

Ana Lúcia Teixeira de Carvalho Zampieri

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
PERMEAÇÃO CUTÂNEA DA ISOFLAVONA GENISTEÍNA EM
NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS**

Orientadora:

Profa. Dra. Eliana Martins Lima

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás como exigência à obtenção do título de Doutor.

Goiânia

2009

ANA LÚCIA TEIXEIRA DE CARVALHO ZAMPIERI

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
PERMEAÇÃO CUTÂNEA DA ISOFLAVONA GENISTEÍNA EM
NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS**

Tese defendida no Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás como exigência para obtenção do título de Doutor, aprovada em 16/12/2009, pela banca examinadora constituída pelos seguintes membros:

Profa Dra Eliana Martins Lima-UFG

Presidente

Profa Dra Maria Vitória Lopes Badra Bentley-USP

2º Membro

Profa. Dra. Marize Campos Valadares-UFG

3º Membro

Profa. Dra. Maria Tereza Freitas Bara-UFG

4º Membro

Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto-UFG

5º Membro

Goiânia, 2009.

Dedico este trabalho,

A Jesus Cristo, Meu Senhor e Salvador!

*A meus pais, **Divino e Elci,**
que com ternura e constância se desdobraram
em esforços possibilitando minha realização
profissional!*

*A meu marido **Henrique,**
que sempre me incentivou, compreendeu minha ausência,
me ofereceu consolo nas situações mais difíceis,
enfim , que com amor e companheirismo
me apoiou em todos os momentos!*

*A minha família, pelo apoio incondicional,
sem eles o cumprimento dessa etapa
não seria possível!*

A todas as pessoas que amo!

AGRADECIMENTOS

- À minha orientadora, Profa Dra Eliana Martins Lima, pela oportunidade e confiança, em mim depositadas.
- Ao Coordenador do curso de pós-graduação em Ciências da Saúde, Prof. Dr. Celmo Celeno Porto pelas orientações.
- À Profa Dra Marize Campos Valadares pelas idéias, sugestões e disposição em me atender.
- À Profa Dra Danielle Diniz pelas sugestões no desenvolvimento desse trabalho.
- À Profa Dra Ieda Sapateiro pelas sugestões, trocas de idéias e conversas que tanto contribuíram para a concretização desse trabalho.
- À Profa Dra Patrícia Pommé Confessori Sartoratto e doutoranda Michelly Patrícia Santana de Almeida do Laboratório de Materiais do Instituto de Química da UFG pelo auxílio na realização dos testes de potencial zeta.
- À Profa Dra Suzana da Costa Santos do Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da UFG pelo auxílio referente ao teste de liofilização.
- À Diretora e Coordenadora do curso de Farmácia da UniEvangélica, Prof^a Dr^a Dulcinea Campos e Prof^a Dra. Gisner Pereira pela amizade e apoio.
- Aos amigos e colegas da UniEvangélica, Prof^a Ms. Francine Pazini, Prof^a Ms. Waleska Morgado, Profa. Ana Paula Montandon, Dona Edilma, Kédima e Adriano pelo incentivo e amizade.
- Aos meus orientandos, em especial Claudieny, Mirelle, Rose, Lourenço e Érica, que compartilharam comigo momentos importantes, sempre demonstrando cuidado, carinho e dedicação.
- Aos meus alunos do curso de Farmácia da UniEvangélica pela amizade, incentivo e carinho.
- Em especial a Mariana, Érica, Marilisa e Fabrícia pelas longas conversas, trocas de idéias, disposição em ajudar, amizade e companheirismo na rotina do Laboratório.
- Ao amigo Marco Júnior pela amizade e auxílio nas correções do inglês.

- Aos amigos do Farmatec, Rodinelli, Mariana, Érica, Marilisa, Fabrícia, Etyene, Dione, Érica, Maísa, Luciano, César, Leonardo, Flávia, Stella, Marco Júnior, Fernanda Maura, Fernanda Steiger, Lidiane, Patrícia, Marcelo e Ricardo, pela amizade e carinho.
- À Fernanda Maura, Amélia, Sílvia e Dona Laci que cuidando tão bem do Laboratório e de todos nós, transformaram-no em nossa segunda casa.
- Aos colegas e amigos dos laboratórios vizinhos pelo companheirismo, pelos auxílios, pelos momentos de descontração.
- A Valdecina e Raquel, secretárias da pós-graduação, pelos serviços prestados, gentileza, amizade e dedicação.
- Aos amigos e colegas de doutorado Rodinelli, Fatinha, Elisa, Cláudia Zanini e Kênia Jesus pela amizade e companheirismo.
- Aos meus irmãos, Prof. Ms. Sérgio Teixeira de Carvalho e Prof. Sandro Teixeira de Carvalho, pelas conversas, trocas de idéias e apoio durante toda minha jornada.
- Aos meus sogros que sempre me apoiaram compreendendo minha ausência e principalmente a demora na chegada do netinho.
- Às cunhadas, cunhado e sobrinhos, que sempre me apoiaram.
- Às amigas de sempre, Vanessa e Marinês que mesmo de longe torceram e oraram por mim.
- Às amigas Lúcia, Linda e Cida pelo carinho e apoio diários.
- Ao CNPq, CAPES e FINEP pelo auxílio financeiro.
- Enfim, a todos que de alguma forma colaboraram para a realização desse trabalho, os mais sinceros agradecimentos.

*Eu te amo, ó Senhor, força minha.
O Senhor é a minha rocha, a minha cidadela, o meu libertador;
o meu Deus, o meu rochedo em que me refugio;
o meu escudo, a força da minha salvação, o meu baluarte.*

Salmo 18: 1-2

A Idade de Ser Feliz

Existe somente uma idade para a gente ser feliz, somente uma época na vida de cada pessoa em que é possível sonhar e fazer planos e ter energia bastante para realizá-las a despeito de todas as dificuldades e obstáculos.

Uma só idade para a gente se encantar com a vida e viver apaixonadamente e desfrutar tudo com toda intensidade sem medo, nem culpa de sentir prazer.

Fase dourada em que a gente pode criar e recriar a vida, a nossa própria imagem e semelhança e vestir-se com todas as cores e experimentar todos os sabores e entregar-se a todos os amores sem preconceito nem pudor.

Tempo de entusiasmo e coragem em que todo o desafio é mais um convite à luta que a gente enfrenta com toda disposição de tentar algo NOVO, de NOVO e de NOVO, e quantas vezes for preciso.

Essa idade tão fugaz na vida da gente chama-se PRESENTE e tem a duração do instante que passa.

Mario Quintana

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1. ESTRUTURA DA PELE	24
2.2. PELE COMO VIA PARA LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS: PENETRAÇÃO E ABSORÇÃO CUTÂNEA	26
2.3. PROMOÇÃO DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS	29
2.4. AVALIAÇÃO BIOFARMACÊUTICA DE FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS	33
2.4.1. Liberação in vitro.....	34
2.5. NANOTECNOLOGIA E LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS	37
2.6. NANOPÁRTICULAS POLIMÉRICAS	38
2.6.1. Métodos de preparo.....	41
2.6.2. Estabilidade de nanopartículas poliméricas.....	45
2.7. METODOLOGIAS EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE SISTEMAS POLIMÉRICOS.....	45
2.7.1. Avaliação morfológica	45
2.7.2. Tamanho e distribuição do tamanho das partículas.....	47
2.7.3. Espalhamento de luz (Dynamic Light Scattering).....	47
2.7.4. Espalhamento de nêutrons a baixos ângulos (SANS).....	49
2.7.5. Composição quali-quantitativa	50
2.7.6. pH.....	56
2.7.7. Potencial zeta.....	57
2.7.8. Calorimetria exploratória diferencial	58
2.7.9. Determinação da eficiência de encapsulação ou taxa de associação do fármaco	59
2.7.10. Cinética de Liberação in vitro do fármaco.....	62
2.7.11. Liofilização de nanopartículas.....	64
2.8. APLICAÇÃO TÓPICA DE NANOCARREADORES.....	65
2.9. FITOESTRÓGENOS	68
2.9.1. Mecanismo de ação	71
2.9.2. Atividades biológicas.....	71
2.9.3. Genisteína	73
2.9.3.1. Características físico-químicas.....	73
2.9.3.2. Propriedade antienvhecimento e quimiopreventivo	73
2.9.3.3. Permeação cutânea de genisteína	77
3. OBJETIVOS	79
3.1. OBJETIVO GERAL	79
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	79
4. METODOLOGIA	81
4.1. TIPO DE ESTUDO.....	81
4.2. LOCAL DA PESQUISA.....	81
4.3. MATERIAL.....	81
4.3.1. Equipamentos	81
4.3.2. Substâncias e reagentes.....	82
4.3.3. Vidrarias e utensílios diversos	82
4.3.4. Substância teste	83
4.4. MÉTODOS	83
4.4.1. Método analítico para quantificação de genisteína	85
4.4.1.1. Linearidade.....	85
4.4.1.2. Seletividade	86
4.4.1.3. Precisão	86
4.4.1.4. Exatidão.....	86
4.4.1.5. Limite de detecção	87
4.4.1.6. Limite de quantificação	87
4.4.2. Estudo da estabilidade do fármaco genisteína	88

4.4.3. Método de preparação das nanocápsulas	89
4.4.4. Incorporação de genisteína nas nanocápsulas	90
4.4.5. Caracterização e estabilidade das nanocápsulas brancas e contendo genisteína	92
4.4.6. Determinação da eficiência de encapsulação da genisteína em nanocápsulas de PLA	96
4.4.6.1. Rompimento das nanocápsulas e precipitação do polímero:	96
4.4.6.2. Separação do fármaco livre e encapsulado	96
4.4.7. Preparação das formas farmacêuticas semi-sólidas: Gel e Emulsão	100
4.4.7.1. Extração da genisteína contida nas formas farmacêuticas.....	101
4.4.8. Avaliação do perfil de permeação cutânea da genisteína a partir das formulações desenvolvidas	101
4.4.8.1. Estudo da permeação cutânea <i>in vitro</i> da genisteína a partir das formulações desenvolvidas	102
4.4.8.2. Solubilidade da genisteína no meio receptor	103
4.4.8.3. Pele Animal.....	105
4.4.8.4. Avaliação do perfil de penetração intrínseco da genisteína	105
4.4.8.5. Cinética de liberação da genisteína a partir das formulações desenvolvidas.....	105
4.4.8.6. Determinação da quantidade de genisteína retida na pele, na forma farmacêutica e taxa de recuperação	106
4.4.8.7. Liberação <i>in vitro</i> através de membrana sintética	107
4.4.9. Análise Estatística	108
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.1. MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE GENISTEÍNA	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.1.1. Linearidade	Erro! Indicador não definido.
5.1.2. Seletividade.....	110
5.1.3. Precisão	Erro! Indicador não definido.
5.1.4. Exatidão	Erro! Indicador não definido.
5.1.5. Limites de detecção e quantificação	Erro! Indicador não definido.
5.2. ESTUDO DA ESTABILIDADE DO FÁRMACO GENISTEÍNA	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.3. PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.3.1. Caracterização das nanocápsulas brancas	Erro! Indicador não definido.
5.3.2. Caracterização das nanocápsulas contendo genisteína	Erro! Indicador não definido.
5.3.2.2. Aspecto, tamanho e distribuição de tamanho das partículas	Erro! Indicador não definido.
5.3.2.3. Resistência a centrifugação e pH.....	Erro! Indicador não definido.
5.3.3. Determinação da eficiência de encapsulação da genisteína em nanocápsulas de PLA	Erro! Indicador não definido.
5.3.3.1. Rompimento das nanocápsulas e precipitação do polímero.....	Erro! Indicador não definido.
5.3.3.2. Separação do fármaco livre e encapsulado	Erro! Indicador não definido.
5.3.3.3. Eficiência de encapsulação	Erro! Indicador não definido.
5.3.4. Estabilidade das nanocápsulas contendo 2,0mg de genisteína.....	Erro! Indicador não definido.
5.3.4.1. Aspecto, tamanho e distribuição de tamanho das partículas	Erro! Indicador não definido.
5.3.4.2. Resistência à centrifugação e pH das dispersões	Erro! Indicador não definido.
5.3.4.3. Potencial zeta	Erro! Indicador não definido.
5.3.4.4. Calorimetria Exploratória Diferencial	Erro! Indicador não definido.
5.3.4.5. Estabilidade das nanocápsulas frente a variações de pH	Erro! Indicador não definido.
5.3.4.6. Resistência a ciclos de congelamento e descongelamento	Erro! Indicador não definido.
5.3.4.7. Conteúdo de fármaco encapsulado.....	Erro! Indicador não definido.
5.3.4.8. Perda de fármaco encapsulado (vazamento) durante o armazenamento	Erro! Indicador não definido.
5.3.5. Preparação das formas farmacêuticas semi-sólidas: gel e emulsão.....	Erro! Indicador não definido.
5.3.6. Avaliação do perfil de penetração cutânea da genisteína e das formulações desenvolvidas	Erro! Indicador não definido.
5.3.6.1. Solubilidade da genisteína no meio receptor	Erro! Indicador não definido.
5.3.6.2. Avaliação do perfil de penetração intrínseco da genisteína.....	Erro! Indicador não definido.
5.3.6.3. Estudo da permeação cutânea <i>in vitro</i> da genisteína a partir das formulações desenvolvidas.....	161
5.3.6.4. Cinética de liberação da genisteína a partir das formulações desenvolvidas...	Erro! Indicador não definido.
Legenda: t: estatística do teste, GL: graus de liberdade, p: nível de significância (0,05).	Erro! Indicador não definido.
5.3.6.5. Determinação da quantidade de genisteína retida na pele e forma farmacêutica	Erro! Indicador não definido.
5.3.6.6. Liberação <i>in vitro</i> através de membrana sintética	Erro! Indicador não definido.
6. CONCLUSÕES	192
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	192

LISTA DE TABELAS

TABELA 01- PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DO ENSAIO DE EXATIDÃO REFERENTE AO MÉTODO PROPOSTO PARA ANÁLISE DE GENISTEÍNA POR HPLC.....87

TABELA 02- FORMULAÇÕES DE NANOCÁPSULAS BRANCAS E CONTENDO GENISTEÍNA OBTIDAS DURANTE A FASE DE PREPARAÇÃO DA DISPERSÃO DE NANOCÁPSULAS.....91

TABELA 03- DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DA GENISTEÍNA EM DIFERENTES PROPORÇÕES DE SOLUÇÃO FISIOLÓGICA E METANOL.....104

TABELA 04 - INTRA-CORRIDA OU REPETIBILIDADE PARA ANÁLISE DE GENISTEÍNA POR HPLC.....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

TABELA 05- INTER-CORRIDA OU PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA ANÁLISE DE GENISTEÍNA POR HPLC.....111

TABELA 06- EXATIDÃO DA ANÁLISE DE GENISTEÍNA POR HPLC.....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

TABELA 07- INTERVALO DE CONFIANÇA DAS MÉDIAS (95%) DAS VARREDURAS E ABSORBÂNCIAS DE GENISTEÍNA CONTIDAS EM SOLUÇÕES METANÓLICAS PH 3,0 E 8,0 APÓS EXPOSIÇÃO EM DIFERENTES AMBIENTES (LUMINOSIDADE, REFRIGERAÇÃO E AQUECIMENTO) ANALISADAS NOS SEGUINTE INTERVALOS DE TEMPO DE EXPOSIÇÃO: 0, 15MIN, 30MIN, 1H, 2H, 4H, 6H, 24H, 48H E 07 DIAS.....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

TABELA 08- INTERVALO DE CONFIANÇA DAS MÉDIAS (95%) DAS CONCENTRAÇÕES DE GENISTEÍNA CONTIDAS EM SOLUÇÕES METANÓLICAS PH 3,0 E 8,0 APÓS EXPOSIÇÃO EM DIFERENTES AMBIENTES (LUMINOSIDADE, REFRIGERAÇÃO E AQUECIMENTO) ANALISADAS NOS SEGUINTE INTERVALOS DE TEMPO DE EXPOSIÇÃO: 0, 15MIN, 30MIN, 1H, 2H, 4H, 6H, 24H, 48H E 07 DIASERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

TABELA 09 - CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS BRANCAS DE PLA PREPARADAS A PARTIR DE DIFERENTES TENSOATIVOS, APÓS 24 HORAS 113

TABELA 10- CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DE NANOCÁPSULAS DE PLA CONTENDO GENISTEÍNA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES APÓS 24 HORAS (T1), 15 DIAS (T2) E 30 DIAS (T3) DE ARMAZENAMENTO A 4±1°C.....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

TABELA 11 - FORMAÇÃO DO BOTÃO DE POLÍMERO PRECIPITADO E RESOLUÇÃO DE PICO CROMATOGRÁFICO DE ACORDO COM OS SOLVENTES UTILIZADOS (METANOL E ETANOL) A PARTIR DA PROPORÇÃO ENTRE NANOCÁPSULAS E SOLVENTE.....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

TABELA 12- SEPARAÇÃO DA GENISTEÍNA LIVRE E ENCAPSULADA EM NANOCÁPSULAS PELO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO. CONDIÇÕES DO TESTE: COLUNA CROMATOGRÁFICA 1 (30,0CM DE ALTURA X 0,70CM DE DIÂMETRO INTERNO); VOLUME DE NANOCÁPSULAS APLICADAS NA COLUNA (0,3ML); VOLUME DAS FRAÇÕES COLETADAS (0,3ML) E NÚMERO DE FRAÇÕES COLETADAS (50)...128

TABELA 13 - SEPARAÇÃO DO FÁRMACO ENCAPSULADO E LIVRE DE NANOCÁPSULAS CONTENDO GENISTEÍNA POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO. CONDIÇÕES DO TESTE: COLUNA 2 (25,0CM DE ALTURA X 1,50CM DE DIÂMETRO INTERNO); VOLUMES DE NANOCÁPSULAS APLICADAS NA COLUNA (0,3ML, 0,5ML, 1,0ML); VOLUME DAS FRAÇÕES COLETADAS (1,0ML, 2,0ML E 2,5ML) E NÚMERO DE FRAÇÕES COLETADAS (60, 80).....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

TABELA 14 - CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS PREPARADAS A PARTIR DE 2,0MG DE GENISTEÍNA. PARÂMETROS: ASPECTO (MACROSCÓPICO), TAMANHO (DIÂMETRO) E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DA

PARTÍCULA (PDI), RESISTÊNCIA À CENTRIFUGAÇÃO, PH E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO. TESTE REALIZADO APÓS 24 HORAS (T1), APÓS 07 (T2), 15 (T3), 30 DIAS (T4) E 90 DIAS (T5) DE ARMAZENAMENTO.....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

TABELA 15- POTENCIAL ZETA DE NANOCÁPSULAS BRANCAS, CONTENDO 2,0MG DE GENISTEÍNA E GENISTEÍNA LIVRE (N=3).....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

TABELA 16- ANOVA SIMPLES (DADOS LOGARITMIZADOS NA BASE 10) COMPARATIVO DOS POTENCIAIS ZETA DE NANOCÁPSULAS BRANCAS, CONTENDO 2,0MG DE GENISTEÍNA E GENISTEÍNA LIVRE.....142 ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

TABELA 17 - CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS PREPARADAS A PARTIR DE 2,0MG DE GENISTEÍNA COM VOLUME FINAL DE 3,0 E 10,0ML. PARÂMETROS: ASPECTO (MACROSCÓPICO), TAMANHO (DIÂMETRO) E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DA PARTÍCULA (PDI), PH E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO. TESTE REALIZADO APÓS 24 HORAS (T1) DE ARMAZENAMENTO EM GELADEIRA (4º ±1ºC).....144

TABELA 18- ANCOVA COM CO-VARIÁVEL CONTROLADA (PH), COMPARATIVA DA CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS PREPARADAS A PARTIR DE 2,0MG DE GENISTEÍNA COM VOLUME FINAL DE 3,0 E 10,0ML (A: PDI; B: DIÂMETRO MÉDIO E C: EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO).....155

TABELA 19 QUANTIDADES DE GENISTEÍNA (µG) CONTIDAS EM CADA 0,3G DAS BASES (GEL E EMULSÃO) PREPARADAS A PARTIR DE NANOCÁPSULAS DE GENISTEÍNA (100µG/0,3G) E GENISTEÍNA LIVRE (100µG/0,3G) QUANTIFICADAS POR HPLC (N=3).....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

TABELA 20- CONCENTRAÇÃO DE GENISTEÍNA ACUMULADA NAS CÉLULAS DE FRANZ NORMALIZADAS PELA ÁREA DE DIFUSÃO E DESVIOS PADRÃO DE 04 CÉLULAS, REFERENTES À PERMEAÇÃO INTRÍNSECA DA GENISTEÍNA EM 24 HORAS.....157

TABELA 21- CONCENTRAÇÃO DE GENISTEÍNA ACUMULADA NAS CÉLULAS DE FRANZ NORMALIZADA PELA ÁREA DE DIFUSÃO, DESVIOS PADRÃO DE 04 CÉLULAS E TEMPO LAG PARA AS FORMAS FARMACÊUTICAS GEL (A: CONTENDO GENISTEÍNA LIVRE OU NANOCÁPSULAS DE GENISTEÍNA) E EMULSÃO (B: CONTENDO GENISTEÍNA LIVRE OU NANOCÁPSULAS DE GENISTEÍNA).....159

TABELA 22- ANCOVA MULTIFATORIAL, DAS QUANTIDADES PERMEADAS DE GENISTEÍNA (µG/CM²) EM FUNÇÃO DO TEMPO, PARA AS FORMAS FARMACÊUTICAS GEL E EMULSÃO, NA PRESENÇA DE GENISTEÍNA NANOENCAPSULADA OU LIVRE.....164

TABELA 23- ANÁLISE DE COMPARAÇÃO PLANEJADA (CONTRASTE) BASEADA NOS DADOS DO TESTE T COMPARATIVO DA GENISTEÍNA ACUMULADA NA SOLUÇÃO RECEPTORA (µG/CM²) APÓS 24 HORAS DE PERMEAÇÃO *IN VITRO* EM ORELHA DE SUÍNO, A PARTIR DA FORMA (LIVRE OU NANOENCAPSULADA) E FORMA FARMACÊUTICA (GEL OU EMULSÃO) (COM SIGNIFICÂNCIA AFERIDA POR MONTE CARLO).....166

TABELA 24- PARÂMETROS CINÉTICOS DAS CURVAS DE PERMEAÇÃO *IN VITRO*, A PARTIR DE PELE DE ORELHA DE SUÍNO, DA GENISTEÍNA LIVRE E NANOENCAPSULADA INCORPORADAS NO GEL DE HPMC E EMULSÃO IÔNICA.....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

TABELA 25- TESTE T DOS PARÂMETROS CINÉTICOS (FLUXO E LAG TIME) DAS CURVAS DE PERMEAÇÃO *IN VITRO* DA GENISTEÍNA NANOENCAPSULADA INCORPORADAS NO GEL DE HPMC E EMULSÃO NÃO IÔNICA.ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

TABELA 26- MASSAS DE GENISTEÍNA NA PELE SUÍNA EM 1,50CM² DE ÁREA APÓS 24 HORAS DE CONTATO COM AS FORMULAÇÕES172

TABELA 27- ANÁLISE DE COMPARAÇÃO PLANEJADA (CONTRASTE) BASEADA NOS DADOS DOTESTE T COMPARATIVO DA GENISTEÍNA RETIDA NA PELE DE ORELHA DE SUÍNO (µG/1,5CM²) APÓS 24 HORAS DE

PERMEAÇÃO *IN VITRO*, DA FORMA (LIVRE OU NANOENCAPSULADA) E FORMA FARMACÊUTICA (GEL OU EMULSÃO) (COM SIGNIFICÂNCIA AFERIDA POR MONTE CARLO).....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

TABELA 28- ANÁLISE DE COMPARAÇÃO PLANEJADA (CONTRASTE) BASEADA NOS DADOS DO TESTE T COMPARATIVO DA GENISTEÍNA REMANESCENTE NA FORMA FARMACÊUTICA MAIS LAVAGEM ($\mu\text{G}/0,3\text{G}$) APÓS 24 HORAS DE PERMEAÇÃO *IN VITRO* EM PELE DE ORELHA DE SUÍNO, DA FORMA LIVRE E NANOENCAPSULADA E FORMA FARMACÊUTICA GEL E EMULSÃO (COM SIGNIFICÂNCIA AFERIDA POR MONTE CARLO)..... ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

TABELA 29- CONCENTRAÇÃO DE GENISTEÍNA ACUMULADA NAS CÉLULAS DE *FRANZ* NORMALIZADAS PELA ÁREA DE DIFUSÃO E DESVIOS PADRÃO DE 04 CÉLULAS, REFERENTES À LIBERAÇÃO DA GENISTEÍNA EM FUNÇÃO DA RAIZ QUADRADA DO TEMPO ($\sqrt{\text{HORAS}}$) EM 24 HORAS.ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

TABELA 30- ANCOVA DAS QUANTIDADES PERMEADAS DE GENISTEÍNA NANOENCAPSULADA EM FUNÇÃO DO TEMPO, PARA MEMBRANA SINTÉTICA E PELE SUÍNA ($\mu\text{G}/\text{CM}^2$) (TESTADA PELO MÉTODO DE MONTE CARLO).....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

TABELA 31- TESTE T COMPARATIVO DA LIBERAÇÃO DE GENISTEÍNA NANOENCAPSULADA A PARTIR DE PELE DE ORELHA DE SUÍNO E MEMBRANA SINTÉTICA ($\mu\text{G}/1,5\text{CM}^2$) (COM SIGNIFICÂNCIA AFERIDA POR MONTE CARLO).185

TABELA 32- PARÂMETROS CINÉTICOS DAS CURVAS DE PERMEAÇÃO *IN VITRO* DA GENISTEÍNA NANOENCAPSULADA INCORPORADAS NO GEL DE HPMC A PARTIR DE MEMBRANA SINTÉTICA DE PTEF186

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01- ESQUEMA ILUSTRATIVO DA ESTRUTURA DA PELE.....	24
FIGURA 02- ESQUEMAS DA ESTRUTURA DA EPIDERME. A) HISTOLOGIA CELULAR E B) ESQUEMA ILUSTRATIVO..	25
FIGURA 03- ROTAS DE PENETRAÇÃO DE FÁRMACOS ATRAVÉS DO ESTRATO CÓRNEO.....	27
FIGURA 04- ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS LOCAIS DE AÇÃO DOS PROMOTORES DE PERMEACÃO E REDUÇÃO DAS ENERGIAS DE INTERAÇÃO DOS LÍPIDIOS INTERCELULARES DO EXTRATO CÓRNEO.....	31
FIGURA 05- CÉLULAS DE DIFUSÃO DE <i>FRANZ</i>	35
FIGURA 06 – A: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE NANOESFERAS (A1) (SISTEMA DE MATRIZ) E NANOCÁPSULAS (A2) (SISTEMA DE RESERVATÓRIO); B: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE NANOESFERAS DE POLI (ÁCIDO LÁTICO-CO-GLICÓLICO) CONTENDO XANTONA (B1) E 3-METOXIXANTONA (B2) (ESCALA: 150NM); C: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE NANOCÁPSULAS DE POLI (ÁCIDO LÁTICO) COM MEMBRANA POLIMÉRICA ESTIMADA A 10 NM. ÁREA DO NÚCLEO ESTIMADO EM 125NM (C1) E 115NM (C2).	39
FIGURA 07 – MORFOLOGIA DE NANOCÁPSULAS DE POLI (ÁCIDO LÁTICO-CO-GLICÓLICO) OBTIDA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO COM CONTRASTAÇÃO NEGATIVA.....	46
FIGURA 08 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (A) E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (B) DE NANOCÁPSULAS CONTENDO CARBONO APÓS PURIFICAÇÃO MAGNÉTICA.	47
FIGURA 09 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA E ESQUEMA SIMPLIFICADO DO MODELO DE NANOCÁPSULAS PREPARADAS A PARTIR DE MYGLIOL [®] , PLA E POLOXAMER 188 [®] ..	55
FIGURA 10- TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO UTILIZADA NA SEPARAÇÃO DE FÁRMACO LIVRE E ENCAPSULADO EM NANOCÁPSULAS..	61
FIGURA 11- VISUALIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL ELÁSTICA CONTENDO MELATONINA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (X 10.000; BAR: 200NM).	66
FIGURA 12- MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE CLOREXIDINA ENCAPSULADA EM NANOCÁPSULAS (NCS) LOCALIZADAS NO ESTRATO CÓRNEO (SC) TRATADO POR NANOCLOREX [®] APÓS 30 MINUTOS E ASSOCIADAS AO ESTRATO CÓRNEO E BACTÉRIA (BC) (X 12,000, BAR: 1µM).....	67
FIGURA 13- ESTRUTURAS QUÍMICAS DE ISOFLAVONAS..	70
FIGURA 14- ESTRUTURA QUÍMICA DO 17 B-ESTRADIOL.	71
FIGURA 15- ESTRUTURA QUÍMICA DA GENISTEÍNA.....	83
FIGURA 16 - ESQUEMA EXPERIMENTAL DO DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA PERMEACÃO CUTÂNEA DA ISOFLAVONA GENISTEÍNA EM NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS.....	84
FIGURA 17- CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA – HPLC, MARCA VARIAN, MODELO PRO-STAR 240.....	85
FIGURA 18- CÂMARA ESCURA ULTRA VIOLETA, MARCA TECNAL, MODELO TE-540 365NM (A) E BANHO-MARIA MARCA FISATOM, MODELO 552 (B).	89
FIGURA 19- PREPARAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE PLA PELO MÉTODO DE DEPOSIÇÃO INTERFACIAL DO POLÍMERO PRÉ-FORMADO (NANOPRECIPITAÇÃO). A=FASE OLEOSA GOTEJADA SOBRE O MEIO AQUOSO; B E C=EVAPORAÇÃO SOB PRESSÃO REDUZIDA EM EVAPORADOR ROTATÓRIO.	90
FIGURA 20- EQUIPAMENTO ZETASIZER NANO, MARCA MALVERN INSTRUMENTS, UK, MODELO ZEN1600.	94
FIGURA 21- CENTRÍFUGA, MARCA SIGMA, MODELO 3-18 K.	94

