

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

Associação do coumestrol com β -ciclodextrina:
caracterização e avaliação da penetração cutânea

CAMILA FRANCO

Porto Alegre, 2007

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

Associação do coumestrol com β -ciclodextrina:
caracterização e avaliação da penetração cutânea

Dissertação de mestrado apresentada por **Camila Franco** para
obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Valquiria Linck Bassani

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – Tecnologia Farmacêutica – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 18.12.2007, pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Letícia Scherer Koester

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. José Ângelo Zuanazzi

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Edison Santana de Carvalho

Universidade Luterana do Brasil

F825a	Franco, Camila Associação do coumestrol com beta-ciclodextrina : caracterização e avaliação da penetração cutânea / Camila Franco – Porto Alegre : UFRGS, 2008. – xvi p., 128 p. : il., tab. Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. 1. Coumestrol. 2. Ciclodextrina. 3. Penetração cutânea. 4. Antienvhecimento. I. Bassani, Valquíria Linck. II. Título. CDU: 615.4
-------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Bibliotecária responsável:

Heloísa do Canto Canabarro – CRB10/1036

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmão, pelo apoio e incentivo constantes, essa vitória é nossa. Muito obrigada por tudo!

*Há quem diga que todas as noites são de sonhos.
Mas também há quem diga, nem todas, só as de verão.
Mas no fundo isso não tem importância.
O que interessa mesmo não são as noites em si.
São os sonhos.
Sonhos que o homem sonha sempre.
Em todos os lugares, em todas as épocas do ano.
Dormindo ou acordado.*

Autor desconhecido.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG), empregando equipamentos da Central Analítica, do Laboratório de Química Farmacêutica, do Laboratório de Controle de Qualidade e do Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico (CDTF) da Faculdade de Farmácia; do Centro de Microscopia Eletrônica (CME/UFRGS), da Central de Química Analítica do Instituto de Química da UFRGS e do Instituto de Química do Centro de Ciências Exatas da UFMG.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida; aos meus pais (Edir L. Bisognin e Gentil B. Franco) pela educação, apoio, incentivo e paciência; à minha orientadora Professora Valquiria Linck Bassani por ter aceitado minha orientação, acreditado em meu trabalho, pela troca de saberes e por sua amizade em todos os momentos da minha trajetória.

Agradeço a todos os colegas dos Laboratórios 606 (LDG), 405 e Laboratório de Química Farmacêutica pelo coleguismo, troca de experiências e amizade.

De forma especial, aos amigos que sempre me incentivaram: Liege Schwingel, Roberta Hansel, Gizele do Canto, Greice Borguetti, Cabral Pavei, Caroline Pommerening de Souza, Daniela Belinazo, Patrícia Bevilaqua, Rubia Porsch, Rejjane Santos, Rosicler Canal e Cristian Bastianello; às tias (Eleni, Vanilde, Benigna e Julita Bisognin) e, especialmente, ao meu irmão Fabiano Bisognin Franco.

Obrigada a todos os professores que fizeram parte do meu aprendizado, assim como a todos os funcionários da Faculdade de Farmácia pelo carinho e amizade.

Também sou grata aos profissionais do grupo Impe do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com os quais convivi e aprendi muito no primeiro ano do mestrado e ao Professor Rubén D. Sinisterra e à doutora Ivana Lula de Belo Horizonte que auxiliaram nas análises de RMN.

Agradeço ao Laboratório Roquette et Frères pela doação de β -ciclodextrina e ao CDTF pelo empréstimo do equipamento calorímetro diferencial exploratório para o desenvolvimento do trabalho.

Por fim, agradeço a todos que participaram da minha vida neste período.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	7
2.1 Objetivo Geral	9
2.2 Objetivos específicos	9
REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1 Pele	13
3.2 Envelhecimento cutâneo	17
3.3 Radicais livres.....	20
3.4 Fitoestrógenos	21
3.5 Coumestanos: coumestrol e suas atividades farmacológicas.....	25
MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Materiais e Solventes	47
4.2 Equipamentos	47
4.3 Métodos	48
4.3.1 Validação dos métodos analíticos para o doseamento de coumestrol.....	48
4.3.1.1 Linearidade	49
4.3.1.2 Precisão	50
4.3.1.3 Exatidão	50
4.3.1.4 Especificidade	52
4.3.1.5 Limite de detecção	52
4.3.1.6 Limite de quantificação	53
4.3.2 Associação da aglicona com β -ciclodextrina	53
4.3.3 Caracterização do complexo coumestrol: β -ciclodextrina e da mistura física coumestrol: β -ciclodextrina	55
4.3.4 Avaliação do perfil de penetração cutânea do coumestrol e das associações.....	57
RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 Validação do método de espectrofotometria no ultravioleta, para quantificação de coumestrol.....	63
5.2 Validação do método de quantificação de coumestrol por CLAE	66
5.3 Diagrama de solubilidade, segundo Higuchi e Connors.....	72
5.4 Análise das associações coumestrol: <i>b</i> -ciclodextrina por microscopia eletrônica de varredura	74

5.5 Análise das associações coumestrol: b -ciclodextrina por calorimetria diferencial exploratória	75
5.6 Análise do coumestrol e suas associações com b -ciclodextrina por espectroscopia no infravermelho (IR)	78
5.7 Análises de ressonância magnética nuclear (RMN de ¹ H) e modelagem molecular.....	86
5.8 Avaliação do perfil de penetração cutânea do coumestrol e de suas associações com b -ciclodextrina	96
5.8.1 Solubilidade do coumestrol no meio aceptor.....	96
5.8.2 Determinação do coeficiente de partição octanol/água	96
5.8.3 Experimentos de permeação <i>ex vivo</i> em pele de orelha de suíno	97
CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS	107
ANEXOS	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade de lipídeos presentes na superfície cutânea e espessura do estrato córneo de alguns animais, comparativamente às encontradas na pele humana (MAGNUSSON et al, 2001).	16
Tabela 2. Teste de exatidão na análise de coumestrol por espectrofotometria no ultravioleta, 343 nm.	51
Tabela 3. Teste de exatidão na análise de coumestrol por CLAE, 343 nm.	51
Tabela 4. Proporções de coumestrol e b-ciclodextrina utilizadas na obtenção do diagrama de solubilidade de Higuchi & Connors (1965).	54
Tabela 5. Absorvância do coumestrol na obtenção de curva de calibração pelo método UV, 343 nm.	63
Tabela 6. Parâmetros da análise de regressão linear da curva analítica do coumestrol por espectrofotômetro no ultravioleta.	64
Tabela 7. Precisão inter-dia do método de determinação do coumestrol por espectrofotometria no ultravioleta, 343 nm.	65
Tabela 8. Teste de exatidão da análise do coumestrol pelo método de espectrofotometria no ultravioleta, 343 nm.	66
Tabela 9. Curva de calibração do coumestrol, obtida por CLAE, 343 nm.	67
Tabela 10. Parâmetros da análise de regressão da curva de calibração do coumestrol por CLAE, 343 nm.	68
Tabela 11. Resultados da precisão inter-dia do coumestrol por CLAE, 343 nm.	69
Tabela 12. Resultados do teste de exatidão do doseamento de coumestrol em homogeneizado de pele por CLAE, 343 nm.	71
Tabela 13. Resultados do teste de exatidão do doseamento de coumestrol em soluções de coumestrol por CLAE, 343 nm.	72
Tabela 14. Valores do incremento de solubilidade do coumestrol nas diferentes proporções molares com b-ciclodextrina.	73
Tabela 15. Parâmetros térmicos observados para o coumestrol, b-ciclodextrina, mistura (1:1) e complexo (1:1), obtidos por DSC.	77
Tabela 16. Atribuições dos sinais do espectro de RMN de ¹ H aos átomos de hidrogênio do coumestrol e da b-ciclodextrina.	88
Tabela 17. Resultados de energia (kJ/mol) da análise conformacional dos complexos formados por uma molécula de coumestrol e uma molécula de b-ciclodextrina, calculados por MM2.	93
Tabela 18. Resultados de energia (kJ/mol) da análise conformacional dos complexos formados por duas moléculas de coumestrol e uma molécula de b-ciclodextrina, calculados por MM2.	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas de uma flavona, isoflavona, coumestrol e estradiol (adaptado de HAVSTEEN, 2002; MITCHELL et al., 1998; BECK et al., 2005; KANJI et al., 1999)...	4
Figura 2. Camadas da pele (adaptada de GENNARO, 2005).....	13
Figura 3. Estrutura química e otimizada do equol (ERKOÇ et al, 2005), com ângulos de ligação.	30
Figura 4. Estrutura química da b-ciclodextrina. Átomos de carbono (esferas claras) e, oxigênio (esferas escuras) na primeira estrutura (LOFTSSON e BREWSTER, 1996; BIBBY et al., 2000).	38
Figura 5. Curva de calibração de coumestrol, obtida pelo método de espectrofotometria no ultravioleta, 343 nm.	64
Figura 6. Perfil cromatográfico do coumestrol obtido pelo método CLAE, detecção em 343 nm. (UA = unidade de absorvância).	67
Figura 7. Curva de calibração para o coumestrol, obtido por CLAE, a 343 nm.	68
Figura 8. Cromatograma obtido em teste de especificidade de doseamento de coumestrol em pele, quantificado por CLAE, na presença dos constituintes da pele extraídos pela fase aceptora.	70
Figura 9. Cromatograma obtido em teste de especificidade em relação aos excipientes (na presença de b-ciclodextrina e hidroxipropilmetilcelulose) por CLAE.	70
Figura 10. Diagrama de solubilidade do coumestrol, em presença de concentrações crescentes de b-ciclodextrina.	73
Figura 11. Fotomicrografias do (a) coumestrol, (b) b-ciclodextrina, (c) mistura coumestrol:b-ciclodextrina (1:1) e (d) complexo coumestrol:b-ciclodextrina (1:1) (MEV, magnificação de 2000x, 1000 x e 500 x).	74
Figura 12. Termogramas (DSC) obtidos para o coumestrol, b-ciclodextrina e associações coumestrol:b-ciclodextrina (1:1), obtidas por mistura física ou por complexação.	76
Figura 13. Espectro na região do infravermelho do coumestrol e sua estrutura química.....	79
Figura 14. Espectro da b-ciclodextrina na região do infravermelho.	80
Figura 15. Espectro na região do infravermelho da mistura física coumestrol:b-ciclodextrina (1:1).....	81
Figura 16. Espectro na região do infravermelho do complexo coumestrol:b-ciclodextrina(1:1).	83
Figura 17. Espectros no infravermelho do coumestrol, b-ciclodextrina, mistura física (1:1) e complexo (1:1), com aproximação do valor das bandas.....	85
Figura 18. Estruturas químicas (a) do coumestrol e (b) da β-ciclodextrina.	86
Figura 19. Espectro de RMN de ¹ H do coumestrol: (a) expansão da região de ressonância dos hidrogênios aromáticos (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).	87

