormonais conduz ao “envelhecimento dérmico mediado por hormônios”, uma vez que o estrogênio endógeno tem a capacidade de estimular a produção dos componentes estruturais da derme quando em níveis normais (ZULLI *et al.*, 2001).

Os antioxidantes, de um modo geral, são usados como componentes ativos contra o envelhecimento dérmico induzido por radiação ultravioleta. Os componentes ativos usuais são, em geral alfa-hidroxi ácidos e ácido retinóico. No entanto, estas substâncias podem produzir efeitos colaterais como tensão e irritação na pele. Outra tentativa para prevenir o envelhecimento da pele é o uso de substâncias que influenciam a regulação da síntese dos componentes estruturais da derme. Os compostos que são adequados para essa finalidade são substâncias que promovam a síntese dos componentes estruturais ou que reduzam sua degradação. O estrogênio ou compostos com similaridade estrutural com esse hormônio, como as isoflavonas da soja, enquadram-se nesse perfil.

Tem sido relatado que a terapia de reposição hormonal, a qual consiste na administração oral de estrogênios, pode manter a espessura e a elasticidade da pele de mulheres na menopausa. Terapias com aplicação externa de estrógenos, também obtêm sucesso contra o súbito envelhecimento da pele após a menopausa. Entretanto, o constante uso de estrógenos ocasiona um aumentado risco de câncer de mama e de útero, efeito que, acredita-se, não ocorrer com o uso de isoflavonas (KATZENELLENBOGEN *et al.*, 1996; CAPPELLETTI *et al.*, 2003).

Estudos com culturas de células demonstram que a aglicona é a forma ativa, que estimula a síntese de colágeno (VARANI *et al.*, 2004) e reduz a produção de enzimas que o decompõem, as metaloproteinases matriciais (BROBERG *et al.*, 1996; ZULLI *et al.*, 2001).

Na aplicação tópica é de crucial importância a forma na qual as isoflavonas serão administradas. Os heterosídeos de isoflavonas não possuem qualquer efeito farmacológico. Quando administrados oralmente exercem efeito estrogênico devido à clivagem dos açúcares por enzimas da flora bacteriana intestinal. Na pele não existem enzimas hidrolíticas, desse modo, para a aplicação tópica, a forma de aglicona deve ser empregada. Apenas as agliconas, por serem apolares, conseguem penetrar até as camadas profundas da pele, ultrapassando a barreira lipídica da epiderme (ZULLI *et al.*, 2001), podendo, assim, interagir com os receptores de estrogênio e inibir a atividade das enzimas envolvidas (FUKUTAKE *et al.*, 1996) com a promoção do envelhecimento cutâneo.

3.2.5 Atividade inibidora de proteínas tirosina-quinase

A atividade inibidora de proteínas tirosina-quinase das isoflavonas vem sendo investigada por alguns pesquisadores. Estudos, *in vivo* e *in vitro*, foram conduzidos com a intenção de avaliar essa atividade biológica apresentada pela genisteína (WEI *et al.*, 2002; KANG *et al.*, 2003).

Estudo *in vitro* submeteu queratinócitos humanos à exposição à radiação UVB, após terem sido incubados com doses crescentes de genisteína, por um período de duas horas. Observou-se a inibição da fosforilação de EGF-R (receptores de fator de crescimento epidérmico) e das MAP-quinases quando a genisteína estava presente no meio celular. Acredita-se que a fosforilação de EGF-R e a ativação das MAP quinases provoque a estimulação dos fatores de transcrição nucleares, ativando as metaloproteinases matriciais responsáveis pela degradação da matriz dérmica (WEI *et al.*, 2002). Dessa maneira, a inibição da fosforilação destes receptores e destas enzimas poderia atenuar, ou até mesmo impedir a degradação do colágeno cutâneo.

WEI e colaboradores, no ano de 2002, analisaram a atividade da genisteína no mecanismo molecular através do qual a radiação UV promove o fotoenvelhecimento. Foi observado que a genisteína, em concentração de 1 %, administrada topicamente na pele dos voluntários 24 horas antes da exposição à luz UV, inibiu em 98 % a fosforilação e ativação de EGF-R. Esse resultado era esperado, tendo em vista a atividade tirosina-quinase intrínseca desse receptor e a potente atividade inibidora da tirosina-quinase apresentada pela genisteína. A propriedade da genisteína de bloquear a fosforilação dos EGF-R pode também ter a influência da inibição da inativação da tirosina-fosfatase. Esta última é uma enzima que antagoniza a atividade da tirosina-quinase e é inativada pela ação das EROs produzidas em função da exposição à radiação ultravioleta. Em virtude de sua atividade antioxidante a genisteína impede a inativação dessa enzima (KANG *et al.*, 2003).

Neste mesmo estudo, foi observado que o tratamento com genisteína, previamente à exposição à radiação UV, inibiu a indução das MAP quinases, em especial a proteína ERK. A fosforilação da MAP quinase JNK, também foi fortemente

inibida. A inibição dessas MAP reduziu de forma significativa a indução da proteína cJun, a qual é essencial para a ativação do fator de transcrição AP-1 (WANG *et al.*, 1998).

O complexo AP-1 formado por cJun e cFos estimula a transcrição dos genes de várias metaloproteinases matriciais (MMPs), como, por exemplo, a colagenase e a gelatinase (92 kDa), responsáveis pela degradação do colágeno e outros componentes da matriz extracelular dérmica (FISHER *et al.*, 1997). A genisteína, por inibir a indução de cJun, acaba evitando a ativação de AP-1, bloqueando, então, a indução dos RNAs das MMPs, por exemplo a colagenase-1, inibindo a degradação do colágeno e, prevenindo, assim, o fotoenvelhecimento cutâneo (KANG *et al.*, 2003).

3.2.6 Atividade antioxidante

O consumo de soja e o uso tópico de extratos contendo genisteína também parecem proteger contra a oxidação do DNA em células humanas (WEI *et al.*, 2002).

Apesar do grande número de estudos existentes sobre a atividade antioxidante de muitos isoflavonóides através da análise de parâmetros indiretos como a inibição de danos oxidativos a lipídios, proteínas e DNA, o mecanismo antioxidante pelo qual as isoflavonas agem não está completamente elucidado. Em estudo realizado por GUO e colaboradores (2002), em células endoteliais de cordão umbilical humano, foi testada a eficácia da genisteína, e de outras isoflavonas, em doses de até 1,00 mM, na captura de várias EROs, como, por exemplo, dos radicais hidroxila, superóxido e óxido nítrico. Nem a genisteína nem as demais isoflavonas testadas demonstrou atividade direta significativa como *scavenger* desses radicais. Esta observação leva a crer que o mecanismo principal pelo qual a genisteína possui ação antioxidante não deve ser pela captação de radicais livres (GUO *et al.*, 2002). Outros pesquisadores também concluíram que as isoflavonas, de um modo geral, possuem fraca atividade de *scavenger* quando comparadas a outros compostos polifenólicos, como a quercetina, a epicatequina e o α -tocoferol (ZHANG *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2004).

Considerando que o anel B é o sítio ativo da atividade captadora de radicais livres dos flavonóides e isoflavonóides, quanto maior o número de hidroxilas neste

anel maior é o potencial de redução desses compostos, e conseqüentemente maior a atividade antioxidante (HEIJNEN *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2002). Sendo assim, moléculas como as isoflavonas, que contêm um grupo 4'-monoidroxila no anel B (fenol), são *scavengers* menos potentes do que compostos diidroxilados (catecol), sendo que a ação desse acontece, provavelmente, através da formação de um radical fenoxila (PANNALA *et al.*, 2001). RECORD e colaboradores (1995), em estudo acerca da oxidação de lipossomas multilamelares constituídos por fosfatidilcolina, observaram que a genisteína pode apresentar maior atividade de *scavenger* quando o radical em questão é o peróxido de hidrogênio. Verificou-se que a oxidação dos lipossomas, em presença de genisteína, foi reduzida em 50 % quando expostos à radiação UVA e UVB ou a outros sistemas em que o peróxido de hidrogênio era o agente oxidante.

Outra hipótese para a elucidação da atividade antioxidante das isoflavonas reside na habilidade destas moléculas em estabilizar membranas pela diminuição de sua fluidez. ARORA e colaboradores (2002) sugerem que as isoflavonas, assim como o colesterol e α -tocoferol, sejam capazes de se distribuir no interior hidrofóbico das membranas celulares, levando a uma drástica diminuição na fluidez dessa região da membrana. Essa rigidez ocasionada pela inserção dessas moléculas na bicamada lipídica impede, estericamente, a difusão de radicais livres e, assim, diminui a cinética das reações promovidas por esses compostos.

Quando aplicada topicamente sobre a pele, a genisteína também demonstra ação contra o estresse oxidativo ocasionado pela exposição à radiação UV. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é gerado, na pele, como uma resposta aguda à radiação UVB. A aplicação tópica, em camundongos, de 10 μ mol de genisteína 1 hora antes da exposição, inibiu em mais de 50 % a produção de H_2O_2 induzida por UVB. Esta inibição pode ser devida a sua atividade *scavenger* de H_2O_2 ou pela inibição do recrutamento de células inflamatórias (WEI *et al.*, 2002).

O malondialdeído (MDA) é tradicionalmente usado como marcador biológico para o dano oxidativo da radiação UV. É formado, em humanos e animais, como produto da peroxidação lipídica das membranas celulares e acumula-se na pele ao longo das exposições à luz solar. Portanto, reflete os efeitos crônicos da radiação UV (BOKOV *et al.*, 2004). WEI e colaboradores (2002) observaram que a aplicação

de 10 μmol de genisteína inibiu a formação de MDA, de forma moderada, em camundongos submetidos à exposição crônica à radiação UV.

Experimentos com a finalidade de avaliar o efeito da genisteína nos danos oxidativos causados pela radiação UVB no DNA, também vêm sendo conduzidos. O marcador biológico tradicionalmente empregado para esse tipo de estudo é a 8-OHdG (8-hidróxi-desóxi-guanosina). As lesões mais graves em nível de DNA são ocasionadas por reações que geram 8-OHdG, pois as bases originais são substituídas por esse constituinte (WEI *et al.*, 2002; BOKOV *et al.*, 2004). A exposição crônica à radiação UVB, além de aumentar os níveis de 8-OHdG na pele, também leva a um aumento nos níveis dessa base oxidada em órgãos vitais, como o cérebro, fígado e baço. Em um estudo realizado por WEI e colaboradores, em 2002, foi relatado que a aplicação tópica de 10 μmol de genisteína foi suficiente para reduzir, substancialmente, a formação de 8-OHdG na epiderme, no cérebro, fígado e baço dos camundongos expostos, subaguda e cronicamente, à radiação UVB (WEI *et al.*, 2002).

A capacidade de estimular enzimas antioxidantes na pele também pode ser observada pela administração oral de genisteína. Estudos demonstram aumento significativo na atividade das enzimas glutathione-redutase e glutathione-S-transferase na pele de camundongos tratados por 30 dias com genisteína pela via oral (WEI *et al.*, 1995; GUO *et al.*, 2002).

3.2.7 Atividade Estrogênica

Os hormônios sexuais, como os estrógenos, têm grande influência no processo de envelhecimento, uma vez que a redução desses hormônios leva à alterações nas atividades celulares sob seu controle. Uma dessas atividades é a síntese de colágeno, elastina e ácido hialurônico nos fibroblastos (URANO *et al.*, 1995; SATOR *et al.*, 2004). A administração oral e tópica de estrógenos, por meio de terapia de reposição hormonal, tem mostrado efeitos benéficos sobre a pele envelhecida de mulheres no climatério (SATOR *et al.*, 2004). Observa-se uma diminuição do ressecamento cutâneo, da atrofia dérmica e no aparecimento de rugas (SCHIMDT *et al.*, 1996; DUNN *et al.*, 1997).

GENDIMENICO e colaboradores (2002) demonstraram que a administração tópica de hormônios naturais na pele de camundongos normal e protegida do sol resultou em aumento da espessura da pele desses animais. Esse aumento é, provavelmente, devido ao acúmulo de água resultante do aumento na síntese de ácido hialurônico (AH) promovido pelos hormônios. Como já descrito, esse glicosaminoglicano possui uma grande capacidade de retenção hídrica, de onde decorre a limitação do uso de hormônios normais devido à hidratação excessiva da pele, que pode determinar o aumento de sua espessura, chegando a caracterizar um edema.

As isoflavonas, pertencendo à classe de fitoestrógenos, são também capazes de produzir efeitos similares aos estrógenos fisiológicos no corpo humano (ADLERCREUTZ, 1999; TAPIERO *et al.*, 2001). Os fitoestrógenos são moléculas planares não-esteroidais que apresentam um caráter estrutural semelhante ao do potente estrógeno 17 β -estradiol, principalmente em relação às características do anel fenólico e da distância entre os grupamentos 4"- e 7-hidróxi (figura 3), sendo que essas características são importantes para a ligação aos receptores estrogênicos (TAPIERO *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2003). Essas moléculas, ao se ligarem aos receptores, podem produzir efeitos agonistas ou antagonistas fracos, dependendo de sua concentração, do estado do receptor, da disponibilidade de estrógenos endógenos e do órgão-alvo (TAPIERO *et al.*, 2001).

Os receptores estrogênicos (ER) em ratos, camundongos e humanos existem na forma de dois subtipos, ER- α e ER- β (KUIPER *et al.*, 1998, HUNTLEY *et al.*, 2003). O receptor ER- β é vastamente distribuído na pele humana, sendo o principal receptor estrogênico expresso na epiderme e nos fibroblastos e queratinócitos dérmicos (THORNTON *et al.*, 2003; SATOR *et al.*, 2004). Dentre as isoflavonas, a genisteína possui atividade agonista em ambos receptores estrogênicos (KUIPER *et al.*, 1998; CHIECHI *et al.*, 2002; HUNTLEY *et al.*, 2003), sendo que sua afinidade de ligação é 20 vezes maior por receptores β do que por receptores α , e sua potência estrogênica relativa em ER- β é 30 vezes maior do que em ER- α . Sendo assim, a genisteína exibe maior afinidade e potência nos receptores estrogênicos do tipo β (KUIPER *et al.*, 1998; CHIECHI *et al.*, 2002; HUNTLEY *et al.*, 2003).

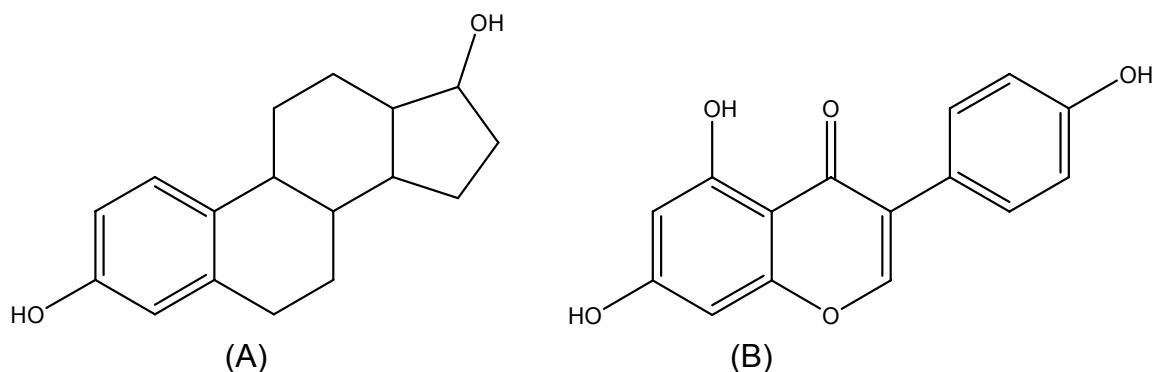


Figura 3. Similaridade estrutural entre estradiol (A) e genisteína (B) (Programa ChemDraw Ultra 8.0, 2003).

Dentre as respostas estrogênicas desencadeadas pela genisteína, o estímulo da síntese de colágeno atrai, para essa isoflavona da soja, grande interesse na área cosmética antienvhecimento (ZÜLLI *et al.*, 2001). VARANI e colaboradores (2004) observaram um aumento significativo na síntese de pró-colágeno através do tratamento de uma cultura de fibroblastos com extrato de soja rico em genisteína.

MIYAZAKI e colaboradores (2002) examinaram o efeito da genisteína e de seu glicosídeo, genistina, na produção de ácido hialurônico numa cultura de queratinócitos humanos transformados e na pele dorsal de camundongos nus. A produção de ácido hialurônico na cultura de queratinócitos foi estimulada significativamente e de forma dose-dependente pela genisteína. A aplicação de genisteína por duas semanas aumentou significativamente o conteúdo de ácido hialurônico na pele dos camundongos. Contudo, foi observado que a potência das isoflavonas genisteína e daidzeína em estimular a síntese de ácido hialurônico é de aproximadamente 1000 e 5000 vezes menor que a do estradiol, respectivamente. A genisteína age como agonista fraco nos receptores de estradiol, na estimulação da produção de ácido hialurônico nos queratinócitos humanos e na pele dos camundongos, sendo que essa estimulação está associada a um aumento na expressão do RNAm da enzima hialuronan sintetase (MIYAZAKI *et al.*, 2002, MIYAZAKI *et al.*, 2003). Nestes estudos, não foi observado o estímulo na produção de AH pela genistina, forma conjugada com um açúcar. Esse resultado pode ser explicado pela fraca atividade da β -glicosidase, enzima responsável pela hidrólise dos glicosídeos, e/ou pela baixa absorção dos glicosídeos nos queratinócitos humanos e na pele dos camundongos (MIYAZAKI *et al.*, 2002).

Assim, os achados relatados na literatura por MIYAZAKI e colaboradores (2002, 2003 e 2004) demonstram que a aplicação tópica das isoflavonas genisteína e daidzeína, em suas formas livres, promove um aumento na síntese de AH, o qual se reflete em uma melhora na hidratação cutânea e no discreto aumento na espessura da epiderme, associado a um aumento na elasticidade da pele.

VÄNTINEN E MORAVCOVA, em 2001, estudaram a absorção transdérmica da genisteína e de outra isoflavona a daidzeína. O estudo consistia na aplicação tópica de uma suspensão das duas isoflavonas em óleo de oliva e posterior análise do plasma, urina e fezes. Uma quantidade equivalente a 10 mg de genisteína foi aplicada nos indivíduos. Foi encontrada no plasma uma concentração de $32,5 \times 10^3$ ng. L⁻¹.

3.3 Hidrogéis de Hidróxi-propilmetilcelulose (HPMC)

A influência dos veículos utilizados nas formulações tópicas sobre quantidade e extensão permeada de uma substância através da pele é bem conhecida. As possibilidades do uso tópico dependem do perfil de penetração da substância ativa ao longo das camadas da pele (GETIE *et al.*, 2002). No caso de substâncias de alta permeabilidade, a velocidade de penetração pode ser controlada pelo emprego de um veículo adequado. Nestas circunstâncias, a difusão da substância ativa na formulação é a etapa limitante e as características de barreira do estrato córneo perdem a importância (ZATZ, 1995; RANGARAJAN E ZATZ, 2003).

Tecnologicamente, os géis apresentam vantagens em relação aos outros tipos de formulação no que diz respeito à produção, ao envase e à aplicação. Proporcionam um aspecto mais agradável e de maior aceitabilidade ao consumidor, além da sua facilidade de administração e baixo custo de produção. Além disso, atualmente, grande parte das substâncias ativas veiculados em líquidos, cremes pomadas podem ser incorporados em géis (BARREIRO-IGLESIAS *et al.*, 2001).

Os géis hidrofílicos têm sido muito utilizados como bases dermatológicas, pois possuem boa espalhabilidade, não são gordurosos e podem veicular várias substâncias ativas hidrossolúveis e lipossomas. A hidróxi-propilmetilcelulose (HPMC) pertence à família dos polímeros hidrofóbicos não-iônicos e é amplamente empregada em formulações destinadas à administração oral e tópica (EL KATTAN

et al., 2000). Sua fácil manipulação é complementada pelo baixo custo, capacidade de gelificação e produção de géis viscosos e demonstrar grande capacidade de gelificação quando em meio aquoso. Possui vários derivados disponíveis que variam em viscosidade, massa molecular, e grau de substituição.

Tecnicamente, o coeficiente de partilha de uma substância de baixa hidrossolubilidade, como a genisteína, entre o hidrogel e o estrato córneo favorece a migração da mesma para o último caracterizando uma boa “cedência” para a pele.

Do ponto de vista de tolerância fisiológica a HPMC não provoca irritação na pele e não existem evidências de toxicidade relacionada a este polímero (WADE E WELLER, 1995).

3.4 Promoção da penetração cutânea

De acordo com a lei de Fick, existem duas estratégias básicas de promoção da penetração de fármacos: pelo aumento do coeficiente de difusão ou por modificação da solubilidade do fármaco (MOSER *et al.*, 2001).

O conceito de promotores químicos de penetração classifica-os como adjuvantes capazes de reduzir a habilidade do fármaco em interagir com os constituintes estruturais da pele, de forma a aumentar seu transporte através das camadas epiteliais (LOFTSSON E MÁSSON, 2001). A teoria de partição (*lipid-protein-partitioning theory* – LPP) formalizada por BARRY, em 1991, considera que os promotores, usualmente, agem por um ou mais dos seguintes mecanismos: alterando os domínios lipídicos intercelulares, interagindo com as proteínas intracelulares, em especial a queratina, ou, ainda, por efeito de cossolvência, resultando numa maior capacidade de solubilização e partição dos fármacos ao longo das camadas da pele.

Vários promotores de penetração são comumente associados a formulações, com o intuito de aumentar a permeabilidade das moléculas bioativas. Por exemplo, etanol, álcoois graxos, ácidos graxos insaturados, aminas e amidas (LOFTSSON E MÁSSON, 2001), terpenos, tensoativos e, mais recentemente, ciclodextrinas (CHATTARAJ E WALKER, 1995; LOFTSSON *et al.*, 1998; MÁSSON *et al.*, 1999), lipossomas (VERMA *et al.*, 2003) e nanopartículas (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004).

Estas substâncias e estruturas auxiliam na penetração de moléculas através da pele por aumentarem a fluidez das membranas biológicas ao alterar sua estrutura lamelar (BARRY, 2001; LOFTSSON E MÁSSON, 2001).

A escolha de um promotor ideal deve considerar características tais como a toxicidade, o grau de irritação cutânea, estabilidade química na formulação e, principalmente, a reversibilidade dos efeitos sobre a pele (CHATTARAJ E WALKER, 1995; LOFTSSON E MÁSSON, 2001).

O incremento da solubilidade do fármaco no veículo leva uma condição de supersaturação, que pode potencializar a sua permeação através da pele, provavelmente por mantê-lo na sua atividade termodinâmica máxima (WILLIAMS E BARRY, 1989). A elevação do grau de saturação pode ser alcançada pelo simples aumento da concentração ou pela diminuição da solubilidade do fármaco no veículo (MOSER *et al.*, 2001). Entretanto, essas formulações são consideradas instáveis, e há a possibilidade da ocorrência da cristalização do fármaco. A estabilidade dessas formulações supersaturadas pode ser incrementada pela adição de certos polímeros como a hidróxi-propilmetilcelulose (HPMC) (HADGRAFT, 2001; MOSER *et al.*, 2001).

O grau de hidratação do estrato córneo também exerce influência sobre o fluxo das moléculas permeantes. A água presente no meio associa-se às cabeças polares dos lipídeos, resultando no aparecimento de uma bolha de hidratação, o que acaba por aumentar o volume disponível para a permeação, incrementando a fluidez lipídica. O domínio hidrofílico também é afetado pela presença de água, uma vez que, nesse processo, existe competição entre as moléculas de água e as moléculas permeantes pela ligação com os hidrogênios. Essa competição permite o aumento da mobilidade e difusão do fármaco através do estrato córneo (BARRY, 2001).

Além da hidratação cutânea, outro fator considerado é a inserção dos promotores nas regiões aquosas das bicamadas lipídicas, permitindo o estabelecimento de um coeficiente de partição adequado à penetração cutânea. Este efeito seria semelhante à ação de um co-solvente, como por exemplo, o efeito do propilenoglicol, do dimetilsulfóxido e do etanol (BARRY, 2001).

Outra possibilidade de atuação dos promotores de penetração é a sua inclusão entre as cadeias apolares dos lipídios do estrato córneo. Dessa maneira, os promotores acarretam uma desorganização na bicamada lipídica, diminuindo a viscosidade do meio, o que favorece a difusão do fármaco (BARRY, 2001).

3.5 Ciclodextrinas

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, amplamente utilizados como adjuvantes farmacêuticos. São obtidos a partir da degradação do amido pela ação da enzima ciclodextrinaglicosiltransferase (CGTase) produzida pelo microrganismo *Bacillus macerans* (LOFTSON E MÁSSON 2001; DEL VALLE, 2003). As principais ciclodextrinas naturais são α -, β - e γ -, as quais possuem seis, sete e oito unidades de glicose, respectivamente. Não existem ciclodextrinas com menos de seis unidades de glicose, mas podem ser encontradas moléculas com até quinze unidades de açúcar. Para formar o ciclo, as moléculas de glicose unem-se por ligações α -1-4. Sendo assim, não podem ser degradadas pelas enzimas intestinais humanas e são, absorvidas, minimamente, quando administradas por via oral (LOFTSSON *et al.*, 1996; BIBBY *et al.*, 2000).

Devido à conformação cadeira das unidades de glicose, as ciclodextrinas têm um formato de um cone truncado, originando um cilindro (LOFTSSON E MÁSSON, 2001). A estrutura cilíndrica desses polissacarídeos, com as hidroxilas voltadas para o exterior da molécula, confere à estrutura um exterior hidrofílico (LOFTSSON *et al.*, 1996). A cavidade central é delineada por um esqueleto de carbonos e oxigênios etéreos, que lhe conferem um caráter lipofílico (LOFTSSON E MÁSSON, 2001). Assim, as ciclodextrinas têm a habilidade de abrigar moléculas pouco solúveis em água, no interior da cavidade central, incrementando a hidrossolubilidade de diversas substâncias, sejam sólidas, líquidas ou gasosas (LOFTSSON *et al.*, 1996; SZETJLI, 1998).

A formação de um complexo ocorre quando moléculas de água de grande entalpia deixam a cavidade hidrofóbica da ciclodextrina para dar lugar a moléculas mais apolares presentes em solução, resultando numa associação apolar-apolar e diminuir a tensão do anel da ciclodextrina, alcançando um estado mais estável, de menor energia (SZETJLI, 1998). A manutenção das moléculas hóspedes no interior

da cavidade acontece por meio de interações de van der Waals, interações hidrofóbicas, liberação da estrutura distendida e mudanças na tensão superficial. Estas ligações não-covalentes estão envolvidas na formação de complexos de inclusão. Moléculas localizadas na cavidade estão em equilíbrio dinâmico com moléculas livres em solução, fora da cavidade (LOFTSSON E BREWSTER, 1996; SZETJLI, 1998).

A formação de complexos de inclusão pode trazer inúmeras vantagens tecnológicas. Não só aumenta a concentração em água da molécula hóspede, como também pode resultar em melhor estabilidade frente à luz e ao oxigênio, e melhor biodisponibilidade de uma gama de fármacos, sem alterar a estrutura química ou suas propriedades farmacológicas (LOFTSSON *et al.*, 1996). A estabilização de moléculas lábeis pode ser observada frente aos efeitos degradativos da oxidação, pela luz visível ou ultravioleta, do calor, ou efeitos de volatilização e sublimação (LOFTSON E MÁSSON, 2001; DEL VALLE, 2003).

As ciclodextrinas também têm sido empregadas no isolamento físico de compostos incompatíveis, em separações cromatográficas, no mascaramento de sabores e odores desagradáveis e na liberação controlada de fármacos e substâncias que conferem sabor (LOFTSON E MÁSSON, 2001; DEL VALLE, 2003). Sendo assim as ciclodextrinas são usadas em alimentos (SZEJTLI E SZENTE, 2004 E 2005), medicamentos (KOESTER *et al.*, 2003; KINNARINEN *et al.*, 2003) e na indústria têxtil (HEDGES, 1998).

As ciclodextrinas naturais (CDs), em particular a β -ciclodextrina (β CD), têm limitada solubilidade em água, isso pode ser devido à ligação relativamente forte das moléculas de CD no estado cristalino. Em adição, a β CD forma ligações de hidrogênio intramoleculares entre as hidroxilas secundárias, que reduzem o número de OH capazes de fazer pontes de hidrogênio com as moléculas de água do meio. Dessa característica de baixa solubilidade decorre a precipitação dos complexos sólidos resultantes da associação de ciclodextrinas e moléculas lipofílicas (SZEJTLI, 1988). Como estratégia para elevar a solubilidade das ciclodextrinas naturais, bem como prover outras propriedades convenientes, vários derivados têm sido sintetizados. Estes derivados são normalmente produzidos por reações de substituição nas hidroxilas primárias e secundárias, seja por aminação, esterificação

ou eterificação. Essas substituições acabam por alterar o volume da cavidade hidrofóbica desses derivados, mantendo sua habilidade em aumentar a solubilidade, estabilidade frente à luz ou oxigênio e ajudar no controle da atividade química das moléculas hóspedes (DEL VALLE, 2003).

3.5.1 Ciclodextrinas no transporte transdérmico

O transporte transdérmico de moléculas bioativas é significativamente limitado pelas características de permeação particulares do estrato córneo e é freqüentemente insuficiente para o uso terapêutico. Assim sendo, várias alternativas para aumentar a absorção tópica vêm sendo empregadas. O incremento da liberação de moléculas bioativas através da pele pode ocorrer por meio de quatro possibilidades: (1) aumento da liberação do fármaco a partir de preparações transdérmicas, (2) aumento do fluxo do fármaco através da pele ou a retenção destas na pele; (3) aumento da liberação tópica ou localizada na pele ou tecidos alvo; (4) uma combinação das três anteriores (MATSUDA E ARIMA, 1999).

Existem diversos estudos acerca dos efeitos das ciclodextrinas na disponibilidade tópica de fármacos. Estes estudos mostram que, dependendo da composição do veículo, as ciclodextrinas podem tanto aumentar quanto reduzir a permeabilidade de substâncias através de barreiras biológicas sem causar mudanças físico-químicas na barreira cutânea (RAJEWSKI E STELLA, 1996; MASSON *et al.*, 1999; STELLA *et al.*, 1999).

As moléculas de ciclodextrinas são relativamente grandes (MM 1000-2000) e penetram a pele intacta somente com grande dificuldade. Em geral, as ciclodextrinas só podem aumentar a liberação de moléculas bioativas, administradas topicamente em meio aquoso, graças ao equilíbrio dinâmico que ocorre entre os complexos e as moléculas de água do meio (TANAKA *et al.*, 1995; RAJEWSKI e STELLA, 1996). As ciclodextrinas podem solubilizar substâncias lipofílicas em sistemas aquosos e liberar a molécula hóspede para a superfície do estrato córneo (LOFTSSON e MÁSSON, 2001). Alguns promotores de penetração, que reduzem as propriedades de barreira do estrato córneo, podem estimular a penetração de ciclodextrinas hidrofílicas através da pele (ARIMA *et al.*, 1990b). Dessa maneira, acredita-se que as CDs atuem como carreadores de substâncias lipofílicas complexadas em

solução, por torná-las mais disponíveis na superfície cutânea, uma vez que a dissolução de substâncias insolúveis é um pré-requisito para sua penetração e/ou absorção. Ao agir como carreadores, acabam por incrementar a penetração de diversos fármacos lipofílicos (LOFTSSON *et al.*, 1998; MÁSSON *et al.*, 1999).

Outra hipótese levantada é que as ciclodextrinas sejam capazes de complexar o colesterol presente nas membranas biológicas, já que são capazes de interagir com alguns componentes lipofílicos da pele. Por exemplo, soluções tampão de β CD, β CD randomicamente metilada (RM β CD), hidróxi-propil- β CD (HP β CD) têm se mostrado capazes de extrair lipídios do estrato córneo (LEGENDRE, 1995) desorganizando a estrutura desta camada da pele. Relacionada à capacidade de extração de lipídios, foi relatado que as ciclodextrinas podem causar alguma irritação na pele quando em grandes quantidades (IRIE E UEKAMA, 1997). Ao formar complexos de inclusão com o colesterol, constituinte da membrana plasmática, as ciclodextrinas afetam a estrutura da bicamada lipídica, aumentando, assim, a fluidez da membrana o que facilitaria a penetração de substâncias. Entretanto, outras investigações revelam que os lipídios da pele podem competir com as moléculas hóspedes ou constituintes do veículo pela cavidade central das ciclodextrinas (LOFTSSON E MÁSSON 2001).

As ciclodextrinas lipofílicas, como a dimetil- β CD (DM β CD) e a RM β CD, são provavelmente absorvidas, mas ainda assim a absorção é negligenciável. De uma maneira geral, os derivados de ciclodextrinas utilizados em formulações destinadas à via tópica incluem HP β CD, RM β CD, sulfobutileter β CD (SBE β CD), maltosil- β CD (ML β CD) e a 2-hidroxipropil- γ CD (HP γ CD). Estes derivados são mais hidrossolúveis que as ciclodextrinas naturais (α -, β - e γ CD), que também podem ser aplicadas em formulações tópicas (LOFTSON E MASSON, 2001).

As vantagens oferecidas pelas CDs têm atraído o interesse para a utilização das ciclodextrinas como adjuvantes farmacêuticos. A utilidade das três CDs naturais na liberação transdérmica tem sido relatada além de sua contribuição à estabilidade e aumento da liberação e biodisponibilidade, na atenuação da irritação local (MATSUDA E ARIMA, 1999).

A instabilidade de alguns fármacos pode dificultar a sua penetração através do estrato córneo. A formação de complexos com CDs auxilia na estabilização desses fármacos por desacelerar sua degradação nas preparações de uso tópico. Vários relatos confirmam o efeito das CDs na estabilização de substâncias. Outro ponto positivo da utilização de CDs na formulação formas farmacêuticas ou produtos cosméticos destinados à via tópica é a capacidade de melhorar a farmacocinética e farmacodinâmica de substâncias bioativas na liberação dérmica (MATSUDA E ARIMA, 1999).

Os efeitos das CDs na taxa de permeação de moléculas bioativas através da pele podem ser medidos pela atividade termodinâmica no veículo e pelo coeficiente da partição entre pele e veículo. O conceito de atividade termodinâmica descrito por Higuchi¹ representa a tendência de escape dos fármacos, e se supõe que o aumento desta atividade leva ao aumento da taxa de permeação através da pele. Além disso, a atividade termodinâmica é proporcional à solubilidade do fármaco no veículo e se torna máxima somente na solução saturada (ARIMA, 1999).

A literatura também refere a relação entre o efeito promotor de penetração das CDs com a sua concentração nas preparações. Na medida em que se aumenta a concentração de CDs nas formulações, observa-se uma redução no fluxo da permeação de substâncias bioativas. Esta redução pode ser explicada pela formação de mais complexos no veículo, os quais não são absorvidos (SIGUROARDOTTIR E LOFTSSON, 1995).

Assim, estas observações sugerem que, em determinadas concentrações, as CDs exercem principalmente efeito promotor na permeação de fármacos lipofílicos como corticóides e AINES através da pele, pelo incremento da atividade termodinâmica do fármaco em veículos aquosos, e que a adição de mais ciclodextrina pode diminuir a taxa permeação de fármacos lipofílicos pela formação de mais complexos não absorvíveis. Adicionalmente, neste último caso, deve-se atentar para a possibilidade de adição de materiais terciários ao veículo que possam

¹ HIGUCHI, T. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. **Journal of Society of Cosmetic Chemistry**, v. 11, p. 85-97, 1960 *apud* MATSUDA, H.; ARIMA, H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, p. 81-99, 1999.

apresentar efeitos promotores na liberação de fármacos a partir do veículo (MATSUDA E ARIMA, 1999) ou para a mudança da base para a formulação.

As CDs podem afetar a permeabilidade de fármacos através da pele via interação com alguns componentes da pele. O pré-tratamento da pele com RM- β -CD em solução aquosa é capaz de incrementar a permeabilidade da pele, sugerindo que a RM- β -CD interage com componentes da pele e tem implicações diretas na difusão da substância bioativa (LEGENDRE *et al.*, 1995).

As CDs também podem ser empregadas como co-promotores na penetração dérmica. Sua combinação com outras CDs ou outros promotores de penetração pode ser útil na liberação de fármacos hidrofílicos. ADACHI e colaboradores (1992) relatam o aumento da penetração de PGE₁ através da pele quando a formulação continha o complexo desta prostaglandina com carboximetil- β -CD (CME- β -CD) associado com outro promotor de penetração HPE-101. Essa associação proporcionou uma ação mais prolongada, quando comparada à administração intravenosa. Isto sugere que a CME- β -CD e HPE-101 atuaram sinergicamente e facilitaram a entrada da PGE₁ na pele e, conseqüentemente, aumentaram o potencial terapêutico na preparação para uso tópico. Outros estudos também demonstraram esse efeito sinérgico das CDs com outros promotores de penetração no incremento da penetração de peptídeos e proteínas, além de outros fármacos (ADACHI *et al.*, 1992; LEGENDRE *et al.*, 1995).

Geralmente, as CDs hidrofóbicas e seus complexos são pouco absorvidos através da pele, isto é, apenas uma pequena fração livre da substância bioativa, que está em equilíbrio com a fração complexada, pode estar disponível para absorção percutânea. Entretanto, ARIMA e colaboradores (1990) relataram que DM- β -CD e HP- β -CD são capazes de permear a pele, particularmente quando aplicadas sob condições oclusivas. VOLLMER e colaboradores (1993) demonstraram que a HP- β -CD se distribui homogeneamente pela epiderme e derme depois da aplicação de uma solução aquosa contendo HP- β -CD sobre a pele de ratos sob condições não oclusivas. Estes resultados sugerem que, pelo menos, a HP- β -CD afeta a transferência de fármacos através da pele via absorção na forma de complexo. Sendo assim, o comportamento de absorção dérmica das CDs propriamente ditas

parece ser controverso, demonstrando que o esclarecimento da absorção dérmica das CDs necessita ser mais estudada (MATSUDA E ARIMA, 1999).

Outra vantagem apresentada pelo uso de CDs na formulação de formas farmacêuticas destinadas à aplicação tópica na pele é a capacidade de aliviar a irritação cutânea ocasionada por determinadas substâncias bioativas. Isso se torna possível graças à redução da quantidade de substâncias bioativas livres resultante do equilíbrio de inclusão. Observações gerais e histológicas revelam que o potencial fotosensibilizante da clorpromazina teve redução significativa com o uso tópico simultâneo de β CDs. O alívio ocasionado pela aplicação das CDs sobre a pele pode ser explicado pela supressão da penetração da clorpromazina para o interior das estruturas cutâneas via o reduzido coeficiente de partição fármaco/pele. A β CD também é capaz de atenuar a irritação cutânea induzida pela tretinoína e pela menadiona, respectivamente (AMDIDOUCHE, *et al.*, 1994).

No entanto, não se pode ignorar que as CDs, propriamente ditas, exibem uma certa irritação cutânea intrínseca. A explicação para essa ação irritante baseia-se no fato de as CDs extraírem alguns componentes estruturais cutâneos como o colesterol, fosfolipídeos e proteínas do estrato córneo. Como consequência, acabam por modificar a função de barreira do estrato córneo e, em virtude disso, a permeabilidade de fármacos e xenobióticos. Tem sido demonstrado que as CDs naturais em altas concentrações causam irritação na pele de porcos da Índia em ordem crescente γ -CD < α -CD < β -CD, característica largamente dependente das suas habilidades em extrair lipídeos do estrato córneo. Sendo este um dos mecanismos pelos quais as CDs promovem a penetração de fármacos, uma atenção particular deve ser dirigida à quantidade segura de CDs tendo em vista seus efeitos irritantes sobre a pele (MATSUDA E ARIMA, 1999).

Com relação aos derivados da β CD, experimentos envolvendo a análise dos efeitos da DM- β -CD e da HP- β -CD demonstraram que a primeira é capaz de extrair componentes de pele pulverizada e de pele de coelhos *in vitro* (OKAMOTO *et al.*, 1986). VOLLMER e colaboradores (1994) utilizando calorimetria diferencial exploratória (DSC) verificaram que a HP- β -CD praticamente não muda o perfil térmico do estrato córneo humano, mas o tratamento com DM- β -CD modificou,

consideravelmente, o perfil térmico do estrato córneo, sugerindo que a DM- β -CD interage com proteínas e desloca os ácidos graxos e o colesterol com subsequente desordenamento da estrutura de bicamada do estrato córneo. Um estudo mais recente de VITÓRIA e colaboradores (1997) revelou que 20,0 % w/v HP- β -CD causou remoção e possível desorganização dos lipídios da matriz que envolve os corneócitos do estrato córneo de ratos nus, entretanto nenhum efeito foi observado após o tratamento de amostras com 1,8 % w/v β -CD e 6,0% w/v γ -CD. Contrariando estes estudos, LEGENDRE e colaboradores (1995) reportaram que a PM- β -CD e HP- β -CD não afetaram o perfil de DSC e do espectro de infravermelho com transformada de Fourier do estrato córneo de ratos nus, embora a primeira tenha extraído todos os componentes lipídicos principais do estrato córneo e a última tenha especificidade pelo colesterol, triglicerídios e, em menor escala, por ésteres de colesterol. Além disso, estudos em humanos voluntários demonstram que as CDs têm uma margem de segurança significativa na aplicação dérmica. Assim, uma atenção especial deve ser dedicada ao fato de as CDs interagirem com os componentes do estrato córneo, especialmente quando grandes quantidades de CDs são aplicadas na pele (MATSUDA E ARIMA, 1999).

3.5.2 Uso de CDs em produtos cosméticos

Os cosméticos são, geralmente, armazenados em temperatura ambiente e são usados, diariamente, por longos períodos. Por esse motivo, altos padrões de segurança e de estabilidade das substâncias ativas e adjuvantes devem ser assegurados. Os cosméticos são usualmente constituídos por materiais oleaginosos (óleos, graxas, carboidratos, ácidos graxos de cadeia longa, álcoois de cadeia longa, ésteres e silicones, etc.), umectantes, polímeros, absorventes de luz UV, antioxidantes, agentes seqüestrantes, pigmentos e corantes, fragrâncias, etc. Considerando que a maioria dos cosméticos é pobre em substâncias hidrossolúveis, o uso de tensoativos e agentes solubilizantes são requeridos. Entretanto, o emprego de tensoativos pode trazer vários inconvenientes, dentre eles a irritação cutânea, turvação e formação de espuma. Assim, solubilizantes mais seguros bioadaptáveis e com características multifuncionais têm sido requeridos em cosméticos, e neste ponto surge a utilidade das CDs em produtos cosméticos (MATSUDA E ARIMA, 1999).

As HP-CDs, HP- α -CD, HP- β -CD e HP- γ -CD, derivados altamente solúveis e bioadaptáveis, foram estudados por na solubilização e liberação de fragrâncias. Todas reduziram grandemente a taxa de liberação das fragrâncias a partir de um meio aquoso, sendo que a HP- β -CD foi a mais eficiente em prolongar a liberação do perfume, sugerindo que apenas a fração livre da fragrância, que está em equilíbrio com a fração complexada, é liberada. As CDs proporcionam o incremento da solubilidade em água e a liberação sustentada de fragrâncias, enquanto reduzem a toxicidade em preparações líquidas de uso tópico com materiais fragrantes (TANAKA *et al.*, 1996²).

Alguns dos conservantes antimicrobianos adicionados aos produtos cosméticos podem ser tóxicos, se penetrarem a pele. Os parabenos são largamente utilizados como conservantes típicos em medicamentos, cosméticos e alimentos. Em geral, o prolongamento da cadeia alquila dos parabenos aumenta não somente sua ação anti-séptica, mas também a segurança clínica. Entretanto, o uso prático dos parabenos com longas cadeias alquila é limitado devido à baixa solubilidade em água. A HP- β -CD aumenta significativamente a solubilidade em água de pelo menos quatro tipos de parabenos (metil< etil< propil< butil ésters) (TANAKA *et al.*, 1995). Também pode ser observada redução na permeabilidade cutânea *in vitro* do metilparabeno através da pele de ratos nus e a permeabilidade do butilparabeno também foi reduzida pela presença de β -CD e DM- β -CD de forma dependente da concentração. A redução na penetração cutânea do butilparabeno pode ser explicada pelo cálculo do seu coeficiente de partição aparente, onde foi obtida correlação entre o coeficiente de partição e a fração livre estimada do butilparabeno baseada no equilíbrio de formação do complexo (OKAMOTO *et al.*, 1986).

Convenientemente, a bioconversão do butilparabeno em um metabólito menos tóxico, ácido p-hidróxi benzóico (PHB) na epiderme foi promovida pela adição de HP- β -CD. Quando o conservante é o metilparabeno, o efeito promotor da bioconversão, com a utilização da HP- β -CD, pode ser atribuído à reduzida taxa de permeação do metilparabeno pela formação de um complexo solúvel em meio

² TANAKA, M.; MATSUDA, H.; SUMIYOSHI, H.; *et al.* 2- Hydroxi-propylated cyclodextrins as a sustained release carrier for fragrance materials. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 44, p. 416-420, 1996 *apud* MATSUDA, H.; ARIMA, H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, p. 81-99, 1999.

aquoso, desde que o metilparabeno esteja suscetível à conversão enzimática na epiderme. No entanto, a formação de complexos estáveis da HP- β -CD com os parabenos acaba por diminuir sua atividade antimicrobiana, o que acaba por limitar sua utilização como agentes solubilizantes de parabenos (TANAKA *et al.*, 1995).

4.1 Materiais

4.1.1 Materias-primas

Genisteína, obtida do laboratório Sigma-Aldrich do Brasil Ltda., β -ciclodextrina, foi gentilmente fornecida pelo laboratório Roquette (França) e a HPMC (Methocel K100LV[®], DOW Chemical Company) fornecido gentilmente pela Blanver (Cotia, Brasil).

4.1.2 Aparelhos e equipamentos

Célula de difusão do tipo Franz, balança analítica AND[®] HM-202, aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu SCL-10, provido de bomba Shimadzu LC-10AD, controlador automático de fluxo Shimadzu SPD-10^A, detector espectrofotométrico Shimadzu LC-10, injetor automático, integrador LC10, coluna de aço inoxidável Phenomenex Synergi Fusion - RP 80 (250 x 4,60 mm, 4 μ), pré-coluna Fusion RP 4 x 3 mm, agitador do tipo vórtex CERTOMAT[®]MW B Braun Biotech International, agitador magnético de 15 pontos IKA[®] RO 15 Power Labor Technik, , banho de água IKA[®]-WERKE, termostato IKA[®] EH4 Basic, freezer vertical Cònsul, espectrômetro no infra-vermelho FTIR-8101 Shimadzu, aparelho de ressonância magnética nuclear de próton de H¹RMN BRUKER DRX400 - *Avance*, liofilizador modular Edwards MODULYO 4K, aparelho de calorimetria diferencial exploratória DSC-60 Shimadzu.

4.1.3 Solventes e outros materiais

Metanol para CLAE (Merck[®]), acetona para CLAE (Merck[®]), acetonitrila para CLAE (Merck[®]), fosfato dibásico de potássio (Synth[®]), octanol, membrana para filtração 0,45 μ m, 13 mm de diâmetro (Durapore[®]), membrana para filtração, 0,45 μ m, 47 mm de diâmetro (Durapore[®]), pele de orelha de suíno seccionada, lavada e hidratada, gentilmente fornecida por Dália-Consuelo (Brasil).

4.2 Métodos

4.2.1 Validação do método analítico para a quantificação de genisteína

Para a quantificação da genisteína nos experimentos realizados foi desenvolvido e validado método utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência. As condições cromatográficas foram: coluna Phenomenex Synergi Fusion - RP 80 (250 x 4,60 mm, 4 μ m) com pré-coluna Fusion RP 4 x 3 mm, mistura de metanol-água-acetonitrila (70:25:5, m/m/m) como fase móvel, fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, injeção de 20 μ L, detecção no ultravioleta em 270 nm. Para a validação da metodologia analítica foram utilizados os seguintes parâmetros: linearidade, precisão (intermediária e repetibilidade), exatidão, especificidade, limites de detecção e quantificação de acordo com o estabelecido pelo ICH (*International Conference Harmonization*, 1996) e pela RDC 899 (BRASIL, 2003), resumido a seguir.

4.2.1.1 Linearidade

4.2.1.1.1 Curva padrão da genisteína

Para a obtenção da curva padrão da genisteína foram preparadas soluções metanólicas nas concentrações de 1, 5, 10, 20 e 50 μ g/mL. Foram realizadas três curvas, cada ponto em triplicata, sendo o resultado expresso como a média de três injeções. As condições cromatográficas estão descritas no item anterior (4.2.1).

Os resultados foram plotados em gráficos, a partir dos quais foram gerados a equação da reta e o coeficiente de correlação linear (r). A análise estatística dos dados foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) em um nível de significância de 95 % ($p < 0,05$).

4.2.1.2 Precisão

A precisão foi realizada intra-dia e inter-dia, correspondendo respectivamente, às análises da repetibilidade e precisão intermediária. Foram obtidas três curvas padrão de genisteína por dia, por três dias consecutivos. Cada ponto foi analisado em triplicata e o resultado expresso por meio da média de três determinações.

4.2.1.3 Exatidão

A recuperação de quantidades de padrão adicionadas a uma solução de genisteína de concentração conhecida é o método preconizado para a determinação da exatidão de um método analítico (ICH, 1999; BRASIL, 2003). O protocolo para a realização deste ensaio está descrito na tabela abaixo.

Tabela 1. Protocolo para ensaio de exatidão na análise de genisteína por CLAE.

Solução	Amostra		Padrão		Conc. Teórica Final *
	Volume da solução	Concentração de genisteína	Volume adicionado	Quantidade de genisteína adicionada	
S1	1,0 mL	10 µg/mL	0,5 mL	5 µg/mL	3 µg/mL
S2	1,0 mL	10 µg/mL	1,0 mL	10 µg/mL	4 µg/mL
S3	1,0 mL	10 µg/mL	1,5 mL	15 µg/mL	5 µg/mL

* O volume final de todas as soluções foi de 5 mL.

À alíquotas de 1,0 mL de uma solução contendo 10 µg/mL de genisteína foram adicionados respectivamente, alíquotas de 0,5, 1,0 e 1,5 mL de uma solução de genisteína de mesma concentração, correspondendo à adição de 5, 10 e 15 µg (50%, 100% e 150%) da substância.

4.2.1.4 Especificidade

O ensaio de especificidade foi realizado para detectar interferências dos demais componentes da formulação, β-ciclodextrina e hidróxi propilmetilcelulose, no perfil cromatográfico da genisteína. Para tanto uma solução de genisteína 20 µg/mL adicionada de quantidades em torno de 1 mg de β-ciclodextrina e hidroxipropilmetilcelulose, e outra contendo apenas os excipientes foram analisadas com o mesmo método cromatográfico desenvolvido para a quantificação da genisteína.

4.2.1.5 Limite de Detecção

O limite de detecção do método foi calculado segundo a equação abaixo (equação 2), onde σ e S correspondem, respectivamente, ao desvio padrão do intercepto e à inclinação da curva padrão.

$$LD = 3,3\sigma / S \quad (\text{Equação 2})$$

4.2.1.6 Limite de Quantificação

O limite de quantificação do método foi calculado de acordo com a equação abaixo (equação 3), onde σ e S correspondem, respectivamente, ao desvio padrão do intercepto e a inclinação da curva padrão.

$$LQ = 10\sigma / S \quad (\text{Equação 3})$$

4.3 Associação da aglicona com ciclodextrina

4.3.1 Diagrama de solubilidade (Higuchi e Connors, 1965)

Genisteína (GEN), em excesso, e β -ciclodextrina (β CD) em diversas proporções, foram dispersas em 2,5 mL de água, em frascos de vidro âmbar completamente fechados. As proporções molares nestas dispersões foram 1:0, 1:1, 1:2 e 1:3 (tabela 2).

Tabela 2. Proporções de GEN e β CD empregadas na obtenção do diagrama de solubilidade de HIGUCHI E CONNORS (1965).

	Proporções molares (GEN: β CD)			
	1:0	1:1	1:2	1:3
GEN (mg)	1,5	1,5	1,5	1,5
GEN (nmol)	5,5	5,5	5,5	5,5
βCD (mg)	0	6,3	12,6	18,9
βCD (nmol)	0	5,5	11	16,5
Volume final (mL)	5	5	5	5

As dispersões aquosas foram submetidas à agitação em banho de água, em 37 °C, por 48 horas. Após esse período, foram resfriadas até atingir 25 °C e filtradas através de membranas filtrantes de 0,45 μ m para balões volumétricos de 5,0 mL. Uma alíquota de 1,0 mL de cada filtrado foi retirada e diluída em metanol, a um

volume de 5,0 mL para análise por cromatografia líquida de alta eficiência. O procedimento foi repetido três vezes.

4.3.2 Preparação do complexo genisteína- β -ciclodextrina em meio líquido

De acordo com o incremento de solubilidade obtido e a viabilidade tecnológica, foi escolhida a proporção GEN e β CD de 1:1, sendo esta associação (“complexo”) produzida em maior quantidade, sob as mesmas condições descritas na seção 4.3.1.

4.3.3 Secagem por liofilização do complexo em meio líquido

Dispersões sólidas contendo genisteína complexada com β -ciclodextrina foram produzidas mediante a secagem por liofilização da dispersão aquosa contendo o complexo produzido na proporção GEN- β CD 1:1. A secagem foi realizada nas condições – 60 °C e aproximadamente 2×10^{-1} torr. O tempo de secagem variou de acordo com o tamanho do lote.

4.3.4 Preparação de simples mistura genisteína/ciclodextrina (GEN/ β CD)

A simples mistura foi obtida pela mistura mecânica de genisteína e β -ciclodextrina na mesma proporção definida para a produção do complexo liofilizado. Ambas as substâncias foram adicionadas a um tubo de *ependorf* que foi submetido a agitação em agitador tipo vórtex durante 1 minuto.

4.4 Caracterização do complexo GEN: β CD e da simples mistura GEN/ β CD

4.4.1 Doseamento da genisteína por cromatografia líquida de alta eficiência

O método cromatográfico empregado foi o descrito na seção 5.1. Caracteriza-se pela dissolução de 2,5 mg de genisteína em 25 mL de metanol, contendo uma concentração de 100 μ g/mL na solução-mãe. Foram realizadas diluições desta solução, obtendo-se uma curva padrão de 1, 5, 10, 20 e 50 μ g/mL. A determinação da concentração de genisteína nas amostras foi realizada por comparação de suas absorvâncias em 270 nm com a curva padrão, mediante a injeção de 20 μ l de solução e amostra, em triplicata, em cromatógrafo de alta eficiência. O sistema de eluição isocrático foi composto de metanol:água:acetonitrila (70:25:5, m/m/m), em

fluxo de 1 mL/min. A coluna cromatográfica utilizada foi Phenomenex Synergi Fusion - RP 80 (250 x 4,60 mm, 4 μ), com pré-coluna Fusion RP 4 x 3 mm.

4.4.2 Calorimetria diferencial exploratória

A termoanálise das matérias primas e dispersões sólidas foi realizada em calorímetro diferencial exploratório, sob atmosfera de N₂ pelo aquecimento a partir de 30 °C até 300 °C, com aumento gradual de 10 °C/min. Amostras de 0,5 a 1,5 mg das dispersões foram analisadas em recipientes de alumínio (CALABRÓ *et al.*, 2003).

4.4.3 Espectroscopia na região do infravermelho

O espectro de infravermelho foi obtido a partir da mistura das amostras com brometo de potássio, pela mistura suave em gral de ágata (CALABRÓ *et al.*, 2003). Foram analisadas tanto as matérias-primas (GEN e β CD), quanto as associações fármaco-ciclodextrina.

4.4.4 Ressonância magnética de próton

Os espectros foram obtidos em uma sonda MULTINUCLEAR detecção inversa 5mm, Z-grad, a 25 °C, com frequência de 400 MHz para o hidrogênio, a partir de soluções saturadas dos analitos (β CD, GEN e dispersões sólidas de β CD e GEN associadas) dissolvidos em DMSO (CALABRÓ *et al.*, 2003). Para o experimento de ROESY usando pulsos de gradiente, foi utilizado um tempo de 600 milisegundos para ROESY-spinlock.

4.5 Avaliação do perfil de penetração cutânea da genisteína e das dispersões sólidas genisteína/ciclodextrina

4.5.1 Solubilidade da genisteína no meio acceptor

Para a determinação da solubilidade da genisteína no meio acceptor foi realizado o método da solubilidade em excesso.

4.5.2 Determinação do coeficiente de partição octanol/água (log P)

A determinação do coeficiente de partição octanol/água da genisteína foi realizada em três etapas. O primeiro passo foi a saturação dos dois solventes por meio de agitação durante 24 horas, com o objetivo de estabelecer um equilíbrio das fases imiscíveis. Num segundo momento, uma alíquota de cada fase foi retirada e acrescida de um excesso de genisteína, mantendo-se a agitação por mais 12 horas.

Por fim, foi realizada a centrifugação da mistura final para a separação das fases, sendo a concentração média de genisteína em cada uma das fases determinada por cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção no ultravioleta em 270 nm.

O coeficiente de partição foi calculado de acordo com a equação 4:

$$K_{oct/w} = C_{oct} / C_w \quad (\text{Equação 4})$$

onde $K_{oct/w}$, ou coeficiente de partição octanol/água, é igual ao quociente obtido entre a concentração de saturação de genisteína ($\mu\text{g/mL}$), respectivamente, nas fases octanólica (C_{oct}) e aquosa (C_w). O resultado corresponde à média de três determinações.

O mesmo procedimento foi empregado para a determinação do coeficiente de partição das dispersões sólidas, complexo e simples mistura.

4.5.3 Preparação da pele de suíno para os experimentos de permeação cutânea *in vitro*

Cortes de pele de orelha de suíno foram utilizados nos experimentos de permeação cutânea. As orelhas foram inicialmente lavadas, apenas com água sem a adição de detergente, secas com papel toalha e os pelos retirados com pinça. A pele da parte posterior das orelhas foi retirada da cartilagem com auxílio de bisturi, e foram retirados da parte interna vasos sanguíneos e gordura, com auxílio de pinça, tomando-se o cuidado de não danificar as estruturas da parte interna da pele.

Os cortes com área idêntica à da abertura das células de Franz, a fim de deixar disponível 2,54 cm², foram seccionados com bisturi. Os cortes foram então colados às células.

Em seguida as células foram totalmente preenchidas com tampão fosfato, pH 7,4, e assim permaneceram durante oito horas, com a finalidade de promover a hidratação dos cortes de pele.

4.5.4 Avaliação do perfil de penetração intrínseco da genisteína

Para determinar a permeabilidade intrínseca, foram aplicados 200 µl de uma solução de genisteína e das dispersões sólidas, simples mistura e genisteína complexada, em acetona na concentração de 1,0 mg/mL. A cinética de permeabilidade foi iniciada após a evaporação do solvente.

A permeabilidade intrínseca do complexo e da simples mistura também foram avaliadas segundo a mesma técnica.

4.5.5 Experimentos de permeação cutânea *in vitro*

A determinação da cinética de penetração cutânea *in vitro* foi realizada em células de difusão do tipo Franz modificada com área de interface correspondente a 2,54 cm² e volume interno de 8,5 mL, com abertura superior livre. Foram utilizados cortes circulares de pele de orelha de suíno como interface entre o meio doador e o meio receptor.

Em todos os experimentos, o compartimento receptor foi preenchido com uma solução aceptora, para a realização do experimento. O meio acceptor foi mantido sob agitação e temperatura de 37 ± 1°C durante todo o período do experimento (8 horas).

4.5.6 Determinação dos parâmetros de permeabilidade cutânea

Após o início das cinéticas de permeabilidade, foram retiradas alíquotas do meio acceptor em intervalos de 1 hora, para posterior análise e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta a 270 nm.

Os resultados obtidos foram expressos em termos de genisteína permeada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (h). O gráfico obtido permite a determinação do fluxo de permeação cutânea no estado estacionário, o qual é equivalente à inclinação da reta resultante. A projeção da interseção desta reta no eixo das abscissas permite determinar o tempo de latência necessário para o alcance da difusão em regime estacionário. Assim, os parâmetros a serem observados na caracterização da permeabilidade cutânea são o fluxo cutâneo, o tempo de latência e a quantidade total permeada após 8 horas.

4.5.7 Determinação dos parâmetros de permeabilidade cutânea da genisteína a partir de gel de HPMC 3 %

A abertura superior das células de Franz modificadas foram preenchidas com aproximadamente 1 g de gel de HPMC 3 % contendo, unicamente, a genisteína, o complexo GEN: β CD ou a simples mistura GEN: β CD, correspondendo a uma concentração de isoflavona de 0,1 %.

A cinética de liberação e os demais parâmetros de permeabilidade foram determinados de acordo com a metodologia descrita no item **4.5.6**.

4.5.8 Determinação da quantidade de genisteína acumulada

Após os experimentos de permeação cutânea, a de pele de suíno foi retirada cuidadosamente das células de Franz, o excesso de gel foi retirado com uma gaze umedecida. A pele foi cortada em pequenos pedaços e, então, transferida para um recipiente contendo 5,0 mL de metanol, onde permaneceu por 8 horas. Em seguida o recipiente foi submetido à sonicação em banho de ultrassom, por 5 minutos. Alíquotas de 1,0 mL foram retiradas e diluídas a 5,0 mL. A pele de todas as células de Franz foram igualmente tratadas.

As soluções resultantes foram, então, submetidas a doseamento em CLAE, utilizando o mesmo método descrito no item **4.2.1**.

5.1 Validação do Método Analítico

O objetivo da validação analítica é demonstrar a adequabilidade de um método ou processo, para avaliar a concentração de um analito. A partir de um propósito determinado, a seleção do procedimento, parâmetros e critérios, assim como o estabelecimento de um protocolo, é responsabilidade de quem os aplica.

O método de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência desenvolvido foi validado segundo os parâmetros estabelecidos pelo ICH (1996) e pela RDC 899 da ANVISA (BRASIL, 2003).

Os cromatogramas resultantes das análises por CLAE, nas condições cromatográficas estabelecidas, apresentaram picos de genisteína, estreitos, simétricos e com áreas reprodutíveis. O tempo de retenção da substância ficou em torno de 3,2 minutos, como pode ser visualizado na figura 6.

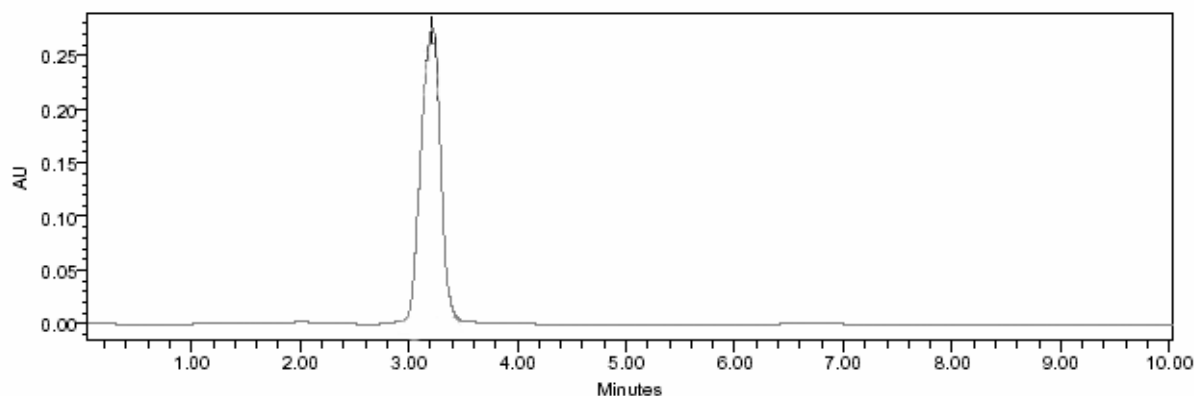


Figura 4. Perfil cromatográfico da genisteína obtido por cromatografia líquida de alta eficiência. Fase móvel: metanol:acetonitrila:água (75:25:05 w/w/w), fluxo 1 mL/min, coluna RP-C18, com detecção no ultravioleta em 270 nm.

5.1.1 Linearidade

A linearidade representa a capacidade do método de produzir respostas diretamente proporcionais à concentração do analito presente na amostra. Para determiná-la é necessária a elaboração de uma curva padrão, o cálculo da equação

de regressão linear e os coeficientes de regressão e de variação percentual (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

As áreas dos picos obtidas nos cromatogramas correspondentes à genisteína foram relacionadas com suas respectivas concentrações, calculando-se a equação da reta por regressão linear (figura 5). Os resultados foram expressos pela média de três injeções realizadas para cada ponto, com seus devidos desvios padrões e coeficientes de variação.

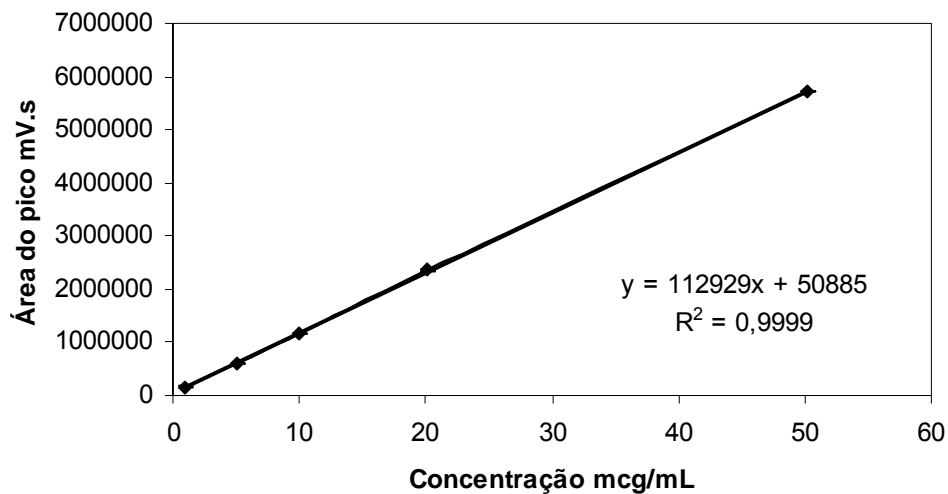


Figura 5. Curva padrão da genisteína obtida por CLAE.

O coeficiente de regressão obtido para a curva padrão de genisteína foi de 0,9999 evidenciando a linearidade do método quando aplicado na faixa de 1 a 50 $\mu\text{g/mL}$.

A avaliação estatística dos valores obtidos na curva padrão foi realizada por análise de variância (ANOVA). De acordo com o valor de F ($F_{\text{calculado}}=25537,45$ e $F_{(0,05;1,3)}= 10,13$), pode-se observar que, em um nível de significância de 5 % não há desvio de linearidade na curva padrão desenvolvida. A tabela da análise de variância (ANOVA) encontra-se em anexo.

5.1.2 Precisão

Com a finalidade de avaliar a precisão do método proposto, foram realizados os testes de repetibilidade e precisão intermediária, de acordo com a metodologia descrita em 4.2.1.2.

Os resultados dos testes de repetibilidade e precisão intermediária do método cromatográfico proposto estão descritos nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Repetibilidade para a análise de genisteína por CLAE*.

	2,0 µg/mL	DPR (%)	15,0 µg/mL	DPR (%)	30,0 µg/mL	DPR (%)
Dia 1	331569	0,58	1745484	0,57	3658142	0,38
Dia 2	322875,7	0,38	1785784	0,32	3614331	0,32
Dia 3	327908,7	1,72	1800289	0,62	3700487	0,57

*Os valores de área individuais para cada ponto encontram-se em anexo.

Tabela 4. Precisão intermediária para a análise de genisteína por CLAE.

Concentração (µg/mL)	2,0	15,0	30,0
Área Média (mV.s)	327451	1777186	3657653
Desvio Padrão	4850	25874	39785
DPR (%)	1,48	1,46	1,09

Os resultados obtidos, tanto para a repetibilidade quanto para a precisão intermediária, podem ser considerados satisfatórios na medida em que os valores de DPR (desvio padrão relativo) são inferiores a 2%, o que é aceitável numa análise quantitativa.

5.1.3 Exatidão

A exatidão do método foi medida em termos de recuperação de quantidades conhecidas de padrão adicionadas à amostra.

A tabela 5 apresenta as taxas de recuperação obtidas, situando-se estas dentro da faixa preconizada pelo ICH (1996) e RDC 899 da ANVISA (BRASIL, 2003), ou seja, de 95 a 105 %, o que demonstra a exatidão do método proposto.

Tabela 5. Exatidão da análise de genisteína por CLAE.

Solução (amostra)	Repetições			Média	DPR (%)	Recuperação (%)
	A1	A2	A3			
S1	2416782	2405146	2392186	2404705	0,51	96,72
S2	2760297	2763736	2781320	2768451	0,41	104,85
S3	2830782	2824142	2830725	2828550	0,13	99,26

5.1.4 Especificidade para a análise de genisteína por CLAE

A capacidade do método em quantificar de forma seletiva a substância estudada em meio a interferentes é expresso pela especificidade (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

Na análise da solução metanólica de 20 µg/mL de genisteína na presença dos demais componentes das formulações estudadas (HPMC e βCD), não foi observada mudança no perfil cromatográfico, sugerindo que as substâncias utilizadas concomitantemente nos experimentos não interferem na quantificação da genisteína.

5.1.5 Limite de detecção

O limite de detecção é definido como a menor concentração absoluta do analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições de análise determinadas. A menor concentração de genisteína passível de detecção pelo método desenvolvido foi calculada de acordo com a equação apresentada no item 5.1.5. O limite de detecção calculado foi de 0,49 µg/ml.

5.1.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação é definido como a concentração mais baixa do analito na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (ICH, 1996; BRASIL, 2003). O limite de quantificação foi calculado utilizando-se a equação descrita no item 5.1.6 da metodologia. O valor encontrado como sendo a mínima concentração de genisteína quantificável pelo método proposto foi de 1,47

$\mu\text{g/mL}$. Esse valor mostra-se adequado para análise quantitativa da genisteína nos experimentos planejados.

5.2 Associação da genisteína com β -ciclodextrina

5.2.1 Diagrama de solubilidade

A realização de diagrama de solubilidade é de grande importância para a verificação do efeito da associação de substâncias bioativas com ciclodextrinas, sobre sua solubilidade, considerando a possibilidade de formação de complexos de inclusão (HIGUCHI E CONNORS, 1965). Mediante o doseamento da genisteína na solução submetida a condições de complexação em meio líquido, descrito na seção 4.2.2.1, foi verificado um incremento de solubilidade para a isoflavona em estudo. O incremento observado foi de até 6,74 vezes em relação à genisteína em água sem presença de β -ciclodextrina (Tabela 6). A curva encontrada foi do tipo A_L que caracteriza uma relação linear ($r^2 > 0,99$) entre o incremento de solubilidade da genisteína e a concentração de β -ciclodextrina. A representação gráfica do Diagrama de Solubilidade pode ser visualizada na figura 6.

Tabela 6. Incrementos de solubilidade da genisteína em função da concentração molar de β -ciclodextrina.

Proporção molar (GEN: β -CD)	Concentração de Genisteína ($\mu\text{g/mL}$) na solução	Incremento de Solubilidade ($\mu\text{g/mL}$)
1:0	$2,26 \pm 0,54$	-
1:1	$7,48 \pm 3,85$	3,31
1:2	$11,29 \pm 3,92$	4,99
1:3	$15,25 \pm 2,34$	6,74

(GEN: β -CD)= genisteína: β -ciclodextrina.

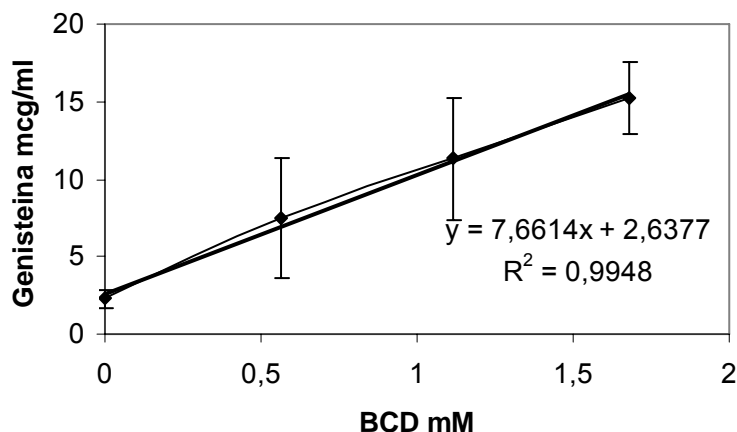


Figura 6. Diagrama de solubilidade da genisteína em presença de β -ciclodextrina.

A elaboração do diagrama de solubilidade também permite o cálculo da constante de estabilidade aparente do complexo (K_c). Essa constante de estabilidade permite classificar o complexo formado como lábil ou estável. Ela é calculada de acordo com a equação apresentada a seguir, descrita por HIGUCHI E CONNORS (1965).

$$K_{c1:1} = \frac{S_t - S_0}{S_0 (L_t - S_t + S_0)} \quad (\text{Equação 5})$$

onde S_t é a concentração molar total do composto em solução ($S_m + S_0$); S_0 é a concentração molar do composto S na ausência de ciclodextrina (L); L_t é a concentração molar total de ciclodextrina. S_m é a concentração do composto em solução decorrente da adição de ciclodextrina ($S_t - S_0$).

Nas condições experimentais apresentadas a constante de estabilidade aparente $K_{c1:1}$ calculada para o complexo genisteína: β -ciclodextrina foi de $1,35 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}$, sendo, portanto, considerado um complexo lábil. Este dado demonstra que a genisteína é capaz de deixar a cavidade com facilidade. No caso de preparações de uso tópico sobre a pele, uma certa labilidade do complexo é desejável uma vez que o fármaco livre deverá deixar a matriz polimérica, composta pelo gel de HPMC 3%, e penetrar a pele (HIGUCHI E CONNORS, 1965; EL-NAHAS, 1996; ZULLI *et al.*, 2001).

Considerando que a β CD é a ciclodextrina com o menor limite de hidrossolubilidade (DEL VALLE, 2004), seria esperado o aparecimento de um platô na curva do diagrama de solubilidade quando essa concentração é atingida (18,5 g/L). A partir deste limite, adições de maiores quantidades de ciclodextrina não deveriam levar maiores incrementos de solubilidade da molécula hóspede. No caso do experimento realizado neste trabalho, a quantidade de ciclodextrina no último ponto da curva (0,756 g/L) poderia ser aumentada a fim de obter maior incremento de solubilidade da genisteína, contudo a concentração de saturação do meio aquoso com a isoflavona também pode influenciar neste limite de solubilidade. Além disto, face à elevada massa molecular de β CD, proporções de GEN: β CD maiores não seriam utilizáveis, como referido no item que segue.

5.2.2 Preparação do complexo genisteína- β -ciclodextrina em meio líquido

Apesar de o maior incremento de solubilidade ter sido observado com a proporção genisteína: β -ciclodextrina 1:3, a proporção molar escolhida foi a de 1:1 por apresentar um incremento de solubilidade considerado suficiente e por ser o mais tecnologicamente viável com relação à massa a ser incorporada no gel e ao custo do material utilizado.

O método utilizado foi o mesmo descrito na seção **4.2.2.2**, porém com quantidade suficiente para a obtenção de complexo seco para a realização dos demais testes.

No total foram preparadas três lotes de complexo dois de 30 mg e um de 150 mg.

5.2.3 Secagem por liofilização do complexo em meio líquido

A suspensão resultante da complexação em meio aquoso foi filtrada, e a solução resultante congelada e submetida à liofilização, a fim de se obter o complexo na forma sólida. O rendimento médio do processo foi de aproximadamente 80 %, devido a perdas de material retido durante a filtração.

Em seguida, o produto seco por liofilização foi submetido a doseamento com a finalidade de se determinar o teor de genisteína no complexo para, então,

proceder à preparação da simples mistura com as mesmas características. Para fins de comparação, é importante que o complexo liofilizado e a simples mistura tenham o mesmo teor de genisteína.

5.2.4 Obtenção da simples mistura

A simples mistura de genisteína e β -ciclodextrina apresentou características macroscópicas diferentes das observadas no complexo liofilizado. Enquanto este último apresentou coloração branca e aspecto floculoso e amorfo, a simples mistura manteve a aparência cristalina da ciclodextrina e a coloração amarelo pálido, característica da genisteína.

5.3 Caracterização das dispersões sólidas genisteína-ciclodextrina

5.3.1 Doseamento físico químico da genisteína por cromatografia líquida de alta eficiência

O doseamento da genisteína contida no complexo liofilizado foi realizado por CLAE, conforme método descrito na seção 5.1. O complexo apresentou um conteúdo de genisteína de 19,22 % (m/m).

5.3.2 Calorimetria diferencial exploratória

As curvas de aquecimento apresentadas na figura 7 (A) apresenta um pico endotérmico no ponto de fusão da genisteína, em 305° C, com um *onset* na temperatura de 303 °C, com o início de uma leve degradação da substância acima desta temperatura (MERCK INDEX, 2001). O termograma 7 (B) apresenta o comportamento da β -ciclodextrina, quando submetida as mesmas condições de aquecimento à qual a amostra de padrão de genisteína foi submetida. Nesse gráfico pode-se observar uma banda larga por volta dos 100 °C, que caracteriza perda de água da ciclodextrina, com uma exoterma de degradação acima dos 320 °C.

O termograma da simples mistura, GEN/ β CD, apresenta duas bandas endotérmicas correspondentes, respectivamente, à desidratação da β -ciclodextrina e à fusão da genisteína, a qual aparece reduzida e deslocada. A atenuação do pico da genisteína pode ser explicada pela pequena quantidade de fármaco usada na análise, correspondente a 19,22 % da mistura. Entretanto, o deslocamento do ponto

de fusão pode ser devido à interação com a ciclodextrina durante o aquecimento (KOESTER *et al.*,2003).

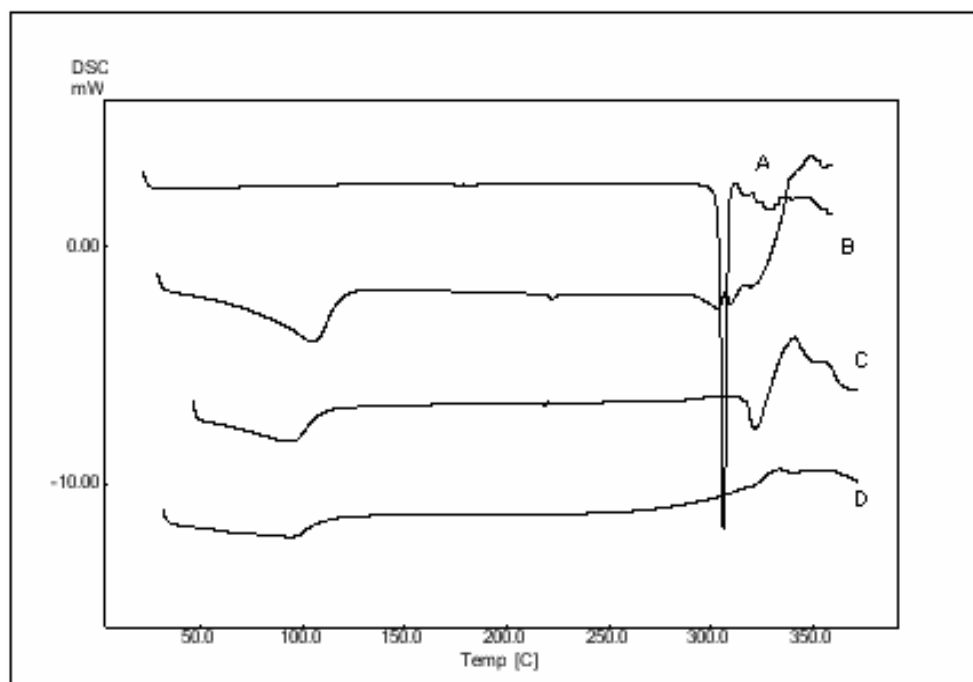


Figura 7. Termogramas obtidos a partir calorimetria diferencial exploratória. A = GEN; B = β CD; C = simples mistura GEN/ β CD e D = complexo GEN: β CD.

O termograma correspondente à dispersão sólida liofilizada, obtida a partir da solução submetida a condições de complexação em meio aquoso, é apresentado na figura 7 (D). Este termograma indica uma forte interação entre ambas as substâncias, uma vez que não pode ser observada a presença do pico correspondente ao ponto de fusão da genisteína, mas somente as bandas características da ciclodextrina, mesmo que atenuadas devido às interações. Esta observação constitui um forte indício da formação de complexo de inclusão entre genisteína e β -ciclodextrina.

5.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros de infravermelho da genisteína e da β -ciclodextrina estão representados na figura 8. Na figura 8D, observa-se o espectro da genisteína, onde podem ser observadas, na região entre 4000 e 3000 cm^{-1} , uma banda característica de hidroxila fenólica (3500 cm^{-1}) e outra banda de anel aromático (3030 cm^{-1}). Também é observado um sinal em 1650 cm^{-1} , correspondente ao estiramento C=C

de γ -pirona (anel A do isoflavonóide) e outro sinal por volta de 1630 cm^{-1} que sugere a presença de uma carbonila em ponte na molécula. A substituição do anel C, metassubstituído da genisteína, é evidenciada por duas bandas fortes e duas bandas fracas na região de 850 cm^{-1} .

O espectro da β CD apresenta uma banda larga entre 3800 e 3200 cm^{-1} e uma banda na região de 2800 cm^{-1} , que caracteriza um estiramento C-H próprio de açúcares. O grupo complexo de bandas entre 1000 e 1300 cm^{-1} caracterizam o estiramento C-O de éter e de OH. A banda dupla por volta de 900 cm^{-1} também é uma banda característica de açúcares. A figura 8 representa o espectro de infravermelho complexo liofilizado (Figura 8B) e da simples mistura (Figura 8C). Como pode ser observado, a banda larga e a banda da β CD se sobrepõem às bandas características da genisteína nesta mesma região (2900 - 3900 cm^{-1}). Esta observação era esperada, uma vez que a massa da isoflavona presente, tanto na simples mistura quanto no complexo, é bastante pequena em relação à massa de ciclodextrina nestas dispersões (MM GEN =270, MM β CD = 1135). No entanto as bandas características da isoflavona na região de 850 cm^{-1} , indicativa de anel aromático meta substituído, fazem-se presentes no espectro da simples mistura. Essas bandas da genisteína apresentam-se bastante atenuadas em virtude da quantidade reduzida de isoflavona presente na dispersão sólida e são correspondentes ao anel C da genisteína. Ambos, complexo e simples mistura, contêm a mesma quantidade de genisteína.

Estas observações corroboram os indícios da formação de um complexo de inclusão entre a genisteína e β CD (CALABRÓ, *et al.*, 2004).

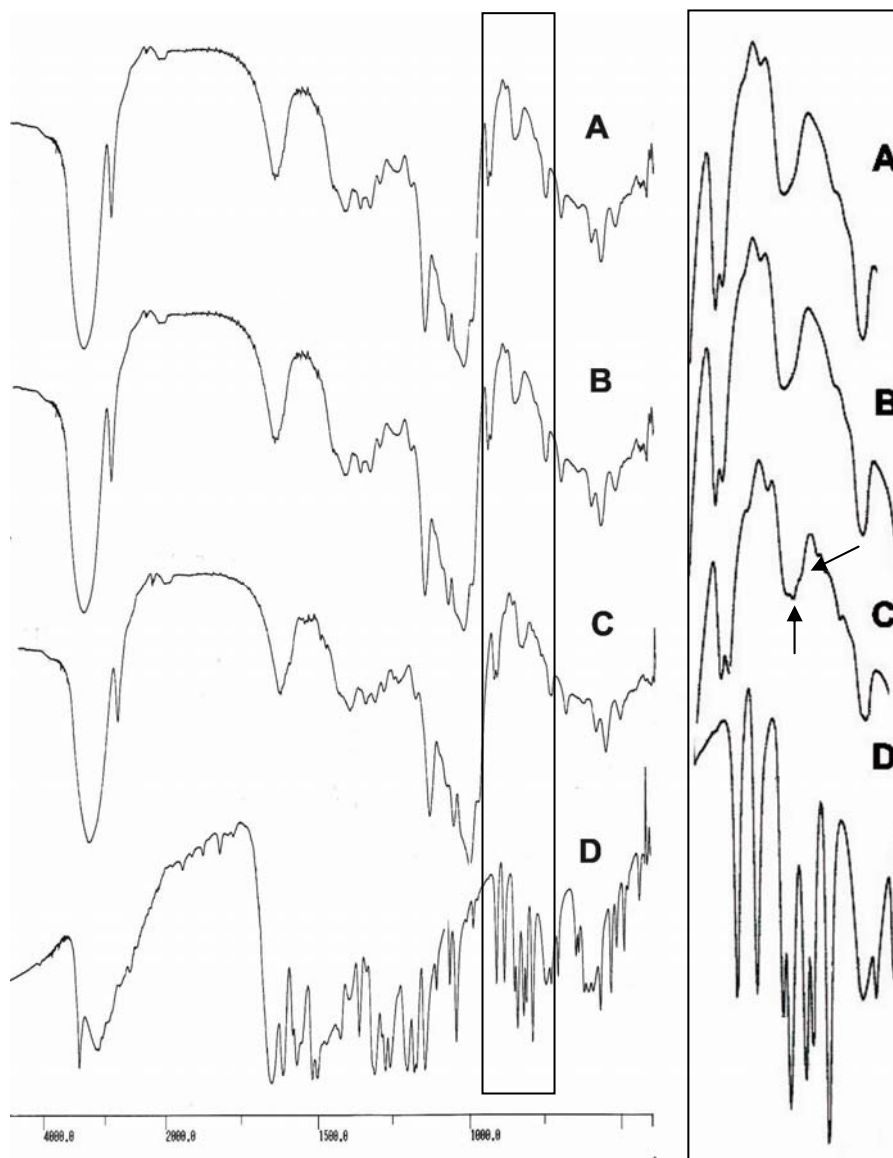


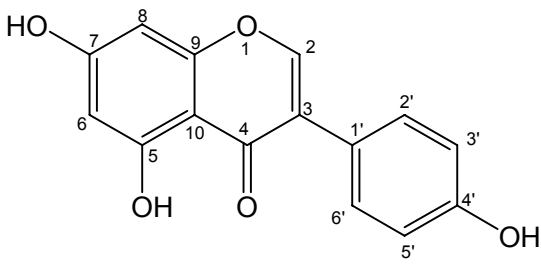
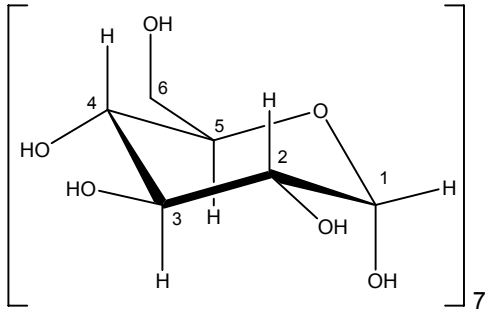
Figura 8. Espectros de infravermelho da (A) β CD, (B) complexo GEN: β CD, (C) simples mistura GEN/ β CD e (D) GEN. Cópia dos espectros originais encontram-se em anexo.

5.3.4 Ressonância magnética de próton

A interação entre genisteína e β -ciclodextrina foi investigada por espectroscopia de ressonância magnética de próton, uma vez que esta técnica proporciona informações diretas e detalhadas a respeito das interações físico-químicas que caracterizam a formação de complexo de inclusão (RAMUSINO *et al.* 1998; PEAN *et al.* 1999; CALABRÓ *et al.*, 2004). Foram realizadas análises da simples mistura e da dispersão sólida correspondente ao complexo GEN: β CD, bem como das duas substâncias isoladas.

Os sinais observados nos espectro da genisteína e da β -ciclodextrina estão expressos na tabela abaixo e foram confirmados pela literatura (BOTELLA, *et al.*, 1996; DEMUNER *et al.*, 2003).

Tabela 7. Deslocamentos químicos (d_6 -DMSO) a partir de espectro de ^1H -RMN antes da associação das duas substâncias.

Genisteína		β -ciclodextrina	
			
Próton	δ (ppm)	Próton	δ (ppm)
H-2	8,317	H-1	4,8357
H-6	6,228	H-2	3,3227
H-8	6,385	H-3 e H-6	3,6385
H-2' e H-6'	7,3755	H-4	3,3675
H-3' e H-5'	6,8205	H-5	3,5668
HO-4'	9,584	OH-2	3,6385
HO-5	12,953	OH-3	5,73095
HO-7	10,872	OH-6	5,6823

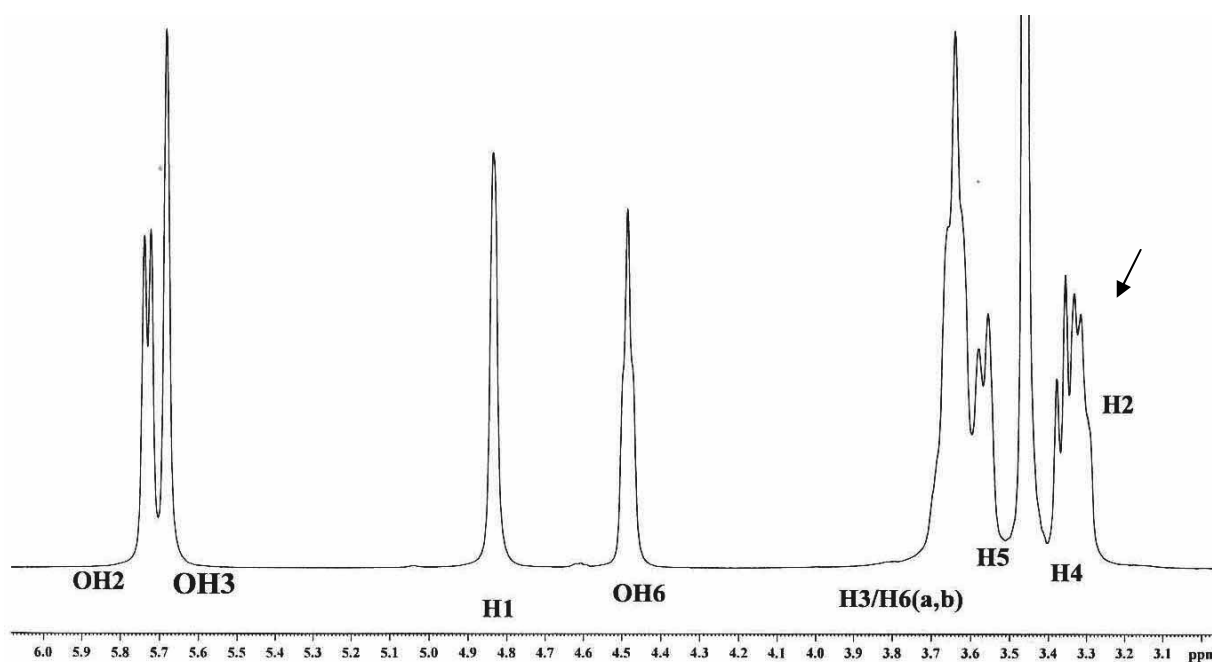


Figura 9. Espectro de ^1H -RMN da β CD.

Tabela 8. Deslocamentos químicos ($\Delta\delta$) da genisteína antes e após a associação com β -ciclodextrina.

Próton	GEN (ppm)	Complexo (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	Simples Mistura (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H-2	8,317	8,318	-0,002	8,316	-0,001
H-6	6,228	6,225	-0,003	6,223	-0,005
H-8	6,385	6,382	-0,001	6,383	-0,002
H-2' e H-6'	7,3755	7,3755	-	7,3755	-
H-3' e H-5'	6,8205	6,8275	-0,007	6,8205	-
HO-4'	9,584	9,583	-	9,584	-
HO-5	12,953	12,953	-	12,953	-
HO-7	10,872	10,872	-	10,872	-

Tabela 9. Deslocamentos químicos ($\Delta\delta$) da β -ciclodextrina antes e após a associação com genisteína.

Próton	β CD (ppm)	Complexo (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	Simples Mistura (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H-1	4,8357	4,831	+0,0047	4,833	+0,0027
H-2	3,3227	-	-	-	-
H-3 e H-6	3,6385	3,6437	-0,0052	3,6436	-0,0051
H-4	3,3675	-	-	-	-
H-5	3,5668	3,5717	-0,0049	3,5715	-0,0047
H-6	3,6385	3,6435	-0,005	3,6436	-0,0051
OH-2	5,73095	5,714	+0,01395	5,714	+0,01695
OH-3	5,6823	5,669	+0,0133	5,667	+0,0153
OH-6	4,4848	4,440	+0,0448	4,439	+0,0458

A observação do espectro de ^1H -RMN do complexo (figura 11) mostra um número relevante de sinais de deslocamento para as ligações da ciclodextrina indicando que todos os hidrogênio da molécula podem ter sido afetados. Foram observadas variações nos deslocamentos químicos dos prótons H-2, H-6 e H-8 na molécula da isoflavona, indicando a ocorrência de interação destes prótons com a molécula da ciclodextrina.

Para comprovar a formação do complexo de inclusão, seriam esperadas mudanças nos deslocamentos químicos dos hidrogênios H-3 e H-5 da β -ciclodextrina, os quais estão alocados na cavidade central da molécula, enquanto os demais prótons (H-1, H-2, e H-4), externos à cavidade, não deveriam apresentar mudanças (KOESTER *et al.*, 2001). Foram observadas mudanças nos deslocamentos químicos destes prótons em ambos os casos, tanto para a simples mistura quanto para o complexo, sugerindo a inclusão da molécula da genisteína.

Também foram observadas mudanças nos deslocamentos químicos dos prótons H-2, H-6 e H-8 da genisteína, sugerindo que parte da molécula, correspondente aos anéis A e C da isoflavona, estaria inclusa na cavidade da β CD. Estas mudanças foram observadas para o complexo, a dispersão sólida que foi submetida ao processo de complexação em meio aquoso, e também para a simples mistura. Esta observação pode ser devida ao método de mistura física empregado, quando realizado de forma intensa pode favorecer a formação de complexo (DEL VALLE, 2004).

O desaparecimento dos sinais de H-2 e H-4, prótons localizados na superfície externa, sugere uma distorção da estrutura tridimensional da β CD relacionada com sua associação com a isoflavona. Estes mesmos sinais, dos prótons H-2 e H-4 da ciclodextrina, também estiveram ausentes no espectro da simples mistura demonstrando a ocorrência de interações entre as moléculas inclusive quando não houve processo de complexação em meio aquoso.

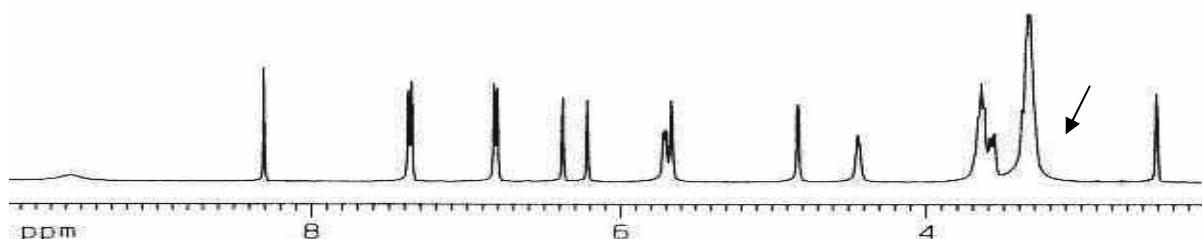


Figura 10. Espectro de ^1H -RMN da simples mistura GEN/ β CD.

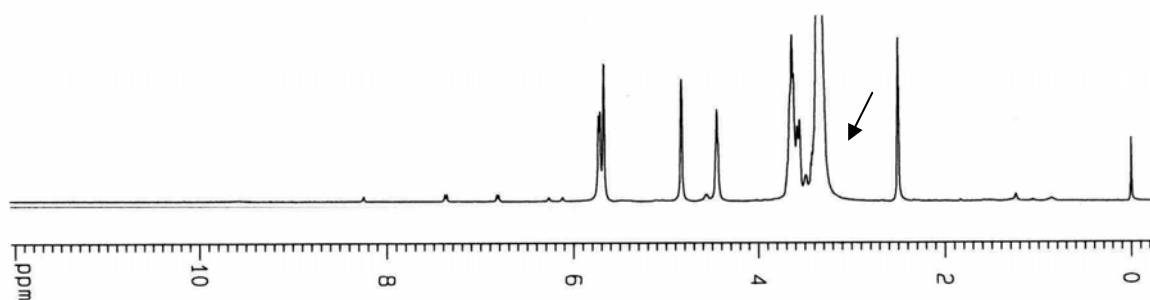


Figura 11. Espectro de ^1H -RMN do complexo GEN: β CD.

A realização do espectro bidimensional (^1H - ^1H ROESY) (figura 12) permitiu a visualização de uma forte interação entre os hidrogênios H-3'-H-5' da genisteína e o próton da hidroxila OH-2 da β CD. Esta interação, somente pode ser observada para

a amostra submetida à condições de complexação em meio aquoso, o que sugere uma interação do anel B da genisteína com prótons externos da β -ciclodextrina.

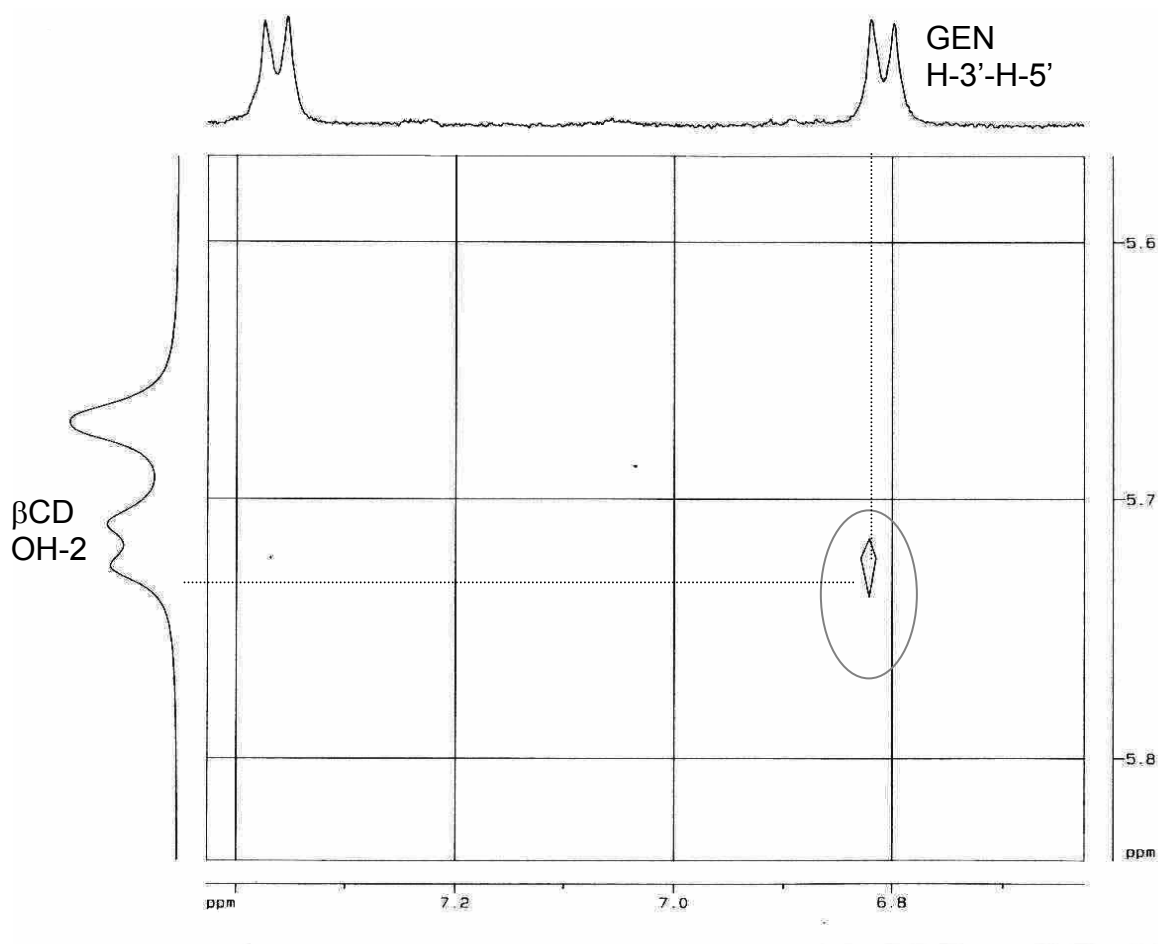


Figura 12. Espectro de ¹H-RMN ROESY do complexo GEN:βCD.

Muito embora a espectroscopia de ¹H-RMN, além de evidenciar interações intermoleculares e permitir a determinação do arranjo estrutural da formação do complexo, por exemplo, se ocorre a inclusão parcial ou total da molécula hóspede. Os dados relacionados acima demonstram a ocorrência de interações entre a isoflavona e a ciclodextrina, mas não são suficientes para propor arranjos estruturais para um possível complexo de inclusão.

5.4 Avaliação do perfil de penetração cutânea da genisteína e das associações genisteína-ciclodextrina

5.4.1 Solubilidade da genisteína no meio acceptor

O meio acceptor usualmente empregado para esse tipo de ensaio, tampão fosfato pH 7,4 (BOSNA *et al.*, 1998; SCHREIBER *et al.*, 2005), por ser uma solução aquosa não apresentou a capacidade de dissolver a genisteína satisfatoriamente.

Considerando que esta isoflavona é praticamente insolúvel em meio aquoso, e o surgimento de precipitado nos ensaios preliminares de permeação, onde foi usado tampão fosfato, a solução receptora foi modificada para os experimentos de cinética de permeação. O meio acceptor selecionado foi, assim, uma mistura de metanol e água 50:50 (v/v), a fim de prevenir a precipitação da genisteína ao longo do experimento (SILVA, 2006).

5.4.2 Determinação do coeficiente de partição octanol/água ($\log P$)

O coeficiente de partição octanol/água ou, mais precisamente, $\log P$ é um parâmetro usualmente empregado em experimentos de permeação cutânea por ser de grande importância para prever o caráter hidrófilo/lipófilo de uma determinada substância. Dessa maneira, o $\log P$ dá indícios da capacidade de uma molécula em permear através de uma barreira com domínios aquosos e lipofílicos, como o espaço intercelular do estrato córneo ou membranas celulares. Para um bom comportamento de difusão, a molécula deve apresentar um equilíbrio de hidrofília e lipofília para que seja alcançado um máximo de penetração cutânea, ou seja, a molécula deve apresentar simultaneamente, uma certa solubilidade em água e em óleo (SAIJA *et al.*, 2000; BARRY, 2001; HADGRAFT, 2001; HADGRAFT, 2004).

O valor do coeficiente de partição pode ser caracterizado como o somatório de forças intermoleculares (interações dipolo-dipolo e pontes de hidrogênio) e o volume molecular. Ele depende da solubilidade relativa do material em dois solventes com polaridades bastante diferentes (DOCHOWICZ E CASTRO 2000; MAROZAENE *et al.*, 2000). A técnica escolhida fornece condições de avaliar a solubilidade da genisteína em duas fases com polaridades distintas, água e octanol,

que mimetizam os diferentes domínios do estrato córneo e das membranas celulares.

Valores de $\log P$ entre 2 e 3 indicam substâncias com adequado comportamento de difusão. Foi encontrado para a genisteína um $\log P$ igual a 4,36, o que a caracteriza como uma molécula com características lipofílicas mais acentuadas tendendo a formar um reservatório no domínio lipídico do estrato córneo e derme (TEHRANY, 2004).

5.4.3 Avaliação do perfil de penetração intrínseca da genisteína em pele de suíno

Considerando os fatores que influenciam a penetração cutânea de fármacos, percebe-se que as características físico-químicas das moléculas têm papel importantíssimo em seu transporte através da pele. Dentre os parâmetros geralmente avaliados para classificar uma substância como candidata à administração cutânea estão a massa molecular, o volume molecular, ponto de fusão, pKa e coeficiente de partição pele/veículo (K). Pela análise da influência desses fatores, a utilização do coeficiente de partição octanol/água como único parâmetro responsável pela penetração de um fármaco torna-se insuficiente (BONINA *et al.*, 1996; FINNIN, 1999; BARRY, 2001).

O gráfico abaixo apresenta o perfil de penetração intrínseca da genisteína a partir de uma solução cujo solvente é volátil. A análise dos resultados da cinética de permeação permite determinar um valor de fluxo de permeação cutânea. A quantidade total permeada ao final de 8 horas foi em torno de 28,81 μg , correspondendo a 14,40 % da quantidade presente na amostra volátil.

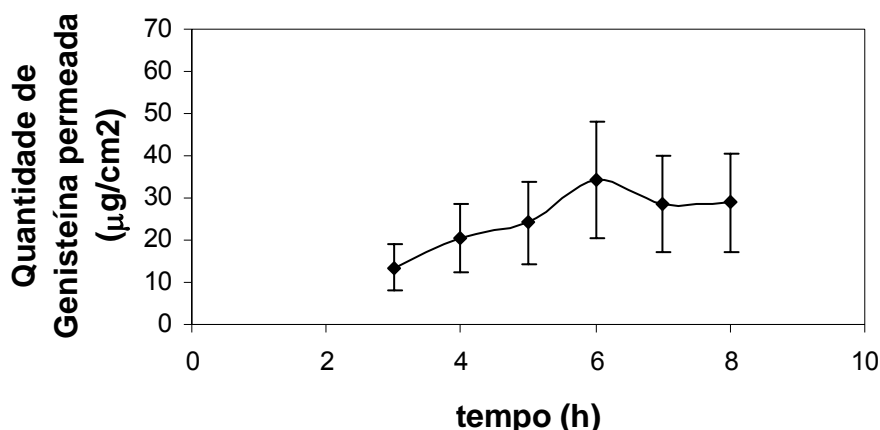


Figura 13. Permeabilidade intrínseca da genisteína em pele de orelha de suíno

Sabe-se, também, que a hidrossolubilidade exerce papel importante nesse tipo de transporte de substâncias e que fármacos muito lipofílicos possuem a capacidade de formar um reservatório no estrato córneo e o seu transporte nas camadas aquosas inferiores torna-se limitado pela sua baixa solubilidade (GUY E HADGRAFT, 1992). Considerando que a quantidade de genisteína aplicada foi de aproximadamente 200 µg, e que foi detectada uma quantidade de 62,86 µg/cm² (79,83%) acumulada na pele de suíno (2,54 cm² de área), pode-se inferir que grande parte da genisteína fica acumulada nas estruturas internas da pele, como foi sugerido em um estudo realizado por VÄNTINEM E MORAVCOVA (2001). Como a absorção sistêmica não é objetivo da presente proposta, este comportamento é desejável, para o alcance da atividade antioxidante, o acúmulo nas estruturas dérmicas e epidérmicas, possibilitando a interação com os receptores de estrogênio, do tipo β, abundantes na derme humana.

5.4.4 Experimentos de permeação cutânea *in vitro*

5.4.4.1 Avaliação do perfil de penetração da genisteína a partir de gel de HPMC

A genisteína é uma molécula apolar, e que possui afinidade, ainda que reduzida, por substâncias lipofílicas. Sendo assim, a escolha do gel de hidroxipropilmetilcelulose como base para aplicação cutânea da genisteína é justificada pelo fato de substâncias lipofílicas serem liberadas do veículo para a pele mais facilmente a partir de bases hidrofílicas (ANSEL, 2000). Porém, o gel de HPMC pode apresentar um efeito de controle da liberação da substância ativa pela sua

característica de matriz gelificada. A adição de outros adjuvantes foi dispensada para eliminar quaisquer interações entre os excipientes que pudessem modificar o microambiente na matriz e, assim, interferir na difusão da isoflavona através da mesma.

A taxa de liberação de um fármaco a partir de uma matriz polimérica depende da concentração do fármaco na camada de gel e de sua difusão através da matriz. A possível presença de uma camada (fronte) de difusão no gel pode influenciar a liberação do fármaco, pois modifica o gradiente de concentração do mesmo na base (BETTINI *et al.*, 2000). Dessa forma, a liberação da genisteína, a partir do gel, e, conseqüentemente sua penetração, podem ser retardadas pela ação do polímero. Na figura 14 pode ser visualizado o perfil de penetração da genisteína na concentração de 0,1 % (m/m) a partir de gel de HPMC 3 % (m/v).

O comportamento da penetração da genisteína a partir de gel de HPMC, quando comparado ao seu perfil de penetração intrínseca, revela uma liberação lenta e crescente em função do tempo. Em contrapartida, quando a genisteína foi aplicada sobre a interface de pele de suíno na forma de solvente volátil, seu perfil de penetração mostrou-se mais rápido e apresentou concentrações muito superiores no meio acceptor. A comparação dos dois perfis pode ser visualizada na figura 15.

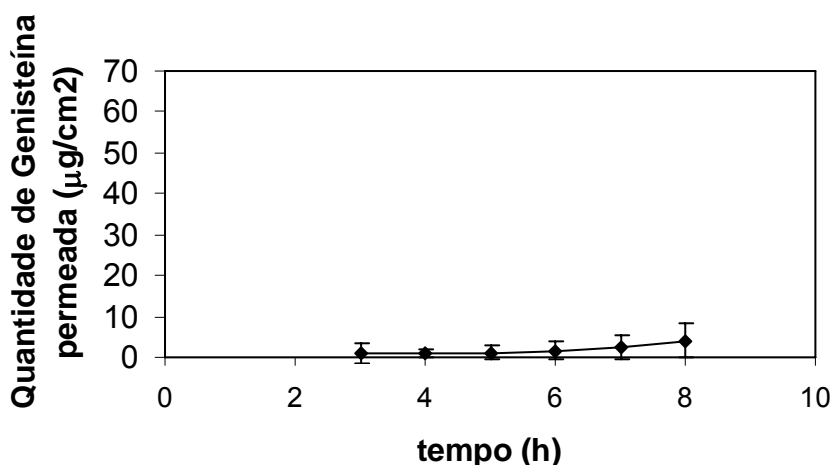


Figura 14. Perfil de penetração da genisteína 0,1% a partir de gel de HPMC 3%.

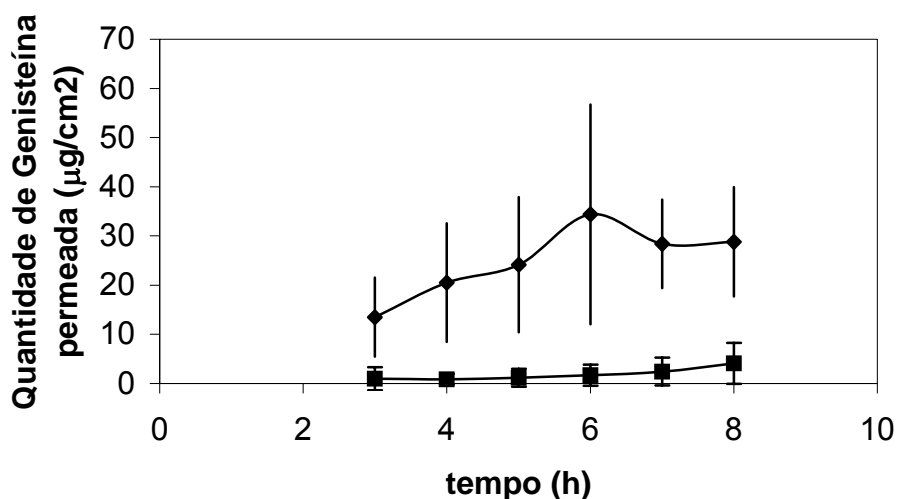


Figura 15. Comparação entre as porcentagens de genisteína permeada na (♦) penetração intrínseca da genisteína (200 µg) e (■) da genisteína a 0,1 % (1 mg) partir de gel de HPMC 3%.

Outro aspecto a ser considerado, nesta diferença observada entre os perfis, é o volume de amostra aplicada. No ensaio de penetração intrínseca foi aplicado um volume de 200 µL de amostra em solvente volátil (acetona) contendo 200 µg de genisteína. O gel foi aplicado numa quantidade de aproximadamente 1,0 g de gel de HPMC 3 %, com 0,1 % de genisteína, representando o depósito de 1 mg de genisteína. A solução em acetona, por evaporar totalmente, permite que todo o conteúdo de genisteína presente na solução fique rapidamente disponível sobre a pele. Quando uma matriz gelificada é aplicada, o volume da base é muito maior e não sendo volátil, o volume permanece praticamente constante ao longo das oito horas de experimento. Nestas matrizes, a genisteína, inicialmente, precisa difundir através da matriz polimérica de HPMC, para então ser disponibilizada na superfície da pele alcançar o estrato córneo, difundir através da matriz lipídica desta estrutura cutânea e, atravessar a pele para ser detectada no meio acceptor. Em suma, a matriz de HPMC exerceu efeito de controle da liberação da genisteína, nas condições experimentais empregadas.

5.4.4.2 Avaliação da interferência da β -CD na permeação cutânea da genisteína a partir de gel de HPMC 3 %

A figura 16 apresenta o perfil de penetração da simples mistura GEN/ β CD a partir do gel de HPMC 3 %. A cinética de penetração cutânea desta formulação,

contendo 0,1 %, de genisteína, apresentou uma quantidade total de genisteína permeada menor que a encontrada quando o complexo foi aplicado em solvente volátil (figura 13). Semelhantemente ao ocorrido com a formulação que continha apenas a isoflavona, o possível motivo desta observação estaria relacionado com a incorporação da simples mistura na base matricial. Em comentário na seção anterior, foi sugerido que, comparativamente à permeabilidade intrínseca, a permeabilidade da genisteína poderia ter sido reduzida em virtude do volume de base aplicado. A quantidade de base parece ser uma das causas do retardo da difusão da isoflavona através da pele, uma vez que a espessura da camada do gel constitui um fator limitante, nesse caso.

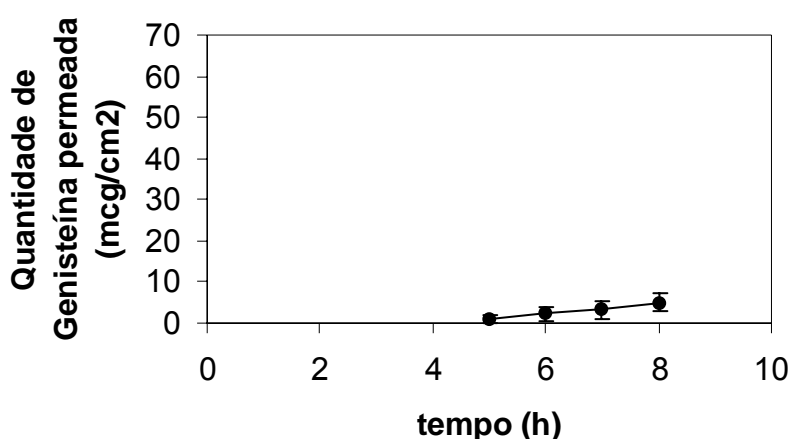


Figura 16. Perfil de penetração da simples mistura GEN/ β CD, a partir de gel de HPMC 3 %.

Além disto, é bem conhecido que a HPMC tem a propriedade de retardar a liberação de substâncias após seu intumescimento e gelificação, o que poderia contribuir para a baixa liberação da genisteína, a partir do gel de HPMC 3 %. Nesse caso, a dissolução do fármaco dentro da matriz hidrofílica parece constiuir-se um fator de limitação da movimentação das moléculas de genisteína no veículo. Sua grande lipofilia impede a completa dissolução da isoflavona, que fica, então, retida, na forma insolúvel, entre as cadeias poliméricas. A presença da β CD, na forma de simples mistura determinou um aumento sutil da quantidade total de genisteína permeada ($5,29 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) em comparação a formulação desprovida de ciclodextrina ($4,12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Se esta diferença fosse maior, esta poderia ser explicada pelo efeito promotor da ciclodextrina, e pela possibilidade da formação de um complexo de

inclusão *in situ*, no interior aquoso da matriz. Como esta diferença é sutil, tais efeitos parecem não estar presentes.

Em contrapartida, o perfil de penetração cutânea do complexo GEN: β CD a partir do gel de HPMC 3 % (figura 17) mostrou-se muito semelhante ao seu próprio perfil de penetração intrínseco (figura 13). Como já mencionado anteriormente, a dissolução do fármaco dentro da matriz hidrofílica tem papel importante na sua liberação, porém, no caso da genisteína previamente complexada, o veículo demonstrou pouca influência na difusão da isoflavona através da pele. Este fator, que nas outras formulações constituía um problema, devido à hidrofobicidade das moléculas de genisteína, deixa de manifestar sua importância. Quando não complexada, a genisteína é insolúvel em água e a sua dissolução e consequente difusão no gel mostra-se bastante difícil, tanto quando incorporada no gel na forma livre, quanto na forma de simples mistura com β CD. A complexação prévia acarreta um incremento de solubilidade da genisteína, fenômeno comprovado no presente trabalho, tornando-a solúvel no meio interno aquoso do gel.

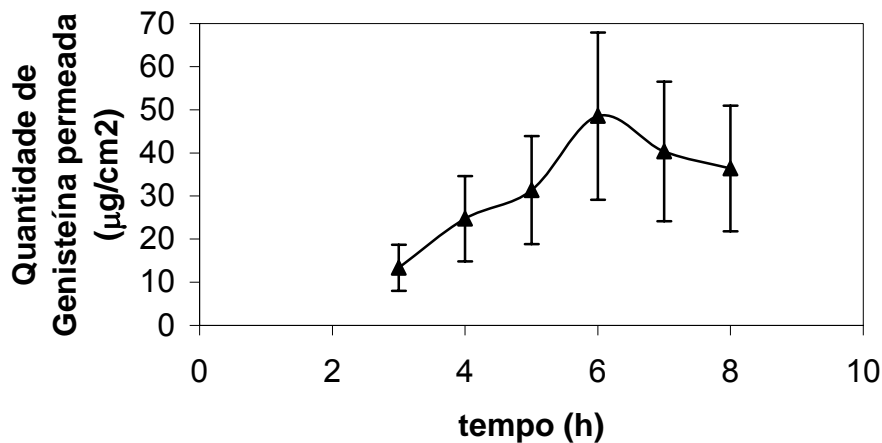


Figura 17. Perfil de penetração do complexo GEN: β CD, a partir de gel de HPMC 3%.

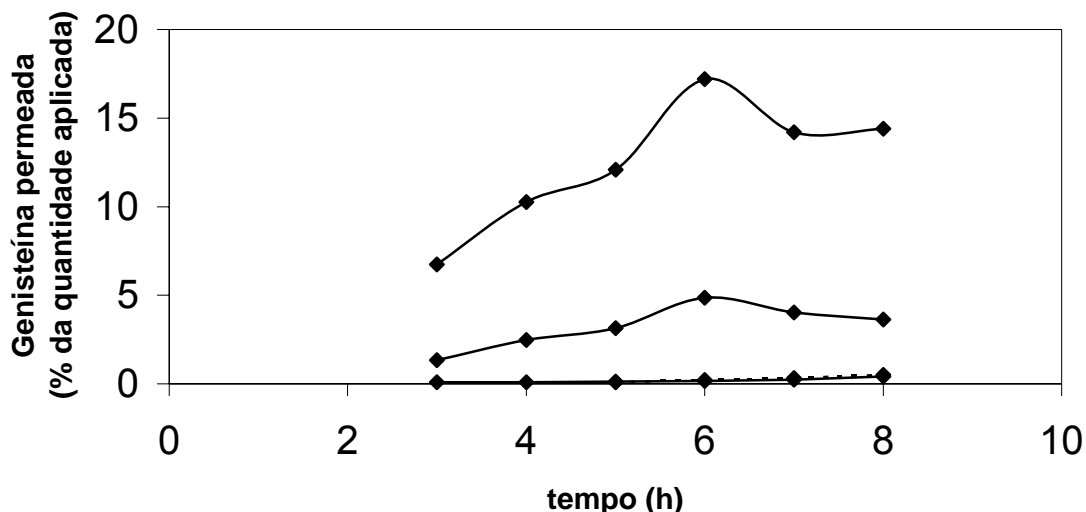


Figura 18. Comparação entre as porcentagens de genisteína permeada quando aplicada em amostra volátil (◆) e de géis de HPMC 3% contendo (■) genisteína pura, (▲) complexo GEN:βCD, e (-x-) a simples mistura GEN/βCD.

Segundo KOESTER e colaboradores (2003), a βCD é capaz de deixar a matriz polimérica composta de HPMC. Os pesquisadores observaram a liberação simultânea de ambas as espécies contidas em comprimidos, sugerindo que é possível que não haja a dissociação do complexo antes da sua difusão para fora da matriz. Considerando que tal fenômeno possa ocorrer também no gel de HPMC, este pode ser um terceiro fenômeno envolvido no perfil de liberação da isoflavona.

A figura 19 sumariza as hipóteses de mecanismo de liberação da genisteína a partir de géis de HPMC. Em A está representada a liberação da genisteína a partir do gel de HPMC 3 %. Em B, está representada a liberação da genisteína a partir do gel de HPMC 3 %, em presença de βCD (simples mistura), onde a ciclodextrina pode complexar o colesterol e outros componentes das membranas celulares facilitando a penetração da isoflavona. Em C, está representada a hipótese de mecanismo de liberação da isoflavona complexada a partir do gel, a genisteína pode deixar a matriz tanto dissociada do complexo, quanto ainda complexada com a βCD. Quando liberadas na forma dissociada, a ciclodextrina está com a cavidade livre para complexar os componentes lipídicos do estrato córneo e assim promover o fluxo cutâneo. Quando o complexo é liberado da matriz antes da desassociação, a genisteína, com sua hidrossolubilidade incrementada em virtude da complexação

prévia, torna-se mais disponível na superfície da pele e, portanto mais apta a transpor a barreira cutânea.

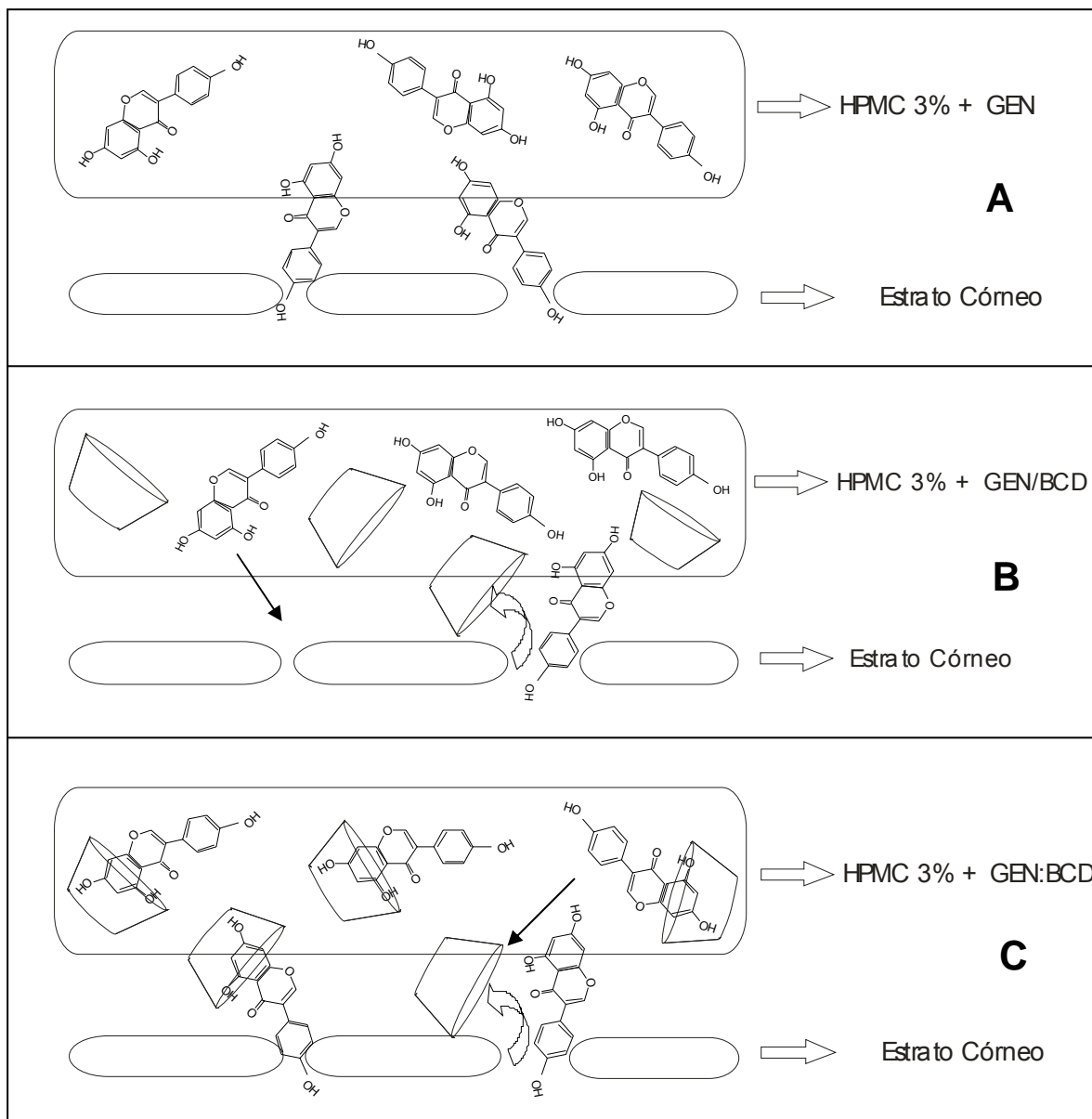


Figura 19. Hipóteses para liberação da genisteína a partir do gel de HPMC 3%: genisteína (A), simples mistura GEN/ β CD (B), complexo GEN: β CD (C).

Os perfis de penetração do complexo GEN: β CD, da simples mistura GEN/ β CD, e da genisteína a partir do gel de HPMC 3 % foram analisadas estatisticamente por análise de variância e teste t de Student, a fim de avaliar se as diferenças observadas eram significativas. No entanto, nem todas as diferenças foram confirmadas pela análise estatística. Pôde-se observar uma clara diferença entre os perfis de penetração do complexo e da simples mistura, sendo que a quantidade total permeada por unidade de área foi muito maior quando a genisteína

estava complexada. Entretanto, não houve diferença significativa entre os perfis de penetração da genisteína e da simples mistura, que podem ser considerados equivalentes. Sendo assim, pode-se concluir que a complexação prévia influencia de forma positiva e significativa o perfil de penetração da genisteína a partir de gel hidrofílico de HPMC 3 % (tabelas em anexo).

5.4.4.3 Determinação da quantidade de genisteína acumulada na pele

VÄNTINEM E MORAVCOVA (2001) sugeriram a formação de reservatório na pele de humanos, após a aplicação de uma suspensão de genisteína e daidzeína em óleo de oliva. Considerando este relato e o valor de $\log P$ da genisteína (4,36), as amostras de pele de suíno foram submetidas à extração e à posterior determinação da quantidade total de isoflavona acumulada nas amostras de pele de suíno. Este fenômeno reveste-se de importância na aplicação tópica desta isoflavona visando à prevenção do envelhecimento cutâneo, uma vez que os mecanismos biológicos envolvidos neste processo estão alocados nas estruturas dérmicas.

O doseamento do extrato obtido a partir da pele permitiu calcular a quantidade de genisteína acumulada por unidade de área. Os resultados corroboram com a interpretação do valor de $\log P$, e reforçam a hipótese levantada por VÄNTINEM E MORAVCOVA (2001). Grande parte da isoflavona não atravessa a pele no intervalo de oito horas em que foi realizado o experimento, ficando depositada no interior das estruturas cutâneas.

A influência da β CD na penetração cutânea da genisteína também pode ser avaliada por esta análise. Segundo o histograma da figura 20, pode ser observado um claro aumento na quantidade de isoflavona acumulada na pele quando a β CD está presente. Estes dados demonstram que a β CD exerce efeito promotor da penetração da genisteína, seja pelo aumento da solubilidade, ou pela capacidade de modificar as características do estrato córneo. Pela análise do histograma, observa-se a maior eficiência do complexo em penetrar e se acumular na pele, a partir da base hidrofílica, pois apresentou o maior acúmulo de genisteína por cm^2 de pele de suíno.

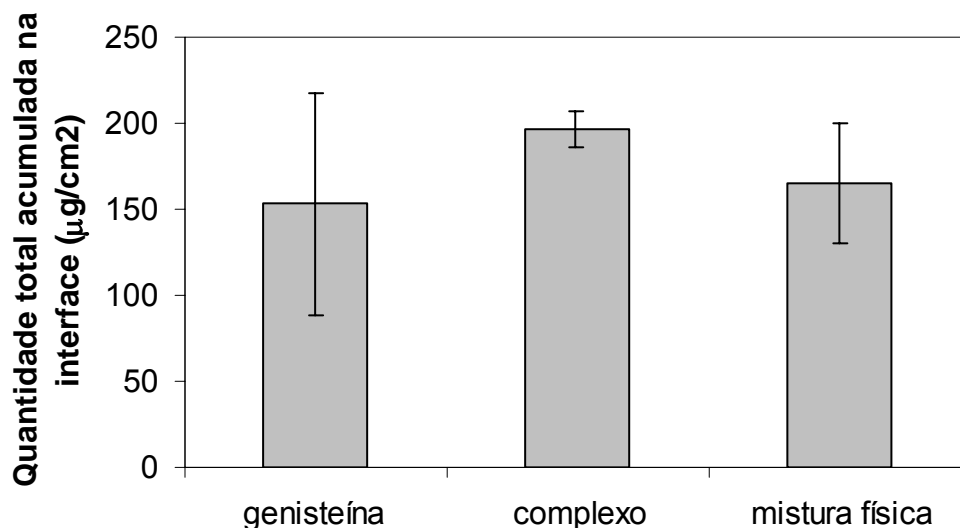


Figura 20. Quantidade total de genisteína acumulada na pele de suíno na presença ou ausência de β CD, após a permeação a partir de gel de HPMC 3%.

Sabe-se que uma concentração de 100 nM de genisteína é suficiente para desencadear resposta estrogênica (KUIPER *et al.*, 1998). A dose acumulada na pele atingiu uma concentração média máxima de 196 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, totalizando aproximadamente 498 μg , no caso da genisteína previamente complexada, considerando a área total de aplicação de 2,54 cm^2 . Essa concentração, de 196 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, é 18,44 vezes maior que a concentração de 100 nM que desencadeia resposta estrogênica. Sendo assim, tanto o complexo, quanto a simples mistura são capazes de elevar a quantidade de genisteína nas estruturas internas da pele em comparação à isoflavona aplicada na ausência da ciclodextrina.

O fato de as quantidades totais de genisteína, permeada e acumulada somadas, não resultarem no total da dose aplicada pode ser devido à permanência de uma grande parte do fármaco e das dispersões sólidas na base de gel aplicado na pele pode não ter difundido e permanecido na base. A figura 21 compara as quantidades totais de genisteína acumulada, permeada e o total liberado a partir do gel de HPMC, e a influência da β CD sobre estes parâmetros.

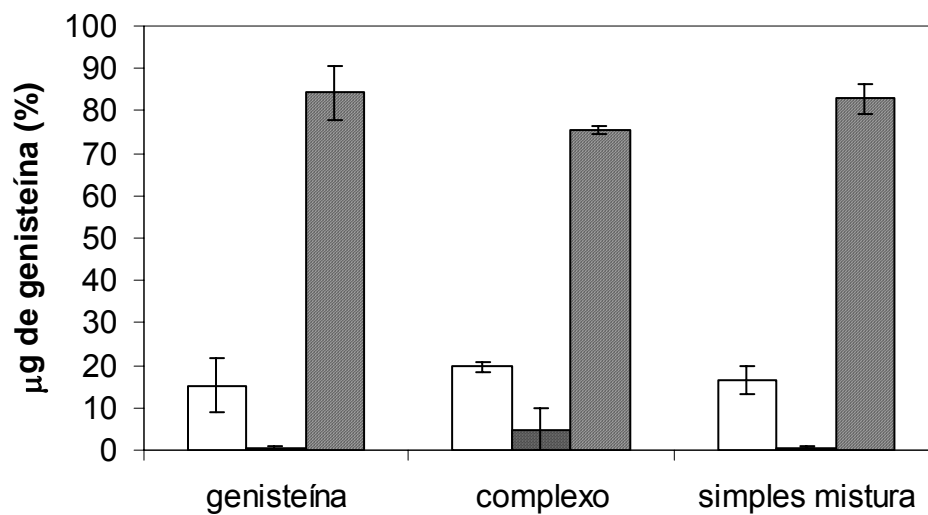


Figura 21. Quantidade total de genisteína % do total aplicado (1mg), (□) acumulada na pele de suíno; (■) quantidade permeada; (▨) quantidade remanescente na base.

O objetivo geral do trabalho foi estudar a associação da genisteína com a β -ciclodextrina, e verificar o efeito desta associação sobre a hidrossolubilidade da isoflavona e sobre a sua permeação cutânea.

O método proposto para a quantificação da genisteína, o qual é inovador, apresentou curvas com valores de regressão que indicam que há linearidade no intervalo de concentração analisado, permitindo o doseamento da isoflavona por CLAE com eluição isocrática. O método está de acordo com as especificações do ICH (1996) e da legislação brasileira (ANVISA, 2003) no tocante à precisão, exatidão e especificidade. Os limites de detecção e quantificação permitiram a análise adequada da genisteína nos experimentos de permeação cutânea e na construção do diagrama de solubilidade.

A associação da genisteína com a β -ciclodextrina, analisada pela construção de um diagrama de solubilidade (HIGUCHI E CONNORS, 1965), promoveu um incremento de até 6,74 vezes em sua hidrossolubilidade.

A possível formação de um complexo entre genisteína e β -ciclodextrina foi caracterizada por análises de H^1 RMN, infravermelho e calorimetria diferencial exploratória. Pela análise de infravermelho não possível afirmar a ocorrência de complexo de inclusão entre as duas substâncias. A análise térmica das dispersões sólidas, bem como a análise de H^1 RMN, demonstram interações significativas entre β -ciclodextrina e genisteína na proporção molar de 1:1, contudo, a formação de um complexo de inclusão, não pode ser evidenciada.

O cálculo do valor de $\log P$ da genisteína (4,36) caracteriza esta isoflavona como uma substância altamente lipofílica, com a capacidade de formar reservatórios nas regiões lipofílicas da pele, o que pode ser observado pela quantificação da genisteína acumulada nos cortes de pele de orelha de suíno realizada posteriormente aos experimentos de permeação cutânea *in vitro*.

A complexação prévia da genisteína com a β -ciclodextrina em meio líquido exerce influência positiva e significativa no aumento da permeabilidade cutânea da genisteína a partir do gel de HPMC 3 %, efeito que pode ser associado ao aumento

da hidrossolubilidade da genisteína, uma vez que a base estudada é aquosa, e ao efeito promotor proporcionados pela presença da β -ciclodextrina.

ADACHI, H.; IRIE, T.; UEKAMA, K.; MANAKO, T.; YANO, T.; SAITA, M. Inhibitory effect of prostaglandin E₁ on laurate-induced peripheral vascular occlusive sequeae in rabbits: optimized topical formulation with β -cyclodextrin derivative and penetration enhancer HPE-101. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 44, p. 1033-1035, 1992.

ADLERCREUTZ, H. Phytoestrogens. State of art. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 7, p. 201-207, 1999.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H.; FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 99 (1), p. 53-62, 2004.

AMDIDOUHE, D.; MONTASSIER, P.; POELMAN, M.C.; DUCHÊNE, D. Evaluation by laser Doppler velocimetry of the attenuation of tretinoin induced skin irritation by β -cyclodextrin complexation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 111, p. 111-116, 1996.

ANSEL, H. C. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 10 cap. São Paulo: Premier, 2000.

ARIMA, H.; ADACHI, H.; IRIE, T.; UEKAMA, K.; PITHA, J. Enhancement of the antiinflammatory effect of ethyl 4-biphenyl acetate in ointment by β -cyclodextrin derivatives: increased absorption and localized activation of the prodrug in rats. **Pharmaceutical Research**, v. 11, p. 1152-1156, 1990.

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.

ARORA, A.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24; p. 1355-1363, 1998.

ARORA, A.; BYREM, T.M.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Modulation of Liposomal Membrane Fluidity by flavonoids and isoflavonoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 373(1), p. 102-109, 2000.

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

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 of action of penetration enhancers in human skin. **Journal of Controlled Release**, v. 6, p. 85-97, 1987.

BARRY, B. W. Lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. **Journal of Controlled Release**, v. 15, p. 237-248, 1991.

BARRY, B.W. Is transdermal drug delivery research still important today? **Drug Discovery Today**, v. 6 (19); p. 967-971, 2001.

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

BERNEBURG, M.; PLETTENBERG, H.; KRUTMANN, J. Photoaging of human skin. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v. 16; p. 239-244, 2000.

BETTINI, R.; CATELLANI, P.L.; SANTI, P.; MASSIMO, G. PEPPAS, N.A.; COLOMBO, P. Traslocation of drug particles in HPMC matrix gel layer: effect of drug solubility and influence on release rate. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 383-391, 2001.

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 90, p. 157-177, 2001.

BONINA, F.; LANZA, M.; MONTENEGRO, L.; PUGLISI, C.; TOMAINO, A.; TROMBETA, D.; CASTELLI, F.; SAIJA, A. Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 145, p. 87-94, 1996.

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

BOSMAN, I. J.; ENSING, K.; DE ZEEUW, R. A. Standardization procedure for the in vitro skin permeation of anticholinergics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 169 (1), p. 65-73, 1998.

BOTELLA, S.M.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; MENÉDEZ, VÁZUQUEZ, L. LERNER, D.A. Analytical applications of retinoid-cyclodextrin inclusion complexes. 1. Characterization of retinal- β -cyclodextrin complex. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, p. 909-915, 1996.

BOWEY, E.; ADLERCREUTZ, H.; ROWLAND, I. Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 631-636, 2003.

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

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

BRENNAN, M.; BHATTI, H.; NERUSU, K.C.; BHAGAVATHULA, N.; KANG, S.; FISHER, G.J.; VARANI, J.; VOORHEES, J.J. Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 78(1), p.43-48, 2003.

BROBERG, A.; HEINO, J. Integrin $\alpha 2\beta 1$ -dependent contraction of floating collagen gels and induction of collagenase are inhibited by tyrosine kinase inhibitors. **Experimental Cell Research**, v. 228, p. 29-35, 1996.

BUDAVANI, S. **The Merck Index**. 11 ed, New Jersey: Merck and Rahway, 1989.

CALABRÒ, M.L.; TOMMASINI, S.; DONATO, P.; RANERI, D.; STANCANELLI, R.; FICARRA, P.; FICARRA, R.; COSTA, C.; CATANIA, S.; RUSTICHELLI, C.; GAMBERINI, G. Effects of α - and β -ciclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v. 35 (2), p. 365-377, 2004.

CAMPISI, J. Replicative senescence: an old live's tale? **Cell**, v. 84, p. 497-500, 1996.

CAMPOS, P.M.B.G.M.; BENETTON, S.A.; ECCLESTON, G. Vitamina A: penetração na pele. **Cosmetics and Toiletries**, v. 10, p. 55-59, jul/ago 1998.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, p. 749-760, 1997.

CAPPELLETTI, V., SATURNO, G., MIODINI, P., KORNER, W., DAIDONE, M.G.. Selective modulation of ER-beta by estradiol and xenoestrogens in human breast cancer cell lines. **Cell Molecular and Life Sciences**, v. 60, p. 567-576, 2003.

CHATTARRAJ, S.C.; WALKER, R.L. In: **Penetration Enhancer Classification, Percutaneous Penetration Enhancers** (MAIBAACH, H.I. and SMITH, E.W.), Boca Raton: CRC Press, 1995.

CHESNOY, S. Influence de la structure et des modifications structurales du stratum corneum sur le transport iontophoretique. Paris: Groupe de Formation Doctorale Pharmacotechnie et Biopharmacie, Université Paris XI, 1997. Tese de Doutorado.

CHIECHI, L. M.; SECRETO, G.; D'AMORE, M.; FANELLI, M.; VENTURELLI, E.; CANTATORE, F.; VALERIO, T.; LA SELVA, G.; LOIZZI, P. Efficacy of a soy rich diet in preventing postmenopausal osteoporosis: the Menfis randomized trial. **Maturitas**, v. 42, p. 295-300, 2002.

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(4), p. 241-246, 2003.

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(4), p. 400-404, 2004.

COLDHAM, N.G.; HOWELLS, L.C.; SANTI, A.; MONTEISSA, C.; LANGLAIS, C.; KING, L.V.; MACPHERSON, D.D.; SAUER, M.J. Biotransformation of genistein in the rat: elucidation of metabolite structure by production mass fragmentology. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 70, p. 169-148, 1999.

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., E WILCOX, G. Phytoestrogens in clinical practice. **Integr. Med.**, v. 1, p. 27– 34, 1998.

DEL VALLE, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1033-1046, 2004.

DEMUNER, A.J.; BARBOSA, C.A., NASCIMENTO, J.C.; VIEIRA, J.J.; DOS SANTOS, M.A. Isolamento e avaliação da atividade nematocidada de constituintes químicos de *Mucuna cinerea* contra *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*. **Química Nova**, v. 26 (3), p. 335-339, 2003.

DIMRI, G. P.; LEE X.; BASILE, G.; ACOSTA, E.; SCOTT, G.; ROSKELLEY, C.; MEDRANO, E. E.; LINSKENS, M.; RUBELJ, I.; PEREIRA-SMITH, O.; M. PEACOCKE, O.; CAMPISI, J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo (replicative senescence/tumor suppression/18-galactosidase). **Cell Biology**, v. 92, p. 9363-9367, 1995.

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

DUNN, L.N.; DAMESYN, M.; ALISON, A.; REUBEN, D.B.; GREENDALE, G.A. Does estrogen prevent skin aging?: Results from the first national health and nutrition examination survey (Nhanes I). **Archives of Dermatology**, v. 133, p. 339-342, 1997.

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.

FINNIN, B. C. and MORGAN, T.M. Transdermal penetration enhancers: applications, limitations, and potential. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 10, p. 955-958, 1999.

FISHER, G.J.; WANG, Z.Q., DATTA S.C.; VARANI J.; KANG, S; VOORHEES, J.J. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. **New England Journal of Medicine**, v.337, p. 1419-1428, 1997.

FISHER, G.J.; TALWAR, H.S.; LIN P.; MCPHILLIPS, F., WANG, Z.Q., Li, X.; WAN, Y., KANG, S; VOORHEES, J.J. Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways 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, C.S.; VOORHESS, J.J. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. **Arch Dermatology**, v. 138, p. 1462-1470, 2002.

FRITZ, W.A.; COWARD, L.; WANG, J.; LAMARTINIERI, C.A. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. **Carcinogenesis**, v. 19; p. 2151-2158; 1998.

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 soybeans and soybeans products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, p. 457-461, 1996.

GENDIMENICO, G.J.; MACK, V.J.; SIOCK, P.A.; MEZICK, J.A. Topical estrogens: their effects on connective tissue in hairless mouse. **Archives of Dermatologic Research**, v. 294, p. 231-236, 2002.

GETIE, M; GEBRE-MARIAM, R.; RIETZ, R. *et al.* Evaluation of the release profiles of flavonoids from topical formulations of the crude extract of the leaves of *Dodonea viscosa* (Sapindaceae). **Pharmazie**, v. 57, n. 5, p. 320-322, 2002.

GIBAUD, S.; ZIRAR, S. B.; MUTZENHARDT, P.; FRIES, I.; ASTIER, A. Melarsoprol-cyclodextrins inclusion complexes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 306 (1-2), p. 107-121, 2005.

GROSS, S.; KNEBEL, A. ; TENEV, T.; NEININGER, A.; GAESTEL, M.; HERRLICH, P.; BÖHMER, F.D. Inactivation of protein-tyrosine phosphatases as mechanism of

UV-induced signal transduction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 26378-26386, 1999.

GUO, Q.; RIMBACH, G.; MOINI, H.; WEBWE, 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. Percutaneous penetration enhancement: physicochemical considerations and implications for prodrug design. In: Sloan, K.B> (Ed), **Prodrugs – topical and ocular delivery**, Marcel Dekker: New York, 1992, p.1-16.

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

HEDGES, A. Industrial Applications of Cyclodextrinas. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 2035-2044, 1998.

HEIJNEN, C.G.M.; HAENEN, G.R.M.M.; ACKER, F.A.A.; VIJGH, W.J.F.; BAST, A. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. **Toxicology in Vitro**, v. 15, p. 3-6, 2001.

HENRY, F.; PIERARD-FRANCHIMONT, C.; CAUWENBERGH, G.; PIERARD, G.E. Age-related changes in facial skin contours and rheology. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 45(2), p. 220-222, 1997.

HIGUCHI, T. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. **Journal of Society of Cosmetic Chemistry**, v. 11, p. 85-97, 1960 *apud* MATSUDA, H.; ARIMA, H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, p. 81-99, 1999.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase solubility techniques. **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**, v. 4, p. 117-212, 1965.

HISIEH, D. S. (Ed.) In: understanding permeation enhancement technologies, **Drug Permeation Enhancement**. New York: Marcel Dekker, 1994.

HO, S.C.; WOO, J.L.; LEUNG, S.S.F.; SHAM, A.L.K.; LAM, JANUS, E.D. Intake of soy products is associated with better plasma lipid profiles in the Hong Kong Chinese population. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2590-2593, 2000.

HUNTLEY, A. L.; ERNST, E. Soy for the treatment of perimenopausal symptoms – a systematic review. **Maturitas**; article in press; p. 1-9; 2003.

INAL, E.M.; KAVIMANI, S.; KUMAR, K.S. Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet A. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 26 (6), p. 536-539, 2001.

INTERNATIONAL Conference On The Harmonization Of Technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). **Guidance for Industry – Q2B** Validation of analytical procedures: methodology, Rockville, 1996.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, p. 147-162, 1997.

JENKINS, G. Molecular mechanisms of skin ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 123, p. 801–810, 2002.

KANG, S.; FISHER, J.G.; VOORHEES, J.J. Photoaging and Topical Tretinoin. **Archives of Dermatology**, v. 133, p. 1280-1284, 1997.

KANG, K. S.; CHE, J. H.; LEE, Y. S. Lack of adverse effects in the F1 offspring maternally exposed to genistein at human intake dose level. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 43-51, 2002.

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.

KARIN, M.; HUNTER, T. Transcriptional control by protein phosphorylation signal transmission from the cell surface to the nucleus. **Current Biology**, v. 5, p. 747-758, 1995.

KARIN, M.; LIU, Z.; ZANDI, E. AP-1 function and regulation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, p. 240-246, 1997.

KATZENELLENBOGEN, B.S. Estrogen receptors: bioactivities and interactions with cell signaling pathways. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 287–293, 1996.

KAWASHIMA, K.; INOUE, T.; TSUTSUMI, N.; ENDO, H. Effect of KCA-098 on the function of osteoblast-like cells and the formation of TRAP-positive multinucleated cell population. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, p. 133-139, 1996 .

KINNARINEN, T.; JARHO, P.; JÄRVINEN, K.; JÄRVINEN, T. Pulmonary deposition of a budesonide/ γ -cyclodextrin complex *in vitro*. **Journal of Controlled Release**, v. 90 (2), p. 197-205, 2003.

KOESTER, L. S.; XAVIER, C. R.; MAYORGA, P.; BASSANI, V. L. Influence of β -cyclodextrin complexation on carbamazepine release from hydroxypropyl methylcellulose matrix tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, p. 85-91, 2003.

KOESTER, L. S.; GUTERRES, S. S.; LE ROCH, M.; EIFLER-LIMA, V. L.; ZUANAZZI, J. A.; BASSANI, V. L. Ofloxacin/ β -cyclodextrin Complexation. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27(6), p. 533-540, 2001.

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

KUIPER, G.G.J.M.; LEMMEN, J.G.; CARLSSON, B.; CORTON, J.C.; SAFE, S.H.; SAAG, P.T.; BURG, B.; GUSTAFSSON, J.A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . **Endocrinology**, v. 139, p. 4252-4263, 1998.

KULLING, S. E.; LEHMANN, L.; METZLER, M. Oxidative metabolism and genotóxico 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.

LEGENDRE, J.Y.; RAULT, I.; PETIT, A.; LUIJTEN, W.; DEMUYNCK, I.; HORVATH, S.; GINOT, Y.M.; CUINE, A. Effects of β -cyclodextrins on skin: implications for the transdermal delivery of pibedil and a novel cognition enhancing-drug, S-9977. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 311-322, 1995.

LEVITZKI, A. Tyrosine kinases for cancer therapy. **European Journal of Cancer**, v. 38, suplemento 5, p. 11-18, 2002.

LEZCANO, M.; AL-SOUFI, W.; NOVO, M.; RODRIÁGUEZ-NUÑEZ, E.; TATO, J. V. Complexation of Several Benzimidazole-Type Fungicides with- and β -Cyclodextrins **Journal of Agriculture, Food and Chemistry**. v. 50, p. 108-112, 2002.

LIEN, E. J.; REN, S.; BUI, H.; WANG, R. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 285-294, 1999.

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

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1. Drug Solubilization and Stabilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, p. 1017-1025, 1996.

LOFTSSON, T.; MÁSSON, M. Cyclodextrins in topical formulations: theory and practice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, p. 15-30, 2001.

LOFTSSON, T.; MÁSSON, M.; SIGURDSSON, H. H.; MANGÚSSON, P.; LEGOFFIC, F. Cyclodextrins as co-enhancers in dermal and transdermal drug delivery. **Pharmazie**, v. 53, p.137-139, 1998.

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.

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, 2005.

MATSUDA, H.; ARIMA, H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, p. 81-99, 1999.

MANUSKIATTI, W.; MAIBACH, H. Hyaluronic acid and skin: wound healing and aging. **International Journal of Dermatology**, v. 35(8), p. 539-544, 1996.

MAROZIENE, A.; KLIUKENE, R.; SARLAUSKAS, J. *et al.* Inhibition of phthalocyanine-sensitized photohemolysis of human erythrocytes by polyphenolic antioxidants: description of quantitative structure-activity relationships. **Cancer Letters**, v. 157 (1), p. 39-44, 2000.

MÁSSON, M.; LOFTSSON, T.; MÁSSON, G.; STEFÁNSSON, E. Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and *in vitro* testing. **Journal of Controlled Release**, v. 59, p. 107-118, 1999.

MIKSICEK, R.J. Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 201, p. 44-50, 1995.

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

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.

MIYAZAKI, K.; HANAMIZU, T.; IIZUKA, R.; CHIBA, K. *Bifidobacterium*-fermented soy milk extract stimulates hyaluronic acid production in human skin cells and hairless mouse skin. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 16, p. 108-116, 2003.

MIYAZAKI, K.; HANAMIZU, T.; SONE, T.; CHIBA, K.; KINOSHITA, T.; YOSHIKAWA, S. Topical application of *Bifidobacterium*-fermented soy milk extract containing genistein and daidzein improves rheological and physiological properties of skin. **Journal of Cosmetic Sciences**, v.55, p. 473-479, 2004.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A. *et al.* Passive skin enhancement and its quantification *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 103-112, 2001.

MUELLER, S.O.; SIMON, S.; CHAE, K.; METZLER, M.; KORACH, K.S. Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor α (ER α) and ER β in human cells. **Toxicological Sciences**, v. 80, p. 14-25, 2004.

MURA, P.; BETTINETTI, G.P.; MANDEROLI, A.; FAUCCI, M.T.; BRAMANTI, G.; SORRENTI, M. Interactions of ketoprofen and ibuprofen with β -cyclodextrins in solutions and in the solid state. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 166, p. 189-203, 1998.

NAHAS, E.P.; NETO, J.N.; DELUCA, L.; TRAIMAN, P.; PONTES, A.; DALBEN, I. Benefits of soy germ isoflavones in postmenopausal women with contraindication for conventional hormone replacement therapy. **Maturitas**, v. 48, p. 372-380, 2004.

NAKANISHI, K. **Infrared absorption spectroscopy: practical**. San Francisco: Nakanodo Company, 1964.

NETZ, P.A.; ORTEGA, G.G. **Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

OKIMOTO, K.; RAJEWSKI, R. A.; STELLA, V. J. Release of testosterone from an osmotic pump tablet utilizing (SBE) $_7$ m- β -cyclodextrin as both a solubilizing and an osmotic pump agent. **Journal of Controlled Release**, v. 58 (1), p. 29-38, 1999.

PANNALA, A.S.; CHAN, T.S.; O'BRIEN, P.J.; RICE-EVANS, C.A. Flavonoids B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, p. 1161-1168, 2001.

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

PÉAN, C.; CRÉMINON, C.; GRASSI, J.; PRADELLES, P.; PERLY, B.; DJEDAINI-PILARD. NMR Investigations of the inclusions of Thyroxine and derivatives in natural cyclodextrins. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 33, p. 307-319, 1999.

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

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R. **Tecnologia Farmacêutica**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, v. 1, 1995.

RAJEWSKI, R. A.; STELLA, V. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. *In vivo* drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 11, p. 1142-1169, 1996.

- 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*. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 6, p. 481-485, 1995(a).
- RECORD, I. R.; JANNES, M.; DREOSTI, I. E.; KING, R. A. Mouse splenocytes by the soy isoflavone genistein *in vitro* but not *in vivo*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 919-922, 1995(b).
- ROBERTS, M.S.; CROSS, S.E.; PELLET, M.A. **Dermatological and transdermal formulations**, v.119, New York: Marcel Dekker, p. 89-194, 2002.
- SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; GIACCHI, M.; DE PASQUALE, A.; BONINA, F. Influence of different penetration enhancers on *in vitro* skin permeation and *in vivo* photoprotective effect of flavonoids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 175, p. 85-94, 1998.
- SARASIN, A. The molecular pathways of ultraviolet induced carcinogenesis. **Mutationresearch/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 428 (1-2), p. 5-10, 1999.
- SATOR, P.G.; SCHMIDT, 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 (suppl.4), p. 36–40, 2004.
- SCHAEFER, H. REDELMEIER, T. E.; BENECH-KIEFFER, F. Novel cosmetic delivery systems. In: Magdassi, S. E Touitou, E. (Ed.) **The skin and its permeability**. New York: Marcel Dekker, Cap. 2; 1999.
- SCHARFFETTER-KOCHANÉK, K.; BRENNEISEN, P.; WENK, J.; HERRMANN, G.; MA, W.; KUHR, L.; MEEWES, C.; WLASCHEK, M. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. **Experimental Gerontology**, v.35, p. 307-316, 2000.
- SCHMID, D.; MUGGLI, R.; ZÜLLI, F. Dermatological Applications of Soy Isoflavones to Prevent Skin Ageing in Postmenopausal Women. *Cosmetics and Toiletries Manufacture Worldwide*; disponível em: <http://www.ctmw.com>; acessado em 01/08/2003.
- SCHMIDT, J.B.; BINDER, M.; DEMSCHIK, G.; BIEGLMAYER, C.; REINER, A. Treatment of skin aging with topical estrogens. **International Journal of Dermatology**, v. 35, p. 669-674, 1996.
- SCHREIBER, S.; MAHMOUD, A.; VUIA, A.; RÜBBELKE, M.K.; SCHMIDT, E.; SCHALLER, M.; KANDÁROVÁ, H.; HABERLAND, A.; SCHÄFER, U.F.; BOCK U. Reconstructed epidermis versus human and animal skin in skin absorption studies. **Toxicology in vitro**, v. 19 (6), p. 813-822, 2005.

SETCHELL, K.D.R. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 98, p. 1333-1346, 1998.

SETCHELL, K.D.R.; BROWN, N.M.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; BRASHEAR, W.T.; WOLFE, B.E.; KIRSHNER, A.S.; HEUBI, J.E. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 447-453, 2002.

SHAH, V.P. Skin penetration enhancers: scientific perspectives. In: HISIEH, D.S. (Ed.) **Drug Permeation Enhancement: theory and applications**. New York: Marcel Dekker, Cap 2, 1994.

SIGUROADÓTTIR, A. M.; LOFTSSON, T. The effect of polyvinylpyrrolidone on hydrocortisone and its diffusion through hairless mouse skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 126, p. 73-78, 1995.

SIMEONI, S.; SCALIA, S.; BENSON, H. A. E. Influence of cyclodextrins on in vitro human skin absorption of the sunscreen, butyl-ethoxydibenzoylmethane. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 163–171, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Capítulo 23; p.489-516; 2ed. Porto Alegre/Florianópolis; Editore da Universidade UFRGS/Editora da Universidade da UFSC, 2000.

SOMEKAWA, Y.; CHIGUCHI, M.; ISHIBASHI, T.; ASO, T. Soy Intake related to Menopausal Symptoms, Serum Lipids, and Bone Mineral Density in Postmenopausal Japanese Women. **The American College of Obstetricians and Gynecologists**, v. 97, p. 109-115, 2001.

SOUZA, K.C.B. Avaliação biológica de preparações obtidas a partir das inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. (Marcela). 2002, 247p. Tese de Doutorado. PPG em ciências farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2002.

STELLA, V. J.; RAO, V. M.; ZANNOU, E. A.; ZIA, V. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, p. 3-16, 1999.

SZETJLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 1743-1753, 1998.

SZEJTLI, J.; SZENTE, L. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.61 (3), p. 115-125, 2005.

SZENTE, L ; SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. **Trends in Food Science and Technology**, v.137-142 (3-4), 2004.

TANAKA, M.; IWATA, Y.; KOUZUKI, Y. Effect of 2-hydroxy-propyl- β -cyclodextrin on percutaneous absorption of methyl paraben. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 47, p. 897-900, 1995.

TANAKA, M.; MATSUDA, H.; SUMIYOSHI, H. 2-Hydroxy-propylated cyclodextrins as a sustained release carrier for fragrance materials. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 44, p. 416-420, 1996 *apud* MATSUDA, H.; ARIMA, H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, p. 81-99, 1999.

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

THORNTON, M.J.; TAYLOR, A.H.; MULLIGAN, K.; AL-AZZAWI, F.; LYON, C.C.; O'DRISCOLLI, J.; MESSENGER, A.G. Oestrogen receptor beta is the predominant oestrogen receptor in human scalp skin. **Experimental Dermatology**, v. 12(2), p.181-190, 2003.

TREMBLE, P.; DAMSKY, C.H.; WERB, Z. Components of the nuclear signaling that regulate collagenase gene expression in response to integrin-derived signals. **Journal of Cell Biology**, v. 129, p. 1707-1720, 1995.

TOREL, J.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. **Phytochemistry**, v. 25, p. 383-385, 1986.

ULLRICH, A.; SCHLESSINGER, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. **Cell**, v. 61, p. 203-212, 1990.

URANO, R.; SAKABE, K.; SEIKI, K.; OHKIDO, M. Female sex hormone stimulates cultured human keratinocyte proliferation and its RNA- and protein-synthetic activities. **Journal of Dermatological Science**, v. 9(3), p. 176-184, 1995.

VAN ACKER, A.B.E.; VAN DEN BERG, D.; TROMP, M.N.L.; GRIFFIOEN, D.H.; VAN BENNEKOM, W.P.; VAN DER VIJGH, W.J.F.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 331-342, 1996.

VARANI, J.; KELLEY, E.A.; PERONE, P.; LATEEF, H. Retinoid-induced epidermal hyperplasia in human skin organ culture: inhibition with soy extract and soy isoflavones. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 77, p. 176-183, 2004.

VERMA, D. D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 258 (1-2), p. 141-151, 2003.

VITORIA, M.; BENTLEY, L. B.; VIANNA, R. F.; WILSON, S.; COLLET, J. H. Characterization of the influence of some cyclodextrins on the stratum corneum from the hairless mouse. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 49, p. 397-402, 1997.

VOLLMER, U.; MÜLLER, B. W.; WILFERT, B.; PETERS, T. An improved model for studies on transdermal drug absorption *in vivo* in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 45, p. 242-245,1993.

VOLLMER, U.; MÜLLER, B. W.; WILFERT, B.; PETERS, T. A study of percutaneous absorption-enhancing effects of cyclodextrins derivatives in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p. 51-58,1994.

VUILLERMOZ, B.; WEGROWSKI, Y.; CONTENT-AUDONNEAU, J.C.; DANOUX, L.; PAULY, G.; MAQUART, F.X. Influence of aging on glycosaminoglicans an small leucine-rich proteoglycans production by skin fibroblasts. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 277, p. 63-72, 2005.

WALTERS, K. A. and ROBERTS, M.S. Dermatological and transdermal formulations. In: Walters, K. A. (Ed). **The structure and function of skin**. New York: Marcel Dekker, Cap. 2, 2002.

WANG, Y.; E, Y.; ZHANG, X.; LEBWOHL, M.; DELEO, V.; WEI, H. Inhibition of ultraviolet B (UVB)-induced c-fos and c-jun expression *in vivo* by a tyrosine kinase inhibitor genistein. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 649-654, 1998.

WANG, J.; ELTOUM,I.; LAMARTINIERI, C. A. Dietary genistein suppresses chemically induced prostate câncer in Lobund-Wistar rats. **Cancer Letters**, v. 186, p. 11-18, 2002.

WEI, H., BOWEN, R., CAI, Q., BARNES, S., WANG, Y. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. **Proceedings of Social Experimental Biology and Medicine**, v. 208, p. 124-130, 1995.

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

WEI, H.; SALADI, R.; LU, YUHUN; WANG, Y.; PALEP, S.R.; MOORE, J.; PHELPS, R.; SHYONG, E.; LEBWOHL, M.G. Isoflavone genistein: photoprotection and clinical implications in dermatology. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 3811S-3819S, 2003.

WILLIAMS, A.C. and BARRY, B.W. Urea analogues in propyleneglycol as penetration enhancers in human skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 36, p. 43-50, 1989.

XU, P.; CHIEN, Y.W. Enhanced skin permeability for transdermal ddrug delivery: physiopathological and physicochemical considerations. **Critical Reviews in therapeutical Drug Crrier Systems**, v. 8, p. 211-236, 1991.

ZATZ, J.L. Aumento da penetração cutânea. **Cosmetics and Toiletries**, v. 7, p. 52-58, 1995.

ZHANG, H; WANG, L; SUN, Y. Why B-Ring is the Active Center for Genistein to Scavenge Peroxyl Radical: A DFT Study. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 909-911, 2003.

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

ZULLI, F.; SCHMID, D.; NISSEN, H.; PRIEUR, H. Penetration and Metabolism of Isoflavones in Human Skin. **Cosmetics and Toiletries**; v. 118(9), p. 71-76; 2003.

Anexo A – Tabelas

Tabela A-1. Áreas dos picos de genisteína, obtidos a partir da curva padrão, analisada por CLAE.

Valor das Áreas (A)	Concentração (µg/mL)				
	1	5	10	20	50
A1	169872	603968	1161951	2350485	5707988
A2	163734	604345	1168096	2364096	5714347
A3	161257	607903	1170014	2364612	5702214
Média	164954	605405	1166687	2359974	5708183
Desvio Padrão	4435,25	2171,25	4212,12	8218,40	6068,85
DPR (%)	2,69	0,36	0,36	0,35	0,11

A1, A2 e A3 = soluções de genisteína injetadas (repetições).

Tabela A-2. Estudo de repetibilidade por CLAE no primeiro dia de análise.

Concentração (µg/mL)	Am 1	Am 2	Am 3	Área Média	Desvio Padrão	DPR (%)
1,0	137837	140816	141823	140158,7	2072,71	1,48
5,0	632534	630966	605666	623055,3	15,080,00	2,42
10,0	1477586	1432323	1428206	1446038	27398,52	1,89
20,0	2655155	2657469	2657125	2656583	1248,59	0,05
50,0	6204937	5971419	6218839	6131732	139008,74	2,27

Tabela A-3. Curva de controle de qualidade – estudo de repetibilidade por CLAE no primeiro dia de análise com valores intermediários a curva padrão de genisteína.

Concentração (µg/mL)	Am 1	Am 2	Am 3	Área Média	Desvio Padrão	DPR (%)
2,0	333679	331153	329876	280317,3	4145,41	1,48
15,0	1749852	1752555	1734046	1745484	9997,66	0,57
30,0	3645797	3655616	3673012	3658142	13782,17	0,38

Tabela A-4. Estudo de repetibilidade por CLAE no segundo dia de análise.

Concentração (µg/mL)	Am 1	Am 2	Am 3	Área Média	Desvio Padrão	DPR (%)
1,0	168584	170971	167439	168998	1802,03	1,07
5,0	584811	583034	581915	583253,33	1460,41	0,25
10,0	1095911	1105563	1108070	1103181,3	6419,86	0,58
20,0	2183967	2181683	2204039	2189896,3	12301,03	0,56
50,0	5205505	5185734	5195913	5195717,3	9886,95	0,19

Tabela A-5. Curva de controle de qualidade – estudo de repetibilidade por CLAE no segundo dia de análise com valores intermediários a curva padrão de genisteína.

Concentração (µg/mL)	Am 1	Am 2	Am 3	Área Média	Desvio Padrão	DPR (%)
2,0	323967	321534	323126	322875,7	1235,67	0,38
15,0	17992338	1782022	1782991	1785784	5696,86	0,32
30,0	3615562	36250638	3602362	3614331	11402,97	0,32

Tabela A-6. Estudo de repetibilidade por CLAE no terceiro dia de análise.

Concentração (µg/mL)	Am 1	Am 2	Am 3	Área Média	Desvio Padrão	DPR (%)
1,0	169872	163734	161257	164954,33	4435,25	2,69
5,0	603968	604345	607903	605405,33	2171,24	0,36
10,0	1161951	1168096	1170014	1166687	4212,12	0,36
20,0	2350485	2364825	2364612	2359974	8218,41	0,35
50,0	570798	5714347	5702214	5708183	6063,85	0,11

Tabela A-7. Curva de controle de qualidade – estudo de repetibilidade por CLAE no terceiro dia de análise com valores intermediários a curva padrão de genisteína.

Concentração (µg/mL)	Am 1	Am 2	Am 3	Área Média	Desvio Padrão	DPR (%)
2,0	339744	327468	322514	329908,7	8870,51	2,69
15,0	1808569	1787490	1804808	1800289	11242,65	0,62
30,0	3705240	3677458	3700487	3700487	21059,14	0,57

Tabela A-8. Estudo de precisão intermediária (inter-dia) do método proposto por CLAE.

Concentração (µg/mL)	Área Média	Desvio Padrão	DPR (%)
1,0	145387,3	2108,25	1,45
5,0	569163,4	2108,25	0,36
10,0	114257	10299,23	0,90
20,0	2296764	6912,89	0,30
50,0	555951	6930,29	0,12

Tabela A-9. Estudo de precisão intermediária (inter-dia) por CLAE a partir da curva de controle de qualidade.

Concentração (µg/mL)	Área Média	Desvio Padrão	DPR (%)
2,0	328118	6079,86	1,85295
15,0	1777186	25873,74	1,455882
30,0	3657653	39784,51	1,087706

Tabela A-10. ANOVA da curva padrão de liberação.

ANOVA	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,9885E+13	1,98846E+13	25537,4499	5,4031E-07
Resíduo	3	2335929229	778643076,2		
Total	4	1,9887E+13			

	Coefficientes	Erro Padrão	Stat t	Valor-P	95% inferiores	95% superiores
Interseção	50884,785	17454,266	2,92	0,06172969	-4662,5312	106432,1018
Variável X 1	112929,44	706,67287	159,80	5,4031E-07	110680,49	115178,3926

Tabela A-11. Estatística t-student comparativa da liberação de genisteína a partir de gel de HPMC (pura x complexada).

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes

	Variável 1	Variável 2
Média	1,879342	25,7328
Variância	1,532722	87,94258
Observações	6	6
Hipótese de Diferença de Média	0	
gl	5	
Stat t	-6,17697	
P(T<=t) uni-caudal	0,00081	
t crítico uni-caudal	2,015049	
P(T<=t) bi-caudal	0,00162	
t crítico bi-caudal	2,570578	

Tabela A-12. Estatística t-student comparativa da liberação de genisteína a partir de gel de HPMC (pura x simples mistura).

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	Variável 1	Variável 2
Média	1,879342	2,014985
Variância	1,532722	4,381759
Observações	6	6
Variância Agrupada	2,95724	
Hipótese de Diferença de Média	0	
gl	10	
Stat t	-0,13662	
P(T<=t) uni-caudal	0,447021	
t crítico uni-caudal	1,812462	
P(T<=t) bi-caudal	0,894042	
t crítico bi-caudal	2,228139	

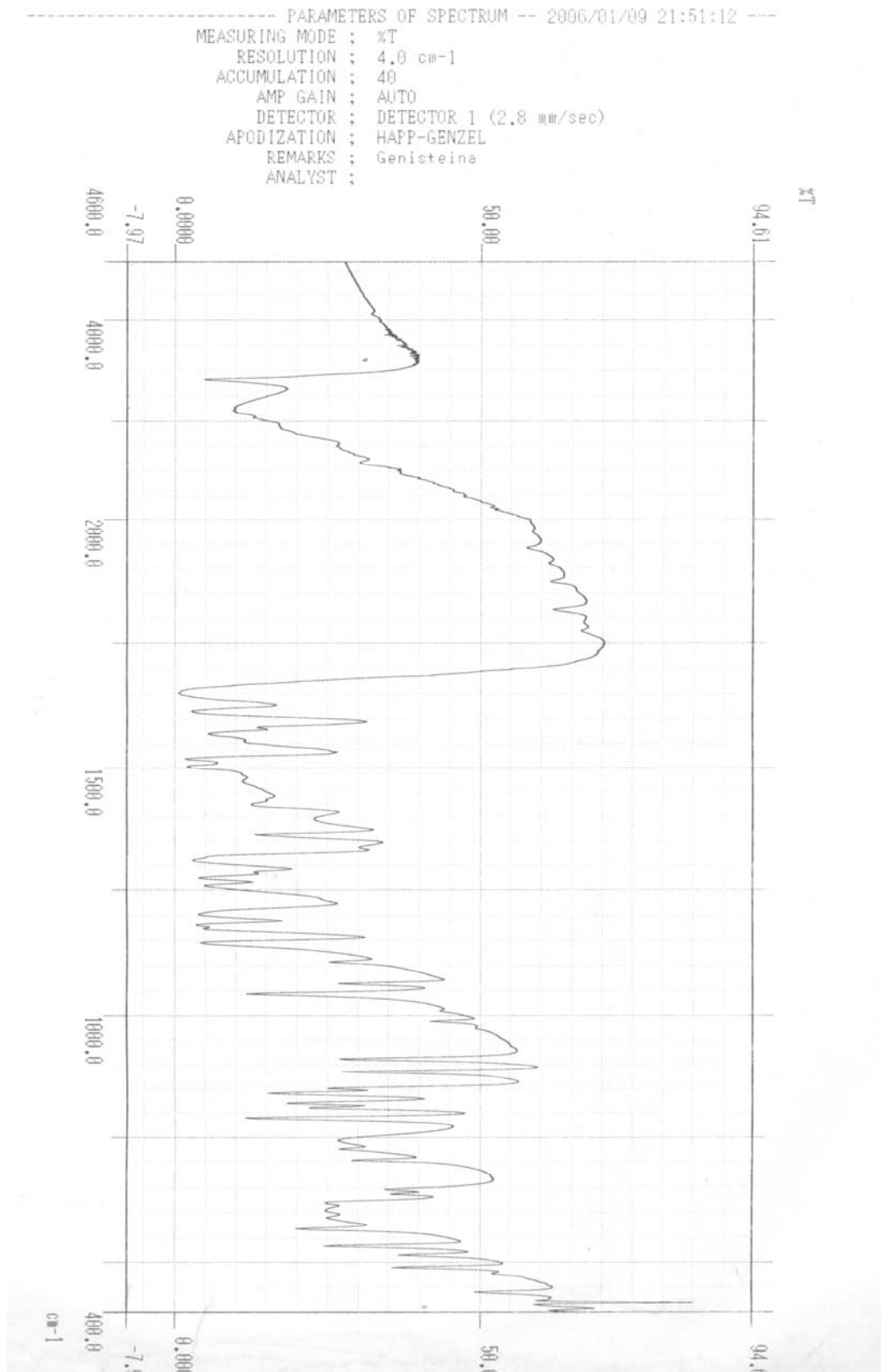
Tabela A-13. Estatística t-student comparativa da liberação de genisteína a partir de gel de HPMC (complexada x simples mistura).

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes		
	Variável 1	Variável 2
Média	25,7328	2,014985
Variância	8794258	4,381759
Observações	6	6
Hipótese de Diferença de Média	0	
gl	5	
Stat t	6,046335	
P(T<=t) uni-caudal	0,000892	
t crítico uni-caudal	2,015049	
P(T<=t) bi-caudal	0,001784	
t crítico bi-caudal	2,570578	

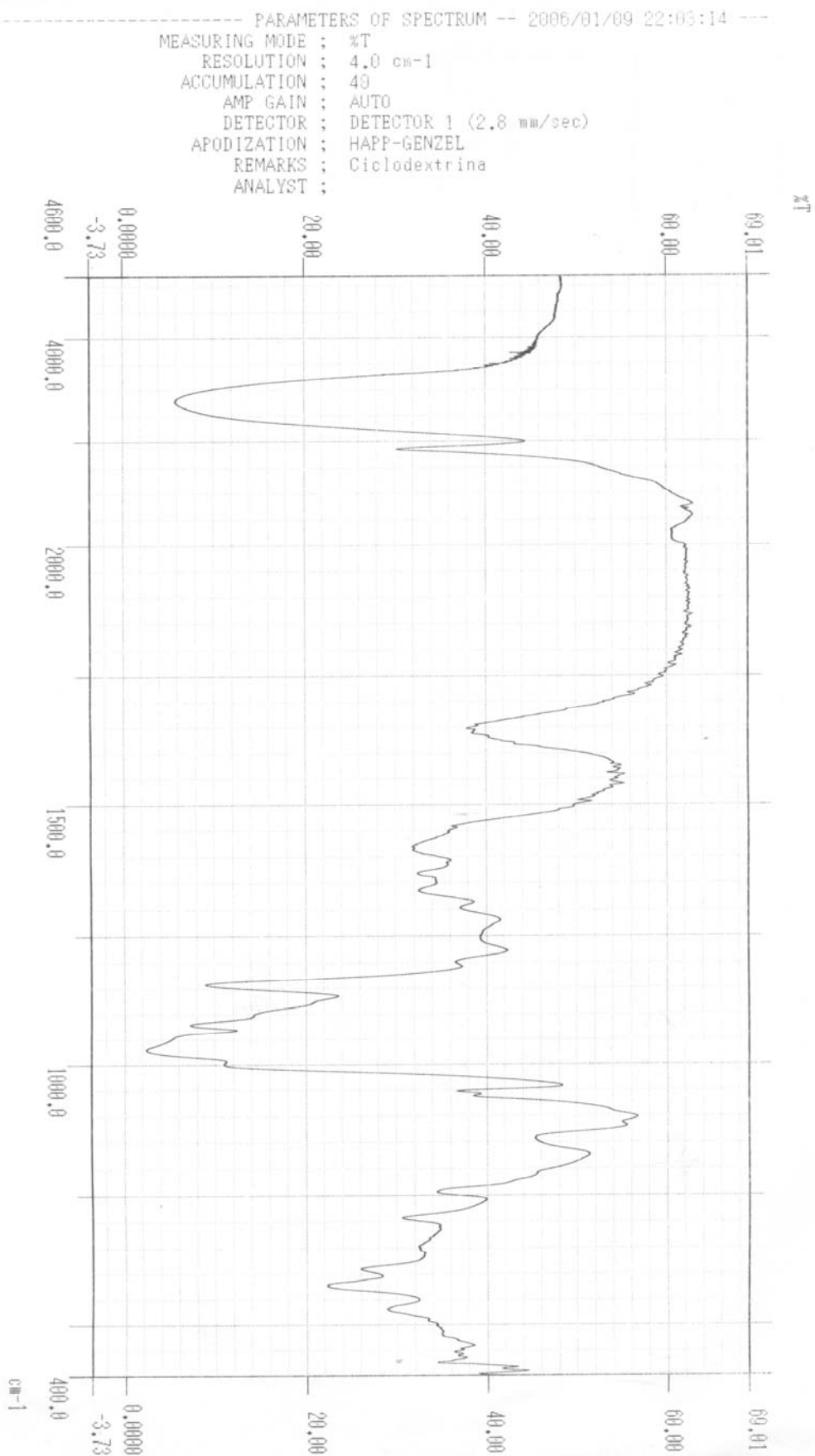
Anexo B – Figuras

Anexo B-1: espectros de infra-vermelho

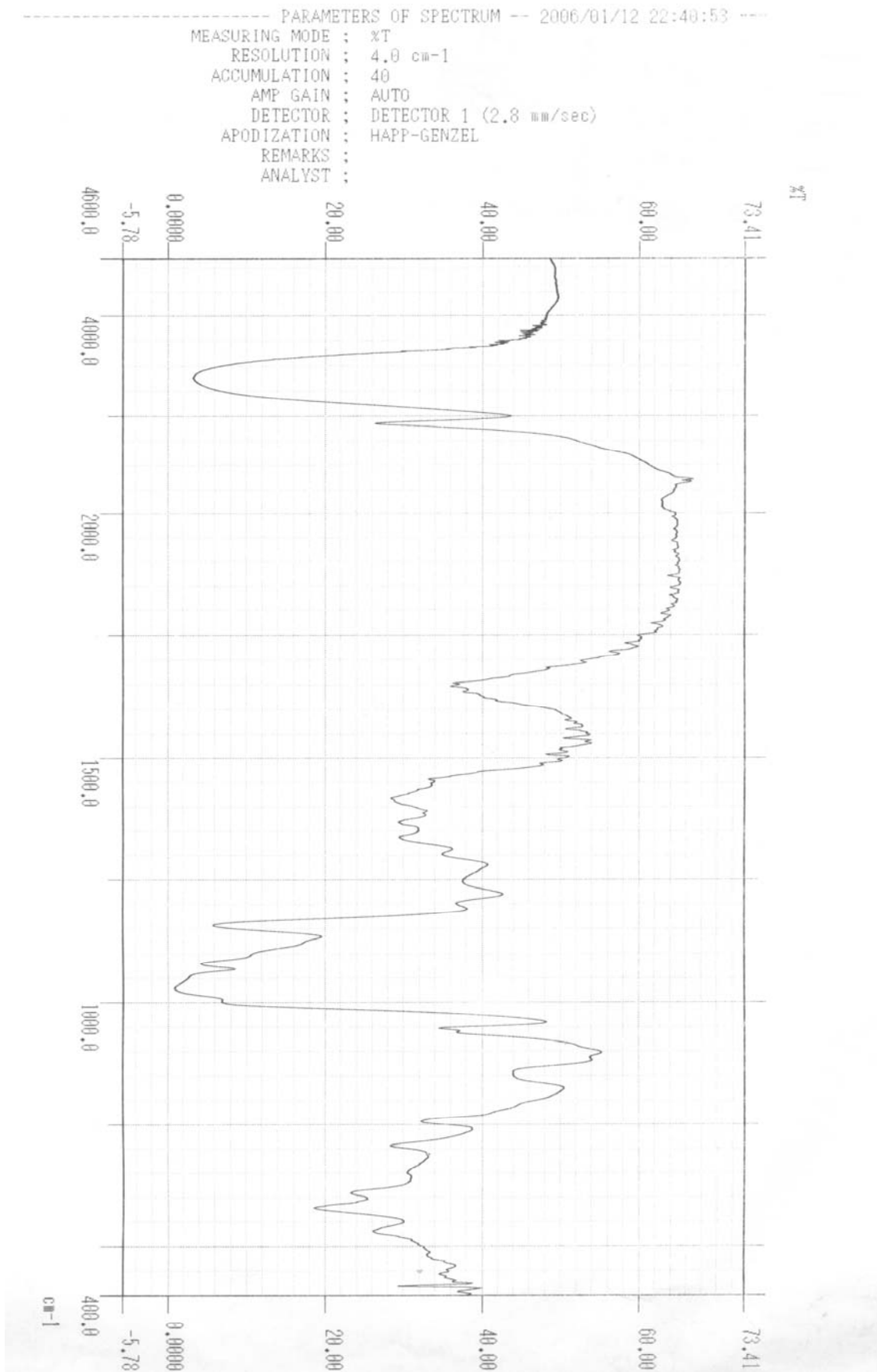
B-1 (a): Espectro de Infravermelho da genisteína.



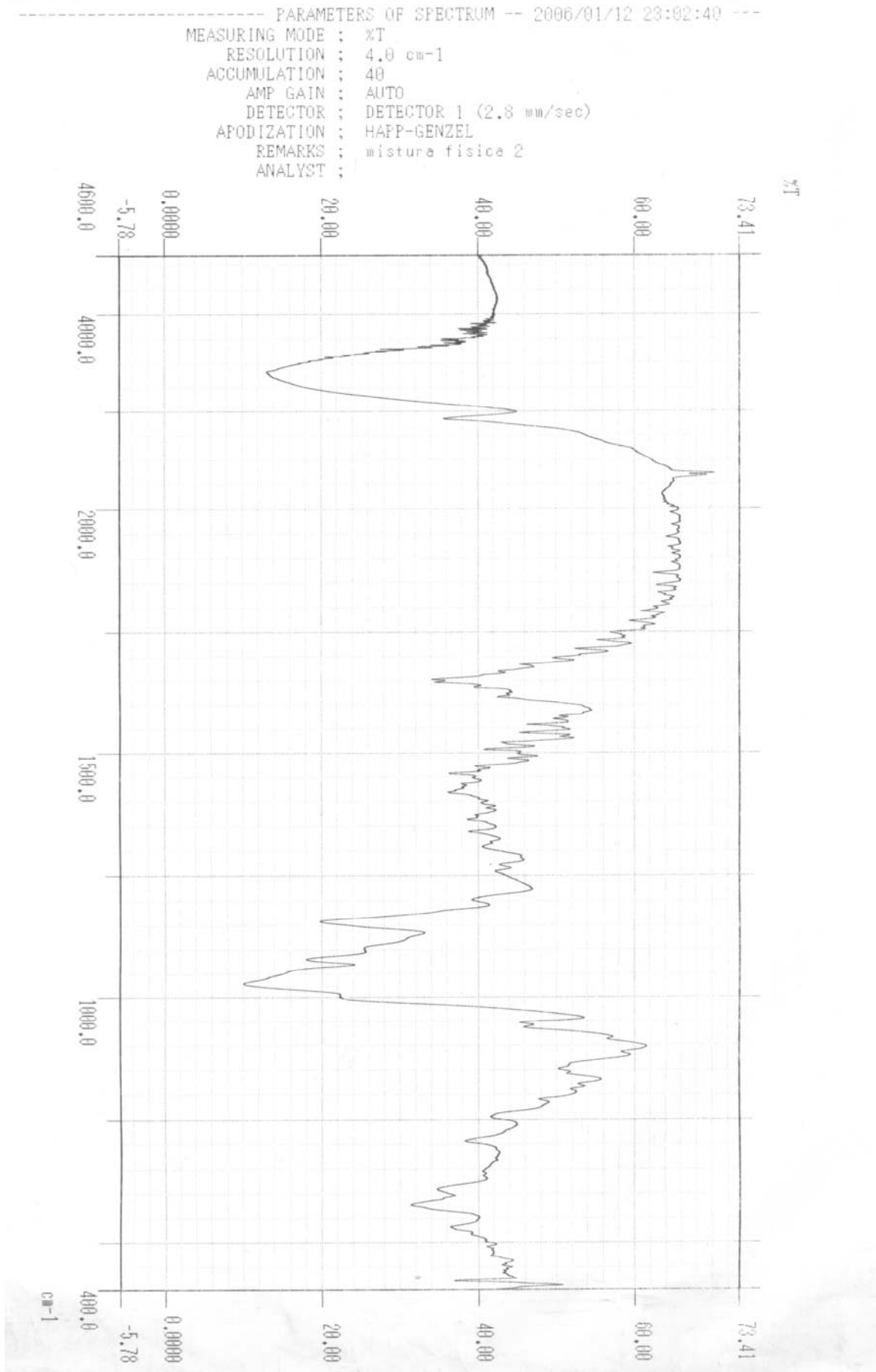
B-1 (b): Espectro de Infravermelho da β -ciclodextrina.



B-1 (c): Espectro de Infravermelho do complexo.

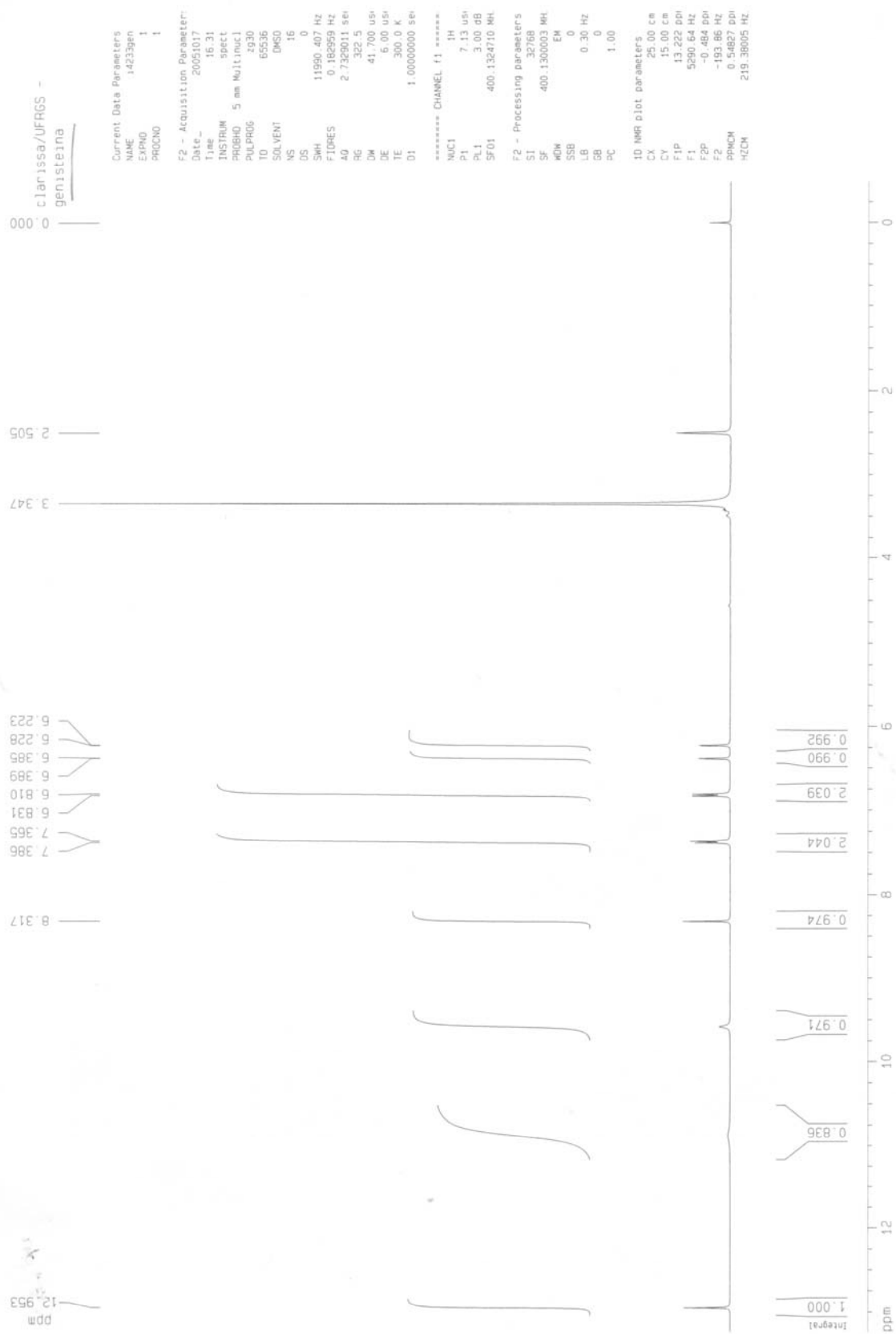


B-1 (d): Espectro de Infravermelho da simples mistura.

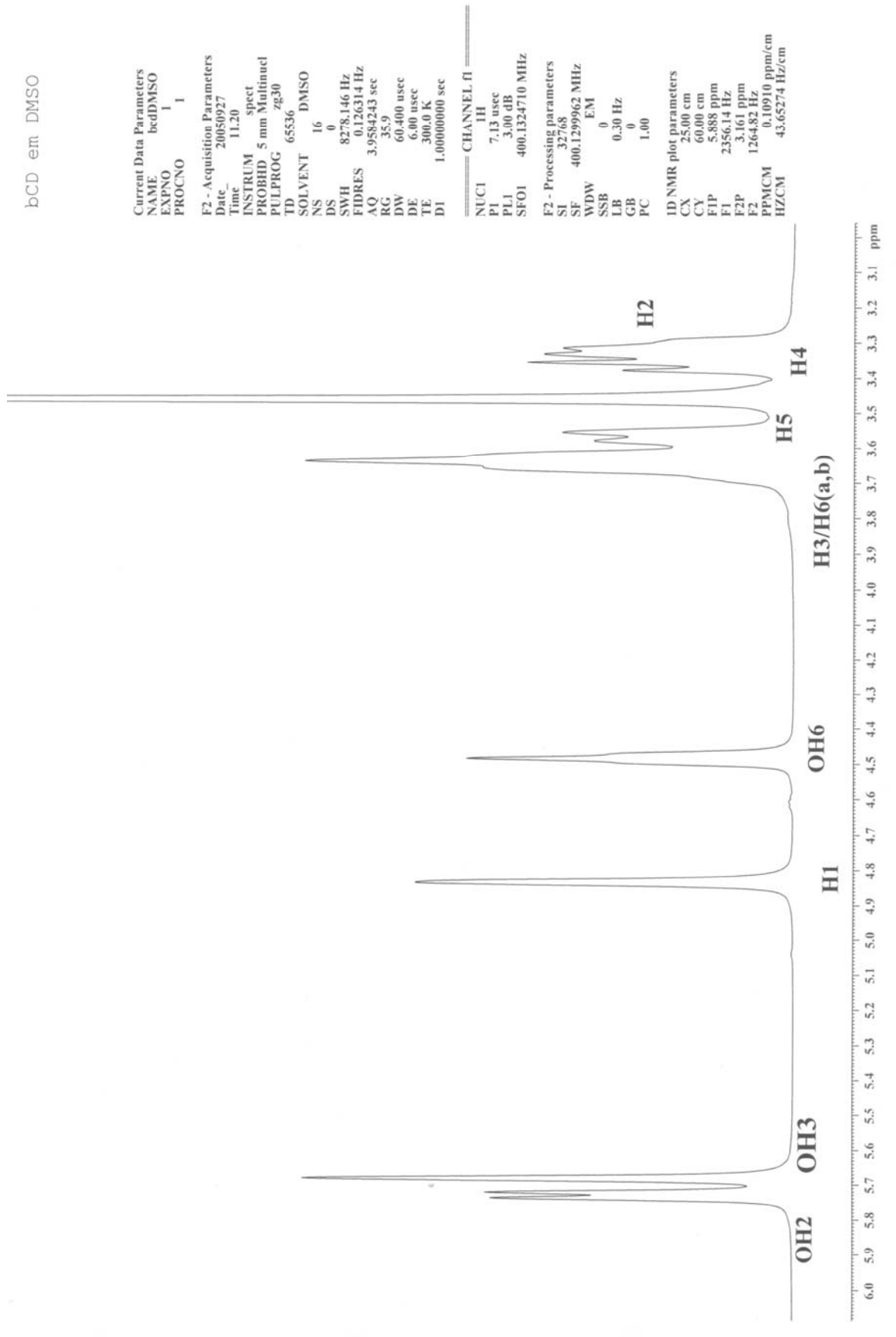


Anexo B-2: espectros de ¹H-RMN

B-2 (a): Espectro de ¹H-RMN da genisteína.



B-2 (b): Espectro de ^1H -RMN da β -ciclodextrina.



B-2 (c): Espectro de ¹H-RMN do complexo.