FIGURA 22 - COLUNAS CROMATOGRÁFICAS DE VIDRO APRESENTANDO 30,0CM DE ALTURA X 0,70CM DE DIÂMETRO INTERNO (COLUNA 1) E 25,0CM DE ALTURA X 1,50CM DE DE DIÂMETRO INTERNO (COLUNA 2) EMPACOTADAS COM GEL DE SEPHADEX TIPO G-50 FINE.....	97
FIGURA 23- FRAÇÕES DE NANOCÁPSULAS COLETADAS APÓS ELUIÇÃO EM COLUNA CROMATOGRÁFICA DE VIDRO EMPACOTADA COM GEL DE SEPHADEX TIPO G-50 FINE.....	98
FIGURA 24- PARTE SUPERIOR DA CÉLULA DE FRANZ, CONTENDO ANEL DE TEFLON BRANCO, DISCO DE ACRÍLICO E ANEL METÁLICO PARA SELAGEM (A) E CÉLULA SELADA COM AUXÍLIO DE GARRA METÁLICA (B)..	102
FIGURA 25 - SISTEMA DE AMOSTRAGEM DA CÉLULA DE FRANZ.	103
FIGURA 26 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO FÁRMACO GENISTEÍNA OBTIDO POR HPLC. FASE MÓVEL: ACETONITRILA:ÁGUA PURIFICADA (47:53) ACIDIFICADAS COM ÁCIDO ACÉTICO (PH 3,0), FLUXO 1,3ML/MIN', COLUNA C18 250X4MM, COM DETECÇÃO NO ULTRAVIOLETA (270NM).ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	
FIGURA 27 – CURVA PADRÃO DE GENISTEÍNA OBTIDA POR HPLC. COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (R)= 0,9999; Y= 2,3939X + 0,6938.	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 28- ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV DO FÁRMACO GENISTEÍNA CONTIDO EM SOLUÇÕES METANÓLICAS PH 3,0 APÓS EXPOSIÇÃO EM DIFERENTES AMBIENTES (A: LUMINOSIDADE, B: REFRIGERAÇÃO E C: AQUECIMENTO) ANALISADAS NOS SEGUINTE INTERVALOS DE TEMPO DE EXPOSIÇÃO: 0, 15MIN, 30MIN, 1H, 2H, 4H, 6H, 24H, 48H E 07 DIAS.	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 29-ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV DO FÁRMACO GENISTEÍNA CONTIDO EM SOLUÇÕES METANÓLICAS PH 8,0 APÓS EXPOSIÇÃO EM DIFERENTES AMBIENTES (A: LUMINOSIDADE, B: REFRIGERAÇÃO E C: AQUECIMENTO) ANALISADAS NOS SEGUINTE INTERVALOS DE TEMPO DE EXPOSIÇÃO: 0, 15MIN, 30MIN, 1H, 2H, 4H, 6H, 24H, 48H E 07 DIAS.	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 30- TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS NANOCÁPSULAS BRANCAS PREPARADAS A PARTIR DE DIFERENTES TENSOATIVOS APÓS 24 HORAS DE PREPARAÇÃO: TRITON® X100, TWEEN® 20' TWEEN® 80'	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 31 – IMAGEM POR MICROSCOPIA ÓPTICA DE CRISTALIZADOS EM FORMA DE AGULHA PRESENTES EM NANOCÁPSULAS CONTENDO GENISTEÍNA, PREPARADAS A PARTIR DE TAMPÃO FOSFATO PH 7,4 (FASE EXTERNA), APÓS 07 DIAS DE ARMAZENAMENTO (AUMENTO: 40X).....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 32 – TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GENISTEÍNA AVALIADAS APÓS 24 HORAS DE ARMAZENAMENTO: 3,0MG, 4,0MG, 5,0MG E 10,0MG.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 33 - TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GENISTEÍNA AVALIADAS APÓS 15 DIAS DE ARMAZENAMENTO: 3,0MG, 4,0MG, 5,0MG E 10,0MG.	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 34 - TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GENISTEÍNA AVALIADAS APÓS 30 DIAS DE ARMAZENAMENTO: 3,0MG, 4,0MG, 5,0MG E 10,0MG.	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 35 - TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS NANOCÁPSULAS BRANCAS E CONTENDO 3,0MG, 4,0MG, 5,0MG E 10,0MG DE GENISTEÍNA APÓS 24 HORAS DE ARMAZENAMENTO . ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	
FIGURA 36 - FORMAÇÃO DO BOTÃO DE POLÍMERO PRECIPITADO A PARTIR DO SOLVENTE METANOL NAS PROPORÇÕES DE 1:1 A 1:5 ENTRE NANOCÁPSULAS E SOLVENTE (1=SOBRENADANTE + PRECIPITADO; 2=SOBRENADANTE).	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 37 - PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO GENISTEÍNA EM COLUNA DE SEPHADEX G-50 (COLUNA 1: 30,0CM DE ALTURA X 0,70CM DE DIÂMETRO INTERNO) DETERMINADO POR HPLC, A PARTIR DOS PARÂMETROS ELEITOS PARA O TESTE (CONCENTRAÇÃO DE FÁRMACO USADO NO PREPARO DAS AMOSTRAS; VOLUME DE NANOCÁPSULAS APLICADO NA COLUNA E VOLUME DE FRAÇÃO COLETADO).	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

FIGURA 38 - PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO GENISTEÍNA EM COLUNA DE SEPHADEX G-50 (COLUNA 2: 25,0CM DE ALTURA X 1,50CM DE DE DIÂMETRO INTERNO) DETERMINADO POR HPLC, A PARTIR DOS PARÂMETROS ELEITOS PARA O TESTE (5,0MG DE FÁRMACO USADO NO PREPARO DAS AMOSTRAS; 0,3ML DE NANOCÁPSULAS APLICADO NA COLUNA E 1,0ML DE FRAÇÃO COLETADA).131

FIGURA 39 - PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO GENISTEÍNA EM COLUNA DE SEPHADEX G-50 (COLUNA 2: 25,0CM DE ALTURA X 1,50CM DE DE DIÂMETRO INTERNO) DETERMINADO POR HPLC, A PARTIR DOS PARÂMETROS ELEITOS PARA O TESTE (CONCENTRAÇÃO DE FÁRMACO USADO NO PREPARO DAS AMOSTRAS; 0,5ML DE NANOCÁPSULAS APLICADO NA COLUNA E 2,0ML DE FRAÇÃO COLETADA). ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

FIGURA 40 - PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO GENISTEÍNA EM COLUNA DE SEPHADEX G-50 (COLUNA 2: 25,0CM DE ALTURA X 1,50CM DE DE DIÂMETRO INTERNO) DETERMINADO POR HPLC, A PARTIR DOS PARÂMETROS ELEITOS PARA O TESTE (CONCENTRAÇÃO DE FÁRMACO USADO NO PREPARO DAS AMOSTRAS); 1,0ML DE NANOCÁPSULAS APLICADO NA COLUNA E 2,5ML DE FRAÇÃO COLETADA). ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

FIGURA 41 - PERFIS DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES DE NANOCÁPSULAS PREPARADAS COM 2,0MG DE GENISTEÍNA (EM TRIPLICATA) APÓS APLICAÇÃO EM COLUNA DE SEPHADEX G-50 X CONCENTRAÇÕES DE GENISTEÍNA DETERMINADAS POR HPLC, TRATADAS 24 HORAS APÓS SUA PREPARAÇÃO (CONCENTRAÇÃO DE GENISTEÍNA = 1ª EXTRAÇÃO + 2ª EXTRAÇÃO).134

FIGURA 42 – TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO 2,0MG GENISTEÍNA (LOTES EM TRIPLICATA) AVALIADAS APÓS 24 HORAS DE ARMAZENAMENTO (T1).138

FIGURA 43 - TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO 2,0MG GENISTEÍNA (LOTES EM TRIPLICATA) AVALIADAS APÓS 07 DIAS DE ARMAZENAMENTO (T2)139

FIGURA 44 - TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO 2,0MG GENISTEÍNA (LOTES EM TRIPLICATA) AVALIADAS APÓS 15 DIAS DE ARMAZENAMENTO (T3)139

FIGURA 45 - TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO 2,0MG GENISTEÍNA (LOTES EM TRIPLICATA) AVALIADAS APÓS 30 DIAS DE ARMAZENAMENTO (T4)140

FIGURA 46 - TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO 2,0MG GENISTEÍNA (LOTES EM TRIPLICATA) AVALIADAS APÓS 90 DIAS DE ARMAZENAMENTO (T5)140

FIGURA 47- TERMOGRAMAS OBTIDOS A PARTIR DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA. (A) GENISTEÍNA COM ONSET DE 304,7C E DELTA H DE -165,5J/G NO ENDOTERMA; (B) PLA COM ONSET DE 48,96C E DELTA H DE -5,40J/G NA TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO; (C) ÓLEO DE SOJA; (D) TWEEN® 80 COM ONSET DE 172,7C E DELTA H DE -19,43J/G NO ENDOTERMA; (E) FOSFATIDILCOLINA E (F) ÁGUA PURIFICADA COM ONSET DE 147,7C E DELTA H DE -948,8J/G NO ENDOTERMA.141

FIGURA 48– TERMOGRAMAS OBTIDOS A PARTIR DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA. (A) PLA COM ONSET DE 48,96C E DELTA H DE -5,40J/G NA TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO; (B) MISTURA FÍSICA DO PLA E GENISTEÍNA COM ONSET DE 49,2C E DELTA H DE -2,20J/G NA TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO E ONSET DE 289,5C E DELTA H DE -87,95J/G NO ENDOTERMA E (C) GENISTEÍNA COM ONSET DE 304,7C E DELTA H DE -165,5J/G NO ENDOTERMA. ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

FIGURA 49– TERMOGRAMAS OBTIDOS A PARTIR DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA. (A) NANOCÁPSULAS BRANCAS COM ONSET DE 150,33C E DELTA H DE -950,35J/G NO ENDOTERMA; (B) PLA COM ONSET DE 48,96C E DELTA H DE -5,40J/G NA TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO; (C) NANOCÁPSULAS CONTENDO GENISTEÍNA COM ONSET DE 135,45C E DELTA H DE -508,24J/G NO ENDOTERMA E (D) GENISTEÍNA LIVRE COM ONSET DE 304,7C E DELTA H DE -165,5J/G NO ENDOTERMA.ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

FIGURA 50- TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO 2,0MG DE GENISTEÍNA SUBMETIDAS VARIAÇÕES DE 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0.....147

FIGURA 51- GRÁFICO REFERENTE À REGRESSÃO ENTRE PDI E PH DE AMOSTRAS DE NANOCÁPSULAS CONTENDO GENISTEÍNA INDUZIDAS A ALTERAÇÕES DE PH ENTRE 3,0 E 10,0 148

FIGURA 52- GRÁFICO REFERENTE À REGRESSÃO ENTRE DIÂMETRO MÉDIO E PH DE AMOSTRAS DE NANOCÁPSULAS CONTENDO GENISTEÍNA INDUZIDAS A ALTERAÇÕES DE PH ENTRE 3,0 E 10,0148

FIGURA 53- TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO 2,0MG DE GENISTEÍNA SUBMETIDAS A CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO. ANTES DO PRIMEIRO CONGELAMENTO; APÓS 1º CICLO; APÓS 15º CICLO E APÓS 30º CICLO.149

FIGURA 54 – EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (% MÉDIO) DE NANOCÁPSULAS PREPARADAS A PARTIR DE 2,0MG DE GENISTEÍNA (EM TRIPLICATA) X TEMPO DE ARMAZENAMENTO (APÓS 01, 07, 15, 30 E 90 DIAS DE ARMAZENAMENTO A $4^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$) (MÉDIAS \pm DP, $N=3$)..... ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

FIGURA 55- PERFIL DE PENETRAÇÃO INTRÍNSECA DA GENISTEÍNA ($\mu\text{G}/\text{CM}^2$), EM PELE DE ORELHA DE SUÍNO ATÉ 24 HORAS DA APLICAÇÃO DE $100\mu\text{G}$ DE GENISTEÍNA / $25\mu\text{L}$ DE ACETONA (MÉDIA \pm DP ($N=4$)).ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

FIGURA 56- PERFIL DE PERMEAÇÃO DA GENISTEÍNA ($\mu\text{G}/\text{CM}^2$) EM PELE DE ORELHA SUÍNA ATÉ 24 HORAS DA APLICAÇÃO DA FORMA FARMACÊUTICA GEL CONTENDO GENISTEÍNA NANOENCAPSULADA E LIVRE E GENISTEÍNA INTRÍNSECA (MÉDIA \pm DP ($N=4$))...... ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

FIGURA 57- PERFIL DE PERMEAÇÃO DA GENISTEÍNA ($\mu\text{G}/\text{CM}^2$) EM PELE DE ORELHA SUÍNA ATÉ 24 HORAS DA APLICAÇÃO DA FORMA FARMACÊUTICA EMULSÃO CONTENDO GENISTEÍNA NANOENCAPSULADA E LIVRE E GENISTEÍNA INTRÍNSECA (MÉDIA \pm DP ($N=4$))...... ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

FIGURA 58- GRÁFICOS REFERENTES À ANCOVA MULTIFATORIAL DAS QUANTIDADES PERMEADAS DE GENISTEÍNA ($\mu\text{G}/\text{CM}^2$) EM FUNÇÃO DO TEMPO (HORAS), PARA AS FORMAS FARMACÊUTICAS GEL E EMULSÃO (A) E GENISTEÍNA NANOENCAPSULADA E LIVRE (B). NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: 0,05.ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

FIGURA 59- GRÁFICO REFERENTE À ANÁLISE DE COMPARAÇÃO PLANEJADA (CONTRASTE) BASEADA NOS DADOS DO TESTE T COMPARATIVO DA GENISTEÍNA ACUMULADA NA SOLUÇÃO RECEPTORA ($\mu\text{G}/\text{CM}^2$), APÓS 24 HORAS DE PERMEAÇÃO *IN VITRO* POR ORELHA DE SUÍNO, A PARTIR DA FORMA (LIVRE OU NANOENCAPSULADA) E FORMA FARMACÊUTICA (GEL OU EMULSÃO) (COM SIGNIFICÂNCIA AFERIDA POR MONTE CARLO (0,05)) (MÉDIA \pm DP ($N=4$))...... ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

FIGURA 60– GRÁFICOS REFERENTES À ANÁLISE DE COMPARAÇÃO PLANEJADA (CONTRASTE) BASEADA NOS DADOS DO TESTE T COMPARATIVO DA GENISTEÍNA RETIDA ($\mu\text{G}/1,5\text{CM}^2$) NA PELE DE ORELHA DE SUÍNO APÓS 24 HORAS DE PERMEAÇÃO *IN VITRO*, DA FORMA (LIVRE OU NANOENCAPSULADA), FORMA FARMACÊUTICA (GEL OU EMULSÃO) E GENISTEÍNA INTRÍNSECA (COM SIGNIFICÂNCIA AFERIDA POR MONTE CARLO (0,05)) (MÉDIA \pm DP ($N=4$)). ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

FIGURA 61– PERCENTAGEM MÉDIA DE GENISTEÍNA APÓS 24 HORAS DE PERMEAÇÃO EM PELE SUÍNA ($1,50\text{CM}^2$ DE ÁREA) NOS DIFERENTES COMPARTIMENTOS DAS CÉLULAS DE *FRANZ*, DE ACORDO COM SUA FORMA (LIVRE OU NANOENCAPSULADA) E FORMA FARMACÊUTICA (GEL OU EMULSÃO) (PERCENTUAL MÉDIO \pm DP, $N=4$)..... ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

FIGURA 62- GRÁFICOS REFERENTES À ANÁLISE DE COMPARAÇÃO PLANEJADA (CONTRASTE) BASEADA NOS DADOS DO TESTE T COMPARATIVO DA GENISTEÍNA REMANESCENTE NA FORMA FARMACÊUTICA MAIS LAVAGEM ($\mu\text{G}/0,3\text{G}$), APÓS 24 HORAS DE PERMEAÇÃO *IN VITRO* EM PELE DE ORELHA DE SUÍNO, DA FORMA LIVRE E NANOENCAPSULADA E FORMA FARMACÊUTICA GEL E EMULSÃO (COM SIGNIFICÂNCIA AFERIDA POR MONTE CARLO (0,05)) (MÉDIA \pm DP ($N=4$))...... ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

FIGURA 63- PERCENTAGEM MÉDIA DE RECUPERAÇÃO DE GENISTEÍNA EM PELE SUÍNA ($1,50\text{CM}^2$ DE ÁREA) PARA AS FORMULAÇÕES TESTADAS APÓS 24 HORAS DE ENSAIO DE PERMEAÇÃO (MÉDIA \pm DP ($N=4$))182.

FIGURA 64- PERFIL DE PERMEAÇÃO DA GENISTEÍNA ($\mu\text{G}/\text{CM}^2$) EM MEMBRANA SINTÉTICA DE PTFE ATÉ 24 HORAS DA APLICAÇÃO DA FORMA FARMACÊUTICA GEL CONTENDO GENISTEÍNA NANOENCAPSULADA (MÉDIA \pm DP ($N=4$))..... ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

FIGURA 65- GRÁFICO REFERENTE À ANCOVA DAS QUANTIDADES PERMEADAS DE GENISTEÍNA NANOENCAPSULADA ($\mu\text{G}/\text{CM}^2$) EM FUNÇÃO DO TEMPO, PARA MEMBRANA SINTÉTICA E PELE SUÍNA (COM SIGNIFICÂNCIA AFERIDA POR MONTE CARLO (0,05)).186

FIGURA 66- GRÁFICOS REFERENTES AO TESTE T COMPARATIVO DA LIBERAÇÃO DE GENISTEÍNA NANOENCAPSULADA A PARTIR DE PELE DE ORELHA DE SUÍNO E MEMBRANA SINTÉTICA ($\mu\text{G}/1,5\text{CM}^2$) (COM SIGNIFICÂNCIA AFERIDA POR MONTE CARLO). ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01: POLÍMEROS UTILIZADOS NO PREPARO DE NANOPARTÍCULAS.....	44
QUADRO 02: PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO POLÍMERO, D, L-PLA.....	55
QUADRO 03: CLASSIFICAÇÃO DOS FITOESTRÓGENOS.....	72
QUADRO 04: TESTES ESTATÍSTICOS APLICADOS AOS DIFERENTES ESTUDOS REALIZADOS.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS

Bar- Escala ou alcance de medição

C máx. - Concentração máxima

CAS - *Chemical Abstracts Service*

cP - Centipoises

Curva AUC - área sob a curva,

DLS - Dynamic Light Scaterrin

DMSO - Dimetilsulfóxido

DP - Desvio padrão

DPR - Desvio padrão relativo

DSC - Differential Scanning Calorimeter ou Calorimetria Exploratória Diferencial

EE - Eficiência de Encapsulação

EHL - Equilíbrio hidrófilo lipófilo

F – F de Fisher (estatística do teste)

FARMATEC - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

FDA - Food and Drug Administration

GL – Graus de liberdade

HPLC- High performance liquid chromatography ou Cromatografia líquida de alta eficiência

HPMC - Hidroxipropil metilcelulose

J - Fluxo cutâneo

Lag Time- Tempo de latência ou intervalo de tempo entre a administração e o alcance de concentração terapêutica

Log P – Logaritmo do coeficiente de partição octanol/água

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

mV- milivolts

NCs - nanocápsulas

p - nível de significância ou probabilidade das diferenças observadas ocorrerem ao acaso

PACA – Poli (cianoacrilato de alquila)

PBA - Poli (butil adipato)

PC- Fosfatidilcolina

PCL – Poli (ϵ -caprolactona)

PDI – Índice de polidispersibilidade

PECA – Poli (etil cianocrilato)

pH - Potencial hidrogeneiônico

PLA – Poli (ácido lático)

PLG – Poli (ácido glicólico)

PLGA – Poli (ácido lático-co-glicólico)

Polawax[®] - Álcool cetosteárico e polioxietilenglicóis

PTEF - Politetrafluoroetileno

PVA - Tensoativo polivinilálcool

PVDF - Fluoruro de polivinilideno

QM – Quadrado médio

r - coeficiente de correlação linear

rpm – Rotações por minuto

SANS - Espalhamento de nêutrons a baixos ângulos

SC - Estrato córneo

SQ - Soma dos quadrados

T máx. - Tempo para concentração máxima

Tween[®] - Tensoativo Polissorbato

UV - Ultravioleta

β CD - Beta ciclodextrinas

RESUMO

As isoflavonas são fitoestrógenos que desempenham atividades biológicas como estrogênica e inibidora de enzimas reguladoras do ciclo celular, sendo para aplicação tópica ressaltada a atividade antioxidante e antitumoral. Dentre as isoflavonas, a genisteína apresenta atividade biológica mais pronunciada, entretanto, sua baixa hidrossolubilidade dificulta tanto sua incorporação em bases para administração tópica na pele, quanto sua permeação passiva. Assim, o desenvolvimento de sistemas nanocarreadores particulados, como as nanocápsulas, com o intuito de acentuar suas atividades biológicas e possibilitar sua administração sobre a pele, tornou-se o objetivo desse trabalho. Para tanto, nanocápsulas de PLA contendo genisteína foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, caracterizadas e avaliadas quanto à estabilidade por 90 dias. Posteriormente genisteína livre e nanoencapsulada foi incorporada em formulações tópicas semi-sólidas (gel e emulsão) e avaliadas em modelos *in vitro*, quanto à habilidade de modularem a penetração na pele de suíno e membrana sintética. O diâmetro médio das nanocapsulas foi 138,5 nm ($DP \pm 2,95$) e índice de polidispersibilidade de 0,126 ($DP \pm 0,03$). Após separação da genisteína livre e nanoencapsulada, o fármaco foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência e demonstrou 89,63% ($DP \pm 2,27$) de eficiência de encapsulação, seguido de perda por vazamento para 63,80% ($DP \pm 11,26$) em 90 dias. Os testes de permeação demonstraram que a formulação em gel contendo genisteína nanoencapsulada apresentou maior concentração permeada, havendo diferença significativa para todas as formulações testadas e semelhança, apenas entre a quantidade de GEN remanescente na forma farmacêutica das formulações contendo NC em gel e emulsão, bem como, entre as quantidades de fármaco retido na pele das formulações contendo genisteína livre em gel e emulsão. Os parâmetros cinéticos das formas nanoencapsuladas demonstraram maior coeficiente de correlação para o modelo cinético de ordem zero, indicando que o fluxo não dependeu de sua concentração. As concentrações de genisteína nanoencapsulada permeada através da membrana sintética e pele suína apresentaram diferença significativa havendo dependência com o tempo. Dessa forma, o estudo realizado demonstrou que o sistema polimérico desenvolvido apresenta grande potencial para aplicação como nanocarreador da genisteína em sistemas biológicos.

Palavras-chaves: Fitoestrógenos; Nanotecnologia, Nanopartículas; Envelhecimento da pele; Antioxidantes.

ABSTRACT

Isoflavones are phytoestrogens that have biological activities such as estrogenic and inhibiting enzymes that regulate the cell cycle, and for topic application it is highlighted antioxidant and anticancer activities. Amongst isoflavones, genistein shows the greatest biological activity, however, its low hydrosolubility damages incorporation in topic vehicles and passive permeation. Therefore, development of particulated nanocarrier systems, such as nanocapsules, aiming to increase genistein biological activities and make topic administration possible, became this work's objective. To do so, PLA nanocapsules containing genistein were prepared by interfacial polymer deposition method, then characterized, and their 90 days stability was evaluated. Later, free and nanoencapsulated genistein were incorporated into semi-solid formulations (gel and emulsion) and evaluated by *in vitro* models using classical Franz-type diffusion cells, to measure its ability to modulate swine skin and synthetic membranes penetration. Nanocapsules average diameter was 138,5 nm (DP \pm 2,95) and PDI found was 0,126 (DP \pm 0.03). After separation of free genistein, the drug was quantified by HPLC and showed 89,63% (DP \pm 2,27) encapsulation efficiency, followed by loss by leaking to 63,80% (DP \pm 11,26) in 90 days. Permeation tests demonstrated that gel formulation containing nanoencapsulated genistein presented the greatest permeated concentration, and there was significant difference for all tested formulations and similarity only between genistein quantity reminiscent in the dosage form of formulations containing gel and emulsion, as well as drug quantities retained in the skin of gel and emulsion formulations containing genistein. Nanoencapsulated forms kinetic parameters showed the greatest correlation coefficient for kinetic of zero order model, indicating that flow didn't depend on its concentration. Nanoencapsulated genistein concentrations permeation across synthetic and swine skin presented significant difference depending on time. Thus, the study performed showed that the polymeric system developed presents great potential for application as genistein nanocarrier in biological systems.

Key words: Phyestrogens; Nanotechnology; Nanoparticles; Skin aging; Antioxidant.

1. INTRODUÇÃO

As isoflavonas são fitoestrógenos que desempenham inúmeras atividades biológicas podendo ser ressaltadas aquelas relacionadas à atividade estrogênica e atividade inibidora de enzimas reguladoras do ciclo celular. Estudos atestam sua eficácia na terapia de reposição hormonal, prevenção da osteoporose, redução do colesterol plasmático, ação antifúngica, antioxidante (prevenção do envelhecimento cutâneo) e antitumoral (mama, próstata e pele, entre outros) (RECORD *et al*, 1995; HODGSON *et al*, 1996; KERRY & ABBEY, 1998; AGUIAR *et al*, 2002; KIM *et al*, 2004; STROHEKER *et al*, 2004; GARCIA-PEREZ *et al*, 2006; NG *et al*, 2006; YANG *et al*, 2007; DAVIS *et al*, 2008).

Dentre as isoflavonas, a genisteína apresenta atividade biológica mais pronunciada e, portanto tem sido alvo de muitas pesquisas. Essa isoflavona tem atraído atenção devido aos potenciais efeitos como quimiopreventivo e como agente antienvhecimento. Na pele, a genisteína age como antioxidante, varredor de radicais livres, radioprotetor, estimulante da síntese de colágeno, elastina e ácido hialurônico. Entretanto, sua baixa hidrossolubilidade em água dificulta sua incorporação em bases para administração tópica, bem como sua permeação através da pele (CAI *et al*, 1997; MIYAZAKI *et al*, 2002; AGUIAR *et al*, 2002; CLAPAUD *et al*, 2002; BAUMANN, 2004).

A pele é uma barreira para o ambiente externo que atua contra ataques químicos e físicos. O transporte de substâncias através de membranas biológicas como a pele é um fenômeno complexo que envolve interações físicas, químicas e biológicas. Dificilmente, portanto, a administração tópica passiva de genisteína culminaria em sua penetração pela pele até as camadas mais profundas e em concentrações suficientes para promoção de atividade biológica (MOSER *et al*, 2001; BOUWSTRA & HONEYWELL-NGUYEN, 2002; DWIECKI *et al*, 2007).

Assim métodos que promovam a penetração percutânea de fármacos podem ser considerados. Dentre esses merecem destaque os métodos químicos, caracterizados por promotores químicos de penetração sobre a pele, como por exemplo, etanol, tensoativos, ciclodextrinas e novos sistemas de liberação, como lipossomas, nanoemulsões e nanocápsulas (MOSER *et al*, 2001; SCHÄFER-KORTING *et al*, 2007).

Os sistemas carreadores nanoparticulados apresentam inúmeras vantagens na entrega de fármacos ativos em alvos específicos da pele. Dentre estas podem ser destacadas: sua associação com a superfície da pele, seu pequeno tamanho e seu favorável coeficiente de partição com o estrato córneo (SCHÄFER-KORTING *et al*, 2007). Conseqüentemente, estudos têm sido desenvolvidos a fim de ampliarem o desempenho, na permeação cutânea, de diferentes classes de fármacos incorporados aos nanocarreadores (MAGHRABY *et al*, 2000; LAU *et al*, 2005; DUBEY *et al*, 2006; ALVES *et al*, 2007; NHUNG *et al*, 2007).

Sendo assim, o desenvolvimento de novos sistemas de liberação para genisteína com o intuito de acentuar suas atividades biológicas e possibilitar sua administração sobre a pele tornou-se desafiadora e, portanto, o objetivo desse trabalho.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Estrutura da pele

A pele é o órgão mais extenso do organismo, uma vez que o recobre externamente em sua totalidade atuando como barreira contra ataques químicos e físicos. Apresenta como função principal a proteção, por exemplo, contra a perda de substâncias endógenas, além das adversidades do ambiente como poluição, temperatura, radiação ultravioleta (UV), umidade e regulação da pressão sanguínea (BOUWSTRA & HONEYWELL-NGUYEN, 2002; AULTON, 2005).

Histologicamente a pele é formada por três camadas, a epiderme, derme e hipoderme, as quais estão organizadas de forma sobreposta e interdependente (Figura 01).

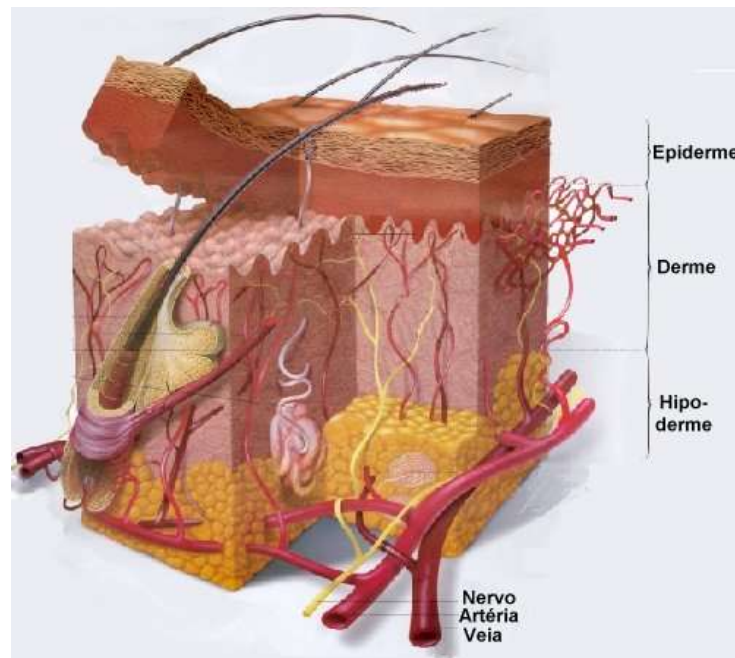


Figura 01- Esquema ilustrativo da estrutura da pele. Fonte: LAMOREA. Transporte através da pele, 2006. Ilustração.