Figura 20. Espectro de RMN de ^1H para a β -ciclodextrina em $\text{DMSO-}d_6$ (400 MHz).	87
Figura 21. Espectros de RMN de ^1H (a) do coumestrol e (b) do complexo coumestrol: β - ciclodextrina (1:1) em $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.	89
Figura 22. Mapa de contornos NOESY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) do complexo coumestrol: β -ciclodextrina (a) expansão da região de ressonância dos hidrogênios aromáticos ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz). Numeração de hidrogênios da β -ciclodextrina conforme o trabalho de Schneider (1998).	89
Figura 23. Simulação da estrutura tridimensional do coumestrol por MM2 (Chem3D Ultra).	91
Figura 24. Simulação da estrutura tridimensional da β -ciclodextrina por MM2 (Chem 3D Ultra).	91
Figura 25. Simulação da complexação de uma molécula de coumestrol e uma molécula de β - ciclodextrina por meio da inserção do anel A do coumestrol pelas bordas das hidroxilas primárias e secundárias da β -ciclodextrina, respectivamente.....	92
Figura 26. Simulação da complexação de uma molécula de coumestrol e uma molécula de β - ciclodextrina por meio da inserção do anel B do coumestrol pelas bordas das hidroxilas primárias e secundárias da β -ciclodextrina, respectivamente.....	92
Figura 27. Simulação da complexação de duas moléculas de coumestrol com uma molécula de β -ciclodextrina por meio da inserção do anel A de ambas moléculas de coumestrol pelas bordas das hidroxilas secundárias e primárias da β -ciclodextrina, respectivamente.	93
Figura 28. Simulação da complexação de duas moléculas de coumestrol com uma molécula de β -ciclodextrina por meio da inserção do anel B de ambas moléculas de coumestrol pelas bordas das hidroxilas secundárias e primárias da β -ciclodextrina, respectivamente.	94
Figura 29. Simulação da complexação de duas moléculas de coumestrol com uma molécula de β -ciclodextrina por meio da inserção do anel A de uma das moléculas de coumestrol pela borda das hidroxilas secundárias e, por meio da inserção do anel B da outra molécula de coumestrol pela borda das hidroxilas primárias da β -ciclodextrina, respectivamente.	94
Figura 30. Simulação da complexação de duas moléculas de coumestrol com uma molécula de β -ciclodextrina por meio da inserção do anel B de uma das moléculas de coumestrol pela borda das hidroxilas secundárias e, por meio da inserção do anel A da outra molécula de coumestrol pela borda das hidroxilas primárias da β -ciclodextrina, respectivamente.	95

RESUMO

O coumestrol, isoflavonóide presente na alfafa (*Medicago sativa* L., Fabaceae), é um potente agente antioxidante e estrogênico, podendo ser empregado para fins de prevenção do envelhecimento cutâneo, bem como na reposição hormonal para mulheres pós-menopausa. A sua baixa hidrossolubilidade motivou a investigação de sua associação, em mistura física ou complexado, à β -ciclodextrina (1:1). A presente pesquisa desenvolveu e validou dois métodos analíticos (UV e CLAE) para a quantificação do coumestrol e de suas associações. A caracterização da interação entre o coumestrol e a β -ciclodextrina foi realizada por MEV, DSC, IV, RMN e modelagem molecular. Visando a sua aplicação tópica, foram realizados ensaios de permeação cutânea em pele de orelha de suínos, em células de difusão tipo Franz, de maneira intrínseca e em matriz de gel HPMC F4M. As análises de caracterização da interação indicaram a existência de complexo de inclusão tanto na mistura física como no complexo, mostrando a possibilidade de inclusão do anel A ou B do coumestrol na cavidade da β -ciclodextrina. A inclusão do anel B do coumestrol na extremidade das hidroxilas secundárias da β -ciclodextrina (borda mais larga) mostrou-se favorecida, uma vez que apresentou a menor energia. Na permeação intrínseca, a mistura física apresentou maior quantidade permeada em 8 horas ($22,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e maior fluxo ($3,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) do que o coumestrol ou o complexo coumestrol: β -ciclodextrina. Já a partir do gel, o complexo coumestrol: β -ciclodextrina apresentou a maior quantia permeada ($2,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), bem como o maior tempo de latência que os demais. O coumestrol complexado mostrou maior solubilidade e apresentou razoável permeabilidade cutânea na forma de gel, mostrando-se promissor para aplicação tópica em pele.

Palavras-chave: coumestrol, β -ciclodextrina, complexo de inclusão e permeação na pele.

ABSTRACT

Coumestrol, isoflavonoid present in alfalfa (*Medicago sativa* L, Fabaceae), is a potent antioxidant and estrogenic agent, which could be employed for the cutaneous aging prevention, as well as, in hormonal replacement for pos-menopausal women. Its low solubility in water gave rise to its association investigation, in physical mixture or complexed with β -cyclodextrin (1:1). The present research developed and validated two analytical methods (UV and HPLC) for the quantification of coumestrol and its associations. The characterization of the interaction between coumestrol and β -cyclodextrin was accomplished by SEM, DSC, IR, NMR and molecular modelling. Seeking the topical application, cutaneous permeation assays were accomplished in swine ear skin, in Franz type diffusion cells, in an intrinsic way and in a gel matrix of HPMC F4M. The characterization analyses indicated the existence of an inclusion compound, as much in the physical mixture as in the complex, showing the inclusion possibility of the A or B rings of coumestrol enter in the cavity of β -cyclodextrin. The inclusion of the B ring of coumestrol in the wider rim of β -cyclodextrin showed to be favorable, due to its lower energy. In the intrinsic permeation, the physical mixture presented larger amount permeated in 8 hours of study ($22,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) and larger flow ($3,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) than that of coumestrol or its coumestrol: β -cyclodextrin complex. With respect to the gel permeation, the complex coumestrol: β -cyclodextrin presented the higher permeation amount ($2,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), as well as the largest lag-time than the others. Coumestrol showed higher solubility when complexated with β -cyclodextrin and it presented reasonable cutaneous permeability in the gel form, being promising to topical application in skin.

Key-words: coumestrol, β -cyclodextrin, inclusion complex and permeation in skin.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Os flavonóides são estruturas polifenólicas de baixo peso molecular, sintetizados a partir da fenilalanina e derivados da benzo- γ -pirona. Caracterizam-se pela presença de dois anéis benzênicos (anel A e B), que estão unidos por uma cadeia de três átomos de carbono, dispostos na forma de anel pirano (anel C, Figura 1) (HAVSTEEN, 2002; FONTES, 2004; TAYLOR e GROTEWOLD, 2005).

Dentro do grupo dos flavonóides estão os isoflavonóides, os quais são caracterizados por possuírem cadeia arila-C3-arila, tipo difenil-1,2-propano e que se dividem em mais de quatro subclasses: isoflavonas (Figura 1), isoflavanonas, isoflavanas, pterocarpanos, coumestanos, entre outras. E ao contrário de outras classes de flavonóides, os isoflavonóides possuem distribuição taxonômica restrita no reino vegetal, apresentando-se como agliconas, glicosídeos, malonilglicosídeos e acetilglicosídeos (SIMÕES et al, 2004; ANTONELLI et al, 2005).

As isoflavonas e coumestanos caracterizam-se por apresentar propriedades fitoestrogênicas devido a sua semelhança estrutural com o hormônio estradiol. As isoflavonas (Figura 1) são metabólitos secundários de plantas superiores e os coumestanos são freqüentemente incluídos entre as isoflavonas devido a sua semelhança estrutural e de atividade e, representam uma versão completamente oxidada de flavonóides pterocarpanos (AL-MAHARIK e BOTTING, 2004; GANRY, 2005).

As fórmulas estruturais de uma flavona, isoflavona, coumestrol e do estradiol podem ser observadas na Figura 1.

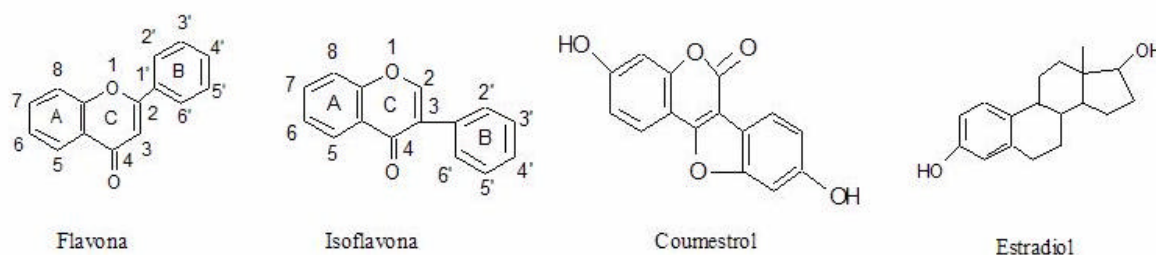


Figura 1. Estruturas químicas de uma flavona, isoflavona, coumestrol e estradiol (adaptado de HAVSTEEN, 2002; MITCHELL et al., 1998; BECK et al., 2005; KANJI et al., 1999).

Nos últimos anos, os flavonóides têm despertado grande interesse em estudos referentes às suas propriedades farmacológicas e bioquímicas, bem como suas aplicações terapêuticas e cosméticas (FICARRA et al., 2002; MALPEZZI et al., 2004; XAVIER, 2005; VIJAYA SRI et al., 2007; SCHWINGEL, 2007).

Entre suas propriedades, destaca-se a atividade antioxidante relacionada com sua ação inibitória sobre enzimas, a capacidade de quelar metais (*quencher*) e remover radicais de oxigênio (*scavenger*), que têm sido relacionada a diversas doenças. Daí seu potencial de uso na prevenção ou tratamento de doenças tais como cardiovasculares, reumáticas, úlceras gastrintestinais, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e alguns tipos de câncer (HEIM et al., 2002; HAVSTEEN, 2002; FONTES, 2004; ELSWIJK et al., 2004).

Adicionalmente, alguns flavonóides podem agir como hormônios devido ao fato de possuírem características estruturais semelhantes às dos hormônios estrogênicos naturais, apresentando função estrogênica (HAVSTEEN, 2002).

Este é o caso das isoflavonas e dos coumestanos. Neste último grupo, encontra-se o coumestrol (Figura 1), conhecido como o composto de mais alta atividade estrogênica entre os isoflavonóides, sendo essa atividade até mesmo maior do que a das isoflavonas (NOGOWSKI, 1999; McGARVEY et al., 2001; JEFFERSON et al., 2002; WHITTEN et al., 2002; POCOCK et al., 2002; YE et al., 2003; AL-MAHARIK e BOTTING, 2004; GANRY, 2005; KOUKI et al., 2005). A adicional atividade antioxidante do coumestrol tem sido referida por Mitchell et al., (1998), Krazeisen et al. (2001) e Zhang e Wang (2004).

A respeito da toxicidade do coumestrol, foram desenvolvidos alguns trabalhos que abrangem seus efeitos sobre culturas celulares mostrando que sua toxicidade é dose-

dependente; sobre células de câncer de pâncreas tendo efeito quimioterápico e em gestantes expostas através da dieta apresentando doses não tóxicas para a mãe e para o feto (KULLING e METZLER, 1997; LYN-COOK et al., 1999; DIEL et al., 2002; KULLING et al, 2002; TOKADA et al, 2005). Quanto a sua toxicidade na pele, não foram encontradas referências científicas. Entretanto, sua ação sobre a 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase pode ser correlacionada a possíveis efeitos na pele, pois tal enzima encontra-se nesse sítio (WHITEHEAD e RICE, 2006).

Por apresentar, simultaneamente, atividade antioxidante e estrogênica, o coumestrol revela-se uma substância de potencial interesse para estudos de formulações destinadas à prevenção do envelhecimento cutâneo, em especial em formulações de aplicação tópica. Neste aspecto também não foram encontrados estudos envolvendo o coumestrol em formulações tópicas ou destinando-o a prevenir ações do envelhecimento cutâneo.

