

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

LORENA MAIONE SILVA

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS
CONTENDO GENISTEÍNA PARA USO TÓPICO**

**Goiânia
2012**

LORENA MAIONE SILVA

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS
CONTENDO GENISTEÍNA PARA USO TÓPICO**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas
Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos**

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Martins Lima
Co-orientadora: Dr^a. Stephânia Fleury Taveira**

**Goiânia
2012**

LORENA MAIONE SILVA

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS
CONTENDO GENISTEÍNA PARA USO TÓPICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas
Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho Batista
Faculdade de Odontologia - Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto
Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Goiás

Dr^a. Stephânia Fleury Taveira
Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Goiás

Prof^a. Dr^a. Eliana Martins Lima
Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Goiás

A Deus, por traçar o meu caminho.

A minha mãe, pai, avós, irmão e Renato, por serem a minha alegria.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Eliana Martins Lima, por todos os ensinamentos e pela oportunidade única. Obrigada pela confiança.

A minha co-orientadora Dr^a. Stephânia Fleury Taveira, por sempre acompanhar os meus passos. Obrigada por me ensinar muito do que aprendi nestes dois anos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto, por todas as contribuições neste trabalho. Obrigada pelo apoio.

A Kamilla Amaral, pela ajuda incondicional para a realização deste trabalho. Obrigada pela ajuda e pelos bons momentos compartilhados.

A Emmanuelle Silva, por sempre estar disposta a me ajudar e ensinar. Obrigada pela amizade e pelas palavras sempre tão bem vindas.

Aos meus amigos de laboratório Carolina, Gabriella, Lidiane, Leonardo, Marco Júnior, Stela, Luís Antônio, Fabrícia, Erika, Ana Paula, Talita, Lívia, Marilisa e Relton. Obrigada pela companhia nesta caminhada.

A Prof^a. Marize Campos Valadares Bozinis, Alane Pereira e Larissa Cleres, juntamente com todos os colegas do laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular, por toda a disposição e ajuda.

A Fernanda Bellato, pelos cuidados e carinho materno.

A Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Goiás (FAPEG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro concedido a este projeto.

Cada segundo é tempo para mudar tudo para sempre

Charles Chaplin

RESUMO

A genisteína (GEN), isoflavona contida nos grãos da soja, apresenta atividade contra um grande número de tipos de câncer, incluindo o câncer de pele. No entanto, para ser usada topicamente é fundamental que a GEN esteja associada a uma formulação adequada. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo genisteína para aplicação tópica. Para a quantificação da genisteína nas diferentes camadas da pele foi desenvolvida e validada uma metodologia bioanalítica em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção no UV. As NLS foram obtidas com behenato de glicerila, polissorbato 80, trioleato de sorbitano e tensoativo catiônico cloreto de cetilpiridínio (CPC) em diferentes quantidades (0,5 – 0,05%). As NLS foram caracterizadas quanto ao tamanho, Pdl, potencial zeta, eficiência de encapsulação e recuperação. Foram realizados estudos *in vitro* de liberação e permeação cutânea passiva e iontoforética. Estudos de citotoxicidade foram realizados em linhagem de melanoma (B16F10) com fármaco livre e NLS com e sem GEN. O método de quantificação do fármaco mostrou-se linear na faixa de concentração de 0,1 a 60 µg/mL. O limite de quantificação foi de 100 ng/mL para ambas as camadas da pele. A recuperação do fármaco variou entre 95,57 a 97,57%. Ainda, o método foi capaz de analisar a GEN sem sofrer interferência dos componentes endógenos da pele. As NLS carregadas com fármaco apresentaram carga superficial positiva (+ 23 mV) e tamanho médio de 343 nm. Também foram obtidas partículas com alta eficiência de encapsulação (93%) e carga de fármaco de 5,45%. Os estudos de liberação *in vitro* demonstraram que a liberação da GEN a partir das NLS ocorre em duas fases, com uma grande quantidade de fármaco liberada nas seis primeiras horas, seguida por uma liberação lenta do restante do fármaco da matriz lipídica das NLS nas horas seguintes. Quando administrada na pele, nos estudos de permeação passiva *in vitro*, as NLS aumentaram a retenção da GEN tanto no estrato córneo quanto na pele remanescente em comparação à administração da GEN livre. Após a aplicação da iontoforese na formulação de NLS contendo GEN, treze vezes mais GEN ficou retida no EC e três vezes mais fármaco ficou retido na pele remanescente. Nos estudos de citotoxicidade, as NLS favoreceram o aumento da interação do fármaco com as células e a citotoxicidade foi concentração-dependente. Deste modo, a encapsulação da GEN em NLS aumentou a permeação e retenção do fármaco na pele, demonstrando assim, potencial para aplicação tópica.

Palavras-chave: Genisteína. Nanopartículas lipídicas sólidas. Permeação cutânea. Validação bioanalítica. Iontoforese.

ABSTRACT

Genistein (GEN), isoflavone contained in soybeans, shows activity against a large number of cancers, including skin cancer. However, to be used topically it is essential the association of GEN in an appropriate formulation. The aim of this study was the development and characterization of solid lipid nanoparticles (SLN) contains genistein for topical application. A bioanalytical method was developed and validated for GEN quantification in skin layers with High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) with UV detection. The SLN was obtained with glyceryl behenate, polysorbate 80, sorbitan trioleate and different amounts of cetylpyridinium chloride (CPC) (0.5 - 0.05%). The characteristics in terms of particle size, size distribution, zeta potential, entrapment efficiency and drug recovery were evaluated. *In vitro* release, passive and iontophoretic, skin permeation studies were performed. Cytotoxicity studies were carried out in melanoma cells (B16F10) with free drug and SLN with and without GEN. The analytical method was linear in the concentration range of 0.1 to 60 mg/mL. Limit of quantification was 100 ng/mL for both skin layers. Recovery of the drug ranged from 95.57 to 97.57%. The method was able to analyze the GEN without suffering interference from endogenous skin components. SLN loaded with GEN showed positive surface (+ 23 mV) and average size of 343 nm. Particles were obtained with high entrapment efficiency (93%) and drug load was 5.45%. *In vitro* release studies demonstrated that the release of GEN from SLN occurs in two stages with a large amount of drug released within the first six hours, followed by a slow release of the remaining drug in the lipid matrix of SLN in the following hours. When administered in the skin, during *in vitro* passive permeation studies, the SLN increased retention of GEN in stratum corneum and remaining skin compared with free GEN. After iontophoresis application in formulation of SLN containing GEN thirteen times more GEN was retained on stratum corneum and three times more drug was retained on remaining skin. In cellular cytotoxicity studies SLN favored the increase of interaction of drug with the cells and the cytotoxicity was concentration-dependent. Thus, GEN loaded SLN increased drug skin permeation and retention and shows to be a potential formulation for topical application.

Key-words: Genistein. Solid lipid nanoparticles. Skin permeation. Bioanalytical validation. Iontophoresis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da pele. <i>Disponível em www.nlm.nih.gov</i>	18
Figura 2. Tipos predominantes de câncer de pele: (a) carcinoma basocelular, (b) carcinoma epidermoide e (c) melanoma. <i>Fonte: Organização Mundial da Saúde - OMS. Disponível em www.inca.gov.br</i>	19
Figura 3. Figura 3. Vias de transporte do fármaco através da pele: (a) via transcelular (através dos corneócitos e da matriz lipídica), via intercelular (entre os corneócitos, pela matriz lipídica) e (c) via apêndices (por exemplo, folículos pilosos). <i>Fonte: Adaptado de MOSER e colaboradores (2001)</i>	20
Figura 4. Célula de fluxo estático tipo “Franz” utilizadas para estudos de permeação cutânea e liberação. <i>Fonte: Adaptado do manual Microette, Hanson Research</i>	22
Figura 5. Representação esquemática da aplicação da técnica de <i>tape stripping</i> para determinação da quantidade de fármaco permeada na pele. (a) Após a aplicação da formulação no compartimento doador (b) o estrato córneo é removido com o uso de fitas adesivas. <i>Fonte: MOSER e colaboradores (2001)</i>	23
Figura 6. Representação esquemática de diferentes sistemas carreadores de fármacos: (a) lipossoma, (b) nanoemulsão e (c) nanopartícula lipídica sólida. <i>Adaptado de PURI e colaboradores (2010)</i>	24
Figura 7. Representação esquemática do equipamento para produção de nanopartículas lipídicas sólidas em larga escala. <i>Fonte: MARENGO e colaboradores (2000)</i>	25
Figura 8. Modelos de incorporação do fármaco na matriz das nanopartículas lipídicas sólidas: (a) distribuição homogênea, (b) maior distribuição na periferia da matriz e (c) predominância do fármaco no centro da matriz. <i>Adaptado de MÜLLER e colaboradores (2002)</i>	26
Figura 9. Representação esquemática de iontoforese. <i>Fonte: GRATIERI e colaboradores (2008)</i>	27
Figura 10. Estrutura química da genisteína.....	28
Figura 11. Esquema representativo do processo de obtenção das NLS pelo método de diluição de microemulsão. (a) Adição de água quente à mistura fundida de lipídeos e tensoativos. (b) Adição da GEN à microemulsão formada. (c) Gotejamento da formulação em água gelada (1:20) e homogeneização em ultra turrax. (d) Aplicação de ultrassom de agulha à formulação.....	37

Figura 12. Células de fluxo estático tipo “Franz” acopladas em equipamento de coleta automatizada, Hanson Research. <i>Fonte: Manual Microette, Hanson Research</i>	40
Figura 13. Células de fluxo estático tipo Glikfield. (a) Visão superior. (b) Visão lateral.....	41
Figura 14. Espectro de absorção da genisteína no UV.....	43
Figura 15. Perfil cromatográfico da GEN em solução de metanol (10 µg/mL) em coluna ZORBAX Eclipse XDB – C18 (250 x 4,6mm, 5µm). Fase móvel constituída por água pH 3, n-propanol e acetonitrila, na proporção 50:2:48 (v/v/v), respectivamente. Comprimento de onda: 270 nm. Fluxo 1,0 mL/min....	44
Figura 16. Cromatogramas obtidos a partir da análise de (a) estrato córneo sem GEN, (b) estrato córneo com GEN, (c) epiderme remanescente sem GEN e (d) epiderme remanescente com GEN.....	46
Figura 17. Curva de calibração da genisteína no estrato córneo.....	47
Figura 18. Curva de calibração da genisteína na pele remanescente.....	47
Figura 19. Cromatogramas obtidos após análise (a) dos componentes das nanopartículas lipídicas sólidas e (b) da genisteína em metanol.....	50
Figura 20. Curva de calibração da genisteína em metanol.....	51
Figura 21. Tamanho médio (nm) e índice de polidispersividade (Pdl) das NLS antes e depois do uso do ultrassom de agulha.....	53
Figura 22. Perfil de liberação da genisteína em solução aquosa contendo 5% de lauril sulfato de sódio (GEN) e da genisteína a partir das NLS (GEN-NLS).....	56
Figura 23. Genisteína livre (GEN) e encapsulada (GEN-NLS) permeada no estrato córneo em 6, 12, 18 e 24 horas.....	58
Figura 24. Genisteína livre (GEN) e encapsulada (GEN-NLS) permeada na pele remanescente em 6, 12, 18 e 24 horas.....	58
Figura. 25. Permeação passiva e iontoforética da genisteína encapsulada nas NLS em 3 horas. EC = estrato córneo. PR = pele remanescente.....	61
Figura 26. Citotoxicidade das NLS contendo quantidades diferentes de cloreto de cetilpiridínio.....	62
Figura 27. Viabilidade celular do fármaco livre e encapsulado em células de melanoma (B16F10).....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições estabelecidas nos estudos de liberação e permeação passiva.....	40
Tabela 2. Exatidão e precisão inter e intradia do método bioanalítico para a quantificação da genisteína nas duas camadas da pele (n = 5).....	48
Tabela 3. Recuperação da genisteína das amostras de pele (n = 3).....	49
Tabela 4. Precisão e exatidão do método analítico para a quantificação da genisteína (n = 5).....	51
Tabela 5. Limite de quantificação da genisteína para o método analítico.....	52
Tabela 6. Caracterização quanto ao tamanho, índice de polidispersividade (Pdl) e potencial zeta das NLS contendo quantidade decrescente do tensoativo catiônico cloreto de cetilpiridínio.....	54
Tabela 7. Caracterização quanto ao tamanho médio, índice de polidispersividade (Pdl), potencial zeta, eficiência de encapsulação (EE%), carga de fármaco (CF%) e recuperação (Rec%) das NLS contendo GEN.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ATCC	American Type Culture Collection
CF%	Carga de Fármaco
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPC	Cloreto de Cetilpiridínio
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
EC	Estrato Córneo
E%	Erro relativo
EE%	Eficiência de Encapsulação
GEN	Genisteína
LQ	Limite de Quantificação
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difeniltetrazólio
PR	Pele Remanescente
REC%	Recuperação de fármaco
Rs	Fator de separação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 CÂNCER.....	18
2.2 A PELE E O CÂNCER DE PELE.....	18
2.3 PERMEAÇÃO CUTÂNEA.....	20
2.4 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS (NLS).....	23
2.5 IONTOFORESE.....	26
2.6 GENISTEÍNA.....	27
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 MATERIAIS.....	31
4.1.1 Substâncias e reagentes.....	31
4.1.2 Equipamentos e utensílios diversos.....	31
4.2 MÉTODOS.....	33
4.2.1 QUANTIFICAÇÃO DA GENISTEÍNA.....	33
4.2.1.1 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da genisteína por espectroscopia.....	33
4.2.1.2 Quantificação da genisteína por cromatografia líquida de alta eficiência.....	33
4.2.1.3 Desenvolvimento e validação da metodologia bioanalítica.....	33
4.2.1.3.1 Escolha e preparo da matriz biológica.....	33
4.2.1.3.2 <i>Tape stripping</i>	34
4.2.1.3.2 Extração da GEN da pele.....	34

4.2.1.3.3 Recuperação.....	34
4.2.1.3.4 Seletividade.....	35
4.2.1.3.5 Linearidade.....	35
4.2.1.3.6 Exatidão e precisão.....	35
4.2.1.3.7 Limite de quantificação (LQ).....	35
4.2.1.4 Validação da metodologia analítica.....	36
4.2.1.4.1 Seletividade.....	36
4.2.1.4.2 Linearidade.....	36
4.2.1.4.3 Exatidão e precisão.....	36
4.2.1.4.4 Limite de quantificação.....	37
4.3 DESENVOLVIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS.....	37
4.3.1 Obtenção das nanopartículas lipídicas sólidas.....	37
4.3.2 Caracterização das nanopartículas lipídicas sólidas.....	38
4.3.2.1 Avaliação da distribuição de tamanho de partícula.....	38
4.3.2.2 Avaliação do potencial zeta.....	38
4.3.2.3 Avaliação da eficiência de encapsulação da genisteína nas NLS.....	38
4.3.2.4 Carga de fármaco.....	39
4.3.2.5 Recuperação do fármaco.....	39
4.4 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO CUTÂNEA.....	39
4.4.1 Estudo de solubilidade.....	39
4.4.2 Estudo de liberação.....	40
4.4.3 Estudo de permeação passiva.....	40
4.4.4 Estudo de permeação iontoforética.....	41
4.5 ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE CELULAR.....	41
4.5.1 Cultura celular.....	41

4.5.2 Avaliação da citotoxicidade celular da genisteína livre e encapsulada pelo método de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difeniltetrazólio (MTT).....	42
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1 QUANTIFICAÇÃO DA GENISTEÍNA.....	43
5.1.1 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da genisteína por espectroscopia.....	43
5.1.2 Quantificação da genisteína por cromatografia líquida de alta eficiência.....	43
5.1.3 Condições cromatográficas.....	44
5.1.4 Validação bioanalítica.....	45
5.1.4.1 Seletividade.....	45
5.1.4.2 Linearidade.....	46
5.1.4.3 Precisão e exatidão.....	47
5.1.4.4 Recuperação.....	48
5.1.4.5 Limite de quantificação.....	49
5.1.5 Validação analítica.....	49
5.1.5.1 Seletividade.....	49
5.1.5.2 Linearidade.....	50
5.1.5.3 Exatidão e precisão.....	51
5.1.5.4 Limite de quantificação (LQ).....	51
5.2 DESENVOLVIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS.....	52
5.3 ESTUDO DE SOLUBILIDADE E VERIFICAÇÃO DA CONDIÇÃO <i>SINK</i>	55
5.4 PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	56
5.5 PERMEAÇÃO PASSIVA <i>IN VITRO</i> DA GENISTEÍNA LIVRE E ENCAPSULADA.....	57

5.6 PERMEAÇÃO IONTOFORÉTICA <i>IN VITRO</i> DA GENISTEÍNA LIVRE E ENCAPSULADA.....	60
5.7 ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE.....	62
5.7.1. Citotoxicidade das nanopartículas lipídicas sólidas desenvolvidas....	62
5.7.2 Citotoxicidade da GEN livre e encapsulada.....	63
6. CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pele é o tipo de câncer mais comum no Brasil, sendo o tipo melanoma altamente letal. No entanto, se for tratado nos estágios iniciais do seu desenvolvimento, o melanoma apresenta bom prognóstico, de modo que a cada 100 novos casos, 69 pessoas se recuperam (INCA, 2011).

O emprego de substâncias derivadas de produtos naturais tem chamado bastante atenção para o desenvolvimento de novos medicamentos e terapias. A genisteína (GEN), isoflavona abundante na soja, possui diversas atividades biológicas importantes, sendo capaz de mimetizar o estrógeno endógeno, além de possuir expressiva atividade antioxidante e antitumoral (BANERJEE et al, 2008). Atua nas células neoplásicas inibindo a proliferação celular e o crescimento de células tumorais já existentes, e ainda possui atividade antiangiogênica (FOFTIS et al, 1993; BANERJEE et al, 2008) e capacidade de inibir metástases (PAVESE et al, 2010). Estas características fazem deste fármaco um bom candidato para aplicação tópica no tratamento do câncer de pele.

Contudo, estudos demonstraram que a GEN incorporada em formulação semi-sólida convencional e aplicada topicamente não consegue permear até as camadas mais profundas da pele (GEORGETTI et al, 2008). Assim, para administração tópica da GEN, é necessária a sua associação a uma formulação adequada, capaz de aumentar sua permeação cutânea para as camadas mais profundas da pele.

O desenvolvimento de sistemas nanoestruturados pode funcionar como uma alternativa às formas farmacêuticas tradicionais (MEHNERT e MÄDER, 2001), sendo as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) um exemplo destes nanocarreadores. As NLS são partículas de tamanho nanométrico constituídas por um lipídeo sólido à temperatura ambiente (MÜLLER et al, 2000). Estas nanopartículas podem ser produzidas em larga escala, podem possibilitar uma liberação controlada do fármaco e podem aumentar a estabilidade do fármaco nelas incorporado (MÜLLER et al, 2000; PURI et al, 2010). Ainda, as NLS são sistemas promissores para aplicação tópica, pois sua constituição lipídica favorece a interação com o estrato córneo, principal barreira da pele.

Existem ainda métodos físicos que possibilitam o aumento da permeação cutânea, como por exemplo, a iontoforese. Esta técnica consiste na aplicação de uma corrente elétrica de baixa intensidade na pele, de modo que, a resistência à permeação é diminuída e a entrada do fármaco é facilitada (SENYIGIT et al 2009). Atualmente, já existem alguns dispositivos iontoforéticos no mercado, tanto com finalidade de diagnóstico quanto com fins terapêuticos (TESSELAAR et al, 2011).

Assim, a encapsulação da GEN em nanopartículas lipídicas sólidas, pode ser uma alternativa promissora para o tratamento do câncer de pele. De modo que, neste trabalho, avaliou-se a permeação passiva e iontoforética das NLS contendo GEN.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER

O câncer é causado pelo crescimento desordenado de células que podem se disseminar pelos tecidos e órgãos do corpo (FENG et al, 2003). O processo em que as células anormais invadem e se instalam em outro tecido é chamado de metástase e é a principal causa de morte por câncer (INCA, 2011). Em 2008, segundo a Organização Mundial da Saúde (World Health Organization – OMS), 7,6 milhões de pessoas morreram de câncer, representando 13% de todas as mortes registradas no mundo. No Brasil, em 2012 são estimados mais de 518.000 novos casos de câncer. Os tipos de câncer mais incidentes serão o câncer de pele não melanoma, próstata e pulmão no sexo masculino e o câncer de pele não melanoma, mama e colo do útero nas mulheres (INCA, 2011). Estima-se a ocorrência de mais de 6.000 novos casos de câncer de pele do tipo melanoma e mais de 134.000 novos casos de câncer de pele do tipo não melanoma, sendo este tipo de câncer o de maior incidência na população brasileira desde 2003 (INCA, 2011).

2.2 A PELE E O CÂNCER DE PELE

A pele é o órgão mais extenso do corpo humano e exerce diferentes funções como regulação térmica, funções sensoriais e proteção contra agentes externos (PROW et al, 2011). É composta por três camadas: a hipoderme, a derme e a epiderme (Figura 1) (ESCOBAR-CHAVEZ et al, 2008).

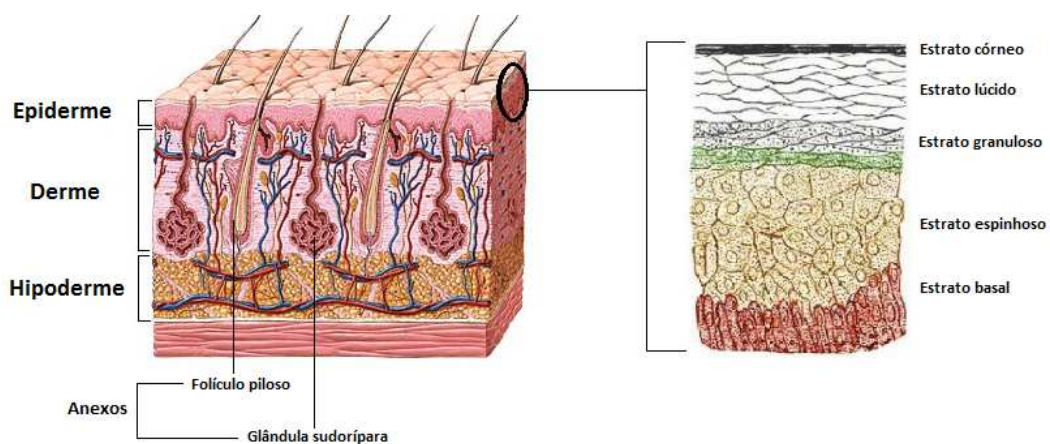


Figura 1. Estrutura da pele. Disponível em www.nlm.nih.gov.

A hipoderme, também chamada de tecido celular subcutâneo, é a porção mais profunda da pele e possui principalmente propriedades isolantes e protetoras (SILVA et al, 2010). A derme é constituída por uma variedade de tipos celulares, terminações nervosas, vasos sanguíneos e linfáticos incorporados em uma vasta rede de tecido conjuntivo, de modo que a derme sustenta a epiderme (MOSER et al, 2001). Já a epiderme é composta pelos estratos basal, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo (Figura 1) (VERUNGANTI e PERUMAL, 2009). As células da epiderme, os queratinócitos, se diferenciam e migram do estrato basal em direção a camada mais externa da pele, o estrato córneo (BOUWSTRA e HONEYWELL-NGUYEN, 2002).

As células do estrato córneo (EC) encontram-se localizadas em uma matriz lipídica organizada em bicamadas lamelares, lembrando um arranjo no estilo “tijolo e argamassa” (MICLAELS et al, 1975). O estrato córneo constitui a principal barreira da pele (ROBERTS et al, 2002), impedindo a entrada de substâncias e atuando ainda na proteção contra a perda de água (PROW et al, 2011).

É principalmente nas células da epiderme que a maioria dos cânceres se desenvolve. O câncer de pele pode ser classificado como não melanômico e do tipo melanoma. Os carcinomas basocelular e espinocelular são do tipo não melanômico (Figura 2), sendo o carcinoma basocelular o mais comum e menos agressivo (INCA, 2011). O melanoma tem origem nos melanócitos e é mais raro (4%), entretanto, é o mais agressivo, com alta taxa de mortalidade devido a sua capacidade de provocar metástase (FIQUEIREDO et al, 2003).



Figura 2. Tipos predominantes de câncer de pele: (a) carcinoma basocelular, (b) carcinoma epidermoide e (c) melanoma. *Fonte: Organização Mundial da Saúde - OMS. Disponível em www.inca.gov.br.*

Atualmente, os cânceres de pele são tratados com remoção cirúrgica, radioterapia e/ou quimioterapia, dependendo do tipo, localização, extensão e estágio (INCA, 2011). O melanoma apresenta bom prognóstico se tratado em estágios iniciais, entretanto o seu tratamento ainda é cirúrgico (INCA, 2011). Assim, esforços

clínicos têm sido focados na detecção precoce e tratamentos que possam eliminar os tumores sem necessitar de tratamentos invasivos, como as cirurgias. O desenvolvimento de novos medicamentos e a aplicação tópica de formulações para o tratamento do câncer de pele podem ser alternativas para evitar dor, cicatrizes indesejadas, efeitos colaterais de quimioterapias sistêmicas, além de melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

2.3 PERMEAÇÃO CUTÂNEA

Para que um fármaco exerça sua atividade nas diferentes camadas da pele, como no câncer de pele, é necessário que este fármaco penetre na pele através do estrato córneo (EC) ou através dos apêndices cutâneos (folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas) (MOSER et al, 2001). No entanto, estes apêndices ocupam apenas 0,1% da área superficial do corpo humano (ANSEL et al, 2000) e a contribuição na permeação pode ser considerada baixa.

O transporte de substâncias através do EC (Figura 3) pode acontecer a partir de duas vias: transcelular e intercelular. Na via transcelular, o fármaco se difunde através dos corneócitos e da matriz lipídica, já na via intercelular a difusão do fármaco acontece por entre os corneócitos e pela matriz lipídica (PROW et al, 2011).

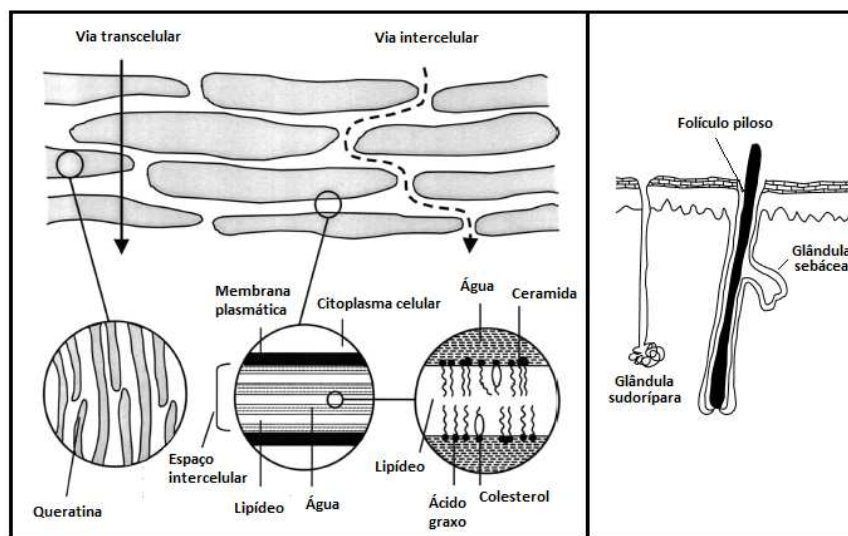


Figura 3. Vias de transporte do fármaco através da pele: (a) via transcelular (através dos corneócitos e da matriz lipídica), via intercelular (entre os corneócitos, pela matriz lipídica) e (c) via apêndices (por exemplo, folículos pilosos). *Fonte: Adaptado de MOSER e colaboradores (2001).*

O fluxo (J) em que o fármaco atravessa o estrato córneo pode ser descrito pela 1ª Lei de Fick (Equação I) (MOSER et al, 2001).

$$J = \frac{DmCs,m}{L} \cdot \frac{Cv}{Cs,v} \quad \text{Equação I}$$

Onde:

Dm = coeficiente de difusão do fármaco na membrana;

Cs,m = solubilidade do fármaco na membrana;

Cv = concentração do fármaco no veículo;

Cs,v = solubilidade do fármaco no veículo;

L = espessura da membrana.

Existem algumas estratégias que podem ser usadas para aumentar a permeação do fármaco através do estrato córneo. Uma das estratégias consiste no aumento da razão $Cv/Cs,v$, que pode ser obtido pelo aumento da saturação do fármaco no veículo. Outras estratégias estão relacionadas com a interação fármaco-estrato córneo, que são: o aumento do Dm , por exemplo pela desorganização do estrato córneo, ou através do aumento da Cs,m , que pode ser conseguido com o uso de solventes como o propilenoglicol e o etanol (MOSER et al, 2001).

Os resultados obtidos pela aplicação destas estratégias podem ser avaliados através dos estudos de permeação cutânea. Estes estudos são divididos em dois grupos: estudos *in vivo* e *in vitro*.

Os métodos *in vivo* apresentam vantagens como a obtenção de uma cinética sistêmica, porém, como desvantagens pode-se citar o uso de animais, diferença na permeabilidade entre o modelo animal e a pele humana, que pode gerar resultados sub/superestimados, e ainda, a utilização frequente de radiomarcadores para obtenção dos resultados (CHIEN, 2001).

Os métodos *in vitro* têm sido extensivamente utilizados e se devidamente delineados e fundamentados conseguem se correlacionar com os resultados obtidos pelos métodos *in vivo*. As vantagens destes métodos são: a não utilização de animais, o que também possibilita que um número maior de experimentos sejam realizados; a fácil realização dos testes, e ainda, a fácil obtenção da membrana (de porco, cobra, macaco). No entanto, entre as principais desvantagens estão a

difficuldade de simular totalmente as condições fisiológicas e o fato de que as alterações sistêmicas não podem ser observadas.

Dentre as técnicas que podem ser utilizadas para realização dos estudos de permeação *in vitro*, a mais utilizada é a de difusão em células de Franz (Figura 4). Estas células são constituídas por um compartimento doador, onde as amostras contendo o fármaco são colocadas, e outro compartimento denominado receptor, que contém uma solução na qual o fármaco é extensivamente solúvel. A membrana é colocada com o estrato córneo voltado para cima na interface destes dois compartimentos, de forma que possa haver um fluxo do fármaco do compartimento doador em direção ao compartimento receptor. Os testes geralmente são realizados com controle de temperatura e agitação.

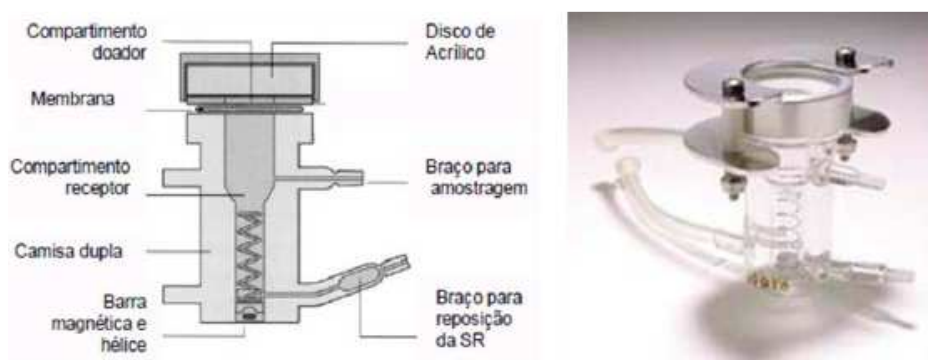


Figura 4. Célula de fluxo estático tipo “Franz” utilizadas para estudos de permeação cutânea e liberação. Fonte: Adaptado do manual Microette, Hanson Research.

No final de cada experimento de permeação cutânea é possível avaliar a quantidade de fármaco que ficou retido nas diferentes camadas da pele e a que atingiu a solução receptora (CHIEN, 2001).

A técnica de *tape stripping* é a mais utilizada para realizar a separação do estrato córneo das demais camadas da pele. Nesta técnica, tiras de fita adesiva são sucessivamente aplicadas na pele, de forma que, o estrato córneo e o fármaco contido nesta camada são removidos (Figura 5). Em seguida, com a utilização de solventes, o fármaco contido no estrato córneo e nas demais camadas da pele (pele remanescente), é extraído e pode ser quantificado.

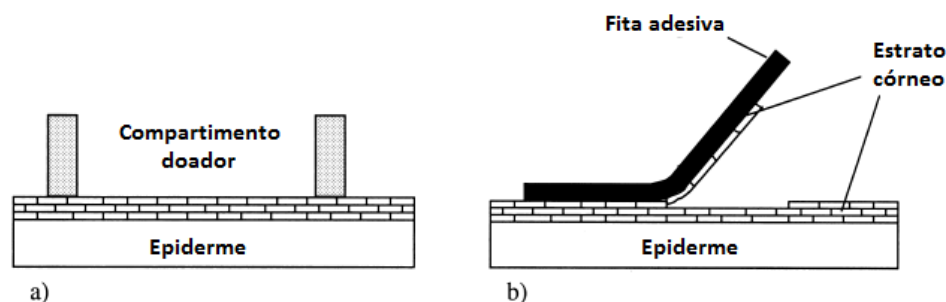


Figura 5. Representação esquemática da aplicação da técnica de *tape stripping* para determinação da quantidade de fármaco permeada na pele. (a) Após a aplicação da formulação no compartimento doador (b) o estrato córneo é removido com o uso de fitas adesivas. Fonte: MOSER e colaboradores (2001).

Devido à complexidade e heterogeneidade das membranas biológicas e a baixa quantidade de fármaco retido na pele durante estes estudos (ECHEVARRÍA et al, 2003; FERNANDEZ et al, 2000), é essencial o desenvolvimento de um método bioanalítico seletivo, sensível e que seja capaz de recuperar o fármaco retido nas camadas da pele (YEGANEH et al, 2000).

2.4 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS (NLS)

A nanotecnologia é um recurso que vem cada vez mais ganhando espaço no tratamento de diversas doenças (CARUTHERS et al, 2007). A maioria dos medicamentos associados a sistemas nanoestruturados disponíveis são formulados (ou reformulados) para melhorar parâmetros relacionados à eficiência e à segurança (WAGNER et al, 2006).

As nanopartículas lipídicas sólidas (Figura 6c) são uma alternativa aos nanossistemas de liberação controlada tradicionais como os lipossomas (Figura 6a) e as nanoemulsões (Figura 6b) (OLBRISH et al, 2001; MÜLLER et al, 2000). Estes sistemas possuem uma matriz lipídica sólida em temperatura ambiente (MÜLLER et al, 2002) que pode proteger o fármaco contra a degradação, além de permitir uma liberação controlada mais eficiente que em sistemas com matriz líquida, visto que a mobilidade do fármaco é menor (MEHNERT e MÄDER, 2001, OLBRISH et al, 2001). Ainda, as NLS podem ser produzidas sem o uso de solventes tóxicos (MÜLLER et al, 2000), podem ser transferidas para escala industrial (MÜLLER et al, 2000) e

geralmente são constituídas por componentes bem tolerados fisiologicamente (OLBRISH et al, 2001; SHAJI e JAIN, 2010).

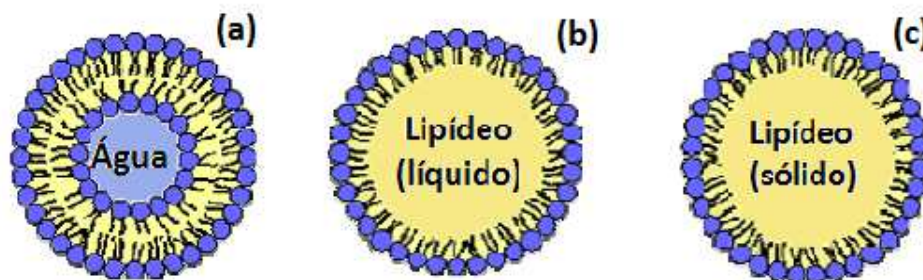


Figura 6. Representação esquemática de diferentes sistemas carreadores de fármacos: (a) lipossoma, (b) nanoemulsão e (c) nanopartícula lipídica sólida. Adaptado de PURI e colaboradores (2010).

Além da matriz lipídica sólida constituída por lipídeos com baixo ponto de fusão, como por exemplo, o ácido esteárico, colesterol e cetilpalmitato (MEHNERT e MÄDER, 2001), as NLS são constituídas por tensoativos e água. A combinação de tensoativos pode prevenir a aglomeração das partículas com maior eficiência (MEHNERT e MÄDER, 2001).

Existem diferentes técnicas utilizadas para a obtenção das NLS, sendo as mais relatadas na literatura, a homogeneização sob alta pressão e a diluição de microemulsão (MEHNERT e MÄDER, 2001).

As NLS produzidas por homogeneização podem ser produzidas a quente ou a frio. Em ambas, o fármaco é solubilizado ou disperso na fase lipídica fundida (MÜLLER et al, 2000).

Na homogeneização a quente, a fase lipídica contendo o fármaco é adicionada a uma solução aquosa contendo os tensoativos, mantida na mesma temperatura da fase lipídica. A mistura é mantida em agitação sob alta velocidade. A pré-emulsão formada é então levada a um homogeneizador de alta pressão e na sequência é resfriada para a formação das NLS (MEHNERT e MÄDER, 2001).

Na homogeneização a frio, a fase lipídica fundida é resfriada e triturada para obtenção de micropartículas. Logo após, as mesmas são adicionadas a uma solução aquosa contendo tensoativos, sob cisalhamento. Por fim, a pré-suspensão formada é submetida à homogeneização sob alta pressão (MÜLLER et al, 2002).

A diluição de microemulsão, desenvolvida por GASCO e colaboradores (1993), consiste na preparação de uma microemulsão a quente, sendo esta gotejada

em água gelada (2-5°C) sob agitação. Como os lipídeos utilizados para obtenção destas nanopartículas encontram-se fundidos antes de serem gotejados, quando entram em contato com a água gelada se cristalizam e formam as NLS (MÜLLER et al, 2000). Esta técnica é simples, pouco dispendiosa e de fácil execução. MARENGO e colaboradores (2000) desenvolveram um sistema de produção em escala industrial através desta técnica, o qual é constituído por uma seringa metálica termostatzada (Figura 7).

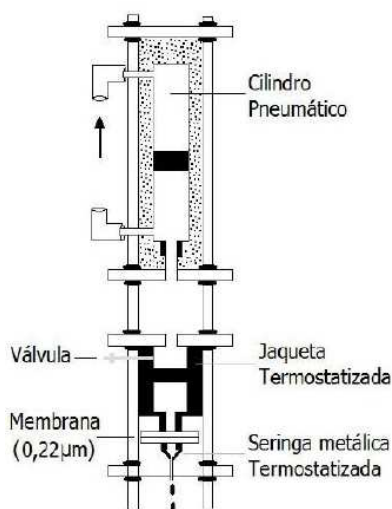


Figura 7. Representação esquemática do equipamento para produção de nanopartículas lipídicas sólidas em larga escala. *Fonte: MARENGO e colaboradores (2000).*

Variáveis da técnica de diluição de microemulsão como agitação, temperatura, pH, velocidade de transferência da microemulsão à água gelada, escolha dos lipídeos, tensoativos e co-tensoativos podem afetar as características das NLS preparadas (WISSING et al, 2004; MEHNERT e MÄDER, 2001).

Durante a produção das NLS o fármaco pode ser distribuído de (I) forma homogênea na matriz lipídica, (II) ficar predominantemente na periferia das nanopartículas ou (III) ficar majoritariamente inserido no centro da matriz lipídica (Figura 8). A estrutura obtida depende das condições de produção e dos componentes utilizados e interfere diretamente na liberação do fármaco a partir das NLS (MÜLLER et al, 2002; MUCHOW et al, 2008).

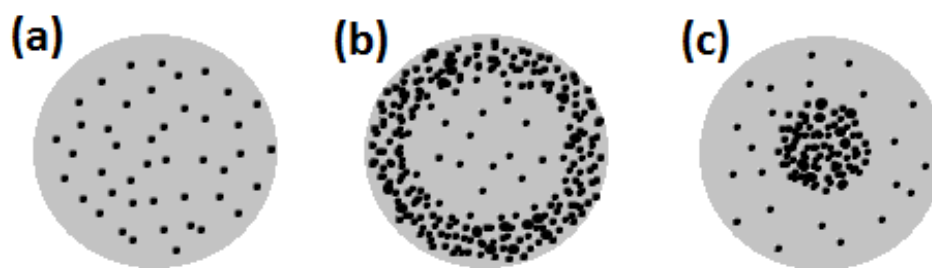


Figura 8. Modelos de incorporação do fármaco na matriz das nanopartículas lipídicas sólidas: (a) distribuição homogênea, (b) maior distribuição na periferia da matriz e (c) predominância do fármaco no centro da matriz. *Adaptado de MÜLLER e colaboradores (2002).*

As NLS podem ser administradas por via intravenosa, pulmonar, oral, intraperitonal e também, por via tópica e transdérmica (MÜLLER et al, 2000). Quando aplicadas topicamente, as nanopartículas podem favorecer o acúmulo do fármaco na pele e conseqüentemente a sua permeação até o seu sítio de ação (PROW et al, 2011).

2.5 IONTOFORESE

Além da utilização de sistemas nanoestruturados como estratégia para aumentar a permeação de fármacos através da pele, métodos físicos também podem ser utilizados com este propósito. Entre estes métodos, a iontoforese é um dos mais pesquisados e utilizados.

A iontoforese baseia-se na aplicação de uma corrente elétrica de baixa intensidade na pele para aumentar a permeação de fármacos (SENYIGIT et al, 2009). A corrente elétrica aplicada é fornecida por uma fonte de energia e é distribuída na superfície da pele por um eletrodo positivo (ânodo) e um eletrodo negativo (cátodo) através de uma solução eletrolítica (GRATIERI et al, 2008). Assim, fármacos carregados positivamente são colocados em contato com o eletrodo positivo, de modo que, com a aplicação da corrente elétrica ocorre a repulsão entre as moléculas do fármaco e o eletrodo, com conseqüente entrada do fármaco na pele (TAVEIRA et al, 2009). O mesmo ocorre com fármacos carregados negativamente, que são posicionados no eletrodo negativo (cátodo). Este mecanismo é denominado de eletrorrepulsão, e o dispositivo iontoforético bem como o transporte dos íons estão demonstrados na Figura 9.

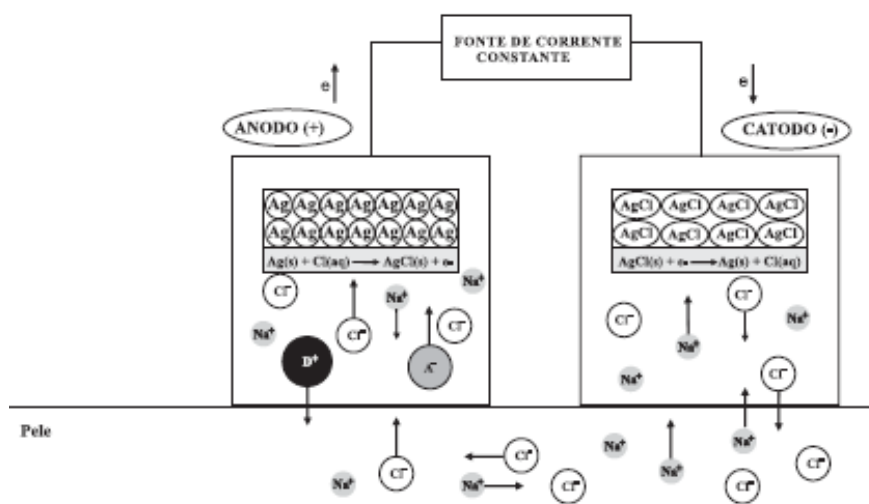


Figura 9. Representação esquemática de iontoforese. *Fonte: GRATIERI e colaboradores (2008).*

Outro mecanismo que permite a entrada de fármacos na pele através da iontoforese é a eletrosmose. Sabe-se que a pele em pH fisiológico apresenta residual de cargas negativas, de modo que, a aplicação da corrente elétrica provoca o fluxo do solvente do ânodo em direção ao cátodo, possibilitando o aumento da permeação dos fármacos posicionados no ânodo (TESSELAAR et al, 2011). Assim, moléculas sem carga também podem ser transportadas pela iontoforese (SENYIGIT et al, 2009).

Entre as vantagens da iontoforese estão: (I) é um método não invasivo e seguro, (II) pode aumentar significativamente a permeação do fármaco através da pele e (III) a quantidade de fármaco disponível pode ser facilmente controlada (GRATIERI et al, 2008). Devido a isto, já existem vários dispositivos no mercado que utilizam este método, como, por exemplo, o Ionsys® (Alza Company), LidoSite® Topical System (Vyteris) e GelSponge® (Iomed).

2.6 GENISTEÍNA

A genisteína (GEN) (Figura 10) foi isolada pela primeira vez em 1899 por PERKIN e NEWBURY da *Genista tinctoria*, popularmente conhecida como Vassoura-de-Tintureiro e encontrada na Europa e na Ásia. Atualmente, várias rotas sintéticas têm sido desenvolvidas para produzir a genisteína (PAVESE et al, 2010).

Contudo, esta isoflavona está presente nos vegetais, no feijão e principalmente nos grãos da soja (LIGGINS et al, 2000).

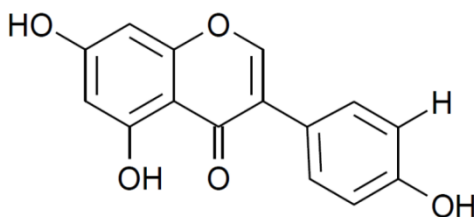


Figura 10. Estrutura química da genisteína.

O consumo de produtos à base de soja tem sido relacionado a vários efeitos benéficos na regulação do colesterol, em doenças cardiovasculares, na osteoporose e no combate aos sintomas da pós-menopausa (PAVESE et al, 2010).

Dentre as várias atividades associadas à GEN, a sua ação em diferentes tipos de câncer, como o de mama (LAMPE et al, 2007), próstata (ADLERCREUTZ et al, 1993), colo (SALTI et al, 2000) e pele (WEI et al, 2003) tem sido objeto de diversos estudos. A GEN é capaz de inibir a angiogênese (FOFTIS et al, 1993) e atua na carcinogênese através de diferentes mecanismos como a inibição da topoisomerase II, eliminação de espécies reativas de oxigênio, bloqueio de danos oxidativos e fotodinâmicos do DNA, indução de diferenciação e inibição da proteína tirosina quinase (SALTI et al, 2000; KANG et al, 2003; WEI et al, 2003; BANERJEE et al, 2008). Ainda, esta isoflavona apresenta a capacidade de inibir a metástase, o que representa um importante mecanismo pelo qual há a redução da mortalidade associada ao câncer (PAVESE et al, 2010).

O uso da GEN no câncer de pele vem sendo estudado há muitos anos. Em 1990, KIGUCHI e colaboradores demonstraram sua capacidade em induzir a diferenciação em tumores de melanoma *in vitro*. E segundo MONON e colaboradores (1998), a GEN inibiu efetivamente a metástase de melanoma em modelos animais. Ainda, esta isoflavona é capaz de inibir o fotoenvelhecimento (KANG et al, 2003) e a fotocarcinogênese (WEI et al, 2003; SILVA et al, 2009). Desta forma, a administração tópica da GEN parece ser uma boa alternativa para o tratamento do câncer de pele.

Porém, GEORGETTI e colaboradores (2008) demonstraram que a GEN incorporada em uma formulação semi-sólida para o tratamento do fotoenvelhecimento, não foi capaz de atingir as camadas mais profundas da pele.

No tratamento do câncer de pele o fármaco tem que atingir as camadas mais internas da epiderme, que é onde a maioria dos tumores cutâneos se desenvolve. Assim, se um fármaco for administrado topicamente sem uma formulação adequada, dificilmente atingirá as células neoplásicas em concentrações suficientes para o tratamento de tumores cutâneos.

O tratamento de doenças da pele geralmente é realizado com o uso de cremes, loções e pomadas (JENSEN et al, 2011). Porém, a liberação do fármaco nestas formas farmacêuticas geralmente é inespecífica e a permeação na pele pode ser muito baixa e com alta variação (KORTING et al, 2009). Uma alternativa é o uso de nanocarreadores como as nanopartículas lipídicas sólidas que podem aumentar a permeação através do estrato córneo, além de possibilitar uma liberação controlada (JENSEN et al, 2011).

Assim, no intuito de aumentar a permeação cutânea, este fármaco pode ser encapsulado em nanossistemas de liberação controlada como as nanopartículas lipídicas sólidas.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar nanopartículas lipídicas sólidas contendo genisteína para uso tópico e avaliar o seu desempenho *in vitro* através de estudos de permeação cutânea passiva e iontoforética, bem como estudos de citotoxicidade.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar metodologia bioanalítica e analítica para quantificação da genisteína por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).
- Obter e caracterizar as nanopartículas lipídicas sólidas quanto ao tamanho médio, índice de polidispersividade, eficiência de encapsulação, recuperação e carga de fármaco.
- Avaliar *in vitro* a liberação e a permeação passiva e iontoforética da genisteína a partir das nanopartículas desenvolvidas e do fármaco livre.
- Avaliar a citotoxicidade da genisteína e das nanopartículas lipídicas sólidas com e sem fármaco em células B16F10.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Substâncias e reagentes

- Acetonitrila HPLC - JT Baker, EUA.
- Ácido Acético Glacial - Merck, Alemanha.
- Ácido clorídrico - Merck, Alemanha.
- Água ultra-pura Milli-Q - Millipore, EUA.
- Azul de Tripiano - Vetec, Brasil.
- Cloreto de cetilpiridínio - Sigma Aldrich, EUA.
- Cloreto de potássio - Sigma Aldrich, EUA.
- Behenato de glicerila - Sigma Aldrich, EUA.
- Genisteína - LC Laboratories, EUA.
- N-propanol - HPLC - JT Baker, EUA.
- Lauril sulfato de sódio - Vetec, Brasil.
- Meio DMEM - Sigma, EUA.
- Metanol HPLC - JT Baker, EUA.
- Trioleato de sorbitano - Sigma, EUA.
- Soro Bovino Fetal – GIBCO, EUA.
- Trealose - Sigma, EUA.
- Tripsina - Sigma, EUA.
- Polissorbato 80 - Sigma, EUA.
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difeniltetrazólio – Sigma, EUA.
- Cloreto de prata - Sigma, EUA.

4.1.2 Equipamentos e utensílios diversos

- Agitador de tubos Vortex VG3 – IKA, Alemanha.
- Banho de Ultrassom USC-2899A – Unique, Brasil.
- Câmara de Neubauer – Boeco, Alemanha.

- Célula de fluxo estático tipo “Franz” acoplada em equipamento de coleta automatizada – Hanson Research, EUA.
- Células de fluxo contínuo para iontoforese LG 1088-IC - Laboratory Glass Apparatus Inc., EUA.
- Coluna Agilent ZORBAX SB-C18 (250 x 4mm, 5µm), com pré-coluna Eclipse XDB-C18 (12,5 x 4,6mm).
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) – Bomba quaternária (ProStar 240), com amostrador automático (ProStar 410) e detector na região do ultravioleta (ProStar 310) – Varian, EUA.
- Estufa de CO₂ – TermoFisher, EUA.
- Espectrofotômetro CARY UV-Visível – Varian, EUA.
- Fita adesiva - Durex Original 500, 3M, Sumaré, SP, Brasil.
- Garrafa para cultivo celular – TPP, Suíça.
- Leitor de placa de ELISA – Stat Fax 2100, Dusseldorf, Alemanha.
- Membrana de diálise FisherBrand (peso molecular 12.000-14.000 Da) de celulose regenerada – Fisher Scientific, Reino Unido.
- Mini-Incubadora Ma 410 – Marconi, Brasil.
- Placa de cultura de 96 poços – TPP, Suíça.
- Ultra-Turrax T25 Digital – IKA, Alemanha.
- Ultrassom de agulha – Misonix, EUA.
- ZetaSizer Nano-S – Malvern Instruments, Reino Unido.
- Zeta Plus – Malvern Instruments, Reino Unido.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 QUANTIFICAÇÃO DA GENISTEÍNA

4.2.1.1 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da genisteína por espectroscopia

A varredura do espectro de absorção no UV foi realizada com solução de genisteína (5 µg/mL) em metanol, com intervalo de comprimento de onda de 200 a 400 nm.

4.2.1.2 Quantificação da genisteína por cromatografia líquida de alta eficiência

A GEN foi quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção UV. Utilizou-se coluna C18 (250 x 4,6mm, 5µm) e pré-coluna C18 (12.5 x 4.6mm). Empregou-se como fase móvel água pH 3, n-propanol e acetonitrila, na proporção 50:2:48 (v/v/v), respectivamente. Foram utilizados comprimento de onda de 270 nm, volume de injeção de 50 µL e fluxo de 1,0 mL/min. Os dados foram processados usando o Software Galaxie Chromatography Data System.

4.2.1.3 Desenvolvimento e validação da metodologia bioanalítica

O método foi desenvolvido e validado de acordo com os parâmetros de recuperação, seletividade, linearidade, precisão, exatidão e limite de quantificação de acordo com o guia de validação bioanalítica do Food and Drug Administration Guidelines (FDA, 2001).

4.2.1.3.1 Escolha e preparo da matriz biológica

Durante a realização dos estudos de permeação cutânea é necessário o uso de uma matriz condizente com a pele humana. Orelhas de porco foram usadas como modelo da pele humana devido sua similaridade, considerando suas propriedades bioquímicas, densidade de folículos pilosos e espessura do estrato córneo (LOPES e REED, 2009; GEORGETTI et al, 2008). As orelhas foram coletadas imediatamente

após o abate dos animais e foram mantidas sob refrigeração (4°C) durante o transporte ao laboratório. Toda a pele foi removida cuidadosamente da superfície da cartilagem da orelha com o uso de um bisturi. O tecido subcutâneo foi removido e a pele foi armazenada a -80°C por um período máximo de 30 dias antes do uso.

4.2.1.3.2 *Tape stripping*

Antes da determinação da GEN nas camadas da pele, o estrato córneo (EC) foi separado da pele remanescente (PR) através da técnica de *tape stripping*. Neste processo, as peles de orelha de porco foram colocadas com o EC voltado para cima e as camadas de células foram removidas sucessivamente com o uso de fitas adesivas, de modo que, tanto o EC quanto o fármaco contido nesta camada ficavam aderidos nas fitas adesivas (LADEMANN et al, 2009). As peles sem o estrato córneo, chamadas de pele remanescente (PR), foram cortadas em pequenos pedaços. Em seguida, EC e PR foram submetidas ao processo de extração do fármaco (item 4.2.1.3.3).

4.2.1.3.3 Extração da GEN da pele

As fitas adesivas contendo o EC, provenientes do *tape stripping*, foram imersas em 5 mL de metanol por 20 minutos e em seguida foram levadas ao vortex por 2 minutos. As amostras foram filtradas e depois analisadas por CLAE-UV. A PR foi homogeneizada (ultra turrax) por 2 minutos com 5 mL de metanol a 6.000 rpm. Em seguida, as amostras ficaram no banho de ultrassom por 20 minutos, foram filtradas e também analisadas por CLAE-UV.

4.2.1.3.4 Recuperação

A recuperação foi determinada através da razão entre quantidade de GEN extraída de pele contaminada e a quantidade de GEN adicionada. Para isso, amostras sem fármaco de EC e PR foram contaminadas com 500 µL de solução de GEN nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4 mg/mL, em triplicata. O solvente foi evaporado e em seguida, as amostras de EC e PR contendo GEN foram submetidas

à extração (conforme item 4.2.1.3.3). A adição de 5 mL de metanol, resultou em concentrações teóricas de 10, 20 e 40 µg/mL.

4.2.1.3.5 Seletividade

Os possíveis interferentes dos componentes endógenos da pele e os componentes da fita foram analisados para verificação da seletividade do método. Seis amostras brancas de PR e fitas provenientes do *tape-stripping* foram submetidas à extração e analisadas por CLAE-UV. O tempo de retenção dos possíveis interferentes foi comparado com o tempo de retenção da GEN.

4.2.1.3.6 Linearidade

Para determinação da linearidade, amostras de EC e PR foram contaminadas com soluções de GEN nas concentrações de 0,001 a 0,6 mg/mL, em triplicata. O solvente foi evaporado e as amostras foram submetidas à extração (conforme item 4.2.1.3.3). As concentrações obtidas variaram de 0,1 a 60 µg/ml. Os valores das áreas obtidas foram plotados em relação à concentração a fim de obter uma curva de calibração.

4.2.1.3.7 Exatidão e precisão

Exatidão e precisão foram analisadas após contaminação do EC e da PR com GEN (conforme item 4.2.1.3.4), em quintuplicata. A precisão foi determinada pela análise de diferentes amostras no mesmo dia e em três dias diferentes. A precisão foi expressa como o desvio padrão relativo (DPR%) dos valores das replicatas. A exatidão foi calculada como a diferença entre o valor real e o valor teórico, em porcentagem, e foi expressa como o erro relativo (E%).

4.2.1.3.8 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) para o método proposto foi estabelecido através da análise de amostras brancas de pele (EC e PR) contendo concentrações

decrecentes do fármaco até a menor concentração com valores de precisão e exatidão menor ou igual a 20%.

4.2.1.4 Validação da metodologia analítica

O método analítico foi validado de acordo o guia para validação analítica do FDA (1996) seguindo os parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, recuperação e limite de quantificação.

4.2.1.4.1 Seletividade

Para determinar a seletividade do método, amostras de nanopartículas lipídicas sem fármaco foram rompidas com metanol, filtradas e analisadas em CLAE-UV. Os testes foram realizados em triplicata. Os componentes das nanopartículas não podem interferir no tempo de retenção da GEN.

4.2.1.4.2 Linearidade

A linearidade foi determinada pela construção de curva de calibração padrão utilizando-se soluções com concentração de genisteína no intervalo de 0,1 a 60 µg/mL, em duplicata. O desvio padrão relativo entre as áreas dos picos e o coeficiente de correlação da curva de calibração foram determinados.

4.2.1.4.3 Exatidão e precisão

Para avaliação da exatidão e da precisão foram determinadas as concentrações de três pontos da curva (10, 20 e 40 µg/mL), em quintuplicata. A exatidão do método foi avaliada através da relação entre as concentrações encontradas e seus respectivos valores teóricos (E%). A precisão intra e interdia foram avaliadas através da proximidade dos resultados obtidos no mesmo dia e em dias diferentes, respectivamente (DPR%).

4.2.1.4.4 Limite de quantificação

Obteve-se o limite de quantificação através da análise de soluções com concentrações decrescentes de genisteína (250 a 75 ng/mL), até a quantificação da genisteína com valores de precisão e exatidão iguais ou menores que 5%.

4.3 DESENVOLVIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

4.3.1 Obtenção das nanopartículas lipídicas sólidas

As nanopartículas foram produzidas pela técnica de diluição de microemulsão. Behenato de glicerila (2%), 1% de tensoativos (polissorbato 80/trioleato de sorbitano 7:3) e cloreto de cetilpiridínio (CPC) (0,05 – 0,5%) foram aquecidos e mantidos sob agitação. Em seguida, 250 μ L de água quente foram adicionados para formação da microemulsão. A microemulsão foi gotejada em água gelada (4°C) (na proporção 1:20), sendo homogeneizada a 14000 rpm por 10 minutos. Por fim, as formulações foram submetidas à ultrassom de agulha por 10 minutos. As formulações contendo NLS carregadas com fármaco foram preparadas com a adição de 8% de fármaco em relação à quantidade total de lipídeos adicionado na formulação, sendo que o fármaco foi adicionado na microemulsão antes do gotejamento em água gelada (Figura 11).

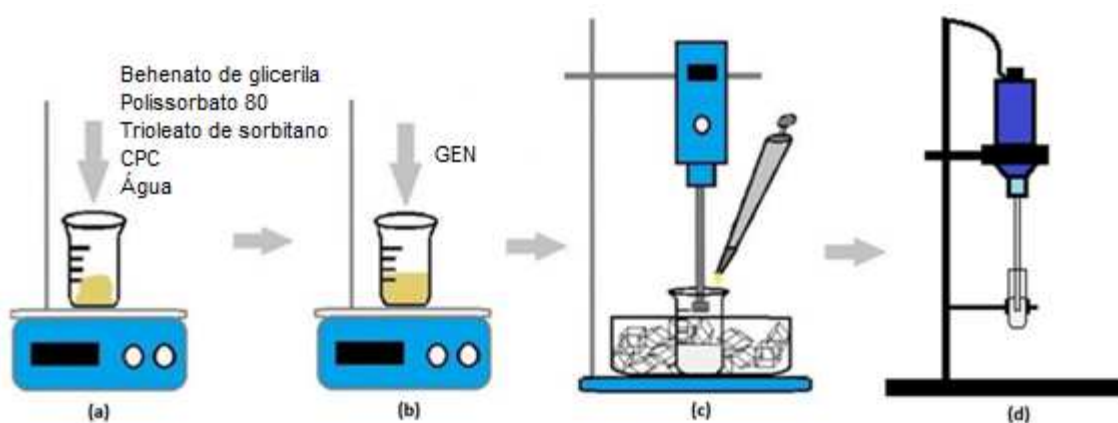


Figura 11. Esquema representativo do processo de obtenção das NLS pelo método de diluição de microemulsão. (a) Adição de água quente à mistura fundida de lipídeos e tensoativos. (b) Adição da GEN à microemulsão formada. (c) Gotejamento da formulação em água gelada (1:20) e homogeneização em ultra turrax. (d) Aplicação de ultrassom de agulha à formulação.

4.3.2 Caracterização das nanopartículas lipídicas sólidas

As formulações obtidas foram avaliadas quanto ao tamanho da partícula, índice de polidispersividade (Pdl), recuperação do fármaco (Rec%), eficiência de encapsulação (EE%) e carga de fármaco (CF%). Os estudos foram realizados em triplicata.

4.3.2.1 Avaliação da distribuição de tamanho de partícula

A caracterização das nanopartículas obtidas em relação ao tamanho e Pdl foi realizada em equipamento ZetaSiser Nano-S pela técnica de espalhamento dinâmico de luz. As leituras foram realizadas a partir de diluição da formulação em água ultrapurificada (1:100) e agitação em vortex por 2 minutos.

4.3.2.2 Avaliação do potencial zeta

A determinação do potencial zeta foi realizada em equipamento Zeta Plus pela medida da velocidade de migração eletroforética das partículas. As leituras foram realizadas a partir de diluição da formulação em solução de KCl 0,1 M (1:75).

4.3.2.3 Avaliação da eficiência de encapsulação da genisteína nas NLS

A EE% foi avaliada através da relação entre fármaco total (FT) e fármaco livre (FL), conforme a Equação II.

$$EE\% = \frac{FT-FL}{FT} \times 100 \quad \text{Equação II}$$

Para determinação do fármaco total na formulação, isto é, fármaco livre mais fármaco encapsulado, as nanopartículas foram rompidas com metanol, agitadas em vortex por 2 minutos, filtradas e analisadas por CLAE. Já para determinação do fármaco livre, uma alíquota de 1 mL foi levada a mini centrífuga por 10 minutos a 2000 rpm. O precipitado foi solubilizado em 1 mL de metanol e quantificado por CLAE.

4.3.2.4 Carga de fármaco

A carga de fármaco (CF%) foi determinada através da relação entre fármaco encapsulado (FT - FL) e massa de lipídeos (ML) adicionada à formulação, conforme a Equação III.

$$CF\% = \frac{FT-FL}{ML} \times 100 \quad \text{Equação III}$$

4.3.2.5 Recuperação do fármaco

Nesta técnica, devido o grande número de etapas manuais, nem todo o fármaco que é adicionado no começo é recuperado no final. Para determinar a recuperação do fármaco (Rec%) foi calculada a relação entre fármaco total (FT) e fármaco adicionado (FA), de acordo com a Equação IV.

$$Rec\% = \frac{FT}{FA} \times 100 \quad \text{Equação IV}$$

4.4 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO CUTÂNEA

Para realização dos estudos de liberação e permeação cutânea é preciso realizar primeiramente um estudo de solubilidade, a fim de que seja assegurada a condição 'sink', segundo a qual, o volume de solução utilizado nos experimentos não favorece proximidade à saturação do fármaco (MARQUES, 2009).

4.4.1 Estudo de solubilidade

A solubilidade da GEN foi determinada em água contendo 5% de lauril sulfato de sódio. Foi preparada uma solução saturada de GEN, a qual permaneceu em agitação orbital (300 rpm) por 24 horas em mini-incubadora a 37°C. Após esse período, a solução foi filtrada em membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) 0,45 µm, diluída e quantificada por CLAE. O estudo foi realizado em triplicata.

4.4.2 Estudo de liberação

Para avaliação do perfil de liberação *in vitro* da GEN livre (isto é, genisteína solubilizada em água com 5% de lauril sulfato de sódio) e da GEN encapsulada nas NLS foram utilizadas células de fluxo estático tipo Franz acopladas em equipamento de coleta automatizada (Figura 12). Nestes estudos foram utilizadas membranas de diálise (10000 – 12000 Da) e solução aquosa contendo 5% de lauril sulfato de sódio como solução receptora. As condições utilizadas nos experimentos estão na Tabela 1. Os tempos de coleta foram 1, 2, 4, 6, 12, 24 e 36 horas.



Figura 12. Células de fluxo estático tipo “Franz” acopladas em equipamento de coleta automatizada, Hanson Research. *Fonte: Manual Microette, Hanson Research.*

Tabela 1. Condições estabelecidas nos estudos de liberação e permeação passiva.

Agitação	300 rpm
Temperatura	37°C
Volume de coleta	1 mL
Volume de rinse	1 mL
Volume do compartimento doador	200 µL
Volume do compartimento receptor	6,666 mL
Área de difusão	1,86 cm ²
Concentração da GEN no compartimento doador	0,2 mg/mL

4.4.3 Estudo de permeação passiva

Nos estudos de permeação passiva também foram utilizadas células de fluxo estático tipo Franz acopladas em equipamento de coleta automatizada e as condições utilizadas foram as mesmas da Tabela 1. O compartimento receptor

continha solução aquosa com 5% de lauril sulfato de sódio. Entre os dois compartimentos foi colocada a pele de orelha de porco com o estrato córneo voltado para cima. Os experimentos foram realizados com 6, 12, 18 e 24 horas de permeação.

4.4.4 Estudo de permeação iontoforética

Os estudos de permeação iontoforética foram realizados utilizando células de semelhantes às de difusão descritas por Glikfield e colaboradores (1998) (Figura 13) mantidas a 37°C e agitadas a 300 rpm. Os experimentos foram realizados utilizando eletrodos de Ag/AgCl com corrente constante de 0,05 mA/cm². No ânodo adicionou-se a formulação de NLS-GEN na concentração de 0,2 mg/mL e no cátodo adicionou-se a solução aquosa contendo 5% de LSS. O compartimento receptor também continha solução aquosa contendo 5% de LSS. A pele foi colocada entre os dois compartimentos. Os experimentos foram realizados com tempo de 3 horas.

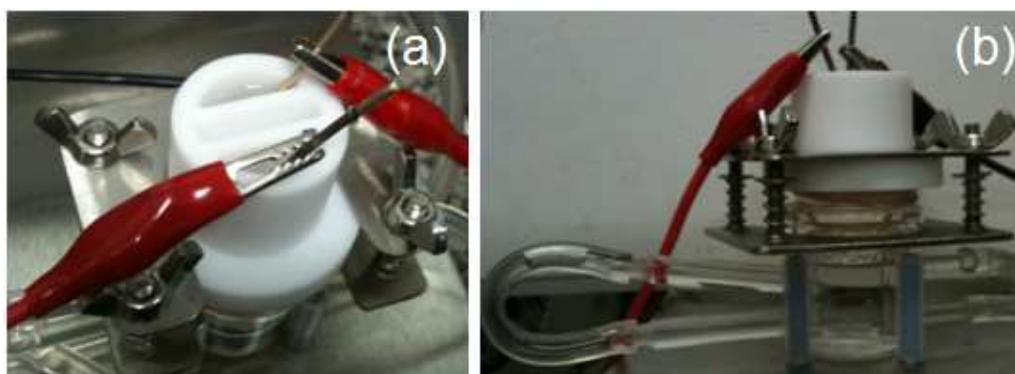


Figura 13. Células de fluxo estático tipo Glikfield. (a) Visão superior. (b) Visão lateral.

4.5 ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE CELULAR

4.5.1 Cultura celular

Os estudos de citotoxicidade foram realizados em linhagem celular de melanoma B16F10, obtida da ATCC (American Type Culture Collection, EUA). As culturas celulares foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal e mantidas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂.

4.5.2 Avaliação da citotoxicidade celular da genisteína livre e encapsulada pelo método de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difeniltetrazólio (MTT)

Para avaliação da viabilidade celular foi utilizado o método de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difeniltetrazólio) (MOSMANN, 1987). As células ($0,5 \times 10^5$ células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas com o meio de cultura por 24 horas. Após a incubação, o meio de cultura foi removido e substituído por meio novo. Adicionaram-se as formulações testes (genisteína livre nas concentrações de 3,7 a 222 μM , NLS sem fármaco, NLS com genisteína nas concentrações de 18,5 e 37 μM) e incubou-se a placa por mais 24 horas. Após este período, o meio foi renovado novamente. Em seguida adicionou-se 10 μL de uma solução de MTT a 5 mg/mL em cada poço. A placa foi protegida contra a luz e deixada em repouso em temperatura ambiente por 3 horas. Posteriormente, adicionou-se 50 μL de uma solução de HCL 0,01M com 20% de lauril sulfato de sódio. As placas foram lidas em espectrofotômetro (ELISA) ($\lambda = 545 \text{ nm}$). A viabilidade celular foi determinada de acordo com a Equação V, onde a absorbância considerada como 100% foi a do controle. Os testes foram realizados em sextuplicata, em três experimentos independentes.

$$\text{Viabilidade} = \frac{\text{Média absorbância formulações testes-branco}}{\text{Média da absorbância do controle-branco}} \times 100 \quad \text{Equação V}$$

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas por teste t não-paramétrico e as médias foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$, utilizando o programa Graph Pad Prism para o Windows.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABISMAÏL, B.; CANSELIER, J.P.; WILHELM, A.M.; DELMAS, H.; GOURDON, C. Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability B. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 6, p. 75-83, 1999.

ADLERCREUTZ, H.; MARKKANEN, H.; WATANABE, S. Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. **Lancet**, v. 342, p. 1209-1210, 1993.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**, 2. ed. Porto Alegre: Artemd, 2005, p.677.

BANERJEE, S.; LI, Y.; WANG, Z.; SARKAR, F. H. Multi-targeted therapy of cancer by Genistein. **Cancer Letters**, v. 269, p. 226–242, 2008.

BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, P. L. Skin structure and mode of action of vesicles. **Adv. Drug Deliv.**, v. 54 (Suppl1), p. S41–S55, 2002.

BOUWSTRA, J. A.; van den Berghe, B. A.; SUHONEN, M. Topical application of drugs: mechanisms involved in chemical enhancement. **J. Recept. Signal Transduct**, Res. 21 (2–3), p. 259–286, 2001.

BRASIL. Instituto Nacional do Câncer. **INCA/MS**. Disponível em:<
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>> Acesso em:
15/11/2011.

CARUTHERS, S. D.;^{1,2} WICKLINE, S. A.; LANZA, G. M. L. Nanotechnological applications in medicine. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 26-30, 2007.

CÉSAR, I. C.; BRAGA, F. C.; SOARES, C. D. V.; NUNAN, E. A.; PIANETTI, G. A.; CONDESSA, F. A.; BARBOSA, T. A. F.; CAMPOS, L. M. M. Development and validation of a RP-HPLC method for quantification of isoflavone aglycones in hydrolyzed soy dry extracts. **Journal of Chromatography B**, v. 836, p.74-78, 2006.

CHEN, H.; CHANG, X.; DU, D.; LIU, W.; LIU, J.; WENG, T.; YANG, Y.; XU, H.; YANG, X. Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. **J. Control. Release**, v.110, n. 2, p. 296–306, 2006.

CHIEN, Y. W. **Novel Drug Delivery Systems**, 2. ed. New York: Marcel Dekker, Inc, 2001. p. 300-375.

DUBHASHI, S.S.; VAVIA, P.R. HPTLC method to study skin permeation of acyclovir. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, p.1017-1022, 2000.

ECHEVARRÍA, L.; BANCO-PRÍETO, M. J.; CAMPANERO, M. A.; SANTOYO, S.; YGARTUA, P. Development and validation of a liquid chromatographic method for *in vitro* mupirocin quantification in both skin layers and percutaneous penetration studies. **Journal of Chromatography B**, v.796, p. 233-241, 2003.

ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J.; MERINO-SANJUÁN, V.; LÓPEZ-CERVANTES, M.; URBAN-MORLAN, Z.; PIÑÓN-SEGUNDO, E.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; GANEM-QUINTANAR, A. The Tape-Stripping Technique as a Method for Drug Quantification in Skin. **J Pharm Pharmaceut Sci**, v. 11, n. 1, p. 104-130, 2008.

FANG, J. Y.; LEU, Y. L.; CHANG, C.C.; LIN, C.H.; TSAI, Y. H. Lipid nano/submicron emulsions as vehicles for topical flurbiprofen delivery. **Drug Deliv**, v.11, p.97–105, 2004.

FANG, JIA-YOU.; FANG, CHIA-LANG.; LIU, CHI-HSIEN.; SU, YU-HAN. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, p. 633–640, 2008.

FENG, SI-SHEN.; CHIEN, S. Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. **Chemical Engineering Science**, v. 58, p. 4087 – 4114, 2003.

FERNANDEZ, C.; MARTI-MESTRES, G.; MESTRES, J. P.; MAILLOLS, H. LC analysis of benzophenone-3: II application to determination of 'in vitro' and 'in vivo' skin penetration from solvents, coarse and submicron emulsions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 1, p.155-165, 2000.

FDA. Center for Drug Evaluation and Research, United States Food and Drug Administration. **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**. 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>>. Acesso em: março, 2009.

FDA. Center for Drug Evaluation and Research, United States Food and Drug Administration. **Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**. 1996. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm073384.pdf>>. Acesso em: março, 2009.

FIGUEIREDO, L. C.; CORDEIRO, L. N.; ARRUDA, A. P.; CARVALHO, M. D. F.; RIBEIRO, E. M.; COUTINHO, H. D. M. Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 3, p. 179-183, 2003.

FOFTIS, T.; PEPPER, M.; ADLERCREUTZ, H.; FLEISCHMANN, G.; HASE, T.; MONTESANO, R.; SCHWEIGERER, L. Genistein, a dietary-derived inhibitor of *in vitro* angiogenesis. **Medical Sciences**, v. 90, p. 2690-2694, 1993.

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

GAO, Y.; GU, W.; CHEN, L.; XU, Z.; LI, Y. The role of daidzein-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles in therapy for cardio-cerebrovascular diseases. **Biomaterials**, v. 29, p. 4129–4136, 2008.

GASCO, M.R. Method of producing solid lipid microspheres having narrow size distribution. **US Patent No. 5250236**, 1993.

GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. Jr.; LOPEZ, R. F.; FONSECA, M. J. Evaluation of in vivo efficacy of topical formulations containing soybean extract. **Int. J. Pharm.**, v. 352 (1-2), p.189-196, 2008.

GLIKFELD, P.; CULLANDER, C.; HINZ, R.S.; GUY, R.H. A new system for *in vitro* studies of iontophoresis. **Pharm.Res.**, v. 5, p. 443–446, 1988.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G.M.; LOPEZ, R.F.V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Quim. Nova**, v. 31, p. 1490-1498, 2008.

JENSEN L. B.; PETERSSON, K.; NIELSEN, H. M. *In vitro* penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact and barrier-impaired skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 68–75, 2011.

KANG, S.; CHUNG, J. H.; LEE, J. H.; FISHER, G. J.; SHENGWAN, Y.; 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, n. 5, 2003.

KIGUCHI, K.; CONSTANTINOU, A.; HUBERMAN, E. Genistein induced cell differentiation and protein-linked DNA strand breakage in human melanoma cells. **Cancer Commun**, v.2 p. 271–278, 1990.

KIM, B. D.; NA, K.; CHOI, H. K. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles (SLN) made of cacao butter and curdlan. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 24, p.199–205, 2005.

Klein, C. B.; King, A. A. Genistein genotoxicity: critical consideration of *in vitro* exposure dose. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 224, p. 1-11, 2007.

KORTING, H. C.; SCHAEFER-KORTING, M. Carriers in the topical treatment of skin disease. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v.197, p. 435–468, 2010.

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

KULKARNI, S.B.; BANGA, A.K.; BETAGERI, G.V. Delivery of liposome encapsulated colchicine across human cadaver skin using iontophoresis. **Pharm. Res.**, v. 13, p. S361–S369, 1996.

KUO, YUNG-CHIH.; CHEN, HUNG-HAO. Entrapment and release of saquinavir using novel cationic solid lipid Nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 365, p. 206–213, 2009.

KUO, Y.C.; LIN, T.W. Electrophoretic mobility, zeta potential, and fixed charge density of bovine knee chondrocytes, methylmethacrylate–sulfopropylmethacrylate, polybutylcyanoacrylate, and solid lipid nanoparticles. **J. Phys. Chem. B**, v. 110, p. 2202–2208, 2006.

LADEMANN, J.; RICHTER, H.; TEICHMANN, A.; OTBERG, N.; BLUME-PEYTAVI, U.; LUENGO, J.; WEISS, B.; SCHAEFER, U. F.; LEHR, C.M.; WEPF, R.; STERRY, W. Nanoparticles-an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.66, p. 159–164, 2007.

LAMPE, J. W.; NISHINO, Y.; RAY, R. M.; WU, C.; LI, W.; LIN, M. G.; GAO, D. L.; HU, Y.; SHANNON, J.; STLSBERG, H.; PORTER, P. L.; FRANKEFELD, C. L.; WÄHÄLÄ, K.; THOMAS, D. B. Plasma isoflavones and fibrocystic breast conditions and breast cancer among women in Shanghai, China. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v.16, p. 2579–2586, 2007.

LIGGINS, J.; BLUCK, L. J.; RUNSWICK, S.; ATKINSON, C.; COWARD, W. A.; BINGHAM, S. A. Daidzein and genistein contents of vegetables. **British Journal of Nutrition**, v.84, 717-725, 2000.

LIU, W.; HU, W.; LIU, W.; XUW, C.; XU, H.; YANG, X. Investigation of the carbopol gel of solid lipid nanoparticles for the transdermal iontophoretic delivery of triamcinolone acetate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 135-141, 2008.

LOPES, L. B.; REED, R. A simple and rapid method to assess lycopene in multiple layers of skin samples. **Biomedical Chromatography**, v.24, p.154-159, 2009.

MARENGO, E.; CAVALLI, R.; CAPUTO, O.; RODRIGUEZ, L.; GASCO, M.R. Scale-up of preparation process of solid lipid nanospheres. Part I. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 205 (1-2), p. 3-13, 2000.

MARQUES, M.R.C. Dissolução de medicamentos. In: ____ **Ciências Farmacêuticas, Biofarmacotécnica**, 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2009. cap. 7.

MORAES, S. L.; REZENDE, M. O. O. Determinação da concentração micelar crítica de ácidos húmicos por medidas de condutividade e espectroscopia. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 701-705, 2004

MONON, L. G.; KUTTAN, R.; NAIR, M. G. Effect of isoflavone genistein and daidzein in the inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F–10 melanoma cells. **Nutr. Cancer**, v. 30, p. 74–77, 1998.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 165-196, 2001.

MICHAELS, A. S.; CHANDRASEKARAN, S. K.; SHAW, J. E. Drug permeation through human skin: theory and *in vitro* experimental measurement, **AIChE J.**, v. 21, p. 985–986, 1975.

MOORE, A.; BASILION, J.P.; CHIOCCA, E.A.; WEISSLEDER, R. Measuring transferring receptor gene expression by NMR imaging. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1402, p. 239–249, 1998.

MOSER, K.; KRIWER, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p.103-112, 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1987.

MUCHOW, M.; MAINCENT, P.; MÜLLER, R. H. Lipid Nanoparticles with a Solid Matrix (SLN®, NLC®, LDC®) for Oral Drug Delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 34, p.1394–1405, 2008.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 161-177, 2000.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, Suppl. 1, p. S131-S155, 2002.

OLBRICH, C.; BAKOWSKY, U.; LEHR, CLAUS-MICHAEL.; MÜLLER, R. H.; KNEUER, C. Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. **Journal of Controlled Release**, v. 77, p. 345-355, 2001.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/cancer/en/>>. Acesso em: 19/11/2011.

PAVESE, J. M.; FARMER, R. L.; BERGAN, R.C. Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein. **Cancer Metastasis Rev**, v. 29, p.465–482, 2010.

PERKIN, A. G.; NEWBURY, F. G. The colouring matters contained in dyer's broom (*Genista tinctoria*) and heather (*Calluna vulgaris*). **Journal of the Chemical Society**, v.75, p. 830–839, 1899.

POUTON, C. W.; PORTER, C. J. H. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 625–637, 2008.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M.T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T.A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 470-491, 2011.

PURI, D.; BHANDARI, A.; SHARMA, P.; CHOUDHARY, D. Lipid nanoparticles (Sln, nlc): a novel approach for cosmetic and dermal pharmaceutical. **Journal of Global Pharma Technology**, v. 2, n. 5, p. 1-15, 2010.

ROBERTS, M. S.; CROSS, S. E.; PELLETT, M. A. **Skin transport.**, New York: Marcel Dekker, Inc, 2002. p.89-195.

SALTI, G.I.; GREWAL, S.; MEHTA, R. R.; DAS GUPTA, T. K.; BODDIE, A. W.; CONSTANTINOU, JR, A.I. Genistein induces apoptosis and topoisomerase II-mediated DNA breakage in colon cancer cells. **European Journal of Cancer**, v. 36, p. 796±802, 2000.

SCHOEPP, U.; MARECOS, E.; MELDER, R.; JAIN, R.; WEISSLEDER, R. Intracellular magnetic labeling of lymphocytes for in vivo trafficking studies. **BioTechniques**, v. 24, p.642, 1998.

SENYIGIT, T.S.; PADULA, C.; OZER, O.; SANTI, P. Different approaches for improving skin accumulation of topical corticosteroids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 380, p. 155-160, 2009.

SHAJI, J.; JAIN, V. SOLID LIPID NANOPARTICLES: A NOVEL CARRIER FOR CHEMOTHERAPY. **Int J Pharmacy and Pharm Sci**, v..2, Suppl. 3, p. 817, 2010.

SHARMA, P.; GANTA, S.; DENNY, W. A.; GARG, S. Formulation and pharmacokinetics of lipid nanoparticles of a chemically sensitive nitrogen mustard derivative: Chlorambucil **International Journal of Pharmaceutics**, v. 367, p.187–194, 2009.

SILVA, A. P.; NUNES, B. R.; DE OLIVEIRA, M. C.; KOESTER, L. S.; MAYORGA, P.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. F. Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein. **Pharmazie**, v.64, n.1, p.32-35, 2009.

SILVA, A. P. C.; KOESTER, L. S.; MAYORGA, P.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. Development and validation of a LC method for determination of genistein in topical nanoemulsions. **Pharmazie**, v. 62, p. 732–734, 2007.

SILVA, J. L.; APOLINÁRIO, A. C.; SOUZA, M. S. R.; DAMASCENO, B. P. G. L.; MEDEIROS, A. C. D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 31, n. 3, p. 125-131, 2010.

SOUTO, E.B.; MÜLLER, R.H. The use of SLN and NLC as topical particulate carriers for imidazole antifungal agents. **Pharmazie**, v. 61, p. 431–437, 2006.

SOUZA, L. G.; SILVA, E. J.; MARTINS, A. L. L.; MOTA, M. F.; BRAGA, R. C.; LIMA, E. M.; VALADARES, M. C.; TAVEIRA, S. F.; MARRETO, R. N. Development of topotecan loaded lipid nanoparticles for chemical stabilization and prolonged release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 189–196, 2011.

TABATT, K.; SAMETI, M.; OLBRICH, C.; MULLER, R. H.; LEHR, C. Effect of cationic lipid and matrix lipid composition on solid lipid nanoparticle-mediated gene transfer. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p.155–162, 2004.

TAVEIRA, S.F.; NOMIZO, A.; LOPEZ, R.F.V. Effect of the iontophoresis of a chitosan gel on doxorubicin skin penetration and cytotoxicity. **Journal of Controlled Release**, v. 134, p. 35-40, 2009.

TESSELAAR, E.; SJOBERG, F.; Transdermal iontophoresis as an in-vivo technique for studying microvascular physiology. **Microvascular Research**, v. 81, p. 88-96, 2011.

THOMAS, B. F.; ZEISEL, S. H.; BUSBY, M. G.; HILL, J. M.; MITCHELL, R. A.; SCHEFFLER, N. M.; BROWN, S. S.; BLOEDEN, L. T.; DIX, K. J.; JEFFCOAT, A. R. Quantitative analysis of the principle soy isoflavones genistein, daidzein and glycitein, and their primary conjugated metabolites in human plasma and urine using reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v.760, p. 191-205, 2001.

TOUITOU, E.; MEIDAN, V. M.; HORWITZ, E. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. **Journal of Controlled Release**, v.56, p. 7-21, 1998.

UNGAR, Y.; OSUNDAHUNSI, O. F.; SHIMONI, E. Thermal Stability of genistein and daidzein and its effect on their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.15, p. 4394-4399, 2003.

VENUGANTI, V. V. e PERUMAL, O. P. **Drug delivery nanoparticles formulations and characterization**. New York: Informa Healthcare, Inc, 2009, 418p.

WAGNER, V.; DULLAART, A.; BOCK, A.; ZWECK, A. The emerging nanomedicine landscape. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 10, 2006.

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

WEISSLEDER, R.; CHENG, H.C.; BOGDANOVA, A.; BOGDANOV, A. Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging. **J. Magn. Reson. Imaging**, v. 7, p.258–263, 1997.

WISSING, S.A; KAYSER, O.; MULLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p. 1257-1272, 2004.

WONG, H. L.; BENDAYAN, R.; RAUTH, A. M.; LI, Y.; WU, X. Y. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 491–504, 2007.

WONG, H. L.; RAUTH, A. M.; BENDAYAN, R.; MANIAS, J. L.; RAMASWAMY, M.; LIU, Z.; ERHAN, S.Z.; WU, X. Y. A New Polymer/Lipid Hybrid Nanoparticle System Increases Cytotoxicity of Doxorubicin Against Multidrug-Resistant Human Breast Cancer Cells. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 7, 2006.

YEGANEH, M. H.; MCLACHLAN, A. J. Determination of terbinafine in tissues. **Biomedical Chromatography**, v.14, p. 261-268, 2000.

YOUENANG PIEMI, M.P.; KORNEV, D.; BENITA, S.; MARTY, J. Positively and negatively charged submicron emulsions for enhanced topical delivery of antifungal drugs. **J. Control. Release**, v. 58, p.177–187, 1999.

YUAN, H.; MIAO, J.; DU, Y-Z.; YOU, J.; HU, F-Q.; ZENG, S. Cellular uptake of solid lipid nanoparticles and cytotoxicity of encapsulated paclitaxel in A549 cancer cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 348, p. 137–145, 2008.

ZIELONKA, J.; GŁĘBICKI, J.; GRYNKIEWICZ, G. Radical scavenging properties of genistein. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 35, p. 958–965, 2003.