A epiderme é a camada mais superficial e encontra-se em contato direto com o exterior. É um epitélio estratificado, avascular, que mede entre 0,04 a 1,6 mm de

espessura, sendo composta primordialmente por queratinócitos, células que se diferenciam num processo denominado queratinização. Este processo gera diferentes estratos ou camadas, denominados de estrato germinativo ou basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo (Figura 02) (LÉPORI, 2006; SCHÄFER-KORTING *et al*, 2007).

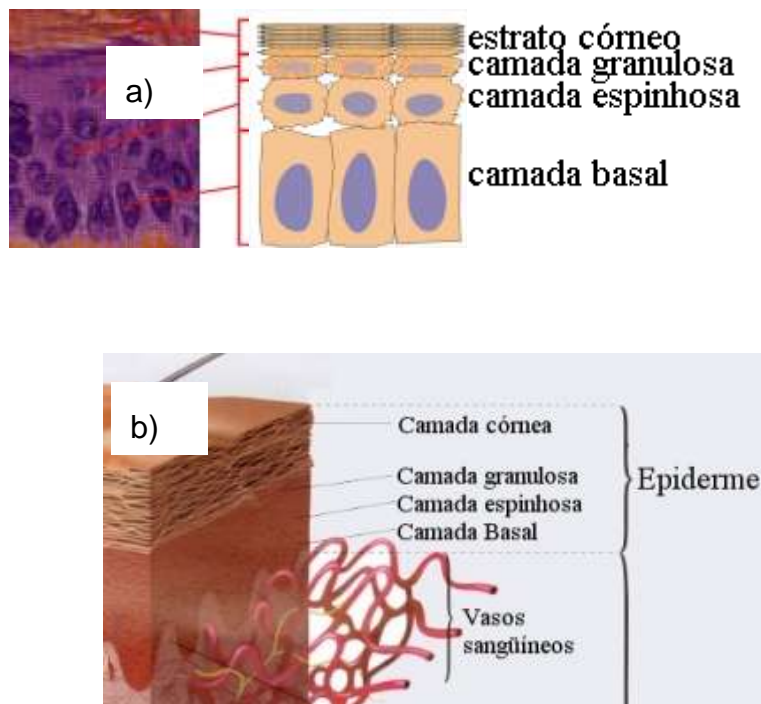


Figura 02- Esquemas da estrutura da epiderme. a) Histologia celular e b) Esquema ilustrativo. Fonte: WEN. Estrutura completa da pele, 2006. Ilustração.

Dentre os estratos epiteliais, o estrato córneo é a camada mais externa e principal barreira contra a penetração de substâncias na pele, com espessura de 5-8 μm no total. Ele é constituído por um sistema de dois compartimentos heterogêneos compostos por queratinócitos e matriz lipídica. Os queratinócitos (ou corneócitos) são compostos por queratina embebidos em uma matriz intracelular, a qual confere resistência química e física ao tecido, bem como plasticidade à pele. Entretanto quando os corneócitos perdem água, a pele se torna quebradiça, e a impermeabilidade é comprometida. Já a matriz lipídica é organizada em bicamadas lamelares e as principais classes de lipídeos encontradas no estrato córneo são ceramidas, ácidos graxos livres, esteróis e triacilgliceróis, podendo variar, nas diferentes áreas do corpo, de 3 a 46%, em relação ao peso total do estrato córneo

(HADGRAFT 1996, 2004; ASBIL *et al*, 2000). Elias (1991) descreveu a estrutura do estrato córneo como uma “parede de tijolos”. Os corneócitos repletos de queratina seriam os tijolos hidrofílicos, enquanto os lipídios intercelulares seriam o cimento hidrofóbico, os quais, de acordo com BOMMANNAN e colaboradores (1990) são os principais responsáveis pela função de barreira à perda de água e entrada de substâncias no estrato córneo. Portanto, a permeabilidade na epiderme é dificultada, devido à presença das bicamadas lipídicas e dos queratinócitos (FINKELSTEIN, 1976; ELIAS *et al*, 1981; VAN DEN BERGH *et al*, 1997; BONTÉ *et al*, 1997). Entretanto, nanoporos hidrofílicos entre os corneócitos, de 20nm em média, não excedendo 100nm são relatados. Esses nanoporos tubulares podem ser alterados por detergentes e ácidos graxos podendo favorecer a penetração de substâncias. Em geral, porém, alterações induzidas por detergentes são associadas a irritações que podem resultar em dermatites severas (BARRY, 2002 e 2004; CEVC, 1998 e 2004).

A derme interpõe-se entre a epiderme e o tecido subcutâneo; é uma camada de espessura variável (1,0mm-2,0mm) e muito vascularizada. É um tecido conjuntivo e especializado constituído por células e proteínas fibrosas (colágeno, elastina e reticulina) embebidas em uma substância de fundo amorfa composta por mucopolissacarídeos. Nela estão presentes todos os acessórios epidérmicos como os folículos pilosos, as glândulas sebáceas e as glândulas sudoríparas. O suprimento vascular da derme regula a temperatura, a pressão e a nutrição do tecido (AULTON, 2005; LÉPORI, 2006).

O tecido subcutâneo ou hipoderme é uma camada adiposa situada abaixo da derme com função protetora e isolante (AULTON, 2005).

2.2. Pele como via para liberação de fármacos: penetração e absorção cutânea

A pele tem sido usada como via para liberação de fármacos há muitos anos, sendo que nas últimas décadas, os avanços referentes ao processo de penetração de substâncias por ela e através dela têm sido bastante consideráveis (HADGRAFT *et al*, 2005).

A produção da ação terapêutica em sítios específicos do tecido epidérmico é o resultado esperado para uma terapia dermatológica, podendo ocorrer desde a

superfície da pele até a epiderme viável ou parte superior da derme, sendo para tanto, requerida a penetração do fármaco na pele por difusão ou absorção percutânea (ALLEN JR. *et al*, 2007).

O estrato córneo é a barreira que limita a velocidade e restringe os movimentos de entrada e saída de substâncias químicas da pele. Devido à sua natureza densa, os valores dos coeficientes de difusão neste tecido são muito reduzidos se comparados com outros tecidos, o que resulta em grande resistência e impermeabilidade geral (LACHMAN *et al*, 2001). Um fármaco pode atravessar a epiderme através de três diferentes vias (figura 03) (MOSER *et al*, 2001; BARRY *et al*, 2001 e 2002):

- Via Intercelular: o fármaco difunde-se ao redor dos corneócitos, permanecendo constantemente dentro da matriz lipídica;
- Via Transcelular: o fármaco passa diretamente através dos corneócitos e da matriz lipídica intercelular intermediária;
- Via Apêndices (folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, poros e imperfeições): rotas paralelas nas quais os fármacos polares, cristalinos, de baixo peso molecular e tamanho de 3,0-10,0µm podem permear.

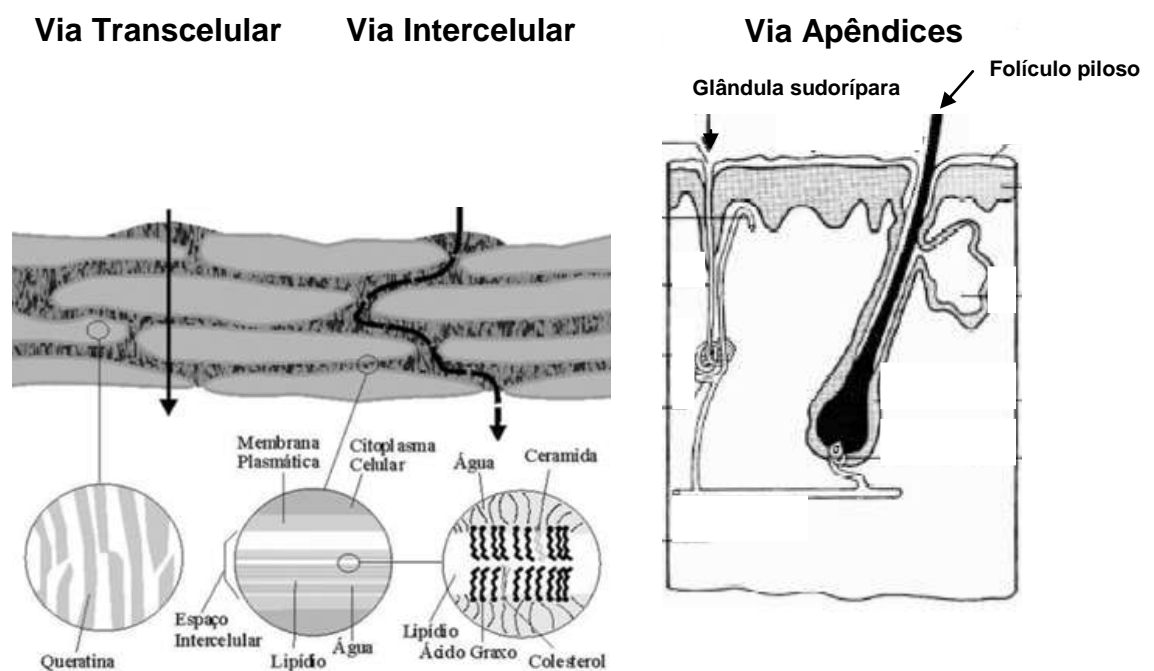


Figura 03- Rotas de penetração de fármacos através do estrato córneo. Adaptado de MOSER *et al*, 2001 e BARRY *et al*, 2002.

Os principais determinantes para a via específica, que uma substância pode tomar, dependem primordialmente das propriedades físico-químicas do fármaco e das condições da pele. Entretanto, em condições apropriadas, a via de permeabilidade pode ser alterada. É possível compreender esse fato a partir da aplicação de uma substância na superfície da pele, para a qual, inicialmente, a difusão inicial deve ser potencialmente maior através dos apêndices do que através do estrato córneo. Contudo, após o estabelecimento do estado estacionário de difusão, a via predominante deve ser alterada em direção à matriz do estrato córneo (LACHMAN *et al*, 2001).

A difusão epidérmica é um processo passivo reconhecido como a primeira fase da absorção percutânea e a absorção do fármaco a partir da derme, a segunda fase. O processo passivo é considerado simples, pois a velocidade de difusão de um fármaco depende somente de suas características físico-químicas, do meio que o contém e de condições da pele. Dentre os fatores de penetração da pele, referentes ao fármaco, aqueles que mais se destacam são a sua concentração no veículo, seu peso molecular, sua solubilidade aquosa, do coeficiente de partilha óleo/água (entre o estrato córneo e o veículo) e pKa. Variáveis fisiológicas, como por exemplo, as condições da pele, ou seja, sua integridade, idade, área a ser tratada, espessura e hidratação, entre outros, também influem na penetração (LACHMAN *et al*, 2002; ALLEN JR. *et al*, 2007).

Após a passagem do fármaco pelo estrato córneo, este poderá atingir mais facilmente a derme a partir de sua permeação através das demais camadas epidérmicas. Se atingir a camada vascularizada da derme, tornar-se-á disponível à absorção na circulação geral. Nesta, o fármaco será diluído e distribuído com pouco aumento de sua concentração sistêmica. A absorção do fármaco a partir da derme, conhecido como a segunda fase da absorção percutânea, é considerada mais complicada que a primeira, pois depende de fatores como o fluxo sanguíneo efetivo, o movimento do fluido intersticial e dos linfáticos, além de outros fatores dependentes da constituição dérmica (LACHMAN *et al*, 2002).

2.3. Promoção da penetração cutânea de fármacos

Para serem eficazes, os agentes aplicados topicamente devem penetrar a pele até o local de ação. Para tanto, devem estar associados a outros componentes, já que sozinhos, devido às suas características físico-químicas, podem ser impedidos pela barreira da pele (HUANG *et al*, 2005).

Os produtos farmacêuticos aplicados na pele podem ser divididos em sistemas dermatológicos e transdérmicos. As formulações dermatológicas têm como objetivo o tratamento local de doenças na pele, enquanto os transdérmicos podem ter finalidade local ou sistêmica. Embora possuam características e objetivos distintos, a eficácia de ambos dependerá da liberação do fármaco da formulação que o contém e de sua penetração/difusão pelas camadas da pele (HUANG *et al*, 2005; ALLEN JR. *et al*, 2007).

As formulações dermatológicas são geralmente líquidas ou semi-sólidas (pomadas, cremes, loções, géis e soluções) e tratam patologias instaladas em diferentes camadas da pele ou em apêndices cutâneos, sendo sua eficácia dependente da concentração do fármaco nesses locais. Assim, o fármaco deve vencer a barreira do estrato córneo e atingir as camadas mais profundas, sem que haja permeação e absorção sanguínea. As classes de fármacos normalmente presentes nessas preparações são antibióticos, antifúngicos, corticosteróides, retinóides, agentes antiinflamatórios, anestésicos locais entre outros (ALLEN Jr *et al*, 2007).

Os sistemas transdérmicos vêm ganhando destaque devido à grande adesão dos pacientes ao tratamento. Quando apresenta finalidade sistêmica são capazes de promover a diminuição das variações plasmáticas do fármaco; anular a variabilidade da absorção oral; anular o metabolismo pré-sistêmico; diminuir a incidência de efeitos colaterais, devido à ausência de picos de concentração; possibilitar a imediata interrupção da administração e apresentar disponibilidade de tecnologia para formulação de adesivos confiáveis e confortáveis ao uso (MARTINS & VEIGA, 2002; AMELLER *et al.*, 2004; GODIN & TOUITOU, 2007). Entretanto essa via pode apresentar limitações como, a função barreira do estrato córneo, o intervalo de tempo entre a administração e o alcance de concentração terapêutica (*Lag time*), a possibilidade de irritação local, bem como de desencadear tolerância e/ou resistência, além de exigir características específicas para os fármacos candidatos.

Os fármacos veiculados nesses sistemas devem ser muito potentes, não irritantes, com tempos de meia-vida curtos, que não sofrem metabolização na pele, não induzem tolerância, dotados de certa lipofilia, não ionizáveis e com baixo peso molecular. Alguns exemplos desses fármacos são clonidina, nicotina e estradiol (MARTINS & VEIGA, 2002; AULTON, 2005).

A quantidade de fármaco presente nas camadas da pele dependerá da eficiência relativa aos processos de liberação do fármaco da formulação que o contém e penetração da substância ativa nas camadas da pele (LACHMAN *et al*, 2001).

Com o objetivo de melhorar as baixas razões de penetração cutânea, pesquisas no campo da tecnologia farmacêutica investigam diferentes possibilidades. De acordo com a 1ª Lei de Fick existem duas estratégias básicas de promoção da penetração de fármacos (HIGUCHI, 1961; HADGRAFT *et al*, 1996):

- Aumento do coeficiente de difusão;
- Modificação da solubilidade do fármaco.

Dessa forma, é possível compreender a influência de promotores químicos de penetração sobre a pele, ou seja, adjuvantes capazes de permear ou interagir com o estrato córneo. Eles reduzem a habilidade do fármaco em interagir com os constituintes estruturais da pele, e conseqüentemente minimizam a resistência da pele à difusão do fármaco aumentando seu transporte através das camadas epiteliais. Os promotores químicos incrementam a atividade termodinâmica do fármaco resultando no aumento de seu fluxo (HIGUCHI, 1962; MOSER *et al*, 2001; MARTINS & VEIGA, 2002).

De acordo com a Teoria de Partição (*Lipid-protein-partitioning theory- LPP*), os promotores podem normalmente agir a partir dos seguintes mecanismos (HADGRAFT *et al*, 1996 e 2004; ASBIL *et al*, 2000; MOSER *et al*, 2001) :

- Aumento da fluidez nos domínios lipídicos intercelulares;
- Interação ou desnaturação das proteínas intracelulares, por exemplo, a queratina;
- Cosolvência ou alteração do coeficiente de partição dos fármacos.

Diferentes substâncias e estruturas podem auxiliar na penetração de moléculas bioativas através da pele, por aumentarem a fluidez das membranas biológicas ao alterar sua estrutura lamelar. Na figura 4 está apresentado um esquema que representa os locais de ação dos promotores de permeação nos lipídios intercelulares do estrato córneo, os quais na bicamada lipídica agem através de alterações nas cabeças polares e cadeias hidrófobas da bicamada, de modo reversível, ou seja, a mudança de ordenamento (como estado normal dos lipídios intercelulares, responsável pela função barreira) para desordem relativa provocada por um promotor de permeação (HADGRAFT *et al*, 1996; SUHONEN *et al*, 1999, *apud* MARTINS & VEIGA, 2002).

Vale ressaltar que, características como toxicidade, grau de irritação cutânea, estabilidade química da formulação e reversibilidade dos efeitos sobre a pele, devem ser considerados na escolha dessas substâncias. São exemplos de promotores de penetração: etanol, álcoois graxos, ácidos graxos insaturados, aminas e amidas, terpenos, tensoativos, ciclodextrinas, lipossomas e nanopartículas (LOFTSSON & MÁSSON, 2001; LIRA *et al*, 2004; BETZ *et al*, 2005; ALVES *et al*, 2007; GUTIÉRREZ *et al*, 2008).

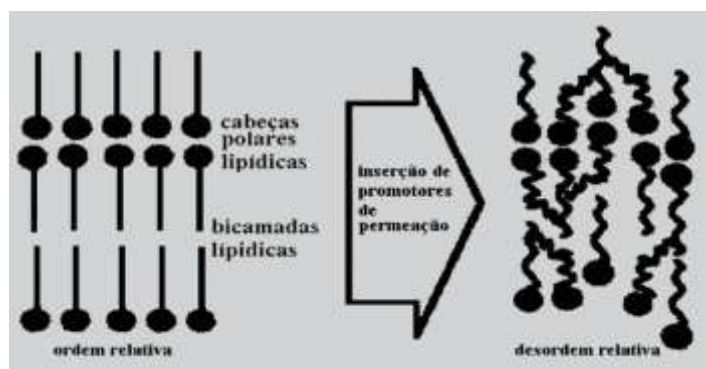


Figura 04- Esquema representativo dos locais de ação dos promotores de permeação e redução das energias de interação dos lipídios intercelulares do extrato córneo. Fonte: Adaptado de SUHONEN *et al*, 1999, *apud* MARTINS & VEIGA, 2002).

De acordo com a 1ª Lei de Fick, outra maneira dos excipientes modificarem a permeabilidade da pele é alterando os parâmetros de solubilidade desta em relação

ao permeante, assim, quando a solubilidade do agente permeante na pele é aumentada observa-se aumento do fluxo. Dessa forma, a permeação de fármacos através do estrato córneo pode ser descrita pela Lei de Fick (HIGUCHI, 1962; BACH & LIPPOLD, 1998a; MARTINS & VEIGA, 2002):

$$-\frac{dc_V}{dt} = K_p \times C_V = \frac{D_B \times PC_{B/V} \times A}{I \times V_V} \times c_V \quad (1)$$

$$J = P_B \times c_V = \frac{D_B \times PC_{B/V} \times c_V}{I} \quad (2)$$

$$PC_{B/V} = \frac{c_{SB}}{c_{SV}} \quad (3)$$

$$J = \frac{D_B \times c_{SB} \times c_V}{I \times c_{SV}} \quad (4)$$

Em que:

c_V – concentração do fármaco no veículo

$-dc_V/dt$ – velocidade do decréscimo da concentração de fármaco no veículo

K_p – constante de permeabilidade

D_B – coeficiente de difusão do fármaco

$PC_{B/V}$ – coeficiente de partição do fármaco entre o estrato córneo e o veículo

A – área de aplicação

V_V – volume de veículo

P_B – permeabilidade do estrato córneo

c_{SB} – solubilidade do fármaco no estrato córneo

c_{SV} – solubilidade do fármaco no veículo

J – fluxo de fármaco

l – espessura da camada córnea

O fluxo de fármaco, J , representa a quantidade de fármaco que permeia por unidade de tempo e por unidade de área. A velocidade de permeação e o fluxo são diretamente proporcionais à permeabilidade do fármaco na barreira (P_B).

Se o coeficiente de partição ($PC_{B/V}$) na equação (2) for substituído pela equação (3), obtemos a equação (4). Em consequência, o fluxo de fármaco através da pele, J , aumenta com: o incremento do coeficiente de difusão do fármaco na barreira (D_B) e com a solubilidade do fármaco na barreira (c_{SB}); o aumento de concentração de fármaco no veículo (c_V) ou com o decréscimo da sua solubilidade no veículo (c_{SV}).

Portanto, torna-se notória a importância dos promotores químicos de penetração sobre a pele, que ao minimizarem a resistência da pele à difusão do fármaco aumentam seu transporte através das camadas epiteliais. Entretanto, nenhum promotor de permeação por si só possui todas as propriedades requeridas, embora, muitos promotores exibam vários destes atributos e vêm sendo testados (HADGRAFT *et al*, 1996; PAULA *et al*, 1996; BACH & LIPPOLD, 1998a; AULTON, 2005; ANJOS & ALONSO, 2008).

2.4. Avaliação biofarmacêutica de formulações semi-sólidas

Conforme visto anteriormente, a administração de medicamentos ou cosméticos pela via cutânea tem por objetivo, tanto a obtenção de ação tópica como sistêmica. Para a ação de um produto dermatológico destinado ao tratamento de patologias cutâneas, superficiais ou profundas, é necessário que o fármaco se apresente retido na pele, com relativo fluxo através dela (Shah *et al*, 1992 *apud* Sato *et al*, 2007).

Dessa forma, o conhecimento sobre a permeação de fármacos na pele é imprescindível e testes de permeação cutânea tornam-se necessários. Os testes

clínicos podem ser precedidos por testes *in vitro*, não devendo ser substituídos por esses, já que permitem entender alguns fenômenos que ocorrem entre a aplicação do produto e sua difusão cutânea, de maneira prática e rápida, mas sem a interferência de fatores biológicos, sendo, portanto, indicados na avaliação da difusão de fármacos e fornecimento de modelos úteis para a avaliação da absorção cutânea em humanos (OECD nº 428, 2004).

2.4.1. Liberação *in vitro*

Os métodos *in vitro* são técnicas valiosas para a triagem e medidas de fluxo, coeficiente de partição e difusão, já que as condições do experimento podem ser controladas (AULTON, 2005).

De acordo com Flynn e colaboradores, 1999, os estudos *in vitro* também encontram aplicação no controle de qualidade de uniformidade de lotes de produtos dermatológicos na indústria farmacêutica. Entretanto, deve-se ter a cautela quanto à extrapolação dos resultados obtidos para situações *in vivo*. Com a metodologia *in vitro* pode-se fazer uma seleção prévia das formulações antes da realização de testes clínicos (SATO *et al*, 2007).

Dentre os testes *in vitro* usados em preparações tópicas podem ser mencionados os testes de liberação através de dissolução e permeação por células de Franz. No primeiro, o teste faz um paralelo com o teste de dissolução de formas farmacêuticas sólidas (SHAH *et al*, 1998). Os princípios de aplicação do teste para preparações transdérmicas pode ser realizado com os aparatos 5, 6 e 7 da Farmacopéia Americana (USP 31, 2007). No entanto, diversos artigos, assim como as orientações do FDA para a indústria (1998) e a OECD nº 428 (2004) preconizam o uso de células de difusão como a célula de Franz, equipada com membrana, para determinar a liberação *in vitro* de formulações tópicas, como cremes, géis, loções e sistemas transdérmicos (U.S.FDA/CDER, 1998; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 1998; HADGRAFT *et al* 1996; FLYNN *et al.*, 1999; OECD nº428, 2004; BEMVINDO *et al*, 2006; CORNELIO *et al*, 2007).

A célula de Franz segue o modelo bicompartimental das células de difusão, possuindo um compartimento contendo o fármaco (doador) e outro, contendo uma solução onde o fármaco é solúvel, separados por uma membrana natural ou

sintética. A solução receptora, em condições *sink*, que simula o suprimento sanguíneo, deve ser agitada, enquanto o compartimento doador pode ser fechado ou aberto às condições ambiente ou a temperatura e umidade controladas (Figura 5). A formulação teste pode ser um sólido depositado a partir de um solvente volátil, um líquido, um semi-sólido, um filme ou um dispositivo contendo o fármaco. Esse produto deve ser colocado na parte acima da membrana, no compartimento doador. A passagem do fármaco pela membrana para o compartimento receptor deve ser monitorada através da análise de amostras do líquido receptor coletadas em diferentes tempos. O gráfico de quantidade de fármaco acumulado no meio receptor em função do tempo fornece o perfil de liberação, e o fluxo de passagem do fármaco a partir da formulação para a solução receptora é representado pela inclinação da reta da curva (BACH & LIPPOLD, 1998b; FLYNN *et al*, 1999; HANSON RESEARCH CORP, 2003; OECD nº428, 2004; AULTON, 2005).

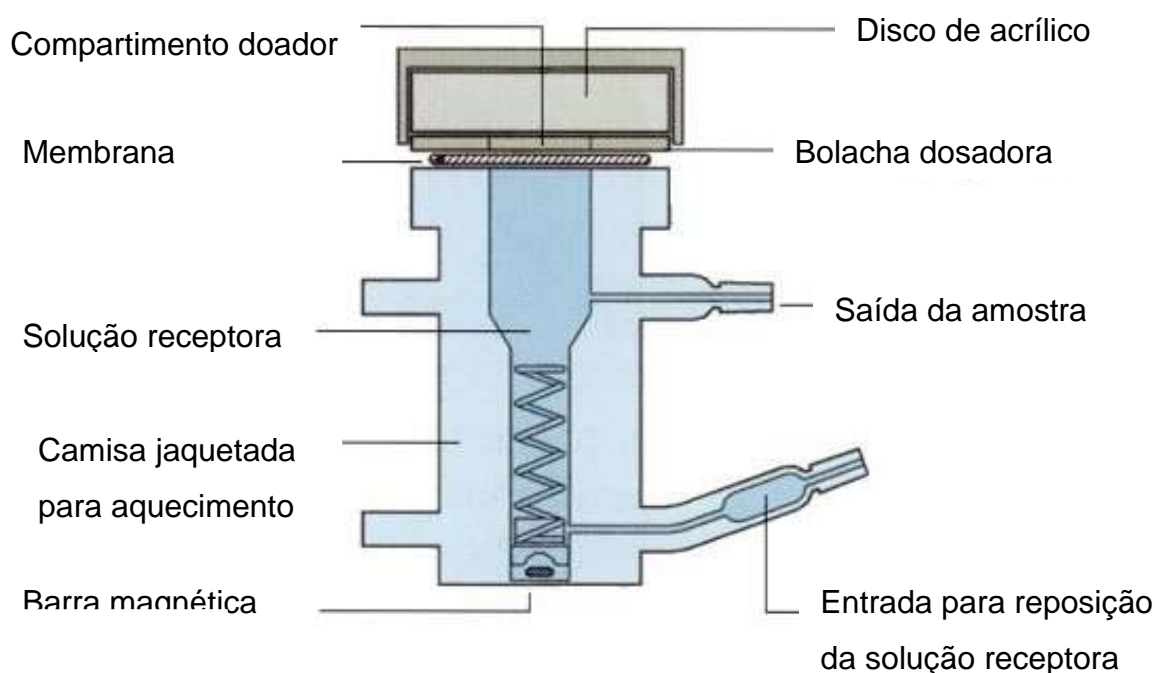


Figura 05- Células de difusão de Franz. Fonte: Adaptado de Hanson Research Corp, 2003.

Diferentes parâmetros podem influenciar a taxa de liberação *in vitro*, como as características da membrana empregada e a composição da solução receptora. As membranas podem ser de origem sintética ou natural. Os materiais mais usados

para membranas sintéticas são acetato de celulose, nitrato de celulose, borracha de silicone ou miristato de isopropila, polissulfonas, polipropileno, poliacrilato de polivinila, ou até sistemas lamelares que mimetizam os lipídeos intercelulares do extrato córneo (BACH & LIPPOLD, 1998a; FLYNN *et al*, 1999; TOSCANO *et al*, 2001; AULTON, 2005; ANTÔNIO *et al*, 2007; BORGIA *et al*, 2008). Entretanto, como essas membranas não são tão complexas como a pele, alguns estudos direcionam a utilização de pele natural (FLYNN *et al*, 1999; OEDC nº428, 2004; SATO *et al*, 2007).

As peles naturais podem ter origem animal ou humana. Se animal deve ser comprovada sua semelhança à pele humana, bem como especificadas as espécies e regiões do corpo do animal utilizadas. Peles dissecadas de ratos, camundongos e cobaias (normais e sem pêlos), coelhos, *hamsters*, porcos, cães sem pêlos, cobras e macacos têm sido utilizadas. Entretanto, como a pele de mamíferos varia consideravelmente quanto ao extrato córneo e o número e densidade de apêndices, o mais recomendado tem sido a utilização de pele humana obtida por autópsias, amputações ou cirurgias estéticas. Dessas, podem ser usados estrato córneo, epiderme, pele sem a derme ou a pele íntegra fixada na célula de difusão. Ainda existem peles reconstruídas em laboratório, dentre as quais podem ser citadas Epiderm™, Episkin® e SkinEthic®, entretanto, estudos mencionam o favorecimento da penetração nessas membranas (SHAH *et al*, 1998; FLYNN *et al*, 1999; FRANZ *et al*, 2003; OEDC nº428, 2004; AULTON, 2005; SCHREIBER *et al*, 2005; HABERLAND *et al*, 2006; GODIN & TOUITOU, 2007; ANTÔNIO *et al*, 2007; BORGIA *et al*, 2008).

Quanto à composição da solução receptora, de acordo com a OECD nº 428 (2004), deve ser garantida adequada solubilidade do fármaco testado, de modo que a solução não aja como um fator limitante para o transporte do fármaco. Sua recomendação é a utilização de fluidos fisiológicos como meio receptor, como por exemplo, solução fisiológica ou tampão fosfato (pH 7,0 e 7,4). Entretanto, diversos estudos utilizam outros meios, quando o fármaco é insolúvel em água, por exemplo, meios contendo tensoativos ou solventes orgânicos que garantam a solubilidade adequada para manutenção da condição *sink* (LIRA *et al*, 2004; CORNÉLIO *et al*, 2007).

Vale reforçar que o teste de liberação *in vitro*, sozinho, não deve ser aplicado na avaliação de biodisponibilidade/bioequivalência de formulações dermatológicas (U.S.FDA/CDER, 1998). De acordo com Sato e colaboradores (2007), a contribuição do estudo de permeação *in vitro* quanto à avaliação de propriedades farmacocinéticas de formulações e no desenvolvimento farmacotécnico é inquestionável, pois representa um procedimento prático, rápido e de baixo custo, entretanto, o objetivo do teste não é mimetizar o comportamento *in vivo*, mas apresentar indicativos da avaliação da difusão de fármacos fornecendo assim, modelos úteis para a avaliação da absorção cutânea em humanos (OECD nº 428, 2004).

2.5. Nanotecnologia e liberação controlada de fármacos

Dentre os promotores químicos, os sistemas carreadores nanoparticulados têm sido amplamente estudados por apresentarem vantagens na entrega de fármacos ativos em alvos específicos da pele (SCHÄFER-KORTING *et al*, 2007). Assim, informações gerais sobre nanotecnologia foram abordadas, seguidas de detalhada revisão bibliográfica acerca de nanopartículas poliméricas.

A nanotecnologia está ligada à manipulação da matéria em escala nanométrica com o objetivo de criar novos materiais e desenvolver novos produtos e processos. Nessa escala, os átomos revelam características peculiares, o que explica o interesse dos pesquisadores pelos nanomateriais. Multidisciplinar por natureza, a nanotecnologia tem o potencial de revolucionar amplamente vários campos tecnológicos e científicos e por isso tem sido aplicada em diferentes áreas como, materiais eletrônicos, catálise, bioencapsulação, liberação controlada de fármacos, entre outras (FREITAS & MARCHETTI, 2005; KAWASAKI & PLAYER, 2005).

A ciência farmacêutica passou a aplicar a nanotecnologia, nos anos 80, dando início a uma revolução na administração de medicamentos no organismo. Esta fez com que um fármaco incorporado num sistema nano-estruturado conseguisse atingir órgãos que apresentam patologias, como infecções e inflamações que não seriam atingidas através de medicamentos convencionais (ANDREO-FILHO & OLIVEIRA, 1999; SCHAFFAZICKI & GUTERRES, 2003; REIS *et al*, 2006; POHLMANN *et al*, 2008).

Assim, a utilização da nanotecnologia como ferramenta para a liberação controlada no sítio de ação específico, de agentes farmacologicamente ativos, mantendo a concentração plasmática efetiva através de mínimas doses, tem sido objetivo dos pesquisadores. Para tanto, diferentes nanopartículas vêm sendo estudadas objetivando a liberação de fármacos.

2.6. Nanopartículas poliméricas

Nanopartículas são sistemas, de natureza coloidal, preparadas a partir de polímeros (biodegradáveis ou não). O tamanho dessas partículas varia entre 10 e 1000 nm, contudo quando maiores são denominadas micropartículas. O fármaco dissolvido ou disperso é encapsulado na nanopartícula e dependendo do processo utilizado para o preparo destas, nanoesferas ou nanocápsulas podem ser obtidas (SCHAFFAZICKI & GUTERRES, 2003; REIS *et al*, 2006) (Figura 6).

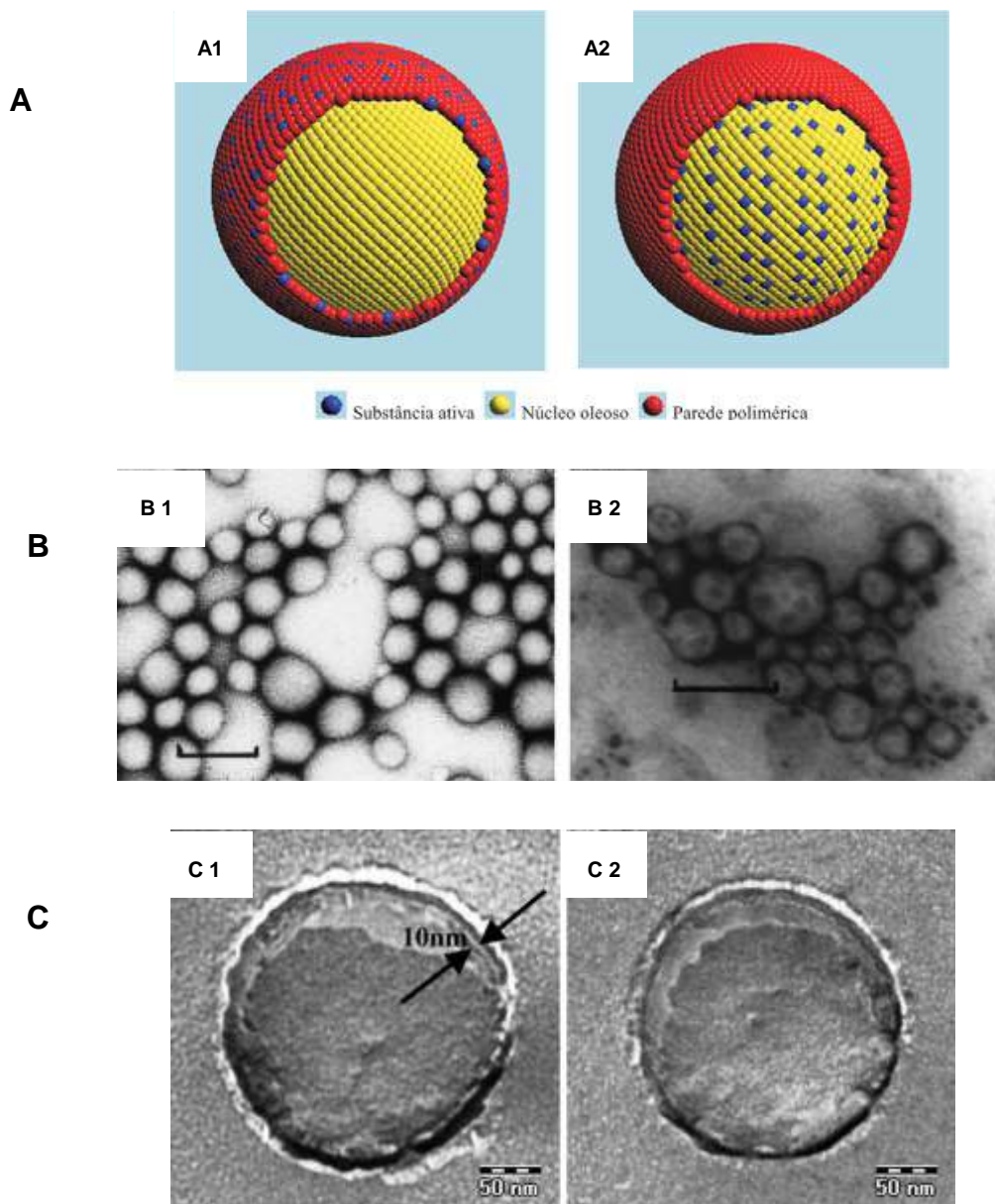


Figura 06 – A: Representação esquemática de nanoesferas (A1) (sistema de matriz) e nanocápsulas (A2) (sistema de reservatório); B: Microscopia eletrônica de transmissão de nanoesferas de Poli (ácido lático-co-glicólico) contendo Xantona (B1) e 3-Metoxixantona (B2) (escala: 150nm); C: Microscopia eletrônica de transmissão de nanocápsulas de Poli (ácido lático) com membrana polimérica estimada a 10 nm. Área do núcleo estimado em 125nm (C1) e 115nm (C2). Adaptado de SCHMALTZ *et al*, 2005; TEIXEIRA *et al* 2005 e RÜBE *et al*, 2005.

Nanoesferas são sistemas nos quais os fármacos encontram-se retidos ou molecularmente dispersos no interior da matriz polimérica ou ainda adsorvidos na sua superfície. Já nanocápsulas são sistemas vesiculares constituídos por um invólucro polimérico disperso ao redor de um núcleo, no qual os fármacos são encerrados, dissolvidos na cavidade aquosa ou oleosa, e/ou adsorvidos à parede polimérica. Pode ser considerado um sistema reservatório (SCHAFFAZICKI & GUTERRES, 2003; REIS *et al*, 2006).

De maneira geral, as aplicações de sistemas micro/nanoparticulados são possíveis graças às propriedades destes sistemas em isolar o agente ativo do meio externo, e até certo ponto possibilitarem o controle da liberação destes agentes no momento pretendido. Tais aplicações estão sendo usadas e testadas com os mais diferentes objetivos:

- Mascaramento de sabor (TARVER, 2006);
- Proteção de fármacos lábeis: vitaminas, hormônios, isotretinoína (BOUCHEMAL *et al*, 2004; DUBEY, *et al*, 2006; DINIZ, 2008;);
- Liberação sustentada e controlada: antibacterianos, antineoplásicos, antiinflamatórios, imunossupressores (NHUNG *et al*, 2007; ALVES *et al*, 2005; LAU *et al*, 2005; LIU *et al*, 2005)
- Vetorização de fármacos (BHARALI *et al*, 2005);
- Biotecnologia: diagnósticos, terapia gênica, biosíntese (NIEMEYER, 2001; WEISSLEDER *et al*, 2005).

Sistemas nanoparticulados são geralmente constituídos por matrizes poliméricas, no entanto, podem também ser obtidos, utilizando-se proteínas, ceras e lipídeos. Vários polímeros têm sido utilizados no preparo de nanopartículas, dentre os quais polímeros naturais ou sintéticos, hidrofílicos ou hidrofóbicos, biodegradáveis ou não biodegradáveis (Quadro 1) (ANDREO-FILHO & OLIVEIRA, 1999; MOINARD-CHÉCOLT *et al*, 2008, LEGRAND *et al*, 2007).

Sistemas obtidos com polímeros hidrofílicos são normalmente utilizados quando se pretende a liberação do fármaco em curto período, já que as micro/nanopartículas constituídas por polímeros hidrofílicos não necessitam sofrer qualquer degradação para se dissolverem no meio biológico. Ao contrário, sistemas

contendo polímeros biodegradáveis necessitam sofrer algum tipo de reação no organismo. Partículas obtidas com essa classe de polímeros possibilitam maior controle na liberação de fármacos, uma vez que alguns desses se decompõem em poucas horas, outros podem resistir à degradação durante dias ou semanas (ANDREO-FILHO & OLIVEIRA, 1999). Portanto, as propriedades químicas e físico-químicas da partícula, bem como do polímero são de grande importância e podem influenciar a elaboração de sistemas micro/nanoparticulados quando se pretende a liberação controlada, prolongada ou vetorização de fármacos. Dessa forma, o fármaco passa a ser dependente do sistema no qual ele está contido (SOPPIMATHA *et al*, 2001; AHSAN, *et al* 2002).

Quadro 01: Polímeros utilizados no preparo de nanopartículas. Fonte: ANDREO-FILHO & OLIVEIRA, 1999; MOINARD-CHÉCOLT *et al*, 2008, LEGRAND *et al*, 2007.

Naturais	Sintéticos
Albumina	Poli(cianoacrilato de alquila) (PACA)
Colágeno	Poliésteres: Poli(ácido lático) (PLA)
Gelatina	Poli(ácido glicólico) (PLG)
Polissacarídeos: Celulose	Poli(ácido lático-co-glicólico)
Quitosana	(PLGA)
Alginatos	Poli(ϵ -caprolactona) (PCL)

2.6.1. Métodos de preparo

Os métodos para obtenção desses sistemas podem ser divididos em dois grandes grupos: baseados na polimerização de monômeros (métodos químicos) ou na

precipitação de polímeros pré-formados (métodos físicos ou físico-químicos). Desses, alguns podem ser destacados: métodos químicos (polimerização/ policondensação/ copolimerização interfacial), métodos físicos ou mecânicos (revestimento em leito fluidizado, centrifugação multiorifício, revestimento em turbinas e *spray drying*, dentre outros), métodos físico-químicos (processos de coacervação/ separação de fases, evaporação do solvente, dentre outros) (ANDREO-FILHO & OLIVEIRA, SOPPIMATHA *et al*, 2001; BOUCHEMAL *et al*, 2004; KOO *et al*, 2005; RÜBE *et al*, 2005; REIS *et al*, 2006; ANTON *et al*, 2008).

O método físico *spray drying*, além de ser utilizado para a obtenção de partículas, também pode ser aplicado para a secagem de suspensões de partículas preparadas por outros métodos. Nesse processo as partículas são obtidas a partir da secagem de uma solução ou dispersão do polímero com o fármaco, sendo esse líquido atomizado na forma de pequenas gotículas, em meio a uma corrente de ar aquecido, onde cada gotícula seca forma uma partícula individual (ANDREO-FILHO & OLIVEIRA, 1999; REIS *et al*, 2006).

Os métodos físico-químicos compreendem diferentes técnicas, dentre as quais aquela utilizada por Bouchemal e colaboradores (2006), que prepararam nanocápsulas poliméricas combinando um simples estágio de emulsificação seguido de uma reação de polimerização interfacial (método químico). A emulsificação espontânea foi rápida gerando vesículas oleosas de 100 a 400nm, nas quais ocorreram subseqüentemente uma reação de policondensação, demonstrando ser este, um método interessante para preparação de nanopartículas poliméricas.

Já Moinard-Chécot e colaboradores (2008) prepararam nanopartículas apresentando de 100 a 500nm, através do método físico-químico de emulsificação/difusão do solvente. Nesse processo dois solventes parcialmente miscíveis foram emulsionados convencionalmente, seguido da eliminação do solvente orgânico presente na fase oleosa, fase esta que continha o polímero PCL. Essa etapa causou a separação do polímero e redução do tamanho da partícula e foi seguida da evaporação do solvente através de pressão reduzida.

Outro processo explorado é a coacervação que ocorre devido a separação de fase de um ou mais hidrocolóides e subseqüente deposição desses sobre o fármaco suspenso ou emulsionado no meio, dando origem a fase coacervada. Pode ser simples (devido a mudanças de pH, força iônica, polaridade do meio ou temperatura)

ou complexa (devido à adição de outro colóide de carga oposta) (ANDREO-FILHO & OLIVEIRA, 1999; REIS *et al*, 2006).

Outras técnicas físico-químicas têm sido descritas para a preparação de dispersões coloidais contendo núcleo oleoso. Dentre essas incluem *salting-out*, emulsificação/evaporação e nanoprecipitação, as quais envolvem um solvente orgânico, como fase interna, e um solvente aquoso contendo estabilizante, constituído de meio dispersante para as nanopartículas (ANDREO-FILHO & OLIVEIRA, 1999; SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003; REIS *et al*, 2006)

O método *salting-out* se baseia na separação de um solvente miscível em água, como por exemplo, a acetona, de uma solução aquosa, através do efeito *salting-out*. A emulsão O/A formada e diluída com volume suficiente de água permite a difusão da acetona na fase aquosa o que induz a formação das partículas. Esse efeito é resultado da remoção de moléculas de água como solvente devido à hidratação competitiva de outros íons (AULTON *et al*, 2005; REIS *et al*, 2006).

Na emulsificação/evaporação do solvente, a fase orgânica (contendo o polímero) deve ser emulsionada com fase aquosa, seguido da evaporação do solvente, o que leva à formação das partículas. Já na nanoprecipitação ocorre rápida desolvatação do polímero, quando uma solução dele, é adicionada a um não solvente. Em contato, a fase orgânica (solvente) se difunde para a água (não-solvente) carreando as cadeias poliméricas, que se agregam formando as nanopartículas (ANDREO-FILHO & OLIVEIRA, 1999; MOINARD-CHÉCOLT *et al*, 2008, LEGRAND *et al*, 2007).

Fessi e colaboradores (1989) desenvolveram e aperfeiçoaram um método de preparação de nanocápsulas baseado no princípio da nanoprecipitação, denominado Processo de Preparação de Sistemas Coloidais de Substâncias na Forma de Nanopartículas, o qual gerou a patente de nº 5.118.528, dos Estados Unidos, de 1992. Eles relataram o mecanismo de formação do nanossistema como um fenômeno hidrodinâmico interfacial complexo, explicado através da turbulência interfacial ou agitação espontânea da interface entre duas fases líquidas sem equilíbrio. Esse sistema envolveu processos de fluidez, difusão e superfície, sendo governado pelo notório *Efeito Marangoni*, no qual o movimento na interface é causado por variações longitudinais de tensão interfacial (STERNLING *et al*, 1959, *apud* FESSI *et al*, 1989). Relataram ainda, que a turbulência interfacial pode ser

promovida por vários fatores, como a remoção do soluto da fase de maior viscosidade, gradiente de concentrações excessiva e próxima da interface, suscetível tensão interfacial e a presença de tensoativo anulando a fluidez interfacial, o que geraria a fuga do solvente orgânico para a fase aquosa e conseqüente formação do núcleo oleoso como resultado da diminuição da tensão interfacial e migração do polímero insolúvel em direção à interface O/A, onde é depositado, formando assim, o invólucro da nanopartícula. Os parâmetros interferentes na obtenção desses nanosistemas são: solubilidade do fármaco, composição, concentração e peso molecular do polímero, proporção fármaco/polímero, solvente orgânico empregado, tipo e concentração do emulsificante utilizado, temperatura e velocidade de agitação, viscosidade e proporção de volume das fases dispersa e contínua. Atendendo a essas variáveis, Fessi e colaboradores (1989) promoveram a formação instantânea e reproduzível de nanocápsulas, que exibiram alta capacidade de encapsulação de diferentes fármacos.

São vários os métodos de produção de nanopartículas estudados, entretanto, a obtenção de nanosistemas com alto rendimento, distribuição de tamanho de partícula homogêneo, adequados ao uso pretendido (tipo de liberação desejada e a via de administração a ser empregada) continua sendo um dos maiores desafios dos pesquisadores, já que dependendo do método, composição quali-quantitativa, condições operacionais, solubilidade e partição do fármaco, esses objetivos podem ser dificultados (BROOKING *et al*, 2001; SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003; LEGRAND *et al*, 2007).

Dessa forma, o desenvolvimento, preparação e caracterização de nanopartículas passam a ser cruciais e se concentram em pontos como a compreensão de seu comportamento físico-químico e/ou modificações (aprimoramentos) que criem novas rotas ou melhorem outros métodos de funcionalização química dessas partículas. Vale ressaltar recentes avanços nessa área, os quais possibilitaram a liberação do primeiro sistema nanoparticulado pelo Food and Drug Administration (FDA), o produto Abraxane[®] em 2006. Esse produto é uma reformulação do fármaco Paclitaxel e consiste em nanopartículas de Albumina ($\pm 130\text{nm}$) em que o fármaco está ligado reversivelmente.

2.6.2. Estabilidade de nanopartículas poliméricas

A estabilidade de um nanosistema é imprescindível em todas as etapas, desde sua produção e armazenamento, até a liberação do fármaco. O estudo da estabilidade deve incluir a caracterização do produto final e a avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento da formulação contendo as nanopartículas poliméricas. Fatores interferentes nesse estudo são as características da suspensão polimérica e as condições do meio ambiente. No primeiro caso são importantes: o aspecto macroscópico, morfológico, tamanho e distribuição de tamanho da partícula, composição quali-quantitativa, potencial zeta, pH das suspensões, taxa de associação e da forma de associação do fármaco e cinética de liberação do fármaco. Dentre os fatores ambientais podem ser mencionados temperatura, luz e oxigênio. Esses fatores podem iniciar reações químicas e físicas, como alterações no tamanho e distribuição de tamanho das partículas, agregação das nanopartículas no meio, formação de precipitados, oxidação e hidrólise de componentes do sistema (SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003; WANG *et al*, 2007).

Dessa forma, a caracterização e estudo da estabilidade físico-química de sistemas poliméricos fornecem informações que conduzem a propostas de modelos capazes de descrever a organização das nanopartículas e prever sua estabilidade em função do tempo.

2.7. Metodologias empregadas na caracterização físico-química de sistemas poliméricos

2.7.1. Avaliação morfológica

Para avaliação morfológica têm sido bastante empregadas as microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e de transmissão (MET). Essas técnicas oferecem informações referentes à forma e tamanho das nanopartículas, com o diferencial da determinação da espessura da parede e diferenciação entre o tipo de nanopartícula formada (nanocápsula ou nanoesfera) quando a MET é aplicada.

Freitas e Marchetti (2005) demonstraram através de MEV que as nanopartículas de PLA preparadas a partir da técnica de emulsificação/evaporação do solvente eram

nanoesferas. Em outro estudo Govender e colaboradores (1999) observaram por MET a forma esférica e discreta das nanocápsulas de PLGA preparadas com cloridrato de procaína (Figura 7). Nesta técnica foi realizada a contrastação negativa que consistiu no envolvimento das estruturas por um meio eletro-denso (solução ácida fosfotúngstica), as quais se apresentaram como um negativo, ou seja, a estrutura estudada apareceu em cor clara, mais transparente aos elétrons do que ao fundo da preparação.



Figura 07 – Morfologia de nanocápsulas de Poli (ácido láctico-co-glicólico) obtida através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão com contrastação negativa (Fonte: GOVENDER *et al*, 1999).

Já Kim e colaboradores (2008) prepararam nanocápsulas contendo carbono e demonstraram sua morfologia através de MEV e MET com criofatura, essa última, uma técnica que permite manter a estrutura observada intacta. Essas técnicas foram eleitas, já que as informações obtidas foram imprescindíveis na demonstração da presença de resíduos de carbono amorfo na amostra, como também a interferência sofrida pelas nanocápsulas após os processos de purificação a que foram submetidas (Figura 8).

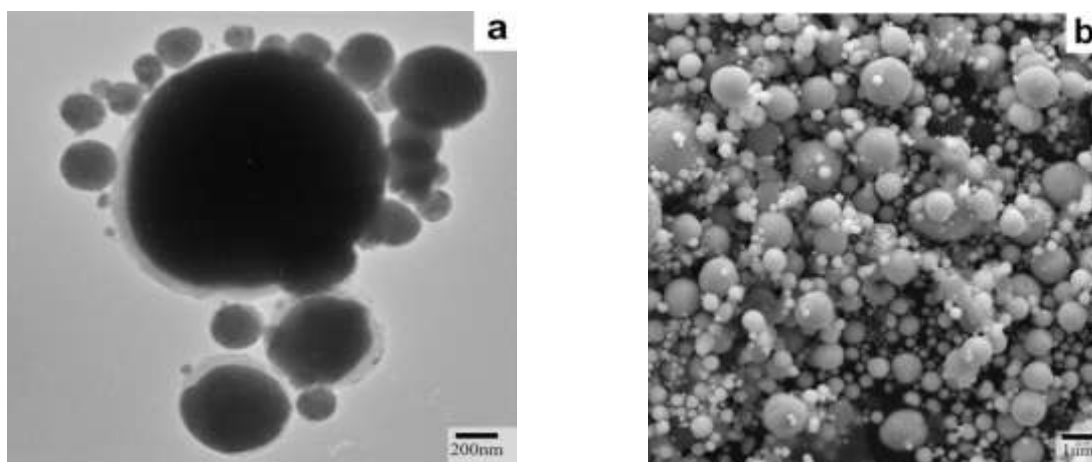


Figura 08 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (a) e microscopia eletrônica de varredura (b) de nanocápsulas contendo carbono após purificação magnética. Fonte: KIM *et al*, 2008.

2.7.2. Tamanho e distribuição do tamanho das partículas

A determinação e controle do diâmetro das partículas dos sistemas nanoparticulados é imprescindível, já que, a eficiência de encapsulação de um fármaco e seu comportamento *in vivo* estão diretamente relacionadas ao tamanho das partículas. Por exemplo, a medida recomendada do tamanho de partícula para aplicação tópica é menor que 600nm, sendo para tanto indicados sistemas nanométricos, para aplicação farmacêutica e cosmética, como nanocápsulas destinadas a uma liberação homogênea (BOUCHEMAL *et al*, 2004).

Os métodos mais utilizados são: Espalhamento de luz, que possibilita a determinação do raio hidrodinâmico das partículas em suspensão e MEV ou MET, que fornecem a imagem da partícula isolada do meio, conforme citado no item anterior.

2.7.3. Espalhamento de luz (*Dynamic Light Scattering*)

Espalhamento de luz ou *Dynamic Light Scattering* (DLS) é uma medida do movimento browniano das partículas, o qual é relatado pelo diâmetro hidrodinâmico quando o feixe de luz incide sobre as mesmas. A intensidade de espalhamento de luz detectada está diretamente relacionada à velocidade de difusão das partículas,

determinada por seu tamanho, que ocorre tanto mais rápida quanto menor forem as partículas. Em certo ponto, a medida da luz difundida através de um sistema nanométrico varia com o tempo, representando a soma de ondulações difundidas individualmente através das partículas. A análise dessas flutuações permite medir o coeficiente de difusão (D) das partículas, o qual é usado para determinar o diâmetro hidrodinâmico (d(H)) médio considerando-se as partículas como esferas perfeitas (LIMA, 1995; MOINARD-CHÉCOT *et al*, 2008; DYNAMIC LIGHT SCATTERING, 2008).

$$d(H) = \frac{KT}{3\pi\eta D}$$

Equação de Stokes – Einstein

Onde:

d (H): Diâmetro Hidrodinâmico;

D: Coeficiente de difusão;

K: Constante de Boltzmann;

T: Temperatura absoluta;

η : Viscosidade do meio.

De maneira geral, a diluição da suspensão é requerida, podendo ser realizada em água purificada, onde as nanopartículas devem apresentar uma distribuição unimodal, ou seja, com baixo índice de polidispersão. Estudos indicam que as nanopartículas apresentam diâmetros médios entre 100 e 300nm, no entanto, partículas podem ser obtidas com diâmetros em torno de 50 a 70nm. Esses parâmetros podem ser influenciados por diferentes condições, como a composição quali-quantitativa e o método de preparação das nanopartículas (SHAFFAZICK *et al*, 2003; MULLER *et al*, 2004; MOINARD-CHÉCOT *et al*, 2008).

A determinação do tamanho das partículas pode indicar a tendência à agregação e sedimentação das nanopartículas dispersas, em função do tempo, o qual pode ser monitorado pela determinação de mudanças na distribuição de tamanho das partículas e, portanto demonstra ser uma ferramenta importante na avaliação da estabilidade dos nanosistemas (SHAFFAZICK *et al*, 2003; MULLER *et al*, 2004; BOUCHEMAL *et al*, 2006).

2.7.4. Espalhamento de nêutrons a baixos ângulos (SANS)

Um método alternativo vem sendo utilizado para obtenção da forma e tamanho da partícula, o Espalhamento de nêutrons a baixos ângulos (SANS). Essa técnica permite a caracterização de estruturas ou objetos em escala nanométrica, na faixa entre 01 e 200nm. As informações que SANS pode extrair são o tamanho médio, distribuição de tamanho e correlação espacial das estruturas em nanoescala, bem como a forma e estrutura interna das partículas (núcleo da estrutura). SANS é uma técnica não invasiva, amplamente usada em várias áreas, com o objetivo de caracterizar partículas (em solução ou granel), grupos e/ou moléculas ou precipitados na faixa de tamanho nanométrico. É realizado um contraste de interface, com correspondente simulação numérica estatística, que possibilita a compreensão do modelo da estrutura núcleo-membrana na nanopartícula, a qual pode ser observada através de outras técnicas microscópicas. Estudos relatam que o melhor é combinar diferentes métodos, como SANS, DLS e MET, complementando-os (RÜBE *et al*, 2005).

Rübe e colaboradores (2005) estudaram a influência de PLA e Poloxamer 188[®] na espessura da membrana de nanocápsulas, através do detalhamento da imagem interior das nanopartículas. Utilizaram os métodos SANS, DLS e MET. Os resultados forneceram informações, através da técnica de SANS, sobre a espessura da membrana de PLA (9,8nm) estabilizada com Poloxamer 188[®] (17nm), as quais concordaram com DLS. Concluíram, portanto que SANS é uma técnica apropriada para o fornecimento de informações sobre a espessura da membrana de nanocápsulas.

2.7.5. Composição quali-quantitativa

A composição quali-quantitativa pode influenciar na formação e estabilidade das nanopartículas poliméricas. É reconhecida na literatura científica, a influência dos diferentes componentes e concentrações utilizadas na produção de dispersões poliméricas, sendo normalmente preparada a partir de uma fase interna ou dispersa lipofílica (composta por um ou mais solventes orgânicos, componente oleoso, tensoativo lipofílico e polímero) e uma fase externa ou dispersante hidrofílica (composta por um solvente aquoso contendo tensoativo hidrofílico). Assim, o fármaco deve ser incorporado na fase que apresenta solubilidade e partição compatíveis (FESSI *et al*, 1989).

Portanto todos os componentes devem ser escolhidos a partir de suas afinidades e atuações na formação e estabilidade do sistema.

➤ Solventes orgânicos:

Os solventes orgânicos devem apresentar além de afinidade pelo polímero, baixa solubilidade em água, mas capacidade de se difundir da fase orgânica para a fase aquosa. Estas características podem ser atribuídas à habilidade que o solvente orgânico apresenta em dissolver o polímero, pois assim promove maior rendimento do produto final, controle do tamanho da partícula e eficiência de encapsulação do fármaco, além da baixa solubilidade em água que gera maior estabilidade da suspensão, pois conduz a formação de partículas esféricas, sem poros e melhor distribuição de tamanho e capacidade de difusão do solvente para a fase aquosa.

Em estudo realizado por Cegmar e colaboradores (2004) nanopartículas de PLGA e Resomer[®] RG 503H (copolímero) contendo cistatina foram preparadas na presença dos sistemas solventes, acetato de etila e diclorometano e acetona (1:1). Os resultados demonstraram a influência dos diferentes solventes, sendo que o tamanho das partículas variou entre 254 a 1505nm para acetato de etila e 235 a 1634nm para diclorometano e acetona (1:1). O tamanho da partícula variou também quando parâmetros referentes ao processo de produção foram modificados.

➤ Tensoativos:

A presença dos tensoativos possibilita a atuação dos solventes orgânicos na formação das nanopartículas poliméricas, que ao reduzirem a tensão interfacial do sistema promovem a formação do núcleo oleoso e migração do polímero insolúvel

em direção à interface O/A onde é depositado. Após a formação das nanopartículas a evaporação do solvente orgânico é situação imprescindível para a estabilidade do sistema (FESSI *et al*, 1989; O'DONNELL *et al*, 1997; FREITAS & MARCHETTI, 2005).

Dependendo das características físico-químicas dos tensoativos, como viscosidade e equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL), é possível obter diferentes tamanhos e distribuição de tamanho de partículas. Quando adequadamente selecionados conferem ao sistema redução da tensão interfacial, formação de filme resistente, que reveste e evita a aglomeração das nanopartículas e conseqüentemente garante a estabilidade coloidal (PUGLISI *et al*, 1995; SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003; MULLER *et al*, 2004; FREITAS & MARCHETTI, 2005). Por exemplo, Khoe e Yaghoobian (2008) observaram que ao prepararem nanocápsulas de Poli butil adipato (PBA) na presença de diferentes tensoativos (Tween[®] 20 e 60; Span[®] 20 e 60) houve maior encapsulação do fármaco Penicilina-G quando a concentração dos tensoativos foi aumentada, com destaque para Tween[®] 60 que apresentou incremento de 24,62 para 76,80% quando sua concentração aumentou de 2 para 16%.

➤ Fase oleosa:

A influência de substância oleosa (fase oleosa), como o óleo de soja, Mytriol[®] 318 ou Mygliol[®] é dependente da nanopartícula que se pretende formar. No caso de nanocápsulas, essas substâncias influenciam notadamente na forma e taxa de associação do fármaco, que nesse caso não são estritamente dependente do coeficiente de partição do fármaco entre a fase oleosa e aquosa (GOVENDER *et al*, 1999; SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003). Em estudo realizado por Teixeira e colaboradores (2005) nanocápsulas foram preparadas a partir de PLGA, Pluronic[®] 68, lecitina de soja, Mytriol[®] 318 e os fármacos xantona (600µg/mL) e 3-metoxixantona (1400µg/mL). A eficiência de encapsulação para os dois fármacos foi dependente da quantidade de fármaco e óleo contida no núcleo da nanocápsula. Quando essas quantidades variaram de 0,5 para 0,6mL de óleo foi observada variação de 90% para 82% de fármaco (quando xantona variou de 600 para 1440µg/mL) e 80% para 83% de fármaco (quando 3-metoxixantona variou de 1400 para 3360µg/mL). Os autores concluíram que a solubilidade dos fármacos no óleo contido no núcleo foi determinante para o aumento da eficiência de encapsulação,

destacando que os tamanhos das partículas apresentaram-se entre 271 e 280nm, bem como o PDI entre 0,37 e 0,48.

➤ Polímeros e copolímeros:

Outro componente das nanopartículas que alteram suas características físico-químicas influenciando sua formação e estabilidade é o polímero.

Os polímeros pré-formados e biodegradáveis mais empregados na preparação de nanocápsulas são poliésteres de ácidos, dentre os quais D, L-PLA, D, L-PLGA, PCL e PACA (GREF & COUVREOUR, 2006).

Em meio aquoso os poliésteres tendem a sofrer hidrólise através do rompimento de suas ligações ésteres, tornando-se ácidos hidroxicarboxílicos atóxicos, os quais são metabolizados no organismo e eliminados na forma de água e dióxido de carbono, pela via do ácido cítrico ou via de Krebs (KIBBE, 2000).

Dentre os polímeros mencionados mereceu destaque o D, L- PLA, o qual tem como nome genérico e químico (CAS), PLA, poli (ácido láctico) e ácido propiônico, 2-hidróxihomopolímero, respectivamente. É solúvel na maioria dos solventes orgânicos, como cloreto de metileno, tetrahidrofurano, acetato de etila, acetona, clorofórmio e hexafluoroisopropanol (KIBBE *et al*, 2000). No quadro 2 estão apresentadas as principais características físico-químicas desse polímero.

Quadro 02- Propriedades físico-químicas do polímero D, L- PLA (KIBBE, 2000).

Fórmula geral	Ponto de fusão (°C)	Densidade (g/mL)	Viscosidade (dL/g)	Massa molecular (Da)	Cor
- (C ₃ H ₆ O ₃) _n	Amorfo	1,25	0,5-0,8 (clorofórmio)	40000- 100000	Branco

Portanto, o polímero deve apresentar características especiais, pois dependendo de sua massa molar ou distribuição de massa molar, antes e após a preparação do sistema, situações podem ser previstas. Por exemplo, ao se

depositar na interface podem diminuir ou não o tamanho das partículas, devido à redução da energia livre interfacial do sistema (no método de polimerização interfacial) ou a partir do efeito estabilizador do polímero ao redor das gotículas (no método de deposição de polímero pré-formado). Além disso, modificações na quantidade de polímero, como aumento da concentração, podem propiciar colisões resultando em fusão das partículas com conseqüente aumento de tamanho (JEFFERY *et al*, 1991, *apud* FREITAS & MARCHETTI, 2005).

Youan e colaboradores (2001) demonstraram que nanopartículas preparadas através da técnica de evaporação do solvente apresentaram aumento da encapsulação do fármaco, sem aumento no diâmetro médio da partícula, quando a concentração do polímero em volumes fixos dos solventes usados foi aumentada.

Bouchemal e colaboradores (2004) produziram e avaliaram nanocápsulas de poli (éter uretano) na presença de etilenoglicol e polietilenoglicóis. O fármaco encapsulado foi o α -tocoferol, o qual apresentou 85,6% de eficiência de encapsulação quando o etilenoglicol foi usado, sendo elevada para 92,2% com polietilenoglicol 600, havendo, entretanto, aumento no tamanho da partícula de 232 para 615nm. Os autores observaram que o aumento na eficiência de encapsulação foi proporcional ao peso molecular dos polióis usados, com conseqüente aumento no diâmetro da partícula.

Por outro lado, Cegnar e colaboradores (2004) verificaram interações entre o fármaco hidrossolúvel, cistatina, e os polímeros mais hidrossolúveis testados, os quais apresentaram maior eficiência de encapsulação. Para tanto, foram produzidas nanocápsulas a partir dos polímeros PLGA, PVA e copolímeros Resomer[®] RG 502 (12 KDA), RG 502H (12 KDA) e 503H (48 KDA), os quais apresentaram respectivamente 12%, 57% e 45% de eficiência de encapsulação. Os resultados foram atribuídos às diferenças de peso molecular, viscosidade e esterificação dos copolímeros, ressaltando que, a ausência de esterificação sobressaiu aos demais parâmetros.

Dessa forma, os copolímeros ocupam lugar de destaque na formação de nanocápsulas. Dentre vários copolímeros, o Poloxamer[®] 188 (copolímero do óxido de etileno e propileno), de natureza não iônica, vem sendo indicado por diferentes estudos para a preparação de nanossistemas estáveis, já que age como estabilizador do polímero principal, interferindo em sua deposição ao redor das gotículas

formadas (FESSI *et al*, 1989; SILVA *et al*, 2006). Tadros e colaboradores (1996, *apud* Rüber *et al*, 2005) descreveram o princípio da estabilização estérica de um copolímero bloco. Propuseram que ele adsorve, com sua porção hidrofóbica para o centro, ou seja, na superfície do núcleo da nanocápsula, e porções hidrofílicas para fora, ou seja, direcionadas para o meio aquoso. Por meio disso, criam uma barreira mecânica com espessura em torno de 10nm, a fim de permitir a estabilização estérica. Rube e colaboradores (2005) demonstraram através da técnica de SANS a influência do Poloxamer 188[®] na espessura da membrana do núcleo de nanocápsulas de PLA preparadas através da técnica de nanoprecipitação. Definiram um modelo provável para a espessura da membrana da nanocápsula, em que, a membrana formada por PLA foi 9,8nm, o diâmetro médio do núcleo oleoso (contendo Miglyol) 84,0nm e a membrana formada pelo Poloxamer 188[®], quando 7,0% foi usado, de 17nm. O modelo detalhado para descrever as nanocápsulas está representado na Figura 9 onde o núcleo oleoso foi rodeado por uma ou mais membranas concêntricas. A primeira membrana foi formada por PLA e a segunda por Poloxamer 188[®], o qual agiu como um estabilizador hidrofílico rodeado por solvente aquoso, ou seja, a fase externa da suspensão polimérica.

Assim, a diferença entre os diâmetros de partículas, como também a previsão de estabilidade alcançada, a partir de nanocápsulas preparadas na presença ou ausência de Poloxamer[®] 188 tornou-se mais clara. Fessi e colaboradores (1989) afirmaram que as nanocápsulas de PLA preparadas por seu grupo de pesquisadores, necessitaram de um ou mais tensoativos, entretanto, a presença de Poloxamer 188[®] foi imprescindível para a estabilidade física da nanosuspensão polimérica.

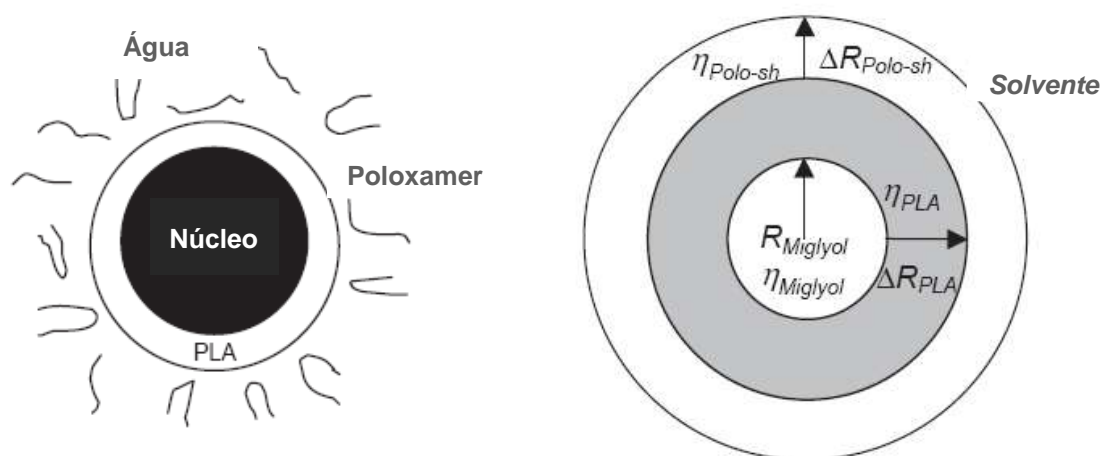


Figura 09 – Representação esquemática e esquema simplificado do modelo de nanocápsulas preparadas a partir de Mygliol[®], PLA e Poloxamer 188[®]. Adaptado de Rüber *et al*, 2005.

➤ **Fármacos:**

Diferenças entre os nanosistemas podem ser atribuídas aos demais constituintes da formulação, com merecido destaque para o fármaco, que pode alterar significativamente o comportamento do sistema devido às suas características físico-químicas. Diversos estudos demonstram a influência ou não do fármaco no diâmetro médio das partículas (FESSI *et al*, 1989; GUTERRES *et al*, 1995; GOVENDER *et al*, 1999; FREITAS & MARCHETTI, 2005). Em seu trabalho de revisão Schaffazick e Guterres (2003) mencionam que dependendo do método de preparação, por exemplo, através do método de polimerização, o fármaco pode influenciar o processo de nucleação, conduzindo a partículas maiores com ampla distribuição de tamanho, mas quando aplicado o método de precipitação do polímero, o fármaco na fase orgânica, antes da precipitação do polímero em meio aquoso, pode ou não influenciar o diâmetro médio das partículas. Essas alterações podem indicar a manutenção ou queda da estabilidade do nanosistema formado.

➤ **Fase externa:**

A fase externa composta por solvente aquoso também pode influenciar no perfil das nanosuspensões. Diversos trabalhos relatam preparação bem sucedida, de nanopartículas poliméricas a partir de meios como água purificada, solução salina e

tampões de diferentes pH. Entretanto, de acordo com a composição qualitativa da suspensão polimérica esses meios podem influenciar na estabilidade almejada. Govender e colaboradores (1999) demonstraram que a variação de pH da solução aquosa usada como fase dispersante das nanopartículas, influenciou o fármaco quanto à sua ionização e solubilidade. Quando o pH foi aumentado a solubilidade do fármaco cloridrato de procaína foi diminuído, o que proporcionou maior eficiência na encapsulação. De maneira semelhante Fessi e colaboradores (1989) acidificaram a fase aquosa da suspensão a fim de limitar a solubilidade do fármaco nesta fase, proporcionando assim melhores condições para a encapsulação do fármaco no cerne da nanopartícula. Outros estudos mencionam que a presença de eletrólitos e sais na fase aquosa pode alterar as características das nanosuspensões, levando à instabilidade desses sistemas (STOLNIK *et al*, 1995; GOVENDER *et al*, 1999).

Dessa forma, diferentes estudos concordam acerca da influência dos constituintes na estabilidade das nanosuspensões, além de ampliar a compreensão do comportamento físico-químico das nanopartículas poliméricas.

2.7.6. pH

Informações relevantes sobre a estabilidade de suspensões coloidais nanoparticuladas podem ser obtidas através do monitoramento do pH em função do tempo. Além dos estudos mencionados no último item (2.7.5), sobre a influência do pH da fase externa na solubilidade do fármaco, o pH também revela a estabilidade dos polímeros. Isto porque podem ser verificadas alterações da massa molar dos mesmos (quando poliésteres), mediante queda de pH. Esse fato pode ser atribuído à sua hidrofobicidade, a qual pode acarretar em hidrólise ou ionização de seus grupos carboxílicos (CALVO *et al*, 1996; LOPES *et al*, 2000; SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003).

Stolnik e colaboradores (1995) prepararam nanoesferas de PLGA, na ausência de tensoativos e relataram que o grau de ionização da superfície dos grupos ácidos carboxílicos do polímero, em tampão pH 9,3, contribuiu para maior estabilidade do sistema, o que corrobora com os demais estudos mencionados.

2.7.7. Potencial zeta

De acordo com Schaffazick e Guterres (p. 730, 2003):

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão.

Este parâmetro é determinado através de medidas de mobilidade eletroforética e vem sendo amplamente aplicado em estudos com nanosistemas, destacando que as características da superfície das partículas auxiliam tanto na caracterização e estudo da estabilidade, quanto na resposta biológica do fármaco associado (AHSAN *et al*, 2002; CUI *et al*, 2006; TEIXEIRA *et al*, 2007; LIU *et al*, 2007; RAWAT *et al*, 2008; HOELLER *et al*, 2009).

Diferentes estudos sugerem que os componentes das nanopartículas como os polímeros, tensoativos, fosfolipídeos, bem como o próprio fármaco são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial zeta. Dentre esses, os polímeros (poliésteres) como o PLA, PLGA e as lecitinas fornecem um potencial negativo à interface, enquanto os tensoativos não-iônicos tendem a reduzir o valor absoluto deste parâmetro (LIU *et al*, 2007; RAWAT *et al*, 2008; HOELLER *et al*, 2009).

Em geral, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, já que grandes forças repulsivas previnem a agregação das partículas (SHAFFAZICK *et al*, 2003).

Rawat e colaboradores (2008) prepararam microesferas de PLGA na presença de três tensoativos (Tween[®] 80, Polietilenoimina e Estearilamina) e constataram que os agentes catiônicos aumentaram o potencial zeta de -1,49 para +2,55 e +3,80mV, devido à neutralização parcial do polímero e da heparina (fármaco contido no sistema).

Em outro estudo, nanoemulsões contendo Flumetasona foram preparadas a partir de Tween[®] 80, sucrose e laureato. Testes de permeação cutânea foram realizados com os nanosistemas e os resultados sugeriram que cargas mais positivas são mais eficazes em termos de difusão cutânea (HOELLER *et al*, 2009).

2.7.8 Calorimetria exploratória diferencial

De acordo com Mothé e Azevedo (p. 115, 2002) a Calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica que:

[...] mede a diferença de energia necessária à substância e a um material inerte de referência, inerte de modo térmico, enquanto ambos são submetidos a uma variação controlada de temperatura, de maneira que a amostra e referência sejam mantidas em condições isotérmicas, uma em relação à outra, independente do evento térmico que esteja ocorrendo.

Dessa forma, as medidas de temperatura e fluxo de calor associado com as transições dos materiais em função da temperatura e do tempo fornecem informações qualitativas e quantitativas sobre mudanças físicas e químicas que envolvem processos endotérmicos e exotérmicos, bem como mudanças de capacidade calorífica. Portanto, essa técnica permite realizar medidas específicas como, transição vítrea, temperatura e tempo de cristalização, ponto de fusão, calor específico, oxidação, pureza, estabilidade térmica, ponto de ebulição, cinética de reação e outros (MOTHÉ & AZEVEDO, 2002; FUKUSHIMA *et al*, 2009; SURYANEGARA *et al*, 2009).

A DSC é uma técnica interessante para avaliar a compatibilidade da mistura quando polímeros são empregados, já que sua transição vítrea pode ser medida. “A transição vítrea pode ser definida como a temperatura na qual as cadeias moleculares começam a adquirir energia suficiente para vencer as forças atrativas e mover-se de forma translacional e vibracional” (MOTHÉ & AZEVEDO, 2002, p. 119). Assim, essa técnica pode ser bastante relevante na avaliação de nanopartículas poliméricas (LEO *et al*, 2000; SURYANEGARA *et al*, 2009).

Leo e colaboradores (2000) avaliaram por DSC microesferas contendo ibuprofeno e verificaram diferentes características térmicas das amostras como, transição vítrea, temperatura e tempo de cristalização e ponto de fusão. Quanto às microesferas formadas sugeriram que o fármaco associou-se a elas durante a evaporação do solvente (etapa do processo de produção), já que o pico das microesferas apresentou-se mais amplo na presença do fármaco.

Em estudo realizado por Corrigan e colaboradores (2009), nanocápsulas de PLGA contendo cetoprofeno foram avaliadas por DSC. Os pesquisadores

verificaram diferentes características térmicas das amostras, como transição vítrea e temperatura de fusão. Concluíram que as características obtidas das nanocápsulas foram comparadas àquelas das nanocápsulas sem o fármaco, o que indicou que o fármaco apresentou-se devidamente nanoencapsulado.

2.7.9. Determinação da eficiência de encapsulação ou taxa de associação do fármaco

Diferentes técnicas podem ser empregadas na determinação da eficiência de encapsulação do fármaco devendo ser ressaltada a necessidade de separação entre o fármaco livre e encapsulado para essa determinação. Aquelas que merecem destaque são: Cromatografia de exclusão por tamanho e Ultracentrifugação.

A primeira é também conhecida como SEC - *Size Exclusion Chromatography* ou Permeação em gel ou Filtração em gel (Figura 10). É um método simples e reprodutível, porém demanda tempo para sua realização. Similar à cromatografia líquida é fundamentada na diferença de tamanho (ou massa molecular) dos componentes da amostra, em que a separação ocorre através de suas passagens por uma coluna cromatográfica contendo uma matriz porosa empacotada. As moléculas são eluídas em ordem decrescente de tamanho, onde aquelas de maior peso molecular eluem rapidamente pela fase móvel, enquanto que as de menor peso molecular penetram nos poros da matriz ou fase estacionária, o que retarda sua eluição. Como o mecanismo impede adsorção a amostra torna-se diluída, o que pode limitar sua aplicação em alguns estudos. Alguns parâmetros devem ser considerados na aplicação dessa técnica como: volume da amostra aplicada na coluna, razão entre o volume da amostra e do volume interno da coluna, o tamanho dos poros da matriz ou fase estacionária, o fluxo, a viscosidade da amostra e a fase móvel utilizada. Desses, o volume da amostra aplicado na coluna é limitado entre 0,4 e 4,0% do volume total da coluna, visto que, atendendo a esse parâmetro previne-se a sobreposição dos picos de separação, alcançando assim adequada resolução (AMERSHAN BIOSCIENCES, 2002).

Teixeira e colaboradores (2007) utilizaram a técnica de Cromatografia de exclusão por tamanho para separar o fármaco isotretinoína de nanocápsulas de PLA. A partir de uma coluna de vidro com capacidade de 25,0mL, contendo gel de

Sephadex[®] G50, obtiveram 99,2% de eficiência de encapsulação. Já Liu e colaboradores (2007) utilizaram a mesma técnica (sem mencionar a capacidade da coluna) e mesmo gel, para separar o mesmo fármaco, contido em nanopartículas lipídicas sólidas obtendo 90,0% de eficiência de encapsulação. Entretanto, em estudo realizado por Ribeiro (2008), a técnica de cromatografia de exclusão por tamanho foi aplicada a partir de uma coluna empacotada, também com Sephadex[®] G-50, mas apresentando 12,0cm de altura, o que corresponde a um pequeno volume se comparado aos demais trabalhos. Assim os pesquisadores separaram o fármaco livre de lipossomas contendo genisteína e obtiveram 99,0% de eficiência de encapsulação a partir da formulação considerada ótima.

Na técnica de ultracentrifugação a suspensão polimérica é ultracentrifugada, combinando-se parâmetros como velocidade de agitação (em rpm), tempo (podendo variar de minutos a horas) e temperatura (normalmente ambiente) (GENERAL & THÜNEMANN *et al*, 2001; LIMAYEM *et al*, 2004; LEAMARCHAND *et al* 2005; BLOUZA *et al*, 2006). O fármaco contido nas nanopartículas precipita e o fármaco livre permanece no sobrenadante. Dependendo da técnica de quantificação adotada, o fármaco livre pode ser quantificado, sendo a quantidade de fármaco encapsulado obtida pela diferença entre o fármaco livre e a concentração teórica de fármaco incorporado na formulação. Entretanto, também é possível tratar o precipitado contendo o fármaco encapsulado, a fim de liberá-lo da nanopartícula. Normalmente isso é feito na presença de um solvente adequado, seguido de centrifugação convencional para separação do polímero e subsequente quantificação. Alguns trabalhos mencionam a necessidade de extrações ou lavagens do precipitado através da redispersão deste em solvente apropriado, por mais duas ou três vezes, em banho sonificado. Portanto, quando sobrenadante e precipitado são quantificados é possível obter a quantidade total de fármaco presente na amostra (GOVENDER *et al*, 1999; BOUCHEMAL *et al*, 2004; CEGMAR *et al*, 2004).

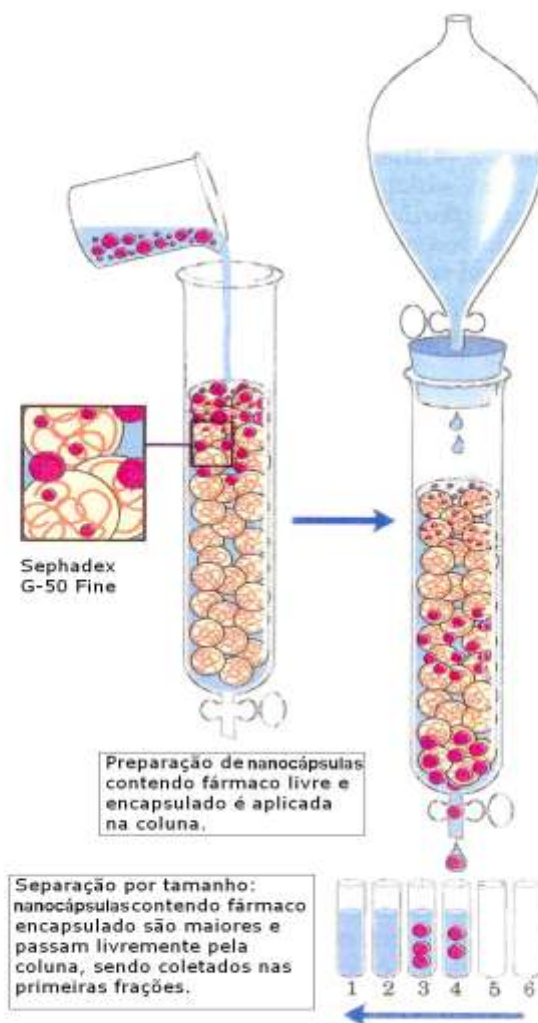


Figura 10- Técnica de Cromatografia de Exclusão por Tamanho utilizada na separação de fármaco livre e encapsulado em nanocápsulas. Fonte: ABOUELADAB EHAD. Molecular Sieve Chromatography, 2008. Ilustração.

A eficiência de encapsulação também pode ser influenciada por parâmetros já mencionados, como: quantidade de fármaco incorporada, características físico-químicas do fármaco e demais constituintes do sistema, merecendo destaque o polímero, os tensoativos e o óleo utilizados e finalmente o pH do meio.

2.7.10. Cinética de Liberação *in vitro* do fármaco

Diferentes fatores podem determinar a liberação dos fármacos encapsulados em suspensões poliméricas (SOPPIMATHA *et al*, 2001):

- Dessorção do fármaco da superfície das partículas;
- Difusão através da parede polimérica das nanocápsulas;
- Difusão do fármaco através da matriz das nanoesferas;
- Erosão da matriz polimérica;
- Combinação dos processos de difusão e erosão.

Portanto, a pesquisa acerca do perfil de liberação do fármaco torna-se imprescindível para o completo conhecimento e perspectivas das potencialidades do nanosistema. Os estudos de cinética e perfil de liberação permitem correlacionar respostas do fármaco *in vitro* – *in vivo* por comparação dos resultados de farmacocinética e modelos de perfis de liberação. A determinação dos parâmetros cinéticos possibilita conhecer sobre os mecanismos das transformações envolvidas e prever o grau de transformação que terá ocorrido após transcorrer um dado intervalo de tempo (AULTON *et al*, 2005; FREITAS & MARCHETTI, 2005).

Para tanto, diferentes métodos vêm sendo aplicados, como difusão em membranas de diálise, separação por ultracentrifugação, filtração a baixa pressão e ultrafiltração-centrifugação. Entretanto, a técnica de difusão permanece em destaque sendo descrita a seguir. Nesta técnica a forma farmacêutica é acomodada, em sacos de membrana de diálise contendo um volume conhecido de meio, os quais após fechados são colocados em outro recipiente contendo também meio (condição *sink*). O conjunto do sistema permanece aquecido a 37°C e sob agitação em velocidade constante e moderada, durante todo o teste. Em intervalos de tempo, alíquotas são coletadas e quantificadas, podendo ou não haver a reposição do meio retirado (MATSUMOTO *et al*, 2005; TEIXEIRA *et al*, 2005; FREITAS & MARCHETTI, 2005; WILSON *et al*, 2008; KHOEE & YAGHOUBIAN, 2008).

Freitas e Marchetti (2005) obtiveram o perfil de liberação *in vitro* de micropartículas contendo nimesulida através do método de difusão em membranas de diálise. Os resultados demonstraram que 28,67% do fármaco foi liberado em 108 horas, a partir do que, constataram liberação bifásica, ou seja, uma rápida liberação

inicial seguida de outra etapa lenta. Consideraram, portanto ser esse sistema promissor para liberação sustentada de uso intramuscular. Já, Matsumoto e colaboradores (2005) submeteram microesferas de PLGA e PLA contendo cisplatina ao método de separação em tubos, os quais, contendo as microesferas e meio tampão fosfato, foram agitados a 25rpm, aquecidos a 37°C. Ao contrário do estudo anterior, verificaram que a liberação envolveu quatro processos: liberação rápida do fármaco próximo à superfície da partícula, formação de microporos na camada, por hidratação e erosão, degradação da camada e difusão do fármaco através dos microporos.

De maneira semelhante, Wilson e colaboradores (2008) prepararam nanopartículas, revestidas com Tween[®] 80, contendo rivastigmina. Em estudo de liberação *in vitro* realizado pelo método de difusão em membranas de diálise foi verificado que a liberação do fármaco ocorreu em 24 horas, variando de 76,5 a 91,7% dependendo da razão de polímero usado, exibindo perfil bifásico, com liberação rápida inicial de 30 minutos, seguida de liberação sustentada por 24 horas. Os autores acreditaram que a primeira fase foi decorrente ao fármaco aderido à superfície das partículas, instantaneamente dissolvido, em contato com o meio de liberação.

Em outro estudo, nanocápsulas de poli(butiladipato) (PBA) contendo penicilina-G foram avaliadas, quanto ao seu perfil de liberação *in vitro*, pela técnica de difusão. A influência dos tensoativos Span[®] e Tween[®] na composição da formulação foram avaliadas e demonstradas. Os autores observaram uma liberação significativa na etapa inicial, seguida de retardo ou inexistência, demonstrando ser essa liberação bifásica (KHOEE & YAGHOUBIAN, 2008). Teixeira e colaboradores (2005) prepararam nanocápsulas de PLGA contendo xantona e avaliaram sua liberação *in vitro* através da técnica de diálise usando como controle nanoemulsões. Os resultados demonstraram que a liberação ocorreu em torno de 60% para nanocápsulas e 70% para nanoemulsões. Logo, essa comparação levou à proposição de que a partição entre núcleo oleoso e meio externo aquoso governou o processo, sugerindo interação do fármaco com o polímero.

Os estudos mencionados corroboram com outros, que atribuem à cinética de liberação de fármacos, a partir de nanoesferas, a forma de primeira ordem. Isto, em decorrência da difusão do fármaco ou erosão da matriz polimérica seguido da

liberação do fármaco. Em contrapartida, nanocápsulas seguiriam a cinética de ordem zero, já que o fármaco, dissolvido no núcleo oleoso, seria liberado mediante sua difusão através da parede polimérica (SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003; MATSUMOTO *et al*, 2005; TEIXEIRA *et al*, 2005; FREITAS & MARCHETTI, 2005; WILSON *et al*, 2008; KHOEE & YAGHOOBAN, 2008).

A interpretação dos valores obtidos nas pesquisas de liberação de fármacos é imprescindível e facilitada pelo uso de modelos matemáticos que descrevem os perfis de liberação como função de alguns parâmetros relatados para as formas farmacêuticas. Os modelos mais utilizados são de ordem zero, Higuchi, Backer-Londsdale, Hixon-Crowell, Korsmeyer-Peppas, entre outros.

As equações de ordem zero e de Higuchi são:

Ordem Zero: $C = C_0 - Kt$

Higuchi: $C = K_H \sqrt{t}$

O modelo de ordem zero apresenta velocidade de reação (liberação do fármaco, dissolução ou até decomposição) independente da concentração dos reagentes, ou seja, a velocidade permanece constante, o que é altamente desejável para formas farmacêuticas. O modelo de Higuchi é considerado um modelo de pseudo primeira ordem e descreve a liberação do fármaco através de diversos tipos de formas farmacêuticas modificadas, como sistemas transdérmicos, comprimidos contendo fármacos pouco solúveis em matrizes, formas revestidas, sistemas osmóticos e sistemas de matrizes poliméricas. Assim, modelos de ordem zero e pseudo primeira ordem, têm sido bastante utilizados como ideais para descrever formas de dosagem revestidas ou controladas por membrana, como as nanocápsulas (VARELAS *et al*, 1995; SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003; LANDGRAF, 2003; AULTON *et al*, 2005; WILSON *et al*, 2008; KHOEE & YAGHOOBAN, 2008).

2.7.11. Liofilização de nanopartículas

Os estudos de caracterização das nanopartículas orientam quanto à estabilidade dessas em função do tempo. Entretanto, são notórias as limitações das nanosuspensões, o que pode comprometer sua aplicabilidade industrial. Para tanto,

estudos têm sido desenvolvidos através do processo de sublimação (ou liofilização), com o objetivo de desidratar os sistemas coloidais prolongando assim sua estabilidade (FREITAS & MARCHETTI, 2005; ABDELWAHED *et al*, 2006; KHOEE & YAGHOUBIAN, 2008).

A liofilização é um complexo processo de secagem empregado para converter dispersões de materiais lábeis em sólidos com estabilidade suficiente para sua distribuição e armazenamento. Esse processo remove água mediante o congelamento da amostra seguido de sublimação a vácuo. Cabe ressaltar que a caracterização dos liofilizados deve ser realizada antes e após sua redispersão em água, sendo indicados os testes de estabilidade convencionalmente utilizados (SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003; ABDELWAHED *et al*, 2006).

Os processos de liofilização mais recentemente realizados têm citado a necessidade de substâncias crioprotetores ou lioprotetores, como carboidratos, usados para prevenir a agregação das partículas durante o congelamento das suspensões, tornando-as ressuspendíveis. Abdelwahed e colaboradores (2006) liofilizaram nanocápsulas na presença de sucrose, glucose e manitol e perceberam que as formulações se mantiveram estáveis em condições ambientes favoráveis, com exceção do manitol. Esses resultados revelaram que as formas liofilizadas atenderam às expectativas dos pesquisadores, pois se mantiveram estáveis em condições adequadas por 06 meses, além de confirmarem que o estresse causado durante o processo de liofilização danificaria o sistema, sendo necessária a proteção de um excipiente crioprotetor específico, para a formulação em questão.

Outros métodos de desidratação de nanosistemas particulados têm sido utilizados, como no trabalho realizado por Muller e colaboradores (2000), que desenvolveram um método de secagem por aspensão (nebulização) para obtenção de pós nebulizados contendo nanopartículas poliméricas, utilizando como adjuvante dióxido de silício (Aerosil 2000[®]).

2.8. Aplicação tópica de nanocarreadores

Embora, os nanocarreadores têm sido amplamente estudados para aplicação parenteral, seu uso tópico para aplicação dermatológica e cosmética tem ganhado importância nos últimos anos (WEI *et al*, 2006; SCHÄFER-KORTING *et al*, 2007).

Os nanocarreadores apresentam diversas vantagens para a aplicação tópica, como sua associação com a superfície da pele, seu pequeno tamanho e seu favorável coeficiente de partição com o estrato córneo (SCHÄFER-KORTING *et al*, 2007). Conseqüentemente, estudos têm sido desenvolvidos a fim de ampliarem o desempenho, na permeação cutânea, de diferentes classes de fármacos incorporados aos nanocarreadores.

Os hormônios são fármacos bastante estudados, tanto em nanossistemas lipossomais como em nanopartículas poliméricas. Maghraby e colaboradores (2000) investigaram a importância de estruturas lipossomais contendo estradiol para liberação na pele, como também o entendimento do mecanismo de ação dessas vesículas lipídicas. Os resultados indicaram a importância da composição do lipossoma no aumento da permeação cutânea, bem como, possíveis sinergismos entre a fosfatidilcolina e tensoativos ou etanol. Também, Dubey e colaboradores (2006) avaliaram a liberação transdérmica do hormônio pineal, melatonina, através de lipossomas elásticos. Os resultados demonstraram a possibilidade desse sistema eliminar o longo tempo de entrega e a pobre permeação do fármaco melatonina na pele. Na figura 11 está apresentada formulação lipossomal elástica contendo melatonina.

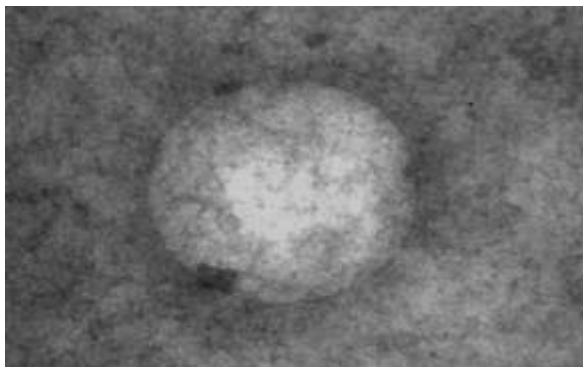


Figura 11: Visualização da formulação lipossomal elástica contendo melatonina por microscopia eletrônica de transmissão (x 10.000; Bar: 200nm). Fonte: DUBEY *et al*, 2006.

Fármacos antitumorais também tem sido alvo de pesquisas para aplicação dérmica. Um exemplo foi a pesquisa realizada por Lau e colaboradores (2005) que avaliaram formulações de lipossomas ultra-deformáveis contendo bleomicina,

fármaco indicado para o tratamento do câncer de pele. Os resultados revelaram que o CL50 em linhagem de células derivadas de um carcinoma primário *in vitro* foi três vezes maior a partir do fármaco encapsulado, em comparação ao fármaco livre.

Outras classes de fármacos com aplicação tópica também podem ser destacadas, como anti-inflamatórios e antissépticos. Um exemplo é o estudo da avaliação da penetração *in vitro* na pele e quantificação de nimesulida a partir de formulações tópicas semi-sólidas, contendo nanoesferas, nanocápsulas e nanoemulsões. Os resultados demonstraram que a quantidade de fármaco liberado no estrato córneo foi similar para os nanosistemas desenvolvidos, com exceção das nanocápsulas que atingiram as camadas mais profundas da epiderme (ALVES *et al*, 2007).

Outros pesquisadores como Nhung e colaboradores (2007), confirmaram a potente ação bactericida de clorexidina encapsulada em nanopartículas, posteriormente incorporadas em gel. Assim, a ação do produto Nanoclorex[®], no estrato córneo, foi tanto imediata, quanto sustentada. Na figura 12 é possível visualizar por MEV nanocápsulas de clorexidina localizadas no estrato córneo, como também sua associação à bactéria, com finalidade antisséptica (NHUNG *et al*, 2007).

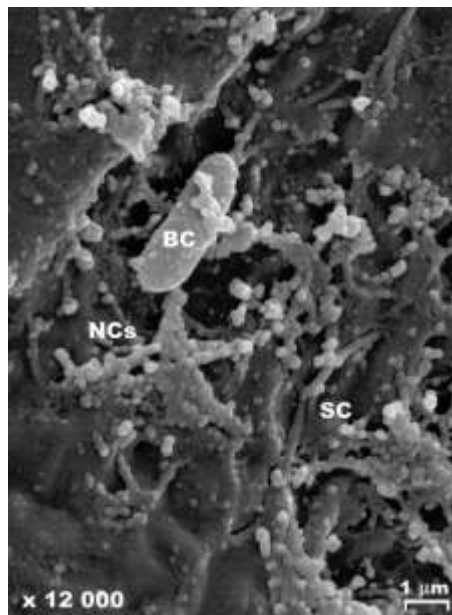


Figura 12- Micrografia eletrônica de varredura de clorexidina encapsulada em nanocápsulas (NCs) localizadas no estrato córneo (SC) tratado por Nanoclorex[®] após 30 minutos e associadas ao estrato córneo e bactéria (BC) (x 12,000, Bar: 1µm). Fonte: NHUNG *et al*, 2007.

Outra classe de substâncias que vêm ganhando destaque na nanotecnologia são os fitoestrógenos. Devido ao elevado potencial terapêutico que apresentam diversos estudos biofarmacêuticos têm sido conduzidos como: atividade estrogênica (GARCIA-PEREZ *et al*, 2006; NG *et al*, 2006), antioxidante (RECORD *et al*, 1995), antitumoral (STROHEKER, *et al*, 2004, YANG *et al*, 2007) e cardiovascular (HODGSON, *et al*, 1996; KERRY & ABBEY, 1998; KIM *et al*, 2004), entre outros. Conseqüentemente, a aplicação da nanotecnologia na busca por sistemas transportadores de fitoestrógenos tornou-se desafiadora, podendo dessa forma, acentuar suas atividades biológicas (MINGHETTI *et al*, 2006; KWON *et al*, 2007; HUANG *et al*, 2008; LEONARDUZZI *et al*, 2009; ZHU *et al*, 2009).

2.9. Fitoestrógenos

Fitoestrogênios são substâncias vegetais estrutural e funcionalmente semelhantes ao estradiol (CLAPAUCH *et al*, 2002).

A atividade estrogênica em plantas foi demonstrada pela primeira vez em 1926, sendo que em meados de 1970, centenas de plantas já haviam demonstrado exercer atividade estrogênica. Em torno de 1940, observou-se que fitoestrogênios presentes em trevos de pastagens, na Austrália, diminuíram a fertilidade de ovelhas após sua ingestão, condição denominada na época como “Doença do Trevo”. A partir de então os fitoestrógenos foram considerados biológica e economicamente importantes (MURKIES *et al*, 1998, *apud*, CLAPAUCH *et al*, 2002).

Também na década de 40, a substância diosgenina, um esteróide vegetal foi extraído da planta *Dioscoria villosa*, também conhecida como Yam Mexicano. Este fitoesteróide vem sendo, desde então, utilizado como precursor na produção química de esteróides sexuais (TAYLOR, 2001).

Os fitoestrogênios podem ser classificados conforme quadro 03 (CLAPAUCH *et al*, 2002).

Quadro 03- Classificação dos fitoestrógenos. Fonte: Adaptado de CLAPAUCH *et al*, 2002.

Isoflavonas (genisteína, daidzeína, biochanina A, formononetina, equol, desmetilangolensina (O-DMA))
Lignanós (enterodiol, enterolactona, secoisolariciresinol, metairesinol)
Cumestanos (cumestrol)
Lactonas do ácido isoresorcílico
Fitoalexinas
Flavonas (crisina, balcaleína, galangina)
Flavononas (naringenina)
Naftoflavona
Polietoxilatos alquilfenólicos

Dentre os fitoestrogênios citados, as isoflavonas têm sido bastante pesquisadas. São compostos pertencentes ao grupo dos flavonóides, caracterizados por apresentar estrutura polifenólica, com dois anéis de benzeno ligados a um terceiro anel de benzeno na posição do carbono 3 (Figura 13) (HODGSON *et al*, 1996).

As isoflavonas ocorrem em produtos naturais, por exemplo, grãos, como ervilha verde, feijão, lentilhas e legumes, merecendo destaque os produtos à base de soja (LIGGINS *et al*, 2000). Diversos fatores podem modificar a biodisponibilidade e efeitos biológicos das isoflavonas quando ingeridas: dieta rica em carboidratos induzindo aumento da fermentação, doenças intestinais, parasitoses, antibióticos e efeito do fígado no metabolismo dessas substâncias. Isto acontece, já que o fígado participa de forma importante na conjugação das isoflavonas e, portanto, a proporção de isoflavonas circulantes na forma livre torna-se pequena (DAVIS *et al*, 1998).

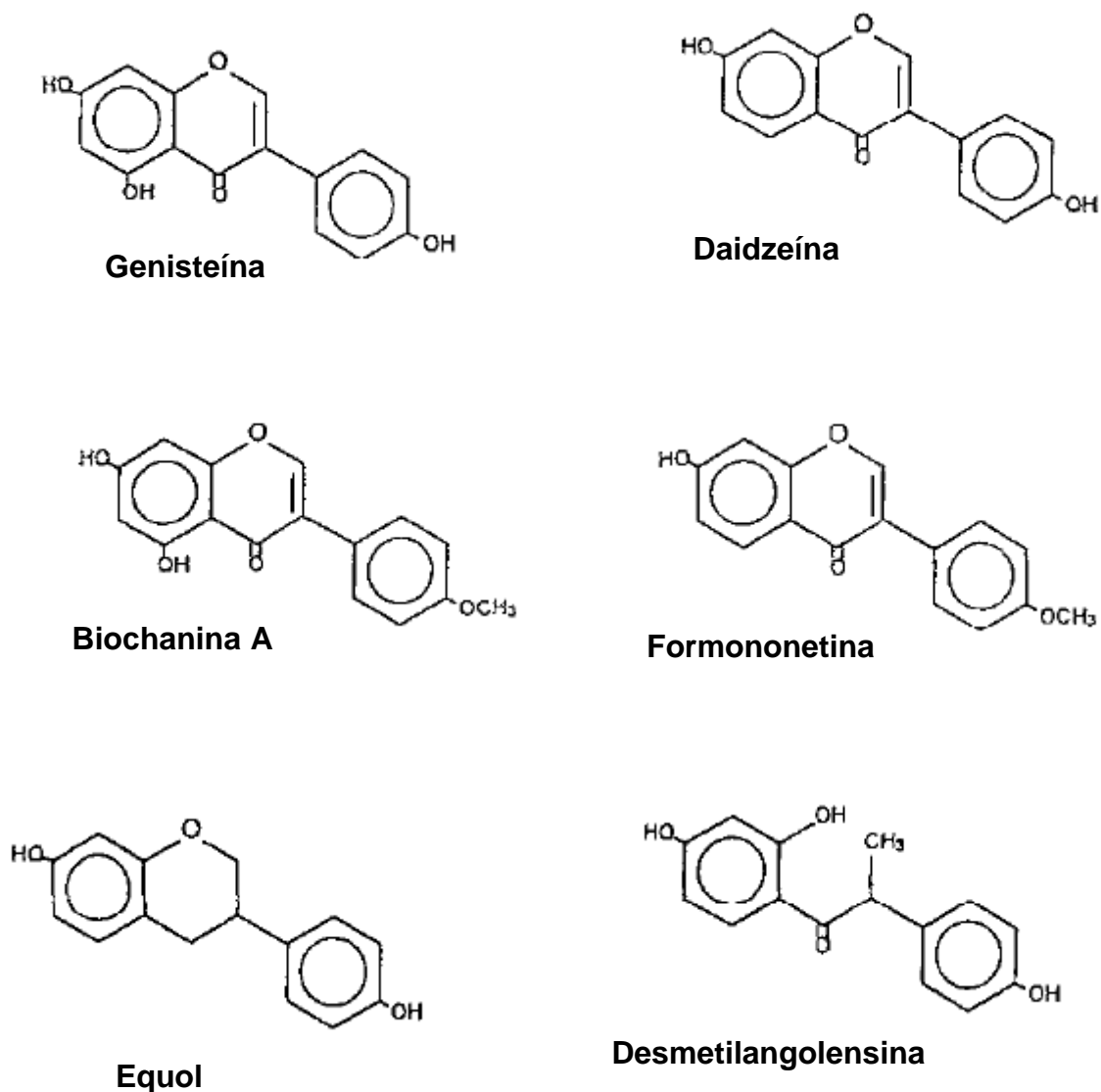


Figura 13- Estruturas químicas de isoflavonas. Adaptado de HODGSON *et al*, 1996.

As isoflavonas são encontradas na forma glicosilada ou aglicona. Na forma glicosilada está conjugada a açúcares, que no intestino é metabolizada por ação de enzimas bacterianas (β -glicosidades intestinais), perdendo assim o resíduo de açúcar e transformando-se na forma mais ativa agliconada. Portanto, as formas de agliconas são absorvidas mais rapidamente e em quantidades maiores do que os glicosídeos, em humanos (AHLUWALIA *et al*, 1953 *apud* AGUIAR, 2002).

Dentre as isoflavonas encontradas na soja encontram-se as formas agliconas genisteína, daidzeína e gliciteína. A diferença estrutural dessas formas está no R1 e R2 presentes no primeiro anel fenólico. Já entre as formas glicosiladas estão a

genistina, dadzina, glicitina, acetilgenistina, acetildaidzina, acetilglicitina, malonilgenistina, malonildadzina, e malonilglicitina e suas diferenças estruturais apresentam-se no R3, R4 e R5 do terceiro anel fenólico (GARRIDO *et al*, 2003; LUI *et al*, 2003).

2.9.1. Mecanismo de ação

As propriedades estrogênicas e antiestrogênicas dos fitoestrogênios dependem de sua concentração, da concentração dos esteróides sexuais endógenos e do órgão específico envolvido na interação com os receptores de estrogênicos. Existem dois tipos de receptores estrogênicos, alfa e beta. Os receptores alfa são os principais receptores encontrados na mama e útero e os receptores beta nos ossos e sistema cardiovascular. O estradiol, por exemplo, é um estrogênio endógeno, que tem afinidade pelos dois receptores, enquanto as isoflavonas são mais seletivas para os receptores beta, na proporção de 1/20 para os receptores alfa e 1/3 para os receptores betas. A similaridade química das isoflavonas com os estrogênios é responsável por sua habilidade em se ligar aos receptores estrogênicos. A figura 14 apresenta a estrutura química do 17 β -estradiol (PATISAUL *et al*, 1999; NACHTIGALL *et al*, 2001; GOUGELET *et al*, 2007).

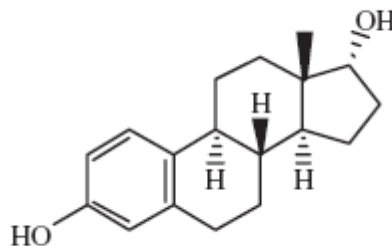


Figura 14- Estrutura química do 17 β -estradiol. Fonte: NG *et al*, 2006.

2.9.2. Atividades biológicas

Estudos demonstram que as isoflavonas desempenham inúmeras atividades biológicas podendo ser ressaltadas aquelas relacionadas à atividade estrogênica e atividade inibidora de enzimas reguladoras do ciclo celular. Em especial, sua segurança na terapia de reposição hormonal, prevenção da osteoporose, redução

do colesterol plasmático, ação antifúngica, antioxidante (prevenção do envelhecimento cutâneo) e antitumoral (mama, próstata e pele, entre outros) (RECORD *et al*, 1995; HODGSON *et al*, 1996; KERRY & ABBEY, 1998; AGUIAR *et al*, 2002; KIM *et al*, 2004; STROHEKER *et al*, 2004; GARCIA-PEREZ *et al*, 2006; NG *et al*, 2006; YANG *et al*, 2007; DAVIS *et al*, 2008).

Aguiar e colaboradores (2002) e Clapaud e colaboradores (2002) apresentaram em suas revisões bibliográficas informações pormenorizadas sobre a eficácia de isoflavonas em diversas patologias e terapia de reposição hormonal na menopausa, respectivamente. O primeiro estudo concluiu que esses compostos, devido a sua similaridade com o estradiol desempenham atividade estrogênica, entretanto, esta depende do tecido alvo e da forma em que se encontra, por exemplo, se a forma apresenta-se como aglicona ou glicolisada (conjugada), a atividade poderá ser maior ou menor. Já o segundo estudo concluiu que as isoflavonas atuam como agonistas ou antagonistas estrogênicos, entretanto as isoflavonas naturais, utilizadas em estudos *in vivo* e *in vitro*, não demonstraram resultados consistentes e uniformes no que diz respeito a mimetizarem as ações estrogênicas em todos os órgãos-alvo e sugere que estudos a partir de isoflavonas isoladas sejam desenvolvidos, visto que representam potencial interesse sobre os efeitos via receptor de estrogênio e extra-receptor.

Devido à representatividade das isoflavonas genisteína e daidzeína diante dos demais isoflavonóides, inúmeras pesquisas tem sido realizadas a partir dessas substâncias isoladas. A principal diferença química existente entre a genisteína e daidzina se deve a presença do grupo 5-hidroxil da genisteína (Figura 13) (LUI *et al*, 2003). Essas isoflavonas são inclusive consideradas, como as principais isoflavonas encontradas na soja (50 a 90%) (FUKUTAKE *et al*, 1996). Entretanto, de acordo com Davis e colaboradores (1998) as potências relativas de comparação entre essas isoflavonas e o estradiol (valor 100%) estabelecidas em curvas de resposta concentração-dependente foram 0,084 para genisteína e 0,013 para daidzeína, resultado estimulante para estudos a partir de genisteína. Sendo assim, fica caracterizada a necessidade de pesquisas que possibilitem a liberação controlada de genisteína nos tecidos alvo com o intuito de acentuarem sua atividade biológica.

2.9.3. Genisteína

2.9.3.1. Características físico-químicas

Sua forma aglicona, além de apresentar elevada atividade biológica, é responsável pela coloração amarelada dos grãos de soja (WEI *et al*, 2002). Em contrapartida, sua forma glicosilada é desprovida de atividade biológica, sendo necessária, para absorção, sua transformação em aglicona, pela fermentação enzimática (hidrólise), a partir de enzimas específicas, como a β -glicosidase ou ***phorizin lactase-hidrolase (lactase)*** encontradas no intestino delgado de mamíferos (AGUIAR *et al*, 2002).

A forma glicosilada é considerada pouco solúvel em água, embora seja mais polar que a forma aglicona. Consequentemente, a forma aglicona apresenta muito pouca solubilidade em água, sendo possível sua solubilização em etanol e metanol. Na presença de água soluções etanólicas precipitam cristais de genisteína, com cor esbranquiçada (WEI *et al*, 2002). De acordo com Drug Bank (2008), apresenta coeficiente de partição octanol/água (log P) igual a 3,04, entretanto Xavier e colaboradores (2005) realizaram um experimento para essa determinação encontrando o valor de 4,36. Embora distintos, os dois caracterizam a genisteína como uma molécula com características lipofílicas. O peso molecular e fusão da genisteína são respectivamente, 270.241 g/mol e 297 - 298°C (com uma leve decomposição térmica desse composto). O comprimento de onda de absorção máxima da genisteína apresenta-se em torno de 270nm, tendo como solvente de escolha o metanol (WEI *et al*, 2002; DRUG BANK, 2008).

2.9.3.2. Propriedade antienvhecimento e quimiopreventivo

A genisteína é um representante fito-estrogênico que têm atraído grande atenção devido aos potenciais efeitos quimiopreventivo e antienvhecimento, os quais demonstram agir como antioxidante, inativador de radicais livres e radioprotetor, bem como estimulante da síntese de colágeno, elastina e ácido hialurônico (AH) (CAI *et al*, 1997; MIYAZAKI *et al*, 2002; BAUMANN, 2004).

As espécies reativas de oxigênio são conhecidas por causar dano oxidativo às macromoléculas como DNA e lipídios e por isso, essas moléculas são consideradas importantes marcadores biológicos, já que possuem importante papel no desenvolvimento de câncer, doença cardíaca e disfunção cerebral, bem como no processo de envelhecimento (OLIVEIRA, 1999; STROHEKER *et al*, 2004; GARCIA-PEREZ *et al*, 2006; DAVIS *et al*, 2008). Diversos autores atestam que a inativação de radicais livres de oxigênio e subsequente proteção de macromoléculas celulares contra danos de oxidação podem ser os mecanismos responsáveis pela quimioprevenção anticarcinogênica e prevenção do envelhecimento cutâneo, os quais têm sido estudados na presença da genisteína.

Cai e colaboradores (1997) avaliaram os efeitos antioxidantes de três flavonóides (genisteína, quercetina e luteonina) através de diferentes sistemas, dentre os quais a formação de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) induzida por reação UV. Os resultados mostraram que todos os compostos do teste tiveram potente efeito de extinção de 8-OHdG, com a ordem dos efeitos sendo maior para genisteína, a qual apresentou IC₅₀ de 0,3 µM para 0,5 e 0,8 µM de luteolina e quercetina, respectivamente.

Wei e colaboradores (2002) demonstraram que a genisteína inibiu a gênese tumoral induzida por radiação UVB em pele de camundongos sem pêlo, mediados por eventos oxidativos induzidos pela radiação UVB, incluindo a formação *in vivo* de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), peroxidação lipídica (representado pelo malondialdeído, MDA) e 8-OHdG. Foi demonstrado que a exposição à radiação UVB subaguda, aumentou substancialmente o nível de H₂O₂, peróxidos lipídicos e 8-OHdG na pele de camundongos sem pêlo. Além disso, a exposição crônica a baixas doses de UVB (0,9-1,2 KJ/m² por 20 semanas) aumentou substancialmente os níveis de 8-OHdG não apenas na epiderme, mas também nos órgãos internos, como fígado, cérebro e baço de camundongos, com exceção de rim. O pré-tratamento dos animais com 10 mmol de genisteína 1 hora antes da exposição ao UVB inibiu a formação de UVB-induzida de H₂O₂ e MDA em pele e 8-OHdG na epiderme, bem como em órgãos internos. Em resumo, os resultados sugeriram que a irradiação UVB provocou uma série de eventos oxidativos, que foram substancialmente inibidos pela genisteína, quer através de têmpera direta de espécies reativas de

oxigênio ou efeitos antiinflamatórios indiretos. Assim, as propriedades antioxidantes da genisteína podem explicar seus mecanismos antifotocarcinogênicos.

Ainda com enfoque na radiação UVB, um estudo *in vitro* expôs queratinócitos humanos a essa radiação após incubação em doses crescentes de genisteína, por duas horas. Os resultados demonstraram inibição da fosforilação de EGF-R (receptores de fator de crescimento epidérmico) e das MAP-quinases na presença de genisteína no meio celular. Assim, foi verificada inibição da degradação da matriz dérmica, já que os indicadores estudados provocaram a estimulação dos fatores de transcrição celulares e ativação das metaloproteinases matriciais (WEI *et al*, 2003). Portanto, o resultado dessa inibição pode conduzir à atenuação ou impedimento da degradação do colágeno cutâneo.

No mesmo estudo, a inibição da indução das MAP quinases, em especial a proteína ERK, promoveu a redução significativa da proteína cJun, a qual é essencial para a ativação do fator de transcrição AP-1. O complexo AP-1 formado por cJun e cFos estimula a transcrição dos genes de várias metaloproteinases matriciais (MMPs), como, a colagenase e gelatinase (92 kDa), responsáveis pela degradação do colágeno e outros componentes da matriz dérmica. A genisteína, por inibir a indução de cJun, preveniu a ativação de AP-1, bloqueando a indução dos RNAm das MMPs, por exemplo a colagenase-1, inibindo a degradação do colágeno, prevenindo assim, o fotoenvelhecimento cutâneo (WEI *et al*, 2003; KANG *et al*, 2003; FISHER *et al*, 1997 *apud* XAVIER *et al*, 2005).

Em outro estudo, Dwiecki e colaboradores (2007) investigaram a atividade antioxidante da genisteína e daidzeína através de suas interações com a membrana fosfolipídica (MF). Foram realizadas medidas de fluorescência e os resultados demonstraram que genisteína na concentração de 10 μ M apresentou-se incorporada na porção hidrofílica da MF, resultando na diminuição da fluidez da membrana, as quais foram confirmadas por medidas anisotrópicas de fluorescência. Os resultados também indicaram que em concentrações acima de 10 μ M a genisteína foi incorporada na região hidrofóbica da MF. Dessa forma foram confirmadas interações entre a genisteína e a MF, com conseqüente estabilização desta, podendo ser ressaltada essa condição para sua atividade antioxidante.

Na dermatologia do envelhecimento cutâneo, os benefícios terapêuticos dos estrógenos, utilizados tanto por via oral ou tópica, têm sido relatados e demonstram

que sua ausência na pele leva a alterações nas atividades celulares, como redução na síntese de colágeno, elastina e ácido hialurônico nos fibroblastos. Assim, a terapia de reposição hormonal (TRH) tópica tem sido direcionada a mulheres pós menopausadas, sendo indicada para aquelas que não recebem a terapia oral (BAUMANN, 2004).

Considerando que a terapia estrogênica é eficaz na prevenção do envelhecimento, as isoflavonas também são capazes de produzir efeitos similares, devido à semelhança estrutural com o estrógeno 17β -estradiol, conforme mencionado no item 2.10.1. Assim, estudos realizados com o estradiol e estriol foram relatados a fim de complementarem a pesquisa realizada. Em estudo realizado por Schmidt e colaboradores (1996) foi observado melhora semelhante àquela vista com TRH oral e transdérmica para o estradiol a 0,01% e estriol a 0,3% tópicos. Também foi observado que após 06 meses de tratamento as pacientes tratadas demonstraram elasticidade e firmeza da pele melhorada, com profundidade diminuída das rugas, hidratação aumentada da pele, além de aumento importante de fibras de colágeno Tipo III, sem nenhum efeito adverso.

A ausência de efeitos adversos para terapia tópica estrogênica também foi tema do estudo realizado por Kainz e colaboradores (1993 *apud* BAUMANN, 2004), que examinaram esfregaços de colpocitologia e mediram as concentrações hormonais de 17 mulheres antes e após 03 meses de terapia de reposição estrogênica tópica (1,0g de pomada de estradiol a 0,01% ou pomada de estriol a 0,3% 1 vez ao dia). As concentrações séricas e o aspecto dos esfregaços vaginais não mostraram nenhuma alteração importante, o que sugere que os estrogênios tópicos não causaram efeitos adversos, podendo ser usados na prevenção de alterações da pele que ocorrem com a menopausa.

Dentre as repostas estrogênicas desencadeadas pela isoflavona genisteína, o estímulo a síntese de colágeno e AH, merecem destaque. Miyazaki e colaboradores (2002) avaliaram a produção de AH em cultura de queratinócitos humanos transformados e em pele dorsal de camundongos. Verificaram que sua produção, nos queratinócitos, foi estimulada significativamente e de forma dose dependente pela genisteína, ocorrendo o mesmo, após 02 semanas, na pele de camundongos. Entretanto, foi observada que a potência da isoflavona, em estimular a síntese de AH foi entre 1000 e 5000 vezes menor que aquela observada a partir do estradiol.

Contudo, esses relatos confirmaram que a aplicação tópica da isoflavona genisteína, em sua forma livre, promoveu aumento na síntese de AH, o qual se refletiu em melhoria da hidratação cutânea e em discreto aumento na espessura da epiderme, associado a um aumento na elasticidade da pele (MIYAZAKI *et al*, 2002; 2003).

Considerando que os benefícios relatados anteriormente ocorreram de forma dose dependentes é possível inferir que se uma quantidade maior de genisteína chegasse às camadas específicas da pele ou mesmo, às células alvo, os efeitos almejados seriam mais facilmente atingidos.

2.9.3.3. Permeação cutânea de genisteína

Pesquisas no campo da tecnologia farmacêutica vêm sendo realizadas a fim de se verificar a penetração cutânea da genisteína. Por exemplo, Silva e colaboradores (2009) desenvolveram nanoemulsões de uso tópico contendo genisteína através do método de emulsificação espontânea. Foram obtidas emulsões monodispersas com tamanho médio de 230-280 nm. A permeação das formulações foi avaliada através da pele da orelha de porco, em células de difusão do tipo Franz. Os resultados apresentaram um perfil de permeação lento para genisteína ($\sim 7,5 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) com redução significativa de sua permeabilidade a partir dos núcleos oleosos ($\sim 3,5-5,0 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) ou nanoemulsões ($\sim 3,0-3,5 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) indicando a afinidade da genisteína pelos veículos oleosos utilizados, bem como interessantes perspectivas para a administração tópica de genisteína.

Minghetti e colaboradores (2006) verificaram a absorção percutânea de genisteína através de células de difusão do tipo Franz em epiderme humana (permeação *ex vivo*) utilizando diferentes veículos. Foi assumido pelos autores que apenas a genisteína pura, no veículo PEG 400, poderia ser eficazmente administrada por via transdérmica.

Huang e colaboradores (2008) verificaram a viabilidade de absorção na pele de genisteína e daidzeína. Foi verificado que a produção de queratinócitos foi inibida por elas demonstrando sua ação inativadora de radicais livres. Quanto à absorção na pele, a genisteína apresentou maior absorção percutânea que a daidzeína, sendo suas deposições na pele comparadas com os estudos *in vivo* também realizados,

além do que os perfis de segurança não demonstraram ruptura do estrato córneo ou eritema de pele para genisteína.

Assim, embora os autores relatem penetração na pele da genisteína, seu favorecimento permanece desejável, gerando o desafio de desenvolver e aplicar novos sistemas de liberação, como as nanocápsulas, com a finalidade de viabilizar sua administração sobre a pele e acentuar suas atividades biológicas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar nanocápsulas de PLA contendo genisteína, incorporadas em formulação tópica semi-sólida e avaliar em modelos *in vitro* e *ex vivo*, a habilidade de modularem a penetração na pele.

3.2. Objetivos Específicos

- Padronizar composição e método de obtenção e formação de nanocápsulas de PLA contendo genisteína;
- Caracterizar os nanosistemas desenvolvidos quanto ao aspecto, forma, dimensões; tamanho e distribuição de tamanho das partículas, resistência à centrifugação, pH das nanosuspensões, potencial zeta, análise térmica por DSC e eficiência de encapsulação do fármaco;
- Estabelecer os melhores parâmetros para a separação de fármaco livre e encapsulado, bem como para o rompimento das nanocápsulas, extração e quantificação do fármaco genisteína;
- Desenvolver e validar metodologia analítica para determinação de genisteína, compreendendo os métodos de extração do fármaco das matrizes estudadas.
- Determinar a permeação cutânea da genisteína, em pele de orelha de suíno *ex-vivo* através de:

- Permeação intrínseca da genisteína;
 - Permeação passiva da genisteína livre e nanoencapsulada, bem como a partir de gel e emulsão não-iônica;
 - Retenção na pele da genisteína livre e nanoencapsulada, a partir de gel e emulsão não-iônica.
 - Retenção na forma farmacêutica da genisteína livre e nanoencapsulada, a partir de gel e emulsão não-iônica.
 - Determinação da taxa de recuperação do fármaco nos diferentes componentes das células de *Franz*.
- Determinar a liberação *in vitro* da genisteína nanoencapsulada a partir de gel através de membrana sintética.
- Determinar a cinética de liberação da genisteína a partir das formulações estudadas através dos parâmetros: coeficiente de correlação linear (r); fluxo cutâneo (J), tempo de latência (tempo LAG) e quantidade total permeada.

4. METODOLOGIA

4.1. TIPO DE ESTUDO

O presente estudo é laboratorial de caráter experimental, com abordagem quali-quantitativa.

4.2. LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (FARMATEC) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás.

4.3. MATERIAL

4.3.1. Equipamentos

Foram empregados os seguintes equipamentos e acessórios:

- Espectrofotômetro UV-vis, marca Varian, modelo Cary-50,
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, marca Varian, modelo Pro-Star 240;
- Zetasizer Nano, marca Malvern Instruments, modelo ZEN1600 e ZS;
- Differential Scanning Calorimeter, marca Shimadzu, modelo DSC-60 A;
- Rotaevaporador, marca Tecnal, modelo TE-210;
- Processador Ultrassônico, marca Misonix, modelo XL2020;
- pHmetro Digital, marca Gehaka, modelo PG 1000;
- Mili Q-Gradient, marca Millipore;
- Balança analítica marca Gehaka, modelo AG-200,
- Centrífuga, marca Sigma, modelo 3-18 K;
- Câmara Escura Ultra violeta, marca Tecnal, modelo TE-540 365NM;
- Agitador magnético, marca Tecnal, modelo TE-085,

- Agitador tipo Vórtex, marca Phoenix, modelo AP-56;
- Lavadora Ultra-Sônica, marca Unique, modelo USC1400,
- Mini Incubadora, marca Marconi, modelo Ma 410.
- Sistema de Células de difusão vertical (Tipo Franz), marca Hanson Research Corporation, modelo Microette Plus Q-Pak™);
- Microscópio Óptico com câmara digital CCD, marca Leica, modelo DME EC3.

4.3.2. Substâncias e reagentes

- Genistéina (LC Laboratories, USA, Lote G-6055)
- Poli (Ácido láctico), (Sigma-Aldrich, Lote 531162-5G);
- Fosfatidilcolina de soja 100% Lipoid (Gerbras, lote 790545-6);
- Tween® 80 P. S. (Vetec, lote 0603298);
- Óleo de soja (Liza, lote 03 0353 PV);
- Hidroxipropil metilcelulose (HPMC) (Gerbras);
- Polawax® (Álcool cetosteárico e polioxietilnoglicóis) (Gerbras);
- Sephadex G-50 Fine (Amersham Bioscience);
- Membrana HV (Durapore) em PVDF (fluoruro de polivinilideno), 0,45µm de poro, 13mm de diâmetro, branca e lisa (Millipore, lote HVLP 01300);
- Membranas Millipore em PTEF (politetrafluoroetileno), 0,22µm de poro, 47mm de diâmetro, branca e lisa;
- Metanol, Acetonitrila, Acetona;
- Água ultra pura Mili-Q;
- Fosfato de potássio monobásico;
- Hidróxido de sódio;
- Lã de vidro (Reagen);
- Demais reagentes, todos de grau analítico ou superior.

4.3.3. Vidrarias e utensílios diversos

- Pipetas volumétricas;

- Micropipetadores (marca Brand, Transferpette, 10-100uL e 100-1000uL);
- Balões volumétricos de vidro;
- Balão de fundo chato;
- Tubos de ensaio;
- Tubos Falcon;
- Ependorfes;
- Espátulas de aço inox;
- Erlenmeyers;
- Garras;
- Colunas cromatográficas de vidro.

4.3.4. Substância teste

Genisteína (figura 15): pó cristalino de coloração branca, solúvel em metanol e insolúvel em água (LC Laboratories, lote G-6055).

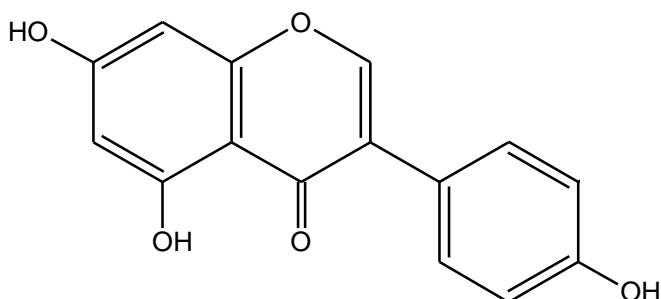


Figura 15- Estrutura química da genisteína.

4.4. MÉTODOS

Com a finalidade de facilitar o entendimento do método empregado nesse trabalho, o esquema experimental está apresentado na figura 16.

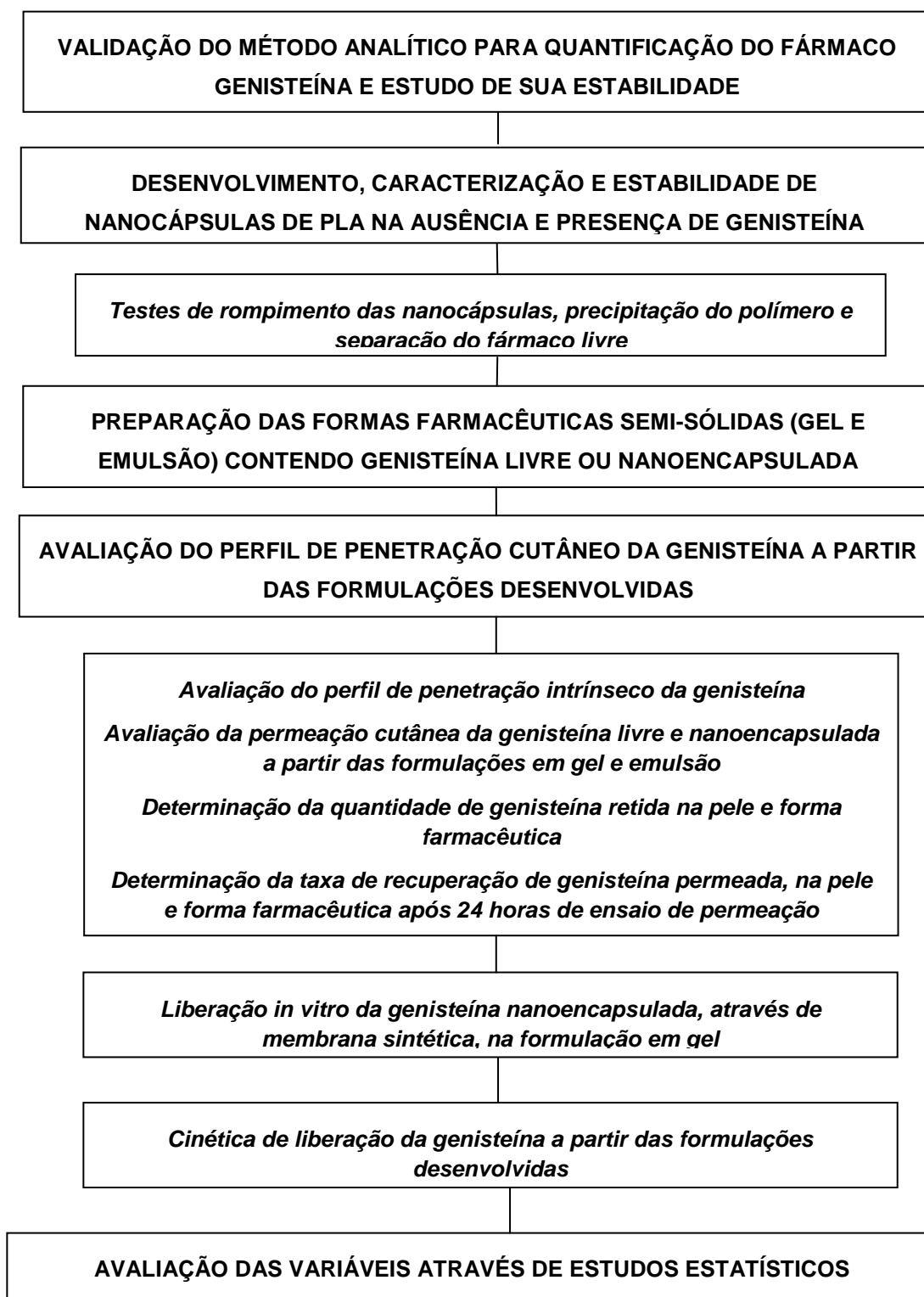


Figura 16 - Esquema experimental do desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea da isoflavona genisteína em nanocápsulas poliméricas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHED W.; DEGOBERT G.; FESSI H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Stuttgart*. v. 63, p. 87–94, 2006.

ABOUELADAB EHAD. Molecular Sieve Chromatography, 2008. Ilustração.

Disponível em: http://courses.cm.utexas.edu/jrobertus/ch339k/overheads-1/ch5_mol-sieve.ipg. Acesso em: 15 de novembro de 2008.

AGUIAR, CLAUDIO LIMA. Isoflavonas de soja e propriedades biológicas. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Curitiba*, v.20, n.2, p.323-334, 2002.

AHLUWALIA V. K.; BHASIN, M. M.; SESHADRI T. R. Isoflavones of soybeans. *Current Science*, v.22, p. 263-265, 1953, *apud* AGUIAR, CLAUDIO LIMA. Isoflavonas de soja e propriedades biológicas. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Curitiba*, v.20, n.2, p.323-334, 2002.

AHSAN F.; RIVASB I. P.; KHANA M. A.; SUA´REZB A. I. T. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers—liposomes and microspheres—on the phagocytosis by macrophages. *Journal of controlled release, Amsterdam*, v. 79, p. 29–40, 2002.

ALBERTI I.; KALIA Y. N.; NAIK A.; BONNY J.; GUY R. H. In vivo assessment of enhanced topical delivery of terbinafine to human stratum corneum. *Journal of controlled release, Amsterdam*, v. 71, p. 319–327, 2001a.

ALBERTI, I. KALIA Y. N.; NAIK A.; BONNY J.; GUY R. H. Effect of ethanol and isopropyl myristate on the availability of topical terbinafine in human stratum corneum, *in vivo*. *International Journal of Pharmaceutical*, Amsterdam, v. 219, p. 11-19, 2001b.

ALLEN JR, L.V.; ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G. Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos. Ed. Artmed, 8ª ed., 2007.

ALVAREZ-ROMÁN R.; NAIK A.; KALIA Y. N.; FESSI H.; GUY R. H. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Stuttgart, v. 58, p 301–316, 2004a.

ALVAREZ-ROMÁN R.; NAIK A.; KALIA Y. N.; GUY R. H.; FESSI H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *Journal of controlled release*, Amsterdam, v. 99, p. 53–62, 2004b.

ALVES C. P. I. Estudo e caracterização da encapsulação de isotretinoína em lipossomas unilamelares. 2005. 134f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Universidade de Brasília, Brasil.

ALVES MARTA P., ANA L. SANTOS SCARRONE B, MARCOS, POHLMANN ADRIANA R., GUTERRES SILVIA S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutical*, Amsterdam. v.341, p.215–220, 2007.

AMELLER T.; LEGRAND P.; MARSAUD V.; RENOIR J. Drug delivery systems for oestrogenic hormones and antagonists: the need for selective targeting in estradiol-dependent cancers. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, Amsterdam, v. 92, p. 1–18, 2004.

AMERSHAN BIOSCIENCES AB. Gel Filtration – Principles and Methods, Sweden, 2002.

AMSELLEM E.; DERRIEN F.; LANQUETIN M.; PARIS J.; MARTY J. P. In vitro studies on the influence of carbomers on the availability and acceptability of estradiol gels. *Arzneimittel Forschung - Drug Research, Montpellier*, v. 48, n5, p. 492-496, 1998.

ANDREO-FILHO N.; OLIVEIRA A. G. Sistemas de micro/nanoencapsulação de fármacos. *Infarma, Brasília*, v.9, n.1/5, 1999.

ANJOS J. L. V.; ALONSO A. Terpenes increase the partitioning and molecular dynamics of an amphipathic spin label in stratum corneum membranes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 350, p. 103–112, 2008.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G. ALLEN JR, L.V. Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos. Ed. Premier, 6ª ed., 2000.

ANTON N.; BENOIT J. P.; SAULNIER P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. *Journal of controlled release, Amsterdam*, v.128; p.185–199, 2008.

ANTONIO M. E. C. O. Permeação cutânea *in vitro* como ferramenta auxiliar para o estudo de formulações semi-sólidas de cetoconazol para aplicações tópicas. 2007. 147f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná, Brasil.

ASBILL CHARLES S.; MICHNIAK BOZENA B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. *Placental Site Trophoblastic Tumor database, Sheffield*, v. 3, n.1 p.36-41, 2000.

AULTON, Michael E. Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

AZEVEDO M. M. M. Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos. 2002. 20f. Monografia (Curso de Química da UNICAMP), Brasil.

BACH M.; LIPPOLD B. C. Percutaneous penetration enhancement and its quantification. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Stuttgart*, v. 46, p. 1–13, 1998a.

BACH M.; LIPPOLD B. C. Influence of penetration enhancers on the blanching intensity of betamethasone 17-benzoate. *International Journal of Pharmaceutical, Amsterdam*, v. 168, p. 97–108, 1998b.

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

BARRY B.W. Drug delivery routes in skin: a novel approach. *Advanced Drug Delivery Reviews, Amsterdam*, v.54 s.1, p.S31–S40, 2002.

BARRY B. W. Breaching the skin's barrier to drugs. *Nature Biotechnology Journal, Miami Beach*. v.22, p.165-167, 2004.

BAUMANN L. Hormônios e envelhecimento cutâneo. *In: BAUMANN L. Dermatologia Cosmética: Princípios e Prática*. Editora Revinter, 2004, p. 27-28.

BEMVINDO C. S. Estudo comparativo da liberação e penetração cutânea de nitrato de miconazol de emulsões tópicas comerciais. 2006.112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

BENFELDT E.; HANSEN S. H.; VOLUND A.; MENNE T.; SHAH V. P. Bioequivalence of Topical Formulations in Humans: Evaluation by Dermal Microdialysis Sampling and the Dermatopharmacokinetic Method. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 127, p. 170–178, 2007.

BENFELDT E.; SERUP J.; MENNE T. Effect of barrier perturbation on cutaneous salicylic acid penetration in human skin: *in vivo* pharmacokinetics using

microdialysis and non-invasive quantification of barrier function. *British Journal of Dermatology*, v. 140, p. 739–748, 1999.

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

BETZ G.; AEPPLI A.; MENSCHUTINA N.; LEUENBERGER H. In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application. *International Journal of Pharmaceutical, Amsterdam*, v. 296, p.44–54, 2005.

BHARALI D.; Klejbor I.; Stachowiak E. K.; Dutta P.; Roy I.; Kaur N.; Bergey E. J.; Prasad P. N.; Stachowiak M. K. Organically modified silica nanoparticles: A nonviral vector for *in vivo* gene delivery and expression in the brain. *Ilar Journal*. v. 102, n. 32, p. 11539-11544, 2005.

BHOWMIK B. B.; SA B.; MUKHERJEE A. Preparation and *in vitro* characterization of slow release testosterone nanocapsules in alginates. *Acta Pharmaceutica, Zagreb*, v. 56, p. 417–429, 2006.

BILENSOY E, GÜRKAYNAK O, ERTAN M, SEN M, HINCAL A. A. Development of nonsurfactant cyclodextrin nanoparticles loaded with anticancer drug paclitaxel. *Journal of Pharmaceutical Sciences, Arlington*, v. 97, n. 4, p. 1519-29, 2008.

BLOUZA L.;CHARCOSSET C.; SFAR S.; FESSI H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use.*International Journal of Pharmaceutical, Amsterdam*,v. 325,p. 124–131, 2006.

BOMMANNAN D.; POTTS R. O.; GUY R. H. Examination of stratum corneum barrier function in vivo by infrared spectroscopy. *The Journal of Investigation Dermatology, Chapel Hill*, v. 95. p. 403-408, 1990.

BONTÉ F.; SAUNOIS A.; PINGUET P.; MEYBECK A. Existence of a lipid gradient in the upper stratum corneum and its possible biological significance. *Archives of Dermatological Research, New York*, v. 289, p. 78–82, 1997.

BORGIA S. L.; SCHLUPP P.; MEHNERT W.; SCHAFFER-KORTING M. In vitro skin absorption and drug release – A comparison of six commercial prednicarbate preparations for topical use. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Stuttgart*, v. 68, p. 380–389, 2008.

BOUCHEMAL K.; BRIANC S.; FESSI H.; CHEVALIER I.; PERRIER B. R. Simultaneous emulsification and interfacial polycondensation for the preparation of colloidal suspensions of nanocapsules. *Materials Science and Engineering, Amsterdam*, v.26, p.472 – 480, 2006.

BOUCHEMAL K.; BRIANÇON S.; PERRIER E.; FESSI H.; BONNET I.; ZYDOWICZ N. Synthesis and characterization of polyurethane and poly(etherurethane) nanocapsules using a new technique of interfacial polycondensation combined to spontaneous emulsification. *International Journal of Pharmaceutical, Amsterdam*, v, 269, p.89–100, 2004.

BOUWSTRA J.A.; HONEYWELL-NGUYEN P.L. Skin structure and mode of action of vesicles. *Advanced Drug Delivery Reviews, Amsterdam*, 54 Suppl. 1 S41–S55, 2002.

BRASIL, ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RE nº 899. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Publicado em 29 de maio de 2003.

BROOKING J.; DAVIS S. S.; ILLUM L. Transport of nanoparticles across the rat nasal mucosa. *Journal of Drug Targeting, Yverdon*, v.9, n.4, p.267-279, 2001.

CAI Q.; RAHNH R. O.; ZHANGA R. Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. *Cancer Letters, Amsterdam*, v.119, p.99- 107, 1997.

CALVO P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative *in vitro* evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *Journal of Pharmaceutical Sciences, Arlington*, v. 85, p. 530-6, 1996.

CARLI R. B. G. Desenvolvimento de formas farmacêuticas semi-sólidas contendo ácido caurenóico e avaliação da atividade antiinflamatória *in vivo*. 2007. 118f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí, Brasil.

CEGNAR M.; KOS J.; KRISTL J. Cystatin incorporated in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: development and fundamental studies on preservation of its activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, Arlington*. v. 22, p. 357–364, 2004.

CEVC G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Advanced Drug Delivery Reviews, Amsterdam*, v. 56, p. 675-711, 2004.

CEVC G.; GEBAUER D.; STIEBER J.; SCHA"TZLEIN A.; BLUME G. Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam*, v. 1368, p. 201–215, 1998.

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.; POVOA L. C. Phytoestrogens: Position of the Department of Female Endocrinology of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism. (SBEM). *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v.46, n.6, p. 679-695, 2002.

CORNELIO R.; MAYORGA P. Estudo da penetração cutânea do flurbiprofeno. *Latin American Journal of Pharmacy, Buenos Aires*, v. 26, n. 6, p 883-888, 2007.

CORRIGAN O. I.; LI X. Quantifying drug release from PLGA nanoparticulates. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, Arlington*, v. 37,p. 477-485, 2009.

CUI F.; SHI K.; ZHANG L.; TAO A.; KAWASHIMA Y. Biodegradable nanoparticles loaded with insulin–phospholipid complex for oral delivery: Preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation. *Journal of controlled release, Amsterdam*, v.114, p.242–250, 2006.

DAVIS D. D.; DÍAZ-CRUZ E. S.; LANDINI S.; KIM Y.; BRUEGGEMEIER R. W. Evaluation of synthetic isoflavones on cell proliferation, estrogen receptor binding affinity, and apoptosis in human breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, Amsterdam*, v.108, p.23–31, 2008.

DAVIS S. R.; MURKIES A. L.; WILCOX G. Phytoestrogens in Clinical Practice. *Integrative Medicine*. v.01, n.1, p.27-34, 1998.

DINIZ D. G. A. Obtenção, caracterização e avaliação da citotoxicidade sobre células neoplásicas da isotretinoína encapsulada em lipossomas e nanocápsulas poliméricas. 2008. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde), Universidade de Brasília, Brasil.

DRUG BANK, Showing drug card of Genistein (DB01645). Disponível em: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01645>. Acesso em 14 de setembro de 2008.

DWIECKI K.; NEUNERT G.; POLEWSKI K. Affinity of genistein and daidzein to phosphatidylcholine membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*. v.149, s.1, p.S76-S77, 2007.

DUBEY VAIBHAV, MISHRA DINESH, ASTHANA ABHAY, JAIN NARENDRA KUMAR. Transdermal delivery of a pineal hormone: Melatonin via elastic liposomes. *Biomaterials*, v. 27, p. 3491–3496, 2006.

DYNAMIC LIGHT SCATTERING, Disponível em: <[http:// www.malvern.co.uk](http://www.malvern.co.uk)>. Acesso em: Dezembro de 2008.

ELIAS P. M. Lipids and the epidermal permeability barrier. *Archives of Dermatological Research*, v.270, p.95-117, 1981.

ELIAS P. M.; FRIEND D. S. THE PERMEABILITY BARRIER IN MAMMALIAN EPIDERMIS. *The Journal of Cell Biology*. v. 65, p. 180-191, 1975.

ELIAS, P.M. Epidermal barrier function: intercellular epidermal lipid structures, origin, composition and metabolism. *Journal of controlled release, Amsterdam*, v.15, p. 199-208, 1991.

FDA. Food and Drug Administration. Summary Minutes of the Oncologic Drugs Advisory Committee. *Abraxane, Abraxis Bioscience, Inc.* p.1-5, 2006. Disponível em: <<http://74.125.47.132/search?q=cache:yhZU3x-lNk0J:www.fda.gov/ohrms/dockets/AC/06/minutes/2006-4235m2-01.pdf+FDA+Abraxane%C2%AE+2006&hl=pt-BR&ct=clnk&cd=1&gl=br>> Acesso: 16 de fevereiro de 2009.

FESSI C.; DEVISSAGUET J. Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanoparticles. *United States Patent*, US5118528, 1992. Disponível em: http://v3.espacenet.com/publicationDetails/biblio?adjacent=true&KC=A&date=19920602&NR=5118528A&DB=EPODOC&locale=en_EP&CC=US&FT=D. Acesso: 16 de fevereiro de 2009.

FESSI H.; PUISIEX F.; DEVISSAGUET J.; AMOMOURY N.; BENITA S. Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent

displacement. *International Journal of Pharmaceutical, Amsterdam*, v.55, p. R1-R4, 1989.

FINKELSTEIN ALAN. Water and Nonelectrolyte Permeability of Lipid Bilayer Membranes. *The Journal of General Physiology*, v.68, p. 127-135, 1976.

FISHER G. J.; WANG Z. Q.; DATTA S. C. VARANI J.; KANG S.; VOORHEES J. J. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet ligh. *New England Journal of Medicine*, v. 337, p.1419-1428, 1997 *apud* XAVIER, C.R. Associação da isoflavona genisteína com B-ciclodextrina: avaliação da penetração cutânea; 2005. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. *Princípios físico químicos em farmácia*. São Paulo: Edusp, 2003 *apud* SATO M. E. O.; GOMARA F.; PONTAROLO R.; ANDREAZZA I. F. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, São Paulo*, v. 43, n. 2, p. 195-203, 2007.

FLYNN G. L.; SHAH V. P.; TENJARLA S. N.; CORBO M.; DEMAGISTRIS D.; FELDMAN T. G.; FRANZ T. J.; MIRAN D. R.; PEARCE D. M.; SEQUEIRA J. A.; SWARBRICK J.; WANG J. C.T.; YACOBI A.; ZATS J. L. Assessment of value and applications of in vitro testing of topical dermatological drug products. *Pharmaceutical Research*, v. 16, n. 9, p.1325-1330, 1999.

FONSECA A.; PRISTA L. N. Manual de terapêutica dermatológica e cosmetologia. São Paulo, Roca, 2000.

FRANZ T. J.; LEHAMN P. A.; FELDMAN R.; SPELLMAN M. C. Bioavailability of Clobetasol Propionate in Different Vehicles. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology, Switzerland*, v. 16, p. 212-216, 2003.

FREITAS M.N.; MARCHETTI J. M. Nimesulid PLA microspheres as a potencial sustained release system for the treatment of inflamatory diseases. *International Journal of Pharmaceutical, Amsterdam*, v.295, p.201-211, 2005.

FUKUSHIMA K.; TABUANI D.; CAMINO G. Nanocomposites of PLA and PCL based on montmorillonite and sepiolite. *Materials Science and Engineering, Amsterdam*, v.29, p. 1433-1441, 2009.

FUKUTAKE M.; TAKAHASHI M.; ISHIDA K.; KAWAMURA H.; SUGIMURA T.; WAKABAYASHI K. Quantification og Genistein and Genistin in Soybeans al Products. *Food and Chemical Toxicology* v.3, p.457-461, 1996.

GAO D.; MAURIN M. B. Physical Chemical Stability of Warfarin Sodium. *American Association of Pharmaceutical Scientists, Arlington*, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2001.

GARCÍA-PÉREZ M. A.; NOGUERA R.; VAL R. D.; NOGUERA I.; HERMENEGILDO C.; CANO A. Comparative effects of estradiol, raloxifene and genistein on the uterus of ovariectomized mice. *Fertility and Sterility*, v. 86, p. 1003-5, 2006.

GARRIDO A. G.; MAZA M. P. C.; VALLADARES L. B. Fitoestrógenos dietarios y SUS potenciales beneficios em La salud Del adulto humano. *Rev. Med Chile*, 131, p. 1321-28, 2003.

GENERAL S.; THÜNEMANN A. F. pH-sensitive nanoparticles of poly(amino acid) dodecanoate complexes. *International Journal of Pharmaceutical, Amsterdam*. v. 230, p.11–24, 2001.

GODIN B.; TOUITOU E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Advanced Drug Delivery Reviews, Amsterdam*, v. xx, p. xxx–xxx, 2007.

GOUGELET ANG´ELIQUE; STEFAN O. KEN S.; KORACH C, RENOIR JACK-MICHEL. Oestrogen receptors pathways to oestrogen responsive elements:The transactivation function-1 acts as the keystone of oestrogen receptor (ER)-

mediated transcriptional repression of ER. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, Amsterdam*, v.104, p.110–122, 2007.

GOVENDER T.; STOLNIK S.; GARNETT M. C.; ILLUM I.; , DAVIS S. S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of controlled release, Amsterdam*, v.57, p.171–185, 1999.

GRAF R.; COUVREOUR P. Nanocapsules: preparation, characterization and therapeutic applications. In: TORCHILIN V. P. Nanoparticulates as drug carriers, *Imperial Colegial Press*, 2006, p. 261.

GUIDANCE FOR INDUSTRY. Topical Dermatological Drug Product NDAs and ANDAs —*In Vivo* Bioavailability, Bioequivalence, *In Vitro* Release, and Associated Studies U.S. *Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER)*, june 1998.

GUINEBRETIERE S.; BRIANÇON S.; LIETO J.; MAYER C.; FESSI H. Study of the emulsion-diffusion of solvent: preparation and characterization of nanocapsules. *Drug Development Research, Wallingford*, v. 57, n. 1, p. 18-33, 2002.

GUTERRES S. S.; BECK R. C. R.; POHLMANN A. R. Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: a brief overview. *Brazilian Journal of Physics, São Paulo*, v. 39, n. 1A, 2009.

GUTERRES S. S.; FESSI H.; BARRATT G.; DEVISSAGUET J. P.; PUISIEUX F. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study, *International Journal of Pharmaceutical, Amsterdam*. 113, 57–63, 1995.

GUTIÉRREZ J.M.; GONZÁLEZ C.; MAESTRO A.; SOLÈ I.; PEY C.M.; NOLLA J. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science, Amsterdam*, v. 13, p. 245–251, 2008.

HABERLAND A.; SCHREIBER S.; MAIA C. S.; RUßBELKE M. K.; SCHALLER M.; KORTING H. C.; KLEUSER B.; SCHIMKE I.; SCHÄFER-KORTING M. The impact of skin viability on drug metabolism and permeation—BSA toxicity on primary keratinocytes. *Toxicology in Vitro*, v. 20, p. 347–354, 2006.

HADGRAFT JONATHAN. Passive enhancement strategies in topical and transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutical*, Amsterdam 184, p.1–6, 1996.

HADGRAFT JONATHAN. Skin deep. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Stuttgart; v.58; p. 291–299; 2004.

HADGRAFT JONATHAN; LANE MAJELLA E. Skin permeation: The years of enlightenment. *International Journal of Pharmaceutical*, Amsterdam, v.305, p.02–12, 2005.

HANSON Research Corp. Vertical Diffusion Cell. Set-Up and manual operation, 2003.

HARADA, K. *et al.* Role of intercellular lipids in stratum corneum in the percutaneous permeation of drugs. *The Journal for Investigative Dermatology*, v. 99, n. 3, p. 278-282, 1992 *apud* BEMVINDO C. S. Estudo comparativo da liberação e penetração cutânea de nitrato de miconazol de emulsões tópicas comerciais. 2006.112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

HIGUCHI W. I. Analysis of data on the medicament release from ointments. *Journal of Pharmaceutical Science*, 51; 8; 802-4, 1962.

HIGUCHI T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *Journal of Pharmaceutical Science*; 50; 874-5, 1961.

HIGUCHI T. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, v. 11, p 85, 1960 *apud* TOSCANO C.; CAMPOS R.; BICA A.; FARINHA A. R. Desenvolvimento e validação de um sistema de avaliação da liberação *in vitro* do peróxido de benzoíla veiculado em géis. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 341-346, 2001.

HODGSON JONATHAN M., CROFT KEVIN D., PUDDEY IAN B., MORI TREVOR A., BEILIN LAWRIE J. Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit *in vitro* lipoprotein oxidation in serum. *Journal of Nutritional Biochemistry*, Lexington, v. 7, p.664-669, 1996.

HOELLER S.; SPERGER A.; VALENTA C. Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation. *International Journal of Pharmaceutical*, Amsterdam, v. 370, p. 181–186, 2009.

HUANG X.; TANOJO H.; LENN J.; DENG H.; KROCHMAL L. A novel foam vehicle for delivery of topical corticosteroids. *Journal of the American Academy of Dermatology*, Auburn, v. 53, n.1, p. S26-S38, 2005.

[HUANG Z. R.](#); [HUNG C. F.](#); [LIN Y. K.](#); [FANG J. Y.](#) In vitro and in vivo evaluation of topical delivery and potential dermal use of soy isoflavones genistein and daidzein. *Int J Pharm.* v.19, n.364(1), p. 36-44, 2008.

JEFFERY H.; DAVIS S. S.; O'HAGAN D. T. The preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. I. Oil-water emulsion solvent evaporation *International Journal of Pharmaceutical*, Amsterdam; v. 77, p. 169-175, 1991 *apud* FREITAS M.N.; MARCHETTI J. M. Nimesulid PLA microspheres as a potencial sustained release system for the treatment of inflammatory diseases. *International Journal of Pharmaceutical*, Amsterdam, v.295, p.201-211, 2005.

KAINZ C.; GITSCH G.; STANI J. When applied to facial skin, does estrogen ointment have systemic effects? *Arch Gynecol Obstet*, 253:71, 1993, *apud*

BAUMANN L. Hormônios e envelhecimento cutâneo. *In: BAUMANN L. Dermatologia Cosmética: Princípios e Prática. Editora Revinter, 2004, p. 27-28.*

KANG S.; CHUNG J. H.; LEE J. H.; FISHER G. J.; WAN Y. S.; DUEL 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 Investigate Dermatology, Chapel Hill*, v. 120, p. 835-841, 2003.

KAWASAKI E. S.; PLAYER A. Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, New York*, v. 1, p. 101– 109, 2005.

KERRY NICOLE; ABBEY MAVIS. The isoflavone genistein inhibits copper and peroxy radical mediated low density lipoprotein oxidation *in vitro*. *Atherosclerosis, Charlottesville*, v.140, p. 341–347, 1998.

KHOEE S.; YAGHOUBIAN M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. *European Journal of Medicinal Chemistry, Amsterdam*, xxx,p.1–8, 2008.

KIBBE A. H.; Handbook of excipients. 3^a edition, APHA. Washington, 2000.

KIM K.; BAEK K.; SHI J.; KIM J. Thermal properties and nanoencapsulation of phase change materials (PCM) by miniemulsion polymerization. *Applied Chemistry*, v. 8, n. 2, p. 422-425, 2004a.

KIM S.; SHIN H.; KIM S. Y.; KIM J. H.; LEE Y. S., KIM D. , LEE M.. Genistein enhances expression of genes involved in fatty acid catabolism through activation of PPAR. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 220,p. 51–58, 2004b.

KIM S.; SHIBATA E.; SERGIENKO R.; NAKAMURA T. Purification and separation of carbon nanocapsules as a magnetic carrier for drug delivery systems. *Carbon*.v.46, p. 1523-29, 2008.

KOO O. M.; RUBINSTEIN I.; ONYUKSEL H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, New York*, v.1, p. 193– 212, 2005.

KWON SH, KIM SY, HA KW, KANG MJ, HUH JS, IM TJ, KIM YM, PARK YM, KANG KH, LEE S, CHANG JY, LEE J, CHOI YW. Pharmaceutical evaluation of genistein-loaded pluronic micelles for oral delivery. *Arch Pharm Res.* v. 30, n.9, p.1138-43, 2007.

LACHMAN L.; LIEBERMAN A H.; KANING L. J. *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*. Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, 2001.

LADEMANN J.; ILGEVICIUS A.; ZURBAU O.; LIESS H. D.; SCHANZER S.; WEIGMANN H. J.; ANTONIOU C.; PELCHRZIM R. V.; STERRY W. Penetration studies of topically applied substances: optical determination of the amount of stratum corneum removed by tape stripping. *Journal of Biomedical Optics, Bellingham*, v. 11, n.5, p. 054026-1- 6, 2006.

LADEMANN J.; RICHTER H.; TEICHMANN A.; OTBERG N.; BLUME-PEYTAVI U.; LUENGO J.; WEIß B.; SCHAEFER U. F. LEHR C.; WEPF R.; STERRY W. Nanoparticles – An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Stuttgart*, v. 66, p. 159–164, 2007.

LANDGRAF W.; LI N.; BENSON J. R. Polymer microcarrier exhibiting zero-order release. *Drug Del Tech LLC* 2003; 3; 1; 56-63.

LAMOREA, S. Transporte através da pele, 2006. Ilustração. Disponível em: www.tqfsite.eng.br/JPG/pele.jpg. Acesso em 22/02/2008.

LAU KENT G., HATTORI YOSHIYUKI, CHOPRA SUNIL, O'TOOLE EDEL A., STOREY ALAN, NAGAI TSUNEJI, MAITANI YOSHIE. Ultra-deformable liposomes containing bleomycin: In vitro stability and toxicity on human cutaneous

keratinocyte cell lines. *International Journal of Pharmaceutical, Amsterdam*. v. 300, p.4–12, 2005.

LEGRAND P.; LESIEUR S.; BOCHOT A.; GREF R.; RAATJES W.; BARRATT G.; VAUTHIER C. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *International Journal of Pharmaceutical, Amsterdam*. v. 344, p. 33–43, 2007.

LEMARCHAND C.; GREF R.; LESIEUR S.; HOMMEL H.; VACHER B.; BESHEER A.; MAEDER K.; COUVREUR P. Physico-chemical characterization of polysaccharide-coated nanoparticles. *Journal of controlled release, Amsterdam*. v.108, p. 97– 111, 2005.

LEO E.; FORNI F.; BERNABEI M. T. Surface drug removal from ibuprofen-loaded PLA microspheres. *International Journal of Pharmaceutical, Amsterdam*, v. 196, n. 1, p. 1-9, 2000.

[LEONARDUZZI G](#), [TESTA G](#), [SOTTERO B](#), [GAMBA P](#), [POLI G](#). Design and Development of Nanovehicle-Based Delivery Systems for Preventive or Therapeutic Supplementation with Flavonoids. [Curr Med Chem](#), 2009.

LÉPORI LUIS RAÚL. A pele – Miniatlas. Soriak COMÉRCIO E Promoções S.A. São Paulo, 2006.

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

LIMA E. M. Lipossomas: Estrutura, propriedades, aplicações. São Paulo. 1995. 209 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

LIMAYEM I.; CHARCOSSET C.; FESSI H. Purification of nanoparticle suspensions by a concentration/diafiltration process. *Separation and Purification Technology*, v. 38, p. 1–9, 2004.

LIRA A. A. M. Estudo de permeação *in vitro* e avaliação térmica de emulgel tópico a base de lapáchol. 2003. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

LIRA A. A. M.; SESTER E. A.; ABREU L. R. P.; SILVA L. B. L.; WANDERLEY A. G.; SANTANA D. P. Desenvolvimento preliminar de gel de lapachol: estudo de permeação *in vitro*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, São Paulo*, v. 40, n. 1, p. 35-41, 2004.

LIU M.; DONG J.; YANG Y.; YANG X.; XU H. Anti-inflammatory effects of triptolide loaded poly(d,l-lactic acid) nanoparticles on adjuvant-induced arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology, Amsterdam*, v. 97, p. 219–225, 2005.

LIU J.; HU W.; CHEN H.; NI Q.; XU H.; YANG X. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. *International Journal of Pharmaceutical, Amsterdam*; v. 328 p. 191–195, 2007.

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

LOPES C. M.; LOBO J. M. S.; COSTA P. F. Modified release of drug delivery systems: hydrophilic polymers *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, São Paulo*; v. 41, n. 2, p. 143-54, 2005.

[LOPES, E.](#) ; POHLMANN, Adriana Raffin ; [BASSANI, V. L.](#) ; GUTERRES, S. S. Polymeric colloidal systems containing ethionamide: Preparation and physico-chemical characterization. *Die Pharmazie*, v. 55, n.7, p. 527-530, 2000.

LUI M. C. Y.; AGUIAR C. L.; ALENCAR S. M.; SCAMPARINI A. R. P.; PARK Y. K. Isoflavonas em isolados e concentrados protéicos de soja. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v. 23 (supl), p. 206-12, 2003.

MAGHRABY GAMAL M.M. EL, WILLIAMS ADRIAN C., BARRY BRIAN W. Skin delivery of oestradiol from lipid vesicles: importance of liposome structure. *International Journal of Pharmaceutical, Amsterdam*, v.204, p.159–169, 2000.

MARTINS M. R. F. M.; VEIGA F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, São Paulo*, v. 38, n. 1, p. 33-54, 2002.

MASINI, V.; BONTE, F.; MEYBECK, A.; WEPIERRE, J. Cutaneous bioavailability on hairless rats of tretinoin in liposomes or gel. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 82, n. 1, p. 17-21, 1993 *apud* SATO M. E. O.; GOMARA F.; PONTAROLO R.; ANDREAZZA I. F. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, São Paulo*, v. 43, n. 2, p. 195-203, 2007.

MATSUMOTO A.; MATSUKAWA Y.; SUZUKI T.; YOSHINO H. Drug release characteristics of multi-reservoir type microspheres with poly(DL-lactide-co-glycolide) and poly(DL-lactide). *Journal of Controlled Release, Amsterdam*, v.106, p.172-180, 2005.

MERCK INDEX. The Merck Index- An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Whitehouse Station, N J.; Thirteenth Edition, 2001.

[MINGHETTI P](#), [CILURZO F](#), [CASIRAGHI A](#), [MONTANARI L](#). Evaluation of ex vivo human skin permeation of genistein and daidzein. *Drug Deliv.* v.13, n. 6, p.411-5, 2006.

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

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

MOINARD-CHÉCOT D.; CHEVALIER Y.; BRIANÇON S.; BENEY L.; FESSI H. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion–diffusion process. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.317, p.458–468, 2008.

MOSER KATRIN; KRIWET KATRIN; NAIK AARTI; KAHA YOGISHWAR N.; GUY RICHARD H.; Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutical*, v.52, p.103-102, 2001.

MOTHÉ C.; AZEVEDO A. D. Análise térmica de materiais. São Paulo. iEditora, 2002.

MUCCILLO E. N. S.; SILVA C. O.; MUCCILLO R. Características físicas do óxido de cério preparado por diversos métodos. In: Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 18º CBECiMat, 2008, Porto de Galinhas, PE, Brasil. Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 18º CBECiMat, 2008, Porto de Galinhas, PE, Brasil, p. 263-273.

MÜLLER CLAUDIA REGINA, HAAS SANDRA ELISA, BASSANI VALQUÍRIA LINCK; GUTERRES SÍLVIA STANISÇUASKI. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. *Quimica. Nova*, v. 27, n. 4, p. 555-560, 2004.

MULLER C. R.; BASSANI V. L.; POHLMANN A. R.; MICHALOWSKI C. B.; PETROVICK P. R.; GUTERRES S. S. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, New Jersey, v. 26, p. 343, 2000.

MURKIES AL, WILCOX G, DAVIS SR. Clinical review 92: Phytoestrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:297-303 *apud* 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.; POVOA L. C. Phytoestrogens: Position of the Department of Female Endocrinology of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism. (SBEM). *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, São Paulo*, v.46, n.6, P. 679-695, 2002.

NACHTIGALL, L. E. Isoflavones in the management of menopause, *Journal of the British Menopause Society*, Supplement S1, p. 8-12, 2001.

NANO AJETUDES CLUB. Disponível em: <http://www.ajetudes.club.fr/nano/images/index.4.jpg> Acesso em 14 de fevereiro de 2009.

NG YULIANA, HANSON STEVEN, MALISON JEFFREY A., WENTWORTH BERNARD, BARRY TERENCE P. Genistein and other isoflavones found in soybeans inhibit estrogen metabolism in salmonid fish. *Aquaculture*, v.254, p.658–665, 2006.

NHUNG DANG THI TUYET; FREYDIERE ANNE-MARIE; CONSTANT H'EL`ENE; FALSON FRANCOISE; PIROT FABRICE. Sustained antibacterial effect of a hand rub gel incorporating chlorhexidine-loaded nanocapsules (Nanochlorex®). *International Journal of Pharmaceutical, Amsterdam*, 334, p.166–172, 2007.

NIEMEYER C. M. Nanoparticles, Proteins, and Nucleic Acids: Biotechnology Meets Materials Science. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, p. 4128-58.

O'DONNELL, P. B. Mcginitry, preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Advanced Drug Delivery Reviews, Amsterdam*, 228, 25-42, 1997.

OECD nº 428. Guideline for the testing of chemicals, GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Skin Absorption: in vitro Method. OECD, Paris. Adopted: 13 April 2004.

OLIVEIRA, C. P. M. S. Estresse oxidativo. *Revista de Nutrição e Saúde, São Paulo*, v. Jul/Ago, 1999.

ORTIZ P. G.; HANSEN S. H.; SHAH V. P. MENNE T.; BENFELDT E. The effect of irritant dermatitis on cutaneous bioavailability of a metronidazole formulation, investigated by microdialysis and dermatopharmacokinetic method. *Contact Dermatitis*, v. 59: p. 23–30, 2008.

OURIQUE A. F.; POHLMANN A. R.; GUTERRES S. S.; BECKD R. C. R. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *International Journal of Pharmaceutical, Amsterdam*, v. 352, p. 1–4, 2008.

PATISAUL H. B.; WHITTEN P. L.; YOUNG L. J. Regulation of estrogen receptor beta mRNA in the brain: opposite effects of 17 β -estradiol and the phytoestrogen, coumestrol. *Molecular Brain Research, New Jersey*, 67, p.165-171, 1999.

PAULA S.; VOLKOV A. G.; VAN HOEK A. N.; HAINES T. H.; DEAMER D. W. Permeation of Protons, Potassium Ions, and Small Polar Molecules Through Phospholipid Bilayers as a Function of Membrane Thickness. *Biophysical Journal*, v.70, p.339-348, 1996.

PELCHRIZIM R.; WEIGMANN H.; SCHAEFER H.; HAGEMEISTERT T.; LINSCHIED M.; SHAH V. P.; STERRY W.; LADEMANN J. Determination of the formation of the stratum corneum reservoir for two different corticosteroid formulations using tape stripping combined with UV/VIS spectroscopy. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, v. 11, p. 914-919, 2004.

PIGNATELLO R.; BUCOLO C.; SPEDALIERI G. A.; MALTESE A.; PUGLISI G. Flurbiprofen-loaded acrylate polymer nanosuspensions for ophthalmic application. *Biomaterials, New Jersey*, v.23, p.3247–3255, 2002.

POHLMANN ADRIANA R., GUTERRES SILVIA S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutical, Amsterdam*. v.341, p.215–220, 2007.

PRISTA L. NOGUEIRA; ALVES A. CORREIA; MORGADO RUI. *Tecnologia Farmacêutica*. Fundação Calouste Gulbenkian. Volume I, II e III, 1995.

PUGLISI G.; FRESTA M.; GIAMMONA G.; VENTURA C. A. Influence of the preparation conditions on poly(ethylcyanoacrylate) nanocapsules formation. *International Journal of Pharmaceutical, Amsterdam*. v.125, p.283–287, 1995.

RAWAT A.; MAJUMDER Q. H.; AHSAN F. Inhalable large porous microspheres of low molecular weight heparin: In vitro and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release, Amsterdam*, v. 128, p. 224–232, 2008.

RECORD IAN R., DREOSTI IVOR E., MCINERNEY JENNIFER K. The antioxidant activity of genistein in vitro. *Journal of Nutritional Biochemistry, Lexington*, v.6, p.481-485, 1995.

REIS C. P.; NEUFELD R. J.; RIBEIRO A. J.; VEIGA F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, New York*, v. 2, p.8– 21, 2006.

RIBEIRO L. R. Encapsulação da Genisteína em lipossomas: caracterização das interações fármaco-lipídeo, estabilidade e atividade antioxidante. 2008. 114f. Dissertação (Mestrado em Química da Universidade Federal de Goiás), Brasil.

RÜBE A, HAUSE G.; MA"DER K.; KOHLBRECHER J. Core-shell structure of Miglyol/poly(d,l-lactide)/Poloxamer nanocapsules studied by small-angle neutron scattering. *Journal of Controlled Release, Amsterdam*, v.107; p.244 – 252, 2005.

SANTOS N. P. S.; NASCIMENTO S. C.; SILVA J. F.; PEREIRA E. C. G.; SILVA N. H.; HONDA N. K.; MAGALH"ES N. S. S. Usnic acid-loaded nanocapsules: na evaluation of citotoxicity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology. Paris*, v. 15, p. 355-361, 2005.

SATO M. E. O.; GOMARA F.; PONTAROLO R.; ANDREAZZA I. F. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, São Paulo*, v. 43, n. 2, p. 195-203, 2007.

SCH"AFER-KORTING M. A.; WOLFGANG M. B.; KORTING H. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews, Amsterdam*, v. 59, p. 427–443, 2007.

SCHAFFAZICK S. R.; GUTERRES S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos *Quimica Nova, São Paulo*, v. 26, n. 5, p.726-737, 2003.

SCHMALTZ C.; SANTOS J. V.; GUTERRES S. S. Nanocápsulas como uma tendência Promissora na área cosmética: a imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. *Infarma, Brasília*, v.16, nº 13-14, 2005.

SCHMIDT J. B.; BINDER M.; DEMSCHIK G. Treatment of skin aging with topical estrogens. *International Journal of Dermatology, Rochester*, 35: 669, 1996.

SCHREIBER S.; MAHMOUD A.; VUIA A.; RU"BBELKE M. K.; SCHMIDT M.; SCHALLER M.; KANDA´ROVA H.; HABERLAND A.; SCHA"FER U. F.; BOCK U.; KORTING H. C.; LIEBSCH M.; SCHA"FER-KORTING M. Reconstructed epidermis versus human and animal skin in skin absorption studies. *Toxicology in Vitro*, v.19, p. 813–822, 2005.

SHAH V. P.; FLYNN G. L.; YACOBI A.; MAIBACH H. I.; BON C.; FLEISCHER N. M.; FRANZ T. J.; KAPLAN S. A.; KAWAMOTO J.; LESKO L. J.; MARTY J.; PERSHING L. K.; SCHAEFER H.; SEQUEIRA J. A.; SHRIVASTAVA S. P.; WILKIN J.; WILLIAMS R. L. Bioequivalence of topical dermatological dosage forms- methods of evaluation of bioequivalence - AAPS/FDA Workshop Report. *Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 2, p. 167-171, 1998.

SHAH, V.P.; ELKINS, J.; SKELLY, J P. Relationship between *in vivo* skin blanching and *in vitro* release rate for betamethasone valerate creams. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Arlington, Washington, v. 81, n. 1, p. 104-106, 1992
apud SATO M. E. O.; GOMARA F.; PONTAROLO R.; ANDREAZZA I. F. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 195-203, 2007.

SIEPMANN J.; PEPPAS N. A. Modeling of drug from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*, Amsterdam; v. 48; p. 139-57; 2001.

SIGMA-ALDRICH. Product information: TWEEN[®] 80. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/productinformationsheet2/p4780pis.Par.0001.File.tmp/p4780pis.pdf>. Acesso em 03 de julho de 2007a.

SIGMA-ALDRICH. Product information: TWEEN[®] 20. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/productinformationsheet2/p5927pis.Par.0001.File.tmp/p5927pis.pdf>. Acesso em 03 de julho de 2007b.

SIGMA-ALDRICH. Materials Science, Triton[®] X-100. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=X100%7CSIAL&N5=SEARCH_CONCAT_PNO%7CBRAND_KEY&F=SPEC. Acesso em: 03 de julho de 2007c.

SILVA AP, NUNES BR, DE OLIVEIRA MC, KOESTER LS, MAYORGA P, BASSANI VL, TEIXEIRA HF. Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein. *Pharmazie*, v.64, n.1, p.32-5, 2009.

SILVA C.; MARTINI E.; TAVARES G.; SILVEIRA T.; DE OLIVEIRA M. C.; TEIXEIRA H. Caracterização físico-química de nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos. *Acta Farmaceutica Bonaerense, Buenos Aires*, v.25, n.1, p.17-21, 2006.

SOPPIMATHA KUMARESH S.; AMINABHAVIA TEJRAJ M.; KULKARNIA, ANANDRAO R.; RUDZINSKI B WALTER E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of controlled release, Amsterdam*, v.70, p.1 –20, 2001.

STERLING C. V.; SCRIVEN L. E. Interfacial turbulence: hydrodynamic instability and the Marangoni effect. *A. I. Ch. E. J.*, v. 5, P. 514-523, 1959, *apud* FESSI H.; PUISIEX F.; DEVISSAGUET J.; AMOMOURY N.; BENITA S. Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutical, Amsterdam*, v.55, p. R1-R4, 1989.

STOLNIK S, GARNETT M. C.; DAVIES M. C.; ILLUM L.; BOUSTA M.; DAVIS S. S. The colloidal properties of surfactant-free bio-degradable nanospheres from poly (b-malic acid-co-benzylmalate)s and poly (lactic acid-co-glycolide). *Colloids and surfaces. Physicochemical and engineering aspects*, v.97, p.235–245, 1995.

STROHEKER T., PICARD K, LHUGUENOT J.C, CANIVENC-LAVIER M.C., CHAGNON M.C. Steroid activities comparison of natural and food wrap compounds in human breast cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, v.42, p.887–897, 2004.

SUHONEN, T. M., BOUWSTRA J. A., URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural. *J. Control. Rel.*, Amsterdam, v.59, p. 149–161, 1999 *apud* MARTINS M. R. F. M.; VEIGA F.

Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 33-54, 2002.

SURYANEGARA I.; NAKAGAITO A. N.; YANO H. The effect of crystallization of PLA on the thermal and mechanical properties of microfibrillated cellulose-reinforced PLA composites. *Composites Science and Technology*, v. 69, p. 1187, 2009.

TADROS T. F., The Effect of Polymers on Dispersion Properties, *Academic Press*, 1996 *apud* RÜBE A, HAUSE G.; MA"DER K.; KOHLBRECHER J. Core-shell structure of Miglyol/poly(d,l-lactide)/Poloxamer nanocapsules studied by small-angle neutron scattering. *Journal of controlled release, Amsterdam*, v.107; p.244 – 252, 2005.

TARVER TONI. Food nanotechnology. *Foodtechnology*. p.22-26, 2006. Disponível em: members.ift.org/NR/rdonlyres/FA6CF1C9.../0/ednanotech.pdf. Acesso em: dezembro de 2009.

TAYLOR M. Botanicals; medicines and menopause. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, v. 44, p. 853-63, 2001.

TEIXEIRA M.; ALONSO M. J.; PINTO M. M. M.; BARBOSA C. M. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Stuttgart*. v.59, p. 491–500, 2005.

TEIXEIRA P. R. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas poliméricas contendo isotretinoína. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

TORRES I. M. S. Ceftazidima e cefepima encapsuladas em lipossomas unilamelares: obtenção, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana *in*

vitro contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, 2008. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília, Brasil.

TOSCANO C.; CAMPOS R.; BICA A.; FARINHA A. R. Desenvolvimento e validação de um sistema de avaliação da liberação *in vitro* do peróxido de benzoíla veiculado em géis. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, São Paulo*, v. 37, n. 3, p. 341-346, 2001.

U.S.FDA/CDER. Topical dermatological drug product NDAs and ANDAs – *in vivo* bioavailability, bioequivalence, *in vitro* release, and associated studies, 1998.

VAN DEN BERGH, B. A.I.; SWARTZENDRUBER, D. C.; BOS-VAN DER GEEST, A.; HOOGSTRAATE, J. J.; SCHRIJVERS, A.H.G. J.; BODDE, H. E.; JUNGINGER, H. E.; BOUWSTRA, J. A. Development of an optimal protocol for the ultrastructural examination of skin by transmission electron microscopy. *Journal of Microscopy*, v.187 (2), p.125-133, 1997.

VARELAS C. G.; DIXON D. G.; STEINER C. A. Zero-order release from biphasic polymer hydrogels. *Journal of Controlled Release*, 1995; 34; 185-92.

WANG C.; YE W.; ZHENG Y.; LIU X.; TONG Z. Fabrication of drug-loaded biodegradable microcapsules for controlled release by combination of solvent evaporation and layer-by-layer self-assembly. *International Journal of Pharmaceutical, Amsterdam*. v.338, p.165–173, 2007.

WEI C. New technology and clinical applications of nanomedicine *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, New York*, v. 2, n. 4, P. 269-269, 2006.

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. *Cancers Letters*, v.185, p. 21-29, 2002.

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

WEISSLEDER R.; KELLY K.; SUN E.; STHATLAND T.; JOSEPHSON L. Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. *Nature Biotechnology*. v. 23, n. 11, p. 1418-23, 2005.

WEN C. L. Estrutura completa da pele, 2006. Ilustração. Disponível em: www.saudeparavoce.com.br/.../pele/anatomia02.asp. Acesso em: 22/02/2008.

WESTER, R.C.; MAIBACH, H. I. *In vitro* testing of topical pharmaceutical formulations. In: BRONAUGH, R.L.; MAIBACH, H.I. *Percutaneous absorption: mechanisms, methodology, drug delivery*. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 653-659 *apud* SATO M. E. O.; GOMARA F.; PONTAROLO R.; ANDREAZZA I. F. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 195-203, 2007.

WESTER R. C.; MAIBACH H. I. Percutaneous absorption, cap. 19. In: BRONAUG R. L. & MAIBACH ed., Marcel Deckker, Inc, New York, 1999 *apud* CORNELIO R.; MAYORGA P. Estudo da penetração cutânea do flurbiprofeno. *Latin American Journal of Pharmacy*, Buenos Aires,; v. 26, n. 6, p 883-888, 2007.

WILSON B.; SAMANTA M. K.; SANTHI K. KUMAR K. P. S.; ARAMAKRISHNAN N.; SURESH B. Poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease. *Brain Research*. v.1200, p.159–168, 2008.

XAVIER, C.R. Associação da isoflavona genisteína com B-ciclodextrina: avaliação da penetração cutânea; 2005. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

YANG S., ZHOU Q., YANG X. Caspase-3 status is a determinant of the differential responses to genistein between MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam*, v.1773, p.903–911, 2007.

YOUAN B.B.C.; JACSON T. L.; DICKENS L.; HERNANDEZ C.; ABADIO G. O. Protein release profiles and morphology of biodegradable microcapsules containing and oily core. *Journal of controlled release, Amsterdam*, v.76, p. 313-326, 2001.

ZHAO Q.; LI B. pH-controlled drug loading and release from biodegradable microcapsules. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, New York*, v.4, p.302–310, 2008.

[ZHU S](#), [HONG M](#), [LIU C](#), [PEI Y](#). Application of Box-Behnken design in understanding the quality of genistein self-nanoemulsified drug delivery syst and optimizing its formulation. *Pharm Dev Technol*. v.14, n.6, p.642-9, 2009.

ZIELONKA J.; GEBICKI J.; GRYNKIEWICZ G. Radical scavenging propertiers of Genisteína. *Free Radical Biology & Medicine, Amsterdam*, v. 35, n.8, p. 958-065, 2003.