O coumestrol é isolado principalmente da família Fabaceae/Leguminosae, na forma de aglicona, forma em que apresenta atividade estrogênica e solubilidade reduzida, tanto em meio hidrofílico quanto em meio lipofílico. Tal característica representa uma limitação à incorporação dessa substância em formas de administração destinadas ao uso tópico (THE MERCK INDEX, 1996; SIMÕES et al, Cap. 23, 2004; SILVA et al, 2001; HAVSTEEN, 2002).

Como recurso farmacotécnico, as ciclodextrinas que possuem capacidade de formar complexos de inclusão com diferentes substâncias resultando em aumento de sua hidrossolubilidade, poderiam auxiliar na viabilização da incorporação do coumestrol em bases hidrofílicas.

Assim, considerando que o coumestrol é um flavonóide abundante, praticamente insolúvel em água e, face ao seu potencial antioxidante e estrogênico, o presente trabalho realizou o estudo de sua complexação com β -ciclodextrina, bem como a influência dessa associação sobre a penetração cutânea. As hipóteses a serem consideradas são:

- a β -ciclodextrina aumenta a hidrossolubilidade do coumestrol?
- o coumestrol é capaz de penetrar na pele na forma livre?
- as associações com β -ciclodextrina promovem a penetração do coumestrol? Qual forma permeia mais?

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo geral estudar a associação do coumestrol com β -ciclodextrina a fim de melhorar sua hidrossolubilidade e avaliar sua penetração cutânea *ex vivo* em pele suína, na forma livre ou associada (mistura física ou complexada) à β -ciclodextrina.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterização físico-química do coumestrol;
- realização de estudo de solubilidade da associação coumestrol: β -ciclodextrina, determinando a relação molar a ser utilizada para a preparação do complexo em estado sólido ou da mistura física entre as duas substâncias;
- complexação do coumestrol com β -ciclodextrina;
- caracterização física e química da associação coumestrol: β -ciclodextrina;
- avaliação do efeito da β -ciclodextrina na hidrossolubilidade do coumestrol;
- estudo de penetração cutânea *ex vivo* do coumestrol nas diferentes formas: livre ou associada (mistura física e complexado com β -ciclodextrina).

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Pele

A pele é o órgão de revestimento do organismo que o protege do meio ambiente, possuindo área superficial média para um homem adulto de 2 m² (GENNARO, 2005). Devido a sua função de barreira, é um alvo especial do estresse oxidativo (SAIJA et al, 1998). A pele é constituída pelas camadas: epiderme, derme e hipoderme, como apresentado de forma esquemática na Figura 2.

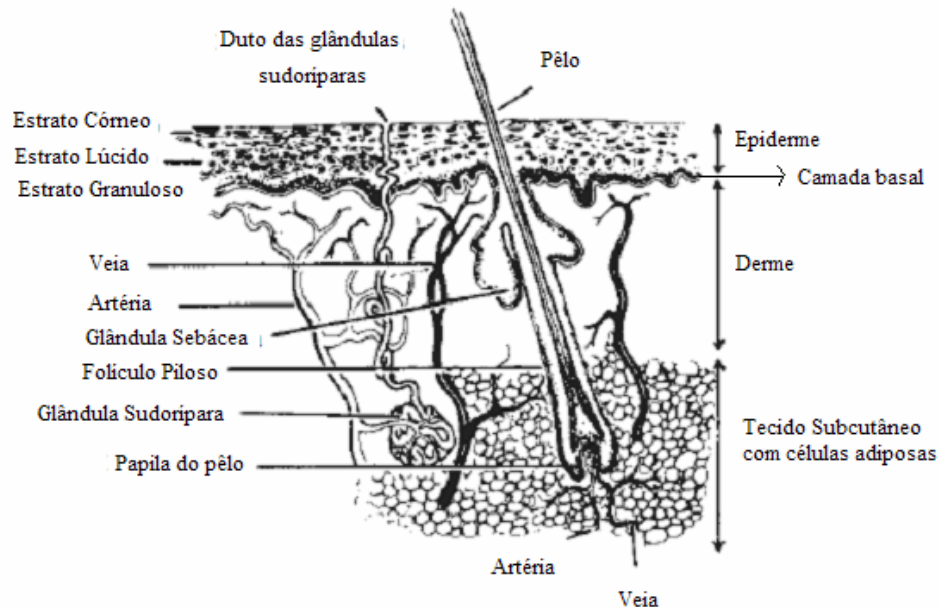


Figura 2. Camadas da pele (adaptada de GENNARO, 2005).

A epiderme é um epitélio formado por várias camadas (multiestratificado) de células achatadas justapostas (epitélio pavimentoso), com 50 µm de espessura. As células que a constituem têm origem na camada basal germinativa e, na medida que envelhecem, tornam-se mais achatadas e passam a produzir e acumular queratina. Quando as células mais superficiais estão repletas de queratina, elas morrem e passam a constituir um revestimento resistente ao atrito e impermeável à água: o estrato córneo (HERNANDEZ e MERCIER-FRESNEL, 1999). Ainda inseridos na camada basal germinativa da epiderme estão os melanócitos que sintetizam a melanina (HERNANDEZ e MERCIER-FRESNEL, 1999).

O estrato córneo é constituído de células epiteliais queratinizadas mortas sobrepostas umas às outras. Sua espessura varia de 10 a 15 μm , sendo a barreira de maior significância para a penetração de substâncias externas. O espaço intercelular é rico em lipídeos com alternância de camadas hidrofílicas e bicamadas lipofílicas, formadas durante o processo de queratinização. O estrato córneo é marcadamente higroscópico, podendo intumescer em torno de três vezes sua espessura original, absorvendo de 4 a 5 vezes seu peso em água. Dentre suas funções, ele retarda a perda de água dos tecidos inferiores, minimiza a penetração da luz ultravioleta e limita a entrada de microorganismos, medicamentos e substâncias tóxicas. O estrato córneo também pode servir como um reservatório onde fármacos aplicados topicamente acumulam-se devido à partição no interior da pele ou ligando-se a componentes da pele (HERNANDEZ e MERCIER-FRESNEL, 1999; MAGNUSSON et al, 2001; WILLIAMS e BARRY, 2004; GENNARO, 2005). Tais características conferem à epiderme a designação de epitélio estratificado pavimentoso queratinizado.

Sob a epiderme, localiza-se a derme que é um tecido conjuntivo com característica elástica (denso estroma fibroelástico de tecido conjuntivo), que contém fibras protéicas, colágeno, fibras de elastina, vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas, órgãos sensoriais, glândulas e outros anexos como pêlos e unhas. A derme possui espessura de 250 μm e sua função é fornecer nutrientes e oxigênio à epiderme por difusão, pois a epiderme é desprovida de vasos sanguíneos (HERNANDEZ e MERCIER-FRESNEL, 1999).

A última camada da pele é a hipoderme, um tecido subcutâneo conjuntivo frouxo, rico em fibras e células que armazenam gordura (adipócitos). A hipoderme atua como reserva energética, proteção a choques mecânicos, isolante térmico e é o tecido responsável pela sustentação e união das camadas celulares superiores ao restante do corpo, o que se dá por meio das fibras de colágeno da derme que penetram através das células de gordura acumuladas, acarretando em uma conexão entre as camadas superficiais da pele e a camada subcutânea (HERNANDEZ e MERCIER-FRESNEL, 1999; GENNARO, 2005).

A fisiologia da pele está relacionada com as seguintes funções (HERNANDEZ e MERCIER-FRESNEL, 1999): proteção física, química e antibacteriana; termorregulação; respiração; reserva de lipídeos em nível de hipoderme; capacidade de percepção de sensações por meio dos receptores, de secreção de sebo por meio das glândulas existentes, de penetração

através da camada córnea e folículos pilossebáceos, de produção de vitamina D, capacidade elétrica, de cicatrização, de perspiração e; função imunitária.

Toda a superfície cutânea possui terminações nervosas capazes de captarem estímulos térmicos, mecânicos ou dolorosos. Essas terminações ou receptores são especializados para estímulos específicos (URANO et al., 1995; HERNANDEZ e MERCIER-FRESNEL, 1999). Tais receptores podem ser classificados como receptores de Krause (frio), Ruffini (calor), Meissner (estímulos táteis), Vater-Pacini (estímulos vibráteis e táteis), discos de Merkel (estímulos táteis e de pressão), terminações nervosas livres (estímulos mecânicos, térmicos e dor) e, receptores de estrogênio (ER) que se localizam na epiderme (queratinócitos, células de Langerhans e melanócitos), vasos sanguíneos e derme (fibroblastos) (THORNTON et al, 2003; SATOR et al, 2004).

O fácil acesso e a possibilidade de manter aplicada uma preparação intacta por um período prolongado tem resultado na utilização desta via de administração, tanto para ação local como sistêmica e, tais efeitos dependem do nível de penetração da mesma.

A pele é o maior alvo não reprodutível no qual agem os estrógenos. Os estrógenos são esteróides com 18 carbonos, cuja produção é regulada pelo eixo hipotálamo-pituitária e é dependente das ações integradas desses órgãos com os ovários (WILLIAMS III et al, 1998; HALL e PHILLIPS, 2005). Os estrógenos exercem sua ação através de sua ligação aos receptores de estrogênio na pele, podendo produzir efeitos agonistas ou antagonistas fracos, dependendo de sua concentração, estado do receptor, disponibilidade de estrógenos endógenos e do órgão-alvo (TAPIERO et al, 2002). A pele da face mostrou expressar mais altas concentrações de receptores ER que a de seios ou coxas. No trato genital, a mais alta concentração de receptores ER é encontrada no epitélio vaginal (HALL e PHILLIPS, 2005).

Os receptores de estrogênio possuem dois subtipos: ER α e ER β . Os ER β são mais comumente distribuídos na pele e em estruturas da pele que os ER α . O ER β é amplamente expressado em epiderme, vasos sanguíneos e fibroblastos dérmicos. A expressão dos receptores ER nas glândulas sebáceas é semelhante. Já suas expressões na pele do couro cabeludo humano e em folículos pilosos do cabelo diferem significativamente. Os receptores ER β são fortemente expressos nos queratinócitos do estrato basal e estrato espinoso, e em

menor grau no estrato granuloso. Também se observou forte presença dos ER β na derme papilar da pele do couro cabeludo humano. No folículo piloso, a expressão de ER α é isolada para as células da papila dérmica, onde o ER β é encontrado na bainha e nas células da papila dérmica. O ER β também estava presente no bulbo do folículo piloso da região occipital do escalpo masculino humano. Já o ER α não se expressa no bulbo. Os receptores ER α e ER β co-expressam-se nos fibroblastos da pele humana (derme) e influenciam a regulação da ação de estrógenos na pele, como o 17 β -estradiol (estrógeno endógeno) que aumentou a proliferação de fibroblastos na fascia pubocervical humana e, em menor grau, na pele humana (THORNTON et al, 2003; HALL e PHILLIPS, 2005).

No que se refere à avaliação experimental da penetração de estrógenos na pele, verifica-se ainda a necessidade de otimização de modelos (SARTORELLI et al, 2000). Em geral, estas iniciam com investigação *ex vivo*, com o uso de pele de animais de experimentação ou pele humana retirada por procedimentos cirúrgicos estéticos. A maior diferença em termos de função de barreira é a presença de pêlos, sebo e estrato córneo. O comparativo entre a permeabilidade na pele humana e na pele animal deve contabilizar também a difusão dos compostos através dos apêndices da pele, como folículos pilosos, pois estes também são cobertos por estrato córneo. A densidade de folículos pilosos humanos é de 40-70/cm². A espessura do estrato córneo da maioria das espécies de animais domésticos é razoavelmente uniforme, em torno de 30 μ m. Em suínos, a espessura epidérmica e do estrato córneo é praticamente o dobro daquela observada em bovinos e eqüinos (MAGNUSSON et al, 2001). A tabela abaixo apresenta a concentração de lipídeos de superfície da pele, extraídos com acetona e, a espessura do estrato córneo de alguns animais, comparativamente às encontradas na pele de humanos.

Tabela 1. Quantidade de lipídeos presentes na superfície cutânea e espessura do estrato córneo de alguns animais, comparativamente às encontradas na pele humana (MAGNUSSON et al, 2001).

	Lipídeo (μ g/cm ²)	Espessura do estrato córneo (μ m)
Rato	212,4	8,8
Porco	130,0	17,5
Humano	60,5	18,2
Gado	Não relatado	30,9
Cachorro	Não relatado	19,9
Ovelha	Não relatado	31,4

Sistemas que utilizam células de difusão de Franz são frequentemente empregados para avaliar a penetração de substâncias na pele devido ao baixo custo, relativa rapidez e reprodutibilidade. A técnica consiste por colocar uma dose de concentração conhecida num lado da membrana e sua difusão é então medida pela concentração da substância numa solução do lado oposto da mesma. As células de Franz permitem o uso de fase doadora líquida, em sol ou em gel, na presença ou ausência de agentes promotores de permeação.

Para minimizar a variabilidade nos resultados devido a diferenças de permeabilidade (causadas pela variação de espessura do estrato córneo e densidades de fliculo) entre os diferentes locais anatômicos, padroniza-se o local de remoção da pele. É possível utilizar peles de sobras cirúrgicas ou pele de autópsias (que envolvem questões éticas) e, é necessário repetir os experimentos com peles de diferentes doadores para eliminar os problemas decorrentes das variações de permeabilidade entre indivíduos. Entretanto, deve-se considerar a limitada disponibilidade de pele humana. Logo, a utilização de pele de animais é mais viável para testes iniciais, mas os resultados obtidos não podem ser diretamente correlacionados com a pele humana devido às diferenças entre as mesmas. A pele animal é fácil de ser obtida sendo possível padronizar a fatia no que se refere à localização anatômica, idade e sexo do animal. A pele de suínos tem sido utilizada devido a sua similaridade com a pele humana e por ser de fácil disponibilidade (SARTORELLI et al, 2000; SEKKAT et al, 2002).

3.2 Envelhecimento cutâneo

O envelhecimento cutâneo é resultante do conjunto de alterações decorrentes do envelhecimento intrínseco e extrínseco que ocorrem na pele e modificam seu aspecto. O envelhecimento intrínseco ocorre por desgaste natural do organismo, pela ação de enzimas como, por exemplo, a ação da xantina oxidase (que converte xantina em ácido úrico e oxigênio em superóxido), por ação dos neutrófilos que atacam o local de dano na pele e realizam respiração resultando em espécies reativas de oxigênio (ERO) e por processos biológicos como isquemias ou outras patologias. O envelhecimento intrínseco é também chamado de envelhecimento cronológico. Já o envelhecimento extrínseco é decorrente de fatores ambientais que interagem com a pele sendo o principal fator a exposição à radiação solar, pois essa tem efeito cumulativo. Além de causar o fotoenvelhecimento, pode acarretar

em imunossupressão local e sistêmica e fotocarcinogênese com o passar dos anos (EL-DOMYATI et al, 2002; DERMATOLOGIA.NET, 2005).

Dentre os tipos de radiação solar, a ultravioleta tipo B, UVB (280-320 nm), é altamente mutagênica e carcinogênica em animais, quando comparada à ultravioleta tipo A, UVA (320-400 nm). Os raios UVB são capazes de induzir câncer de pele em animais e podem causar danos ao DNA (ácido deoxiribonucléico), por meio de dímeros de ciclobutano piridina e fotoprodutos, os quais induzem mutação nas células epidérmicas, levando ao câncer. O DNA quando excitado por radiação ultravioleta tipo A pode ser danificado por reação em cadeia, iniciada através da absorção de UVA por cromóforo não identificado (ICHIHASHI et al, 2003).

A radiação ultravioleta, além de acarretar alterações no DNA, oxida ácidos nucleicos, modifica proteínas e lipídeos e altera as funções dos mesmos. A radiação UVA é mais citotóxica e gera mais stress oxidativo que a UVB. A luz solar contém em torno de 20 vezes mais UVA que UVB. A radiação UVB é praticamente toda absorvida na epiderme, enquanto que os raios UVA são capazes de alcançar a derme e, até mesmo, afetar as células sanguíneas circulantes (PINNEL, 2003).

Quando a luz solar passa através da atmosfera, toda a radiação UVC e 90% da UVB são absorvidas, principalmente pela camada de ozônio, além de serem também absorvidas por vapores de água, oxigênio e dióxido de carbono. A radiação UVC só chega à superfície da terra quando houver falhas na camada de ozônio e, pode causar danos celulares severos com efeitos mais pronunciados do que a radiação UVB (DIXON e DIXON, 2004; HACHICH et al, 2007).

As modificações que ocorrem na pele fotoenvelhecida podem ser observadas nas diversas camadas da pele (HERNANDEZ e MERCIER-FRESNEL, 1999; DERMATOLOGIA.NET, 2005):

- em nível de epiderme, a camada basal germinativa se desorganiza e a epiderme torna-se menos espessa. A camada córnea torna-se laminar e quebradiça e o número de células de Langerhans diminui. Logo, a defesa imune da pele também fica reduzida.

- em nível de derme, a capacidade replicativa dos fibroblastos decresce, as fibras de colágeno tornam-se rígidas e as de elastina sobrecarregam-se de lipídeos e perdem a elasticidade.

- em nível de hipoderme, a fragilidade dos septos determina o aparecimento de rugas.

A radiação ultravioleta também pode afetar alguns órgãos, mas poucos são os órgãos que sofrem exposição aos raios ultravioleta nos níveis em que sofre a pele (KOHEN, 1999).

Entretanto, o corpo possui antioxidantes naturais com capacidade de reduzir as reações provocadas pela ação solar, principalmente pela radiação ultravioleta. Esses antioxidantes podem ser enzimáticos ou não enzimáticos. A proteção natural da pele ocorre por meio de antioxidantes enzimáticos, que inclui glutathione peroxidase e glutathione reductase (presentes nas células e recicladas nos queratinócitos), catalase (presente no estrato córneo) e superóxido dismutase (presente nas mitocôndrias) e, por meio de antioxidantes não enzimáticos, como o ácido ascórbico (vitamina C, presente nos fluídos biológicos), a-tocoferol (vitamina E, presente nas membranas celulares) e ubiquinol (produzido nas mitocôndrias). Entretanto, devido ao baixo peso molecular dos antioxidantes naturais, estes sofrem depleção, o que torna de interesse a aplicação tópica de produtos antioxidantes como complemento. Assim, embora os antioxidantes possam chegar à pele através da alimentação e suplementação oral, os processos de absorção, solubilidade e transporte limitam a quantidade que é liberada para a pele, não sendo totalmente eficaz contra os radicais livres gerados e levando ao dano oxidativo. Este, quando severo, acarreta em apoptose ou morte celular necrótica. Isto evidencia as vantagens quanto à liberação alvo na pele para prevenção do envelhecimento cutâneo (PINNEL, 2003; XU e FISHER, 2005).

Deve-se ressaltar que os raios solares não trazem somente riscos à saúde, mas também são benéficos quando a exposição solar ocorre de forma moderada, em horário adequado e, mediante a utilização de filtros solares. Nessas circunstâncias, há ativação da circulação sanguínea e do metabolismo, auxílio da digestão e estímulo da produção de vitamina D, protegendo o organismo de doenças ósseas como fraturas, raquitismo, osteomalácia e osteoporose. Os efeitos benéficos da exposição solar se dão, principalmente, pela manutenção dos níveis de vitamina D no organismo, mas são mais fortemente evidenciados nos casos de proteção às desordens auto-imunes como esclerose múltipla,

diabetes tipo I e artrite reumatóide do que no controle do desenvolvimento de alguns tipos de câncer. A luz solar teria esses efeitos por meio de sua capacidade de regular a secreção de interferon, interleucinas, melatonina (relacionada com a produção de citocinas e progressão de câncer), entre outras ações (LUCAS e PONSONBY, 2006; SINCLAIR, 2006; LIRA, 2007).

3.3 Radicais livres

Os radicais livres são moléculas ou átomos com elétron desemparelhado, formados pela ativação de oxigênio na resposta inicial dos macrófagos ao reconhecimento de um antígeno (HAVSTEEN, 2002; PINNEL, 2003). Os radicais de oxigênio são originários de fontes metabólicas (cadeia respiratória ou oxidações catalisadas por oxigenases) e agentes externos (radiações) (HAVSTEEN, 2002).

A geração de radicais livres por meio de processos biológicos se dá quando o fagócito adulto, leucócito polimorfonuclear, exerce fagocitose, morte e digestão de microorganismos, mediado principalmente por radicais de oxigênio (hidroxila ($\cdot\text{OH}$), superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) e óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$)) (HAVSTEEN, 2002).

Como já referido anteriormente, outra fonte importante de radicais livres são as radiações, entre elas, os raios ultravioleta (UVC = 190 a 280 nm, UVB: 280-320 nm e UVA: 320-400 nm), raios-X e raios- γ . Sob radiação, os radicais $\text{OH}\cdot$, $\text{NO}\cdot$ e $\cdot\text{O}_2^-$ são produzidos no organismo e formam compostos tóxicos como peróxido de hidrogênio, peroxinitrito e ácido nítrico (HAVSTEEN, 2002).

Para exercer os efeitos do fotoenvelhecimento nas células, a energia eletromagnética inerente da irradiação UV deve ser absorvida pelos cromóforos celulares e é convertida à energia química. Cromóforos celulares como DNA, porfirinas, ácido urocânico e aminoácidos aromáticos são todos capazes de absorver a energia ultravioleta. Esses cromóforos energizados reagem com oxigênio molecular resultando em ERO. As ERO podem ser classificadas em duas categorias (HAVSTEEN, 2002):

- radicais livres: superóxido e hidroxila;
- compostos não-radicaís: oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio.

A transferência de quatro elétrons ao oxigênio gera duas moléculas de água, mas a redução parcial leva à formação de componentes altamente tóxicos, como o íon superóxido: $O_2 + e^- \rightarrow \cdot O_2^-$. Tal reação é desejável, mas o excesso de superóxido deve ser removido logo para não destruir lipídeos insaturados das membranas ou grupos sulfidríla dos sítios das enzimas. O superóxido e oxigênio singlete são produzidos pelos neutrófilos. O superóxido é protonado a radical hidroperóxido que reage com um segundo ânion e produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Logo: $2 O_2 + 2 e^- \rightarrow 2 O_2^- + 2 H^+ \rightarrow 2 HO_2 \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (HAVSTEEN, 2002).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é capaz de atravessar as membranas celulares facilmente e juntamente com Ferro II transicional gerar radical hidroxila que é altamente tóxico ($OH\cdot$) (SCHARFFETTER-KOCHANNEK et al, 2000).

Nessas reações também podem ser geradas espécies reativas de nitrogênio (ERN) que são produzidas por uma variedade de tipos celulares incluindo células endoteliais, macrófagos, células de músculo liso e fibroblastos. As ERN têm capacidade de modular caminhos de sinalização e regular a expressão de alguns genes inflamatórios vasculares (TAMIR et al., 2002). Logo, as espécies reativas produzidas no organismo acarretam em inúmeras alterações, como descrito no item anterior, tanto em pele como em nível de DNA.

3.4 Fitoestrógenos

O termo fitoestrógeno é utilizado para compostos não esteroidais encontrados em células de plantas ou provenientes do metabolismo *in vivo* de precursores presentes em várias plantas. Os fitoestrógenos possuem propriedades estrogênicas devido as suas semelhanças estruturais ao hormônio natural estradiol (GANRY, 2005). Os fitoestrógenos mais estudados pertencem ao grupo dos flavonóides, que possuem, além da atividade estrogênica, também as atividades antioxidante, antiinflamatória, antitrombótica, antimicrobiana, antialérgica, antitumoral, antiasmática e de inibição sobre enzimas como transcriptase reversa, proteína C quinase, tirosina quinase, calmodulina, ornitina decarboxilase, hexoquinase, aldose redutase, fosfolipase C e topoisomerase II (TRUEBA, 2003).

Dentre os flavonóides encontram-se os isoflavonóides, cujo grupo se subdivide em outras classes e dentre elas têm-se as isoflavonas e os coumestanos, muito semelhantes estruturalmente (Figura 1).

O mais relevante coumestano é o coumestrol, encontrado principalmente em brotos de alfafa (*Medicago sativa* L. – família Fabaceae/Leguminosae), em vários trevos e em outras plantas leguminosas. Está presente nos gêneros *Medicago*, *Trifolium*, *Phaseolus*, *Pueraria*, *Thephrosia* e *Glycine* spp. (LAPCIK et al, 2003; AL-MAHARIK e BOTTING, 2004).

A alfafa é composta por vários ácidos; alcalóides do tipo pirrolidina e piridina; aminoácidos sendo a asparagina presente em altas concentrações nas sementes, bem como a canavanina (aminoácido não-protéico presente em altas concentrações nas sementes e em baixas concentrações nas partes aéreas); cumarinas (medicagol); isoflavonóides (coumestrol, biochanina A, daidzeína, formononetina e genistéina); saponinas; esteróides e outros componentes como carboidratos (frutose, arabinose, sacarose e xilose), vitaminas (A, B1, B6, B12, C e K), pectina metilesterase, pigmentos (clorofila, xantofila, β -caroteno e antocianinas), proteínas, minerais (cálcio, potássio, fósforo e ferro) e oligoelementos (NEWALL et al., 2002; LORENZI e MATOS, 2002).

Duke (1998) também menciona que a alfafa contém vários coumestanos: 4'-*O*-metilcoumestrol; 3'-metoxicoumestrol; lucernol; medicagol; sativol; trifoliol; 11,12-dimetoxi-7-hidroxicoumestano.

O conteúdo de coumestrol na alfafa pode ser altamente variável e é afetado por vários fatores, incluindo: idade da planta, condições climáticas, ataque de patógenos, processamento da colheita, irrigação e, principalmente, pela presença ou não de componentes orgânicos no solo, como o nitrogênio. Plantas localizadas em solos com limitada quantidade de nitrogênio produzem maiores quantidades de flavonóides, como o caso da alfafa (*Medicago sativa* L.), *Trifolium subterraneum* L. e *T. repens* L. já estudados (ROSSITER, 1969; CORONADO et al, 1995; MITCHELL et al, 2007). O aumento da produção de coumestrol nas raízes e exsudatos da alfafa foram demonstrados por análise de CLAE. A concentração de coumestrol no exsudato da alfafa submetida à limitada suplementação de nitrogênio foi superior à do exsudato da planta desenvolvida sob condições abundantes de

nitrogênio. A concentração deste último exsudato não atingiu o limite de detecção do método empregado e, tal limite não foi mencionado no estudo em questão (ZUANAZZI et al, 1998). Segundo Moravcová e colaboradores (2004), o feno da alfafa pode conter coumestrol na quantia de 10 a 184 mg/kg.

Quanto à toxicidade da planta, as sementes induzem uma síndrome semelhante ao lúpus eritematoso sistêmico em macacas e a canavanina presente nas mesmas, atua sobre as células do sistema imunorregulador, sendo tóxica para as espécies animais devido à sua semelhança estrutural com a arginina. As sementes contêm quantidades de canavanina de 8,33 a 13,6 mg/kg, ao passo que a planta contém quantidades consideravelmente menores. As saponinas das partes aéreas não são tóxicas e mostram-se capazes de reduzir os níveis de colesterol séricos e, também, não induzem o lúpus como as saponinas das sementes (NEWALL et al., 2002).

A ingesta diária estimada de coumestrol para mulher americana (EUA) é 0,6 µg/dia (0,2-1,7 µg). Essa quantidade representa apenas uma fração da ingesta de isoflavonas que se situa em torno de 154 µg/dia (99-235 µg). Para estabelecimento desta faixa, o estudo foi realizado na forma de um questionário com 964 mulheres caucasianas, pós-menopausa. Logo, as fontes de coumestrol são o brócolis com 0,008 mg/100g (ingerido em maior quantidade), brotos de alfafa (4,68 mg/100g), sendo assim 10,5 % do coumestrol ingerido diariamente pelas mulheres caucasianas originou-se da alfafa e o restante, 89,4 %, do brócolis (KLEIJN et al., 2001; WHITTEN et al., 2002).

Mei e colaboradores (2001) aplicaram um questionário a 650 mulheres do sudeste da China para analisar a ingesta de fitoestrógenos na alimentação. Dos 33 alimentos mais ingeridos, 9 eram derivados de soja. A ingesta diária média de isoflavonas, coumestrol, ligninas e flavonóides foram respectivamente 25,4 mg; 63,9 mg; 1,9 mg e 33,1 mg.

Já Beck e colaboradores (2005) mencionaram que os efeitos estrogênicos dos fitoestrógenos ocorrem quando é alcançada uma concentração plasmática de isoflavonas de 50-800 ng/ml, sendo este valor semelhante ao consumo regular da população asiática. O autor também refere que a ingesta diária de fitoestrógenos necessária para alcançar um efeito

biológico seria em torno de 30-50 mg/dia. Sob esta ótica, a população chinesa alcançaria estes níveis.

É importante salientar a distinção entre glicosídeos e agliconas devido ao fato de as propriedades físico-químicas, estabilidade, biodistribuição e farmacodinâmica serem diferenciadas. Nas plantas, as isoflavonas estão presentes como glicosídeos e malonilglicosídeos, menos freqüentemente na forma de aglicona.

Nas plantas, não foram encontrados relatos das propriedades biológicas do coumestrol especificamente. A respeito de sua apresentação sob forma de glicosídeos ou agliconas, Tiller e colaboradores (1994) identificaram o coumestrol nas raízes da alfafa, principalmente, na forma conjugada de malonilglicosídeos.

Em termos metabólicos, os fitoestrógenos sofrem ação das hidrolases intestinais, tendo seu grupo glicosídico removido permitindo assim, a rápida absorção e distribuição periférica das agliconas. As agliconas são conjugadas a ácido glicurônico e/ou sulfato para formar derivados solúveis facilmente excretados pelo sistema renal. Após a primeira hidroxilação pelo citocromo P450, as agliconas sofrem *O*-demetilação, seguido por redução, o qual leva à degradação do esqueleto da isoflavona, produzindo compostos aromáticos simples, como ácidos carboxílicos ou alquilfenóis. Os produtos finais da biodegradação da genisteína, o 4-etilfenol e o ácido 4-hidroxi propiônico são exemplos desta transformação. Após, as isoflavonas do sangue vão para a bile e retornam ao intestino onde sofrem glicuronidação nos enterócitos. Ocorre então uma hidrólise lenta que conjuga as isoflavonas na segunda passagem ao intestino e há a redução do anel heterocíclico. Os conjugados com ácido glicurônico e sulfato são excretados na urina e bile e os metabólitos biliares vão para circulação entero-hepática. Além do metabolismo redutor e conjugativo, as isoflavonas podem sofrer biotransformação oxidativa em ratos e, também, em humanos (KULLING et al, 2002; WANG et al, 2002; GRYNKIEWICZ et al, 2005).

Lampe (2003) menciona que as isoflavonas (referindo-se à genisteína e daidzeína) estão presentes predominantemente na urina como conjugados sendo 75-85 % como conjugados do ácido glicurônico, 15-25 % como sulfatos e menos de 1 % como agliconas

livres. Entretanto, os estrógenos naturais persistem por mais tempo na circulação (GENNARO, 2005).

Wolf (2001) apresenta em seu trabalho a excreção urinária de algumas isoflavonas, fitoestrógenos e estrógenos endógenos em mulheres americanas e japonesas (valores em ng/24 horas). A genisteína é referida como presente na excreção urinária da mulher japonesa a 3,440 ng/dia, enquanto, na mulher americana esta não foi detectada. A daidzeína foi excretada a 2,6 ng/dia na mulher japonesa e 216 ng/dia mulher na americana. Já estrona, estradiol e estriol foram detectados somente em mulheres japonesas pós-menopausa, respectivamente, nas quantidades de 4,48; 0,76 e 4,48 ng/dia.

Já a respeito do metabolismo do coumestrol isoladamente, não foram encontrados relatos na literatura, apenas Mallis e colaboradores (2003) verificou que o coumestrol apresenta a menor biodistribuição quando administrado pela via oral em ratos, sendo esta de 11,7 %, comparado com outros fitoestrógenos estudados como genisteína (18,3 %), biochanina A (21,3 %), daidzeína (22,7 %) e zearaleno na (28,1 %).

3.5 Coumestanos: coumestrol e suas atividades farmacológicas

Os coumestanos apresentam propriedades antioxidantes por meio da doação de hidrogênio/elétrons dos grupos hidroxilas fenólicas dos anéis A e B. Eles podem atuar como removedores de radicais livres, prevenindo danos oxidativos e até inibir o desenvolvimento de algumas doenças. Essa potência, no entanto, não descarta a possibilidade de ser encontrada ação pró-antioxidante, de acordo com a concentração empregada (POLYDORO et al, 2004).

Como já citado por Hodnick apud Polydoro e colaboradores (2004) e Trueba (2003), a quercetina apresenta capacidade de auto-oxidação celular em pH biológico resultando na formação dos radicais: peróxido, superóxido e hidroxila. A sua atividade pró-oxidante tem sido também comprovada pela determinação de ácido metanesulfônico formado por meio da reação de Fenton entre DMSO e pelo radical hidroxila. Outros flavonóides citados por Trueba (2003) que apresentam tal potencial são miricetina, fisetina, bacalaína, naringenina, hesperetina e apigenina.

Entretanto, Mitchell e colaboradores (1998) também relatam que os coumestanos tiveram capacidade inibitória de peroxidação dezesseis vezes mais alta que o a-tocoferol (antioxidante não-enzimático natural).

No trabalho de Tamir e colaboradores (2002) é demonstrado que o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), Fe^{+2} , 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) e macrófagos ativados afetam a expressão dos receptores de estrogênio de $ER\alpha$ e $ER\beta$ diferentemente em células cardiovasculares, inflamatórias e cancerígenas, demonstrando uma resposta específica da célula a qual pode ser bloqueada por antioxidantes.

É sugerido que o mecanismo de ação dos efeitos antioxidante e pró-oxidante dos flavonóides ocorra pela soma de suas ações. A atividade antioxidante se dá por suas propriedades quelantes de ferro, sequestrantes de radicais livres, por sua capacidade de inibição de enzimas como as oxidases que são diretamente envolvidas nos processos oxidativos, como pela inibição de enzimas envolvidas indiretamente nesses processos, além de sua capacidade de aumentar a disponibilidade de antioxidantes endógenos. Já os efeitos pró-oxidantes ocorreriam pela redução temporal de cobre II a cobre I e ferro III a ferro II, pela geração de ERO, por sua ação sobre componentes do sistema de defesa antioxidante nuclear como a glutathiona e glutathiona-S transferase. Assim, o efeito pró-oxidante seria o responsável pelas propriedades mutagênicas, citotoxicidades e pelos efeitos genotóxicos gerados por flavonóides (TRUEBA, 2003).

O composto que mais se destaca dentro do grupo dos coumestanos é o coumestrol, designado pelos seguintes nomes químicos: 3,9-dihidroxi-6H-benzofuro[3,2-c][1]benzopiran-6-ona; ácido 2-(2,4-dihidroxifenil)-6-hidroxi-3-benzofurancarboxílico δ -lactona e 7'6-dihidroxicoumarino(3',4', 3, 2)coumarona (BICKOFF, 1958; THE MERCK INDEX, 1996). Outros nomes também encontrados são: ácido 3-benzofurancarboxílico; 2-(2,4-dihidroxifenil)-6-hidroxi δ -lactona; coumesterol e cumestrol (SOFTWARE SCIFINDER SCHOLAR, 2004). Sua fórmula molecular é $C_{15}H_8O_5$ e possui peso molecular de 268,23.

O coumestrol foi descoberto por Bickoff, em 1958, e apresenta-se na forma de cristais, que sublimam em $325\text{ }^\circ\text{C}$ e, em alto vácuo, próximo a $175\text{ }^\circ\text{C}$. Apresenta máximos de

absorção na região ultravioleta (em metanol) em 208, 243 e 343 nm e exibe fluorescência azul em meio alcalino forte (BICKOFF et al, 1960; THE MERCK INDEX, 1996).

Quanto a sua solubilidade, é praticamente insolúvel em água em pH ácido ou neutro e em éter de petróleo; é pouco solúvel em água em pH alcalino (pH 11-12); ligeiramente solúvel em metanol (correspondendo de 30 a 100 partes pela Farmacopéia Brasileira (1988)), clorofórmio e éter e; muito levemente solúvel em tetracloreto de carbono e em benzeno (THE MERCK INDEX, 1996).

Seu ponto de fusão, segundo o Software Scifinder Scholar (2004), é de 360-385 °C e seu ponto de ebulição é $561,9 \pm 40,0$ °C sob pressão de 760 Torr. O coumestrol apresenta densidade de $1,602 \pm 0,06$ g/cm³, em temperatura de 20 °C e pressão de 760 Torr e seu pKa é de $8,12 \pm 0,20$ em temperatura de 25 °C.

O coumestrol é formado, nas plantas, através da seguinte rota biossintética: Fenilalanina ? ácido p-hidroxicinâmico Co-A ? 7,4'-hidroxiflavanona ? daidzeína ? composto intermediário ? coumestrol. Al-Maharik e Botting (2004) realizaram a síntese de coumestrol em duas etapas, utilizando condensação catalisada do acetato de fenil com cloreto de benzoila seguido de dimetilação e ciclização intramolecular. A matéria-prima coumestrol utilizada nessa pesquisa foi sintetizada por rota desconhecida, contendo 95 % de pureza e, sendo adquirida por meio da empresa Sigma-Aldrich do Brasil LTDA.

No que se refere as suas propriedades farmacológicas, o coumestrol é um agonista estrogênico, apresentando mais alta afinidade de ligação pelos receptores de estrogênio do que a isoflavona genisteína (AL-MAHARIK e BOTTING, 2004).

O coumestrol age, predominantemente, como agente estrogênico, mas também exibe atividade anti-estrogênica dose-dependente, pois compete com o estrogênio pela ligação com os receptores de estrogênio, bloqueando estes. O decréscimo da atividade estrogênica foi observado com o aumento dos níveis de coumestrol (BUROW et al., 2001; PINNEL, 2003).

O coumestrol tem afinidade pelos receptores de estrogênio podendo agir, tanto em receptores ER α , como em ER β , ocasionando diferentes ações no cérebro. É importante

ressaltar que a forma livre (aglicona) é a que interage com os receptores de estrogênio (KRAZEISEN et al, 2001; POCKOCK et al, 2002).

Benassayag e colaboradores (2002) descrevem que os receptores ER α e ER β têm sido identificados em seio, útero, ovário e vasos sanguíneos mas as proporções de ER α e ER β variam de acordo com os tecidos alvo do estrogênio e sua categoria fisiológica e patológica. ER α é dominante em glândula pituitária, ovário, útero, glândulas mamárias, vagina, hipotálamo, rim e miométrio adrenal. Enquanto o ER β é predominante em cérebro humano, timo, bexiga, próstata, ovário, testículo, hipotálamo, pulmão e ossos. Os dois tipos de receptores (ER α e ER β) estão presentes na pele como já mencionado anteriormente (DIEL et al, 2002; BENASSAYAG et al, 2002; PINNEL, 2003).

O coumestrol não somente liga-se aos receptores ER, mas também pode iniciar a transcrição de genes por ambos receptores. Também demonstrou ter atividade estrogênica e anti-estrogênica na fisiologia reprodutiva, ativação gênica e comportamental. Esses dados indicam que o coumestrol pode atravessar a barreira sangue-cérebro e afetar a expressão gênica dependente de estrogênio, mas não define através de qual receptor teria esse efeito (JACOB et al, 2001).

Para elucidar a interação do coumestrol com estes receptores, Whitten e colaboradores (2002) avaliaram a regulação do receptor de oxitocina localizado no núcleo ventromedial do hipotálamo. Esse núcleo possui exclusivamente receptores ER α , observando-se o efeito do coumestrol sobre este receptor. Já no núcleo paraventricular no qual existe somente receptores ER β , o estudo demonstrou que o coumestrol possui grande afinidade por estes receptores, maior do que aquela apresentada pelos receptores ER α no núcleo ventromedial, e mesmo maior que a do estradiol.

Estudos demonstraram que o coumestrol, dentre outros fitoestrógenos, inibe a ligação específica do 17 β -estradiol aos receptores ER em útero de ratos e de humanos e, em glândula mamária humana sendo dose dependente (0,1-10 μ M) em ambos os tipos de receptores (WHITTEN et al, 2002).

Segundo Benassayag e colaboradores (2002) o 17 β -estradiol possui afinidade de ligação por ER β igual a ¼ da afinidade de ligação por ER α e tanto o coumestrol como a genisteína têm afinidade significativamente maior por ER β que por ER α (7 e 20-30 vezes maior, respectivamente, para coumestrol e genisteína).

Entretanto, as pesquisas que envolvem estudos de afinidade de ligação de fitoestrógenos com os receptores de estrogênio são bastante controversas entre si, quando comparam essas afinidades à do 17 β -estradiol.

Huntley e Ernst (2004) mencionam que o comparativo da potência estrogênica entre esses compostos deveria considerar também, a quantidade de hormônio estradiol circulante, a disponibilidade dos receptores no tecido e a concentração do fitoestrógeno administrado para então se obter um perfil mais exato.

Apesar destas controvérsias, há tentativas de estabelecer uma ordem de potência estrogênica dos fitoestrógenos, de acordo com o subtipo ER. Para o receptor ER α , a ordem de potência estrogênica é: 17 β -estradiol >> zearalenol = coumestrol > genisteína > daidzeína > biochanina A > quercetina. Para ER β é: 17 β -estradiol >> genisteína = coumestrol > zearalenol > daidzeína > biochanina A > quercetina (BENASSAYAG et al., 2002).

Garey e colaboradores (2001) propõem possíveis mecanismos de ação para o coumestrol:

- modulação por meio dos ER α , agindo como agonista ou antagonista, dependendo da dose;
- modulação por meio dos ER β , agindo em ER β com afinidade 7 vezes maior que em ER α ;
- ação através de outros receptores que não por meio de receptores de estrogênio, possivelmente por receptores ansiolíticos (receptores benzodiazepínicos), cuja ligação ainda não está bem elucidada.

Bickoff e colaboradores (1960) estudaram a atividade estrogênica do coumestrol e de outros 29 compostos relacionados ao estrogênio. A acetilação de ambos os grupos hidroxilas não reduziu a atividade estrogênica. Entretanto, a eterificação dos grupos hidroxilas reduziu a

atividade estrogênica em $\frac{2}{3}$ da original. Abrindo o anel lactona do coumestrol, para formar um sal potássico do ácido o-hidroxicinâmico não houve redução da atividade estrogênica, mas a derivação para ácido o-metoxicinâmico diminuiu a atividade. Abrindo o anel furano também houve redução bastante significativa da atividade estrogênica. A remoção de uma hidroxila do coumestrol diminuiu a atividade em torno de $\frac{1}{6}$ da original e a remoção das duas hidroxilas eliminou completamente a resposta estrogênica. A presença de grupos hidroxila adicionais no coumestrol também diminuiu a atividade estrogênica deste composto.

Mukherjee e colaboradores (2005) relatam que a atividade estrogênica é a única que não requer uma configuração estrutural esteroidal, como os demais hormônios sexuais. De acordo com os autores, moléculas com distâncias de 10.3 a 12.1 Angstrons entre os átomos de oxigênio e os grupos hidroxilas apresentam atividade estrogênica ótima. Os modelos gerados através do estudo mostraram a importância dos átomos C3', C5' (anel B) e C6 (anel A) na orientação e rigidez conformacional dos flavonóides para a atividade estrogênica. Não há relatos na literatura de pesquisas que verifiquem a distância entre os átomos do coumestrol. No entanto, Erkoç e colaboradores (2005) estudaram o equol (isoflavona, C₁₅O₃H₁₄), metabólito da daidzeína, cuja estrutura química possui algumas similaridades à do coumestrol e está representada abaixo.

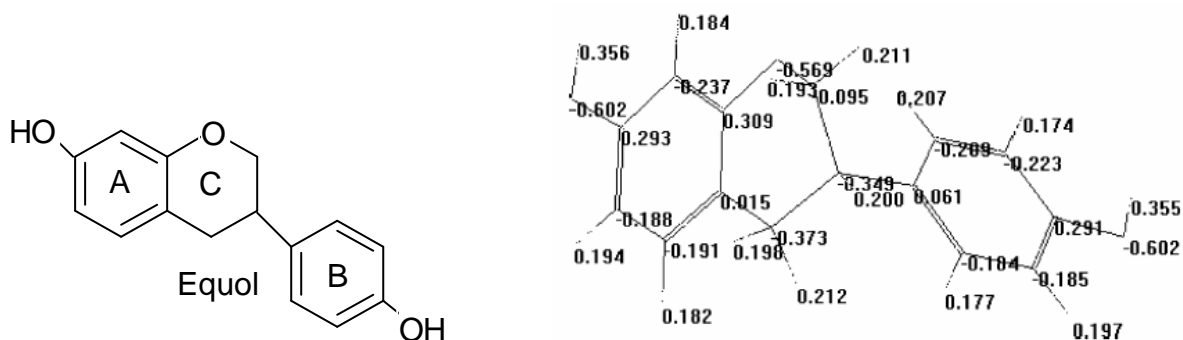


Figura 3. Estrutura química e otimizada do equol (ERKOÇ et al, 2005), com ângulos de ligação.

O equol não é uma estrutura planar, possui os anéis A e C no mesmo plano, no entanto, C e B são perpendiculares entre si, com ângulo de 91°.

Segundo Erkoç e colaboradores (2005), uma das razões que confere estrogenicidade aos flavonóides é a presença de um único grupo hidroxila na posição 4' do anel B. Seu trabalho foi desenvolvido através do programa HyperChem-7, utilizando os métodos modelo

de Austin-1 (AM-1) e a teoria da função densidade (DFT) para a análise da molécula do equol. O anel B da genisteína possui maior capacidade de doação de elétrons que o anel B do equol, relacionando-se a formação de pontes de hidrogênio com os receptores. Os grupos hidroxila dos anéis A e B do equol são descritos como sendo responsáveis pela atividade antioxidante e os próximos doadores de elétrons seriam os carbonos 2 e 4 do anel C.

Outra importante atividade farmacológica apresentada pelo coumestrol é sua atividade antioxidante sobre sistemas celulares, característica do grupo dos coumestanos como mencionado anteriormente.

Testes por espectroscopia de ressonância de giro de elétron demonstraram que o coumestrol destrói 0,102 radicais/molécula enquanto que a quercetina, 3,4 radicais/molécula (MITCHELL et al., 1998).

Segundo Brozic e colaboradores (2006), os fitoestrógenos 7-hidroxi flavona, 3,7-dihidroxi flavona e naringenina foram os mais potentes inibidores da enzima 20α -hidroxiesteróide desidrogenase, responsável pela metabolização de progesterona. Comparando-se a atividade inibitória da genisteína e do coumestrol sobre a redução dependente de NADPH de 9,10-fenantrenequinona e progesterona, a genisteína inibiu 5 % e 0 %, respectivamente, enquanto que o coumestrol inibiu essas reduções em 2,3 % e 17,9 %. A atividade inibitória sobre 9,10-fenantrenequinona foi identificada devido a presença de hidroxilas nos carbonos 5 e 7 nos compostos testados.

No trabalho de Trueba (2003) a presença de hidroxilas nos carbonos 3' e 4' do anel B foram apontadas como responsáveis pela atividade antioxidante dos flavonóides. Tal atividade se mostrou mais intensa quando, além dessa condição, há a presença de ligação dupla entre os carbonos 2 e 3.

No estudo de Lê Bail e colaboradores (1998) foi avaliada a capacidade inibitória de alguns fitoestrógenos sobre as enzimas aromatase e 17β -hidroxiesteróide dehidrogenase (17β -HSD). O coumestrol foi usado como inibidor competitivo reconhecido da 17β -HSD (controle). Foi demonstrado que os maiores inibidores de ambas enzimas foram a 7-hidroxi flavona e apigenina, sendo identificada tal atividade inibitória pela presença de

hidroxila no C7. Flavonóides com grupo metoxi em C7 ou hidroxila em C8 do anel A mostraram somente atividade inibitória sobre a aromatase.

Kristan e colaboradores (2005) avaliaram a ação inibitória do coumestrol sobre a enzima 17 β -HSD, produzida pelo fungo *Cochliobolus lunatus*. O coumestrol apresentou ação inibitória da oxidação na concentração de 3,2 μ M e ação inibitória da redução na concentração de 2,8 μ M.

No entanto, a atividade antioxidante do coumestrol ainda é pouco explorada. Sua ação sobre a inibição de enzimas envolvidas nos processos oxidativos giram em torno da aromatase e 17 β -HSD, não sendo explorados outros enfoques esclarecedores de sua ação antioxidante.

Quanto à atividade farmacológica do coumestrol na pele, são encontradas poucas referências na literatura, como o trabalho de Thornton e colaboradores (2003) sobre a atividade estrogênica em pele de escalpo (já citado) e a relação que pode ser feita a respeito de sua ação antioxidante sobre a enzima 17 β -HSD que também está presente na pele, como citado por Whitehead e Rice (2006).

Em relação à toxicidade do coumestrol, alguns estudos de seus efeitos podem ser destacados. Medlock e colaboradores (1995) estudaram os efeitos do coumestrol e equol no desenvolvimento do útero de ratos. Várias doses desses compostos foram injetadas no tecido subcutâneo nos dias pós-natal para observar os efeitos no peso uterino e níveis de receptores ER. O coumestrol (dias 1 a 5) aumentou o peso uterino (seco e úmido) tanto quanto o dietilstilbestrol (DES), enquanto que equol aumentou somente o peso úmido. Entretanto, 10 a 100 μ g de coumestrol (dias 1 a 5/10) inicialmente aumentaram o peso uterino. Com 100 μ g de coumestrol houve redução dos níveis de receptores ER em todas idades, enquanto que 10 μ g não foram efetivos. Quando administrado nos dias 10 a 14, período crítico de gênese glandular, 10 μ g e 100 μ g de coumestrol aumentaram bastante o peso uterino. Embora o coumestrol iniba a gênese glandular uterina de maneira dose-dependente, ele não aboliu a gênese como o DES a 10 μ g ou o tamoxifeno. Essas informações demonstram que o coumestrol possui toxicidade uterina bioquímica e morfológica semelhante ao DES.

Os efeitos do coumestrol também foram avaliados sobre cultura de células V79 de hamsters chineses machos. Os fitoestrógenos foram inoculados em culturas celulares dissolvidas em DMSO, na concentração de 0,1 % (v/v). Foram analisados os efeitos sobre inibição de crescimento celular (citotoxicidade), alterações morfológicas dose-dependente, ações sobre microtúbulos citoplásmicos, quebras da fita de DNA e mutações sobre o locus HPRT do cromossomo X (o que impediria a incorporação de 6-TG ao DNA, o que seria letal). O coumestrol inibiu o crescimento celular em concentrações superiores a 30 μM . Em 40 μM , algumas células apresentaram alterações morfológicas, entretanto, isso não constitui uma citotoxicidade grosseira. A análise em microtúbulos foi realizada com incubação de 50 μM de coumestrol durante 6 horas com anticorpos anti- α -tubulina, não apresentando efeito sobre o complexo de microtúbulos citoplásmicos na interfase celular ou no fuso mitótico nas células em metáfase. O coumestrol induziu apenas o micronúcleo com fragmentos cromossômicos acêntricos de 10-35 μM , mas não teve ação sobre micronúcleo com anticorpo anti-cinetocoro. Abaixo desta concentração não houve alteração morfológica do núcleo celular. A 50 μM , alguns núcleos celulares tiveram forma de foice. A indução das quebras de DNA foi significativa a 25 μM de coumestrol, havendo um aumento dessa indução de maneira dose-dependente, chegando a 66 % de indução de quebras de DNA com 100 μM de coumestrol. O coumestrol a 50 μM causou efeito sobre o locus HPRT, levando a um aumento de 10 vezes o número de mutações ao 6-TG quando comparado às células não tratadas. Logo, o coumestrol não teve efeito sobre o complexo de microtúbulos citoplásmicos e no fuso mitótico das células V79. Na concentração sem citotoxicidade grosseira, o coumestrol induziu fortemente o micronúcleo contendo fragmentos acêntricos, o que implica que o coumestrol é clastogênico e ele também induziu quebras de DNA. Além da indução de quebras de DNA e de micronúcleos, o coumestrol é capaz de induzir mutações em HPRT nas células V79 dose-dependente (KULLING e METZLER, 1997; KULLING et al, 2002).

Lyn-Cook e colaboradores (1999) avaliaram o efeito protetor do coumestrol, genisteína, biochanina A e equol sobre células de adenocarcinoma pancreático humano *in vitro*. Foram utilizadas células masculinas (HPAF-11) e femininas (Su 86.86) em cultura, recebendo os fitoestrógenos a 1 e 10 μM em DMSO, sendo observado o crescimento celular até 5 dias e a expressão da proteína K-ras e do gene *mdr-1* (relacionados à resistência celular a quimioterápicos). À concentração de 1 μM , o coumestrol aumentou o crescimento das células masculinas e reduziu o das femininas em 95 %. Na concentração de 10 μM o coumestrol foi

tóxico para as células do tipo Su 86.86 e na concentração de 1 μ M reduziu a expressão de K-ras em 55 % nas Su 86.86 e em 25 % nas HPAF-11. Sobre a expressão de *mdr-1*, seu efeito foi pouco significativo em termos de redução do crescimento sendo considerado sem efeito sobre *mdr-1* em células masculinas e de pequena redução na expressão de *mdr-1* em células femininas. Logo, o coumestrol apresenta potencial quimioterápico contra o câncer pancreático.

Zand e colaboradores (2002) mencionam um estudo no qual foi verificado que a posição das hidroxilas nos C7, C6 e C4' são as mais importantes na relação estrutural-atividade para a potência estrogênica. Linhagem MCF-7 transfectada com gene de luciferase foi utilizada para determinar atividades agonistas e antagonistas de estrogênio. O agonismo foi observado em compostos com hidroxilas no C7 e 4' em concentração menor que 1 μ M e, essas hidroxilas em C7 e 4' podem ser consideradas equivalentes as hidroxilas das posições 3 e 17 do estradiol. As células MCF-7 também foram expostas de 50 a 100 μ M de genisteína continuamente por mais de 10 dias, e apresentaram a síntese de DNA fortemente inibida dos dias 1 a 4, após cujo período a citotoxicidade ocorreu.

Diel e colaboradores (2002) avaliaram o efeito do coumestrol sobre a proliferação celular, indução de apoptose, expressão de RNAm de receptores de progesterona e andrógeno e, expressão de ER α em células MCF-7 (células de câncer de seio humano). Na concentração de 10^{-6} M, o coumestrol aumentou a proliferação celular e a expressão dos receptores de progesterona e, reduziu a indução de apoptose e a expressão de receptores de andrógenos quando comparado ao 17 β -estradiol. Já em doses maiores foi demonstrado que há aumento de apoptose (dose-dependente), o que seria indicativo de efeito tóxico.

Lapcik e colaboradores (2003) mencionaram em seu trabalho que altas doses de coumestrol causam toxicidade em gados e ovelhas. Infelizmente, não foi possível ter acesso a maiores informações, pois o artigo original foi publicado por Bickoff e colaboradores em 1960. Rossiter (1969) menciona em seu trabalho que a importância da análise de flavonóides perante a baixa disponibilidade de nitrogênio para o crescimento e desenvolvimento da planta se reflete no aumento do risco de ocorrência da doença do trevo, uma desordem reprodutiva responsável por infertilidade e que aparece em ovelhas que consomem excesso de fitoestrógenos ao alimentarem-se desse tipo de forragem.

Tokada e colaboradores (2005) realizaram um estudo com 51 gestantes japonesas e 20 indivíduos adultos para verificar a exposição fetal a genisteína, daidzeína, equol, coumestrol e genisteína conjugada a sulfato (conjugada pela posição 4' e 7) através da ingestas desses flavonóides pela dieta. As análises do soro da mãe, soro de cordão umbilical dos fetos e soro dos adultos foram analisadas por LC-MS/MS. Foi demonstrado que a genisteína e daidzeína foram detectadas em mais altas concentrações nas amostras de cordão que nas maternas (19,4 e 4,3 ng/ml x 7,2 e 1,8 ng/ml, respectivamente), enquanto que o equol foi mais alto nas amostras maternas (0,9 x 2,0 ng/ml). Esta observação deve-se ao fato de o equol ser um metabólito da daidzeína e o metabolismo materno excretar mais rapidamente os flavonóides que o feto. Já o coumestrol não foi detectado no cordão umbilical (limite de detecção de 0,5 ng/ml), estando presente no soro materno na concentração de 0,5 ng/ml. A genisteína sulfatada não foi detectada na mãe, mas no cordão obteve-se concentração de 5,2 ng/ml.

Whitehead e Rice (2006) citam dois trabalhos, no primeiro o coumestrol inibiu significativamente a atividade da enzima 17β -HSD tipo 1, responsável pela conversão de estrona a 17β -estradiol e está presente na placenta, pele, glândulas mamárias, próstata e endométrio. Tal inibição ocorreu em preparações purificadas da enzima em doses na faixa micromolar. O segundo estudo menciona que o coumestrol inibiu a atividade da aromatase, enzima conversora de andrógenos à estrógenos, em adipócitos humanos na concentração de $1,3 \mu\text{M}$. Este resultado foi semelhante a de inibição causada por $0,5 \mu\text{M}$ de aminoglutetimida, inibidor da aromatase.

De maneira geral, pode-se concluir que o coumestrol é capaz inibir enzimas do metabolismo de hormônios endógenos devido a sua atividade antioxidante, mas isto não é tão prejudicial, pois o coumestrol também tem propriedades estrogênicas para a reposição hormonal. O coumestrol mostrou ser tóxico quando administrado em animais, acredita-se que por alterar os órgãos reprodutíveis dos mesmos. Já no homem, o coumestrol pode ser tóxico dependendo da dose administrada e da finalidade pretendida, podendo abranger alterações na proliferação celular, expressão de receptores, ocorrência de apoptose, quebras de DNA, entre outras alterações celulares.

De forma geral, outros flavonóides são citados como mutagênicos, além da genisteína (McCLAIN et al, 2006); a biochanina A, kaemferol, luteolina, miricetina e quercetina, os quais atuam com potentes inibidores da topoisomerase IIa e II β humanas em concentrações de 50 μ M, aumentando o número de clivagens ou quebras de DNA de forma permanente, sendo atribuída tal ação às hidroxilas das posições 5 e 4' desses flavonóides. Ressalta-se que a presença de hidroxilas no anel B, em 3' ou 5' é capaz de aumentar a atividade mutagênica dos flavonóides, especialmente às clivagens mediadas por topoisomerase II β (SKIBOLA e SMITH, 2000; BANDELE e OSHEROFF, 2007).

3.6 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas, oligômeros cíclicos, de unidades de glicose unidas por ligação α -(1,4), possuem capacidade de formar complexos de inclusão com diferentes substâncias resultando em aumento de sua hidrossolubilidade. Essa capacidade de inclusão ocorre devido à presença de uma cavidade hidrofóbica e de uma face externa polar. Os átomos de carbono e oxigênio presentes na cavidade lhe conferem caráter lipofílico, enquanto que as hidroxilas que estão voltadas para a face exterior conferem o caráter hidrofílico (LOFTSSON e BREWSTER, 1996; SINGH et al, 2002; MUNRO et al., 2004).

As ciclodextrinas também são conhecidas por suas propriedades de promoção da penetração cutânea de algumas substâncias, como hormônios esteróides e flavonóides (WOERDENBAG et al, 1990; CAVALLI et al, 1999; MATSUDA e ARIMA, 1999; FICARRA et al, 2002; TOMMASINI et al, 2004; MALPEZZI et al., 2004).

A ciclodextrina mais disponível, de menor custo e com diâmetro de cavidade freqüentemente adequado é a β -ciclodextrina, cuja vigência de patente de produção já expirou.

Dentre os métodos de formação de complexos de inclusão de moléculas em ciclodextrinas, Szeftli (1988) cita métodos em solução, suspensão ou por *kneading* (mistura úmida com aquecimento). Entretanto há outros métodos também citados na literatura como: complexação rápida (*slurry*), complexação em pasta, extrusão, mistura a seco, co-evaporação, co-liofilização, co-fusão, evaporação, *freeze-drying*, granulação, *grinding*, *spray-drying*,

neutralização e, o método mais empregado, é a co-precipitação (LOFTSSON e BREWSTER, 1996; GIORDANO et al, 2001; DEL VALLE, 2004).

No método de co-precipitação a ciclodextrina é dissolvida em água e a molécula hóspede é adicionada sob agitação à solução de ciclodextrina em diferentes proporções molares (hóspede:β-ciclodextrina). Muito embora algumas ciclodextrinas, em especial a β-ciclodextrina, apresente baixa hidrossolubilidade (1,85 g/100 ml), sua concentração pode alcançar até 20 %, por aumento de temperatura. No entanto, deve-se verificar a estabilidade térmica da molécula hóspede. Após alcançar o equilíbrio, a mistura é resfriada e o precipitado pode ser coletado por decantação, centrifugação ou filtração e, após, deve ser lavado com pequena quantidade de água ou solvente miscível em água como etanol, metanol ou acetona (DEL VALLE, 2004). A co-precipitação é realizada a temperatura de 37 °C ocorrendo a precipitação do complexo de inclusão após a filtração, já o método empregado nesse trabalho foi o método em solução no qual realiza-se a filtração a 25 °C.

As ciclodextrinas podem complexar moléculas totalmente ou parcialmente por meio de interações não covalentes. As forças que regem a formação do complexo são a alta entalpia das moléculas de água, presentes na cavidade apolar, cuja saída da cavidade dá lugar à entrada de uma molécula menos polar, sendo, portanto, termodinamicamente favorecida; além disto, no complexo há a presença de interações Van der Waals, interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (BIBBY et al, 2000; ZARZYCKI e SMITH, 2001; SINGH et al., 2002). A formação do complexo é por interação não covalente, constituindo um processo dinâmico no qual há associação e dissociação constantes. A substância incluída é dissociada por dissolução, deslocada por um hóspede mais adequado ou transferida a uma matriz pela qual tem maior afinidade (STELLA et al, 1999; BIBBY et al, 2000).

Os complexos de inclusão com ciclodextrinas podem ser caracterizados por meio de técnicas analíticas como: dicroísmo circular, calorimetria diferencial exploratória (DSC), análise térmica diferencial (DTA), análise de gases emanados (EGA), fluorimetria, espectroscopia no infravermelho (IR, FTIR, Raman-IR), cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectroscopia de massas (MS), ressonância magnética nuclear (RMN), espectrofotometria no ultravioleta e visível (UV-VIS), diagrama de solubilidade, difração de raios-X e nêutrons, microscopia eletrônica de varredura (MEV),

termofractografia, termogravimetria (TG), cromatografia em camada delgada, titrimetria e, geometria reflectante total atenuada, entre outros (GIORDANO et al, 2001; FORGO et al., 2003; CALABRÒ et al., 2004; CUPRI et al., 2007).

A β -ciclodextrina possui fórmula molecular $C_{42}H_{70}O_{35}$ e encontra-se sob a forma de cristais em paralelograma, seu ponto de fusão varia de 255 a 265 °C (KIBBE, 2000; THE MERCK INDEX, 1996).

A β -ciclodextrina possui massa molecular de 1135 Da, sua solubilidade é de 1,85 g em 100 ml de água, é solúvel 1 em 200 partes de propilenoglicol e praticamente insolúvel em acetona, etanol (95 %) e em cloreto de metileno. Ela possui um diâmetro de cavidade de 6,0-6,5 Å, altura da cavidade de 0,79 nm, volume de cavidade de 262 ml/ml e seu perfil termo-analítico pode ser dividido em três partes (KIBBE, 2000; DEL VALLE, 2004; SHIMPI et al., 2005):

- perda de água para o ambiente até 120 °C;
- degradação térmica (acompanhada por oxidação do ar) iniciando acima de 250 °C na fase sólida e continuando no estado líquido após a fusão que ocorre próximo a 300 °C e;
- ignição acima de 300 °C.

A estrutura química da β -ciclodextrina pode ser visualizada na Figura 4.

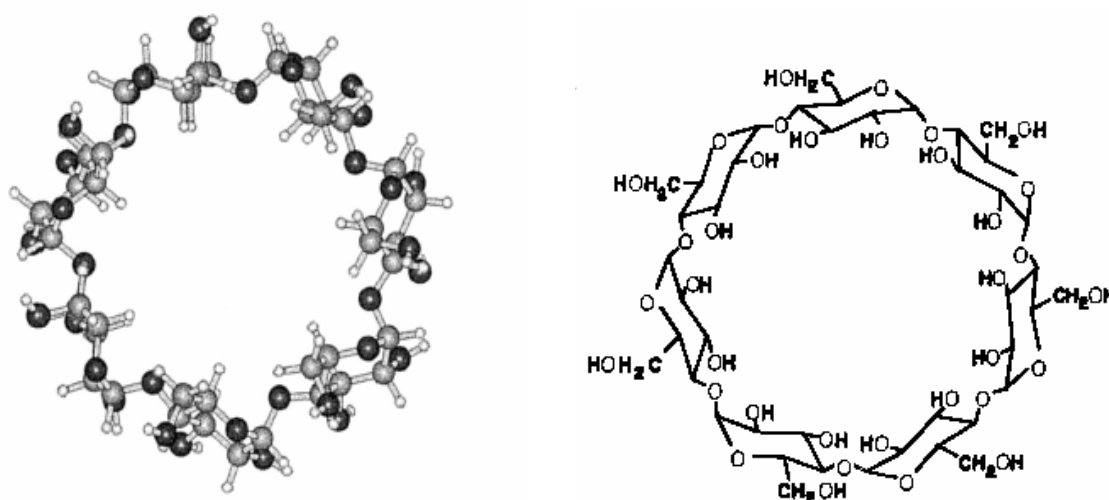


Figura 4. Estrutura química da β -ciclodextrina. Átomos de carbono (esferas claras) e, oxigênio (esferas escuras) na primeira estrutura (LOFTSSON e BREWSTER, 1996; BIBBY et al., 2000).

Na literatura encontra-se um grande número de relatos de complexação de fármacos com β -ciclodextrina, entretanto, há poucos estudos disponíveis sobre a complexação de moléculas naturais bioativas, como, por exemplo, flavonóides e hormônios, principalmente visando à aplicação cutânea. Entre estes se destacam os estudos desenvolvidos por Malpezzi e colaboradores (2004) que complexaram a dihidrochalcona neohesperidina à β -ciclodextrina observando a inserção de um anel aromático desta molécula na extremidade das hidroxilas primárias da β -ciclodextrina e focando o estudo nas características cristalográficas e conformacionais deste complexo.

Cavalli e colaboradores (1999) avaliaram a capacidade de carreamento e liberação de complexos de hidrocortisona e progesterona com β -ciclodextrina por meio de nanopartículas lipídicas sólidas.

Ficarra e colaboradores (2002) caracterizaram complexos de inclusão e misturas físicas de hesperitina, hesperidina, naringenina e naringina à β -ciclodextrina em estado sólido e solução aquosa por meio de análises de RMN, FTIR, DSC e raios-X.

Vijaya Sri e colaboradores (2007) investigaram o preparo (por *kneading* e co-*evaporação*), a caracterização de complexos de inclusão de quercetina e rutina à β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina (pelos métodos de raios-X, DSC e FTIR) e, a avaliação de suas taxas de dissolução (utilizando meio de dissolução de 900 ml de água com 0,75 % de lauril sulfato de sódio, 50 rpm, 37 °C e equipamento de pