

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUIMICA

**ENCAPSULAÇÃO DA GENISTEÍNA EM LIPOSSOMAS:
CARACTERIZAÇÃO DAS INTERAÇÕES FÁRMACO-
LIPÍDEO, ESTABILIDADE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

LIDIANE RADOLL RIBEIRO

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Federal de
Goiás com exigência parcial para
obtenção do título de Mestre em
Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Martins Lima.

GOIÂNIA

2008

I. INTRODUÇÃO

A atividade biológica de vários isoflavonóides desperta o interesse pela pesquisa de suas possíveis propriedades câncer-preventivas, que podem ser exercidas através de efeitos múltiplos associados à inibição da carcinogênese. Alguns efeitos associados à inibição da carcinogênese têm sido atribuídos à afinidade da genisteína em se ligar a receptores de estrógeno, principalmente de se ligar aos receptores β . As isoflavonas mais estrogenicamente ativas são genisteína e daidzeína, que ocorrem principalmente em plantas como glicosídeos inativos (ARORA et al., 2000).

Apesar da diversidade estrutural encontrada para os isoflavonóides, a genisteína e a daidzeína são as mais estudadas, sendo que a genisteína possui atividade biológica mais pronunciada e também é a mais abundante nas fontes vegetais, sendo encontrada em maior quantidade na soja e em produtos derivados da soja (DIXON e FERREIRA, 2002).

O principal interesse das isoflavonas da soja (*Glycine max*) na terapêutica está relacionado ao fato destes metabólitos secundários vegetais apresentarem atividade estrogênica e antiestrogênica, atividade antioxidante e atividade inibidora de enzimas reguladoras do ciclo celular (PATEL et al., 2001; LEE, 2006; ARORA et al., 2002; CHIECHI et al., 2002). Além dessas atividades farmacológicas, a atividade antioxidante atribuída às isoflavonas impulsionou estudos relacionados à sua utilização na terapia contra vários tipos de câncer (BARNES et al., 1995), na redução do colesterol plasmático e na prevenção de doenças cardiovasculares (PATEL et al., 2001).

A genisteína tem demonstrado possuir vários efeitos, todos podem contribuir para a sua capacidade de quimioproteção contra a carcinogênese. Record e colaboradores (1995) demonstraram que a genisteína inibiu a formação de tumor induzido por peróxido de hidrogênio *in vitro* e *in vivo* na pele de ratos. Outros trabalhos também discutem o potencial antioxidante da genisteína, inibindo a proliferação de células tumorais e o crescimento de células tumorais já existentes (ESTEVES e MONTEIRO, 2001).

Isoflavonas com estrutura química similar à do 17β -estradiol, como a genisteína, contêm um anel aromático com grupo hidroxila e têm afinidade de se ligar a ambos os subtipos de receptores de estrogênio: α -receptor e β -receptor. Contudo, sua afinidade é significativamente maior por receptores β

do que por receptores α e é menor em comparação ao estradiol. Entre as isoflavonas, a genisteína apresenta a maior afinidade para se ligar a receptores de estrógeno. Diferenças entre as isoflavonas na afinidade de ligação a estes receptores são provavelmente devidas à posição exata e o número de substituintes hidroxila no anel aromático. Genisteína apresenta três grupos hidroxila, exibindo maior afinidade para se ligar a receptores de estrógeno β que a daidzeína e biochanina A, que contêm dois grupos hidroxila (SZKUDELSKA e NOGOWSKI, 2007).

Os sistemas coloidais de veiculação de fármacos, tais como lipossomas têm sido empregados na área farmacêutica, uma vez que podem compartimentalizar fármacos, modificando sua velocidade de liberação no meio biológico (OLIVEIRA, 2006).

Lipossomas ou vesículas fosfolipídicas são estruturas esféricas, fechadas, com dimensões variando entre alguns nanômetros a alguns micrômetros de diâmetro, nas quais uma ou várias membranas concêntricas, compostas por moléculas de fosfolídeos encapsulam a fase aquosa em seu interior. Devido à similaridade da estrutura entre a bicamada lipídica e a membrana celular, os lipossomas são capazes de interagir efetivamente com as células, permitindo o direcionamento do fármaco ao órgão alvo e, portanto, com menor toxicidade que o fármaco livre (FARRELL e SIRKAR, 1997; McPHAIL et al., 2000).

Vários fosfolídeos naturais ou sintéticos podem ser empregados na preparação de lipossomas, os quais, devido a sua habilidade de encapsular substâncias hidrofílicas em seu cerne aquoso, lipofílicas e anfílicas em suas bicamadas, têm sido considerados como estruturas úteis para transporte de fármacos, proteínas, agentes diagnósticos e outros, atuando desta forma como potenciais transportadores destas substâncias (LASIC e MARTIN, 1989; GREGORIADIS, 1995).

A genisteína possui baixa solubilidade em água, quando ativa na forma aglicona. Para contornar esse problema, a encapsulação da genisteína em lipossomas de fosfatidilcolina parece uma alternativa eficaz para viabilizar o transporte desta substância até seu sítio de ação no organismo.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGRWAL, A. K.; GULPA, C. M. Tuftsin-bearing liposomes in treatment of macrophage based infections. *Adv Drug Delivery Rev.* v.41, p. 135-146, 2000.

ALVES, C. P. I. Estudo e caracterização da encapsulação de isotretinoína em lipossomas unilamelares. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde UFG – UnB – UFMG, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.

ANDERSON, J.J., AMBROSE, W.W., GARNER, S.C. Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized, lactating rat model. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, New York, v.217, n.13, p.345-350, 1998.

AOKI, H.; TOTTORI, T.; SAKURAI, F.; FUJI, K.; MIYAJIMA, K. Effects of positive charge density on the liposomal surface on disposition kinetics of liposomes in rats. *Int J. Pharm*, Amsterdam, v. 156, p. 163-174, 1997.

ARORA, A.; MURALEEDHARAN, G.N.; STRASBURG, G.M. Antioxidant activities of isoflavonas and their biological metabolites in a liposomal system. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v.356, nº 2, p. 133-141, 2000.

ARORA, A.; BYREM, T.M.; MURALEEDHARAN, G.N.; STRASBURG, G.M. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v.373, nº1, p. 102-109, 2002.

BANGHAM, A. D.; HILL, M. W.; MILLER, N. G. Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. *Methods Memb. Biological*. v.1,p. 1-68, 1974.

BARNES, S., PETERSON, T.G., COWARD, L. Rationale for the use of genistein-containing soy matrices in chemoprevention trials for breast and prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, New York, v.22, p.181-185, 1995.

BARNES, S., SFAKIANOS, J., COWARD, L. Soy isoflavonoids and cancer prevention. Underlying biochemical and pharmacological issues. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, New York, v.401, p.87-100, 1996.

BATISTA, C.M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N.S.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.43 n.2, p. 167-179, 2007.

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

CEH,B.; WINTERHALTER, M.; FREDERIK, P.M.; VALLNER, J.J.; LASIC, D.D. Stealth liposomes: from theory to product. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Amsterdam, v.24, p. 165-177, 1997.

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

CHORILLI, M.; LEONARDI, G.R.; OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V. Lipossomas em formulações dermocosméticas, *Infarma*. v.16 n.7-8, p.75-79, 2004.

CITERNESI, U.; SCIACCHITANO, M. Phospholipid active ingredient complexes. *Cosm. Toil*, v.110, n.11, p. 57-68, 1995.

CLAPAUCH, R.; MEIRELLES, R.M.R.; JULIÃO, M.A.S.G.; LOUREIRO, C.K.C.; GIARODOLI, P.B.; PINHEIRO, S.A.; HARRIGAN, A.R.; SPRITZER, P.M.; PARDINI, D.P.; WEISS, R.V.; ATHAYDE,A.; RUSSO,L.A.; PÓVOA,L.C. Fitoestrógenos: posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabolgia (SBEM). *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.46, n.6, p. 679-695, 2002.

CORDECH, L.; FONOLLOSA, J.; PERA, M.; ESTELRICH, J.; MAZA, A.; PARRA, J.L. Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR: Relationship with percutaneous absorption. *Journal of Controlled Release*. Amsterdam, v.68, p. 85-95, 2000.

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

EBRAHIM, S.; PEYMAN, G.A.; LEE, P. J. Applications of liposomes in ophthalmology. *Surv Ophthalmol*. v.50, n.2, p.167-182, 2005.

EGBARIA, K.; WEINER,N. Topical application of liposomal preparations. *Cosm. Toil.*, v.106, n. 3, p. 79-93, 1991.

ESTEVEES, E.A.; MONTEIRO, J.B.R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. *Revista de Nutrição*. v. 14, nº1, p. 43-52, 2001.

FARRELL, S.; SIRKAR, K.K. Controlled release of liposomes. *Journal Membrane Science*, Amsterdam, v.127, p. 223-227, 1997.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D.A.; ROCHA, O.G.F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: Propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Química Nova*. v.28, n. 3, p. 511-518, 2005.

FRITZ, K.L.; SEPPANEN, C.M.; KURZER, M.S.; CSALLANY, A.S. The *in vivo* antioxidant activity of soybean isoflavonas 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.

GARBUZENKO, O.; BARENHOLZ, Y.; PRIEV, A. Effect of grafted PEG on liposome size and compressibility and packing of lipid bilayer. *Chem Phys Lipids*. v.135, p.117-129, 2005.

GRABIELLE-MADELMONT, C.; LESIEUR, S.; OLLIVON, M. Characterization of liposomes by size exclusion chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical methods*. Amsterdam, v. 56, p. 189-217, 2003.

GREGORIADIS, G. FLORENCE, A. T. Liposomes in drug delivery. *Drugs*. v. 45, p.15-28, 1993.

GREGORIADIS, G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Tibtech*, London, v. 13, p. 527-537, 1995.

GRUNDY, S.M. Absorption and metabolism of dietary cholesterol. *Annual Review of Nutrition*, Palo Alto, v.3, p.71-96. 1983.

GULATI, M.; GROVER, M.; SINGH, S.; SINGH, M. Lipophilic drug derivatives in liposomes. *Int. J. Pharm.* Amsterdam, v.165, p. 129-168, 1998.

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.

HODGSON, J.M.; CROFT, K.D.; PUDDEY, I.B.; MORI, T.A.; BEILIN, L.J.; Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit in vitro lipoprotein oxidation in serum. *Nutritional Biochemistry*. Nova Iorque. v.7, p. 664-669, 1996.

HUFF, M.W.; HAMILTON, R.M.G.; CARROL, K.K. Plasma cholesterol levels in rabbits fed low fat, cholesterol-free, semipurified diets: effects of dietary proteins, protein hydrolysates and amino acid mixtures. *Atherosclerosis*, Limerick, v.28, p.186-195, 1977.

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

IONASHIRO, M. *Giolito: Fundamentos da Termogravimetria / Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial*. Giz Editorial, São Paulo, 2005.

ISHIDA, H., UESUGI, T., HIRAI, K. Preventive effect of the plant isoflavones, daidzin and genistin, on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, v.21, n.1, p.62-66, 1998.

ISHIHARA, K.; TSUJINO, R.; HAMADA, M.; TOYODA, N.; IWASAKI, Y. Stabilized liposomes with phospholipid polymers and their interactions with blood cells. *Colloids and Surfaces*, Amsterdam, v. 25, p. 325-333, 2002.

KABANOV, A.V.; BATRAKOVA, E.V.; ALAKHOV, V.Y. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J Control Release*. v.82, p.189-212, 2002.

KAHN, C.R. Section on cellular and Molecular physiology. *JOSLIN Magazine*, v.11, n.3., p.17, 1998.

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.; FISCHER, 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.

KAO, T.H.; LU, Y.F.; HSIEH, H.C.; CHEN, B.H. Stability of isoflavone glucosides during processing of soymilk and tofu. *Food Research International*. v. 37, p. 891-900, 2004.

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

LAMARTINIERE, C.A., MOORE, J., HOLLAND, M. *et al.* Neonatal genistein chemopreventives mammary cancer. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, New York, v.208, n.1, p.120-123, 1995.

LASIC, D.D. The mechanism of vesicle formation. *Biochemistry J.*, London, v.256, p.1-11, 1988.

LASIC, D.D.; MARTIN, F.J. Liposome. *Farm Vestn*, Ljubljana, v.40, p.197-208, 1989.

LASIC, D.D.; WINTERHALTER, M. Liposome stability and formation: Experimental parameters and theories on the size distribution. *Chemistry and Physics Lipids*, v.64, p. 35-43, 1993.

LASIC, D.D. Novel applications of liposomes. *Tibtech*. London, v.16, p. 307-321, 1998.

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, 2004.

LEE,J.S. Effects of soy protein and genisteína on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*. South Korea. v.79, p. 1578-1584, 2006.

LESIEUR, S.; GRABIELLE-MADELMONT, C.; PATERNOSTRE, M. T.; OLLIVON, M. Study of size distribution and stability of liposomes by high performance gel exclusion chromatography. *Chem Phys Lipids*, v.64, p. 57-82, 1993.

LICHTENSTEIN, A.H. Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v.128, n.10, p.1589-1592, 1998.

LIMA, E.M. Lipossomas: Estrutura, propriedades, aplicações. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

MACHY, P.; LESERMAN, L. Piloting of drugs and biological macromolecules: approaches to therapy. In: Liposomes in cell biology and pharmacology. *Les editions Inserm*, Cheshire, p.34-97, 1987.

MATSUZAKI, K.; MURASE, O.; SUGISHITA, K.; YONEYAMA, K.A.; UEHA, M.; NAKAMURA, A.; KOBAYASHI, S. Optical characterization of liposomes by right angle light scattering and turbidity measurement. *Biochemistry Biophysical Acta.*, Amsterdam, v.1467, p. 219-226, 2000.

MAURER, N.; WONG, K. F.; HOPE, M. J.; CULLIS, P.R. Anomalous solubility behavior of the antibiotic ciprofloxacin encapsulated in liposomes: a H-NMR study. *Biochim Biophys Acta.* v. 1374, p 09-20, 1998.

McCLAIN, R.M.; WOLZ, E.; DAVIDOVICH, A.; BAUSCH, J. Genetic toxicity studies with genistein. *Food and Chemical Toxicology.* v. 44, p. 42-55, 2006.

McPHAIL, D.; TETLEY, L.; DUFES, C.; UCHEGBU, I.F. Liposomes encapsulating polymeric chitosan based vesicles a vesicles in vesicle system for delivery. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.200, p. 73-86, 2000.

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.

MOLTENI, A., BRIZIO-MOLTENI, L., PERSKY, V. *In vitro* hormonal effects of soybean isoflavones. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v.125, p.751-756, 1995.

MÜLLER, M.; MACKEBEN, S.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. Physicochemical characterization of liposomes with encapsulated local anesthetics. *Int. Journal Pharm.*, Amsterdam, v.274, p.139-148, 2004.

NAGAYASU, A.; UCHIYAMA, K.; KIWADA, H. The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews.* Amsterdam, v. 40, p. 75-87, 1999.

NESTEL, P.J., YAMASHITA, T. SASAHARA, T. Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.17, n.12, p.3392-3398, 1997.

OLIVEIRA, L.C. Ciprofloxacino encapsulado em lipossomas revestidos com ácido poliláctico co-glicólico ou veiculados em gel de copolímero de bloco 'Pluronic F127'. 2006. 130 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e

Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo, 2006.

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,.; PARKS,D.A.; BARNES,S.; DARLEY-USMAR,V. Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging. *Free Radical Biology & Medicine*.v.31, nº12, p. 1570-1581, 2001.

POTTER, S.M., PERTILE, J., BERBER-JIMENEZ, M.D. Soy protein concentrate and isolated soy protein similarly lower blood serum cholesterol but differently affect thyroid hormones in hamsters. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v.126, n.8, p.2007-2011, 1996.

POTTER, S.M., BAUM, J.A., TENG, H. Soy protein and isoflavones: Their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.68, n.6, p.1375S-1379S, 1998.

RAVINDRANATH M H; MUTHUGOUNDER S; PRESSER N; VISWANATHAN S. Anticancer therapeutic potential of soy isoflavone, genistein. *Adv Exp Med Biol*, v.546, p.121-165, 2004.

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

SAMUNI, A.M.; LIPMAN,A.; BARENHOLZ, Y. Damage to liposomal lipids: protection by antioxidants and cholesterol-mediated dehydration. *Chemistry and Physics of Lipids*. Irlanda, v.105, p. 121-134, 2000.

SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A.R.B. Lipossomas: A bala mágica acertou. *Química Nova*. v.25, n. 6B, p. 1181-1185, 2002.

SEMPLE, S.C.; CHONN, A.; CULLIS, P.R. Interactions of liposomes and lipid based carrier systems with blood proteins: relation to clearance behaviour in vivo. *Advanced Drug Delivery*. Amsterdam, v.32, p. 3-17, 1998.

SENIOR, J.H. Fate and behavior of liposomes in vivo: a review of controlling factors. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, v.2, p. 123-193, 1987.

SHARMA, A.; SHARMA, U.S.; Liposome in drug delivery: progress and limitations. *Int. J. Pharm.* Amsterdam, v. 154, p. 123-140, 1997.

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; 2ª Edição. Porto Alegre/Florianópolis, Editora da Universidade UFRGS/Editora da Universidade da UFSC, 2000.

STANCANELLI, R.; MAZZAGLIA, A.; TOMMASINI, S.; CALABRÒ, M.L.; VILLARI, V.; GUARDO, M.; FICARRA, P.; FICARRA, R. The enhancement of isoflavones water solubility by complexation with modified cyclodextrins: A spectroscopic investigation with implications in the pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.44, p.980-984, 2007.

SULKOWSKI, W.W.; PENTAK, D.; NOWAK, K.; SULKOWSKA, A. The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. *Journal of Molecular Structure*. Amsterdam, v.xx, p.1-11, 2005.

SUNAMOTO, J.; SATO, T.; HIROTA, M.; FUKUSHIMA, K.; HIRATANI, K.; HARA, K.; A newly developed immunoliposome – na egg phosphatidylcholine liposomes coated with pullulan bearing both a cholesterol moiety and an IgMs. *Biochemistry Biophysical Acta*, Amsterdam, v.898, p. 323, 1987.

SZKUDELSKA, K.; NOGOWSKI, L. Genistein – A dietary compound inducing hormonal and metabolic changes. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. SBMB 2871, p. 1-9, 2007.

SWARTZ, H.M.; BOLTON, J.R.; BORG, D.C. Biological Applications of Electron Spin Resonance, 1ª edição, New York, 1972.

TAKEUCHI, H.; YAMAMOTO, H.; TOYODA, T.; TOYOBUKU, H.; HINO, T.; KAWASHIMA, Y. Physical stability of size controlled small unilamellar liposomes coated with a modified polyvinyl alcohol. *Int. J. Pharm*, Amsterdam, v.164, p. 103-111, 1998.

TAKEUCHI, H.; KOJIMA, H.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. Polymer coating of liposomes with a modified polyvinyl alcohol and their systemic circulation and RES uptake in rats. *Journal Controlled Release*. Amsterdam, v. 68, p. 195-201, 2000.

TAPIERO, H.; NGUYEN BA, G.; TEW, K.D. Estrogens and environmental estrogens. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 56, p. 36-44, 2001.

TIKKANEN, M.J., WAHALA, K., OJALA, S. Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington DC, v.95, n.6, p.3106-3110, 1998.

TORCHILIN, .P.; Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. *Nature*, London, v.4, p. 145-160, 2005.

VEMURI, S.; RHODES, C.T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm Acta Helv.* v.70, p.95-111, 1995.

WEI, H., BOWEN, R., CAI, Q. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, New York, v.208, n.1, 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.

WHALEY, W.L.; RUMMEL, J.D.; KASTRAPELI,N. Interactions of genistein and related isoflavonas with lipid micelles. *Langmuir*, v. 22, p. 7175-7184, 2006.

WILLIAMS, J.P., JORDAN, S.E., BARNES, S. Tyrosine kinase inhibitor effects on osteoclastic acid transport. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.68, n.6, p.1369S-1374S, 1998.

WOODLE, M.C.; LASIC, D.D. Sterically stabilized liposomes *Biochemistry Biophysical Acta*, Amsterdam, v.1113, p. 171, 1992.

XAVIER, C.R. Associação da isoflavona genisteína com β -ciclodextrina: avaliação da penetração cutânea. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ZAVA, D.T., DUWE, G. Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro. *Nutrition and Cancer*, Hillsdale,v.27, n.1, p.31-40, 1997.

ZHANG,H.; WANG,L.; SUN,Y. Why B-ring is the active center for genistein to scavenge peroxy radical: a DFT study. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v.13, p. 909-911, 2002.

ZULLI,F.; SCHIMID,D.; NISSEN,H.; PRIER,H. Penetration and metabolism of isoflavones in human skin. *Cosmetics and Toiletries*,v.118, n° 9, p. 71-76, 2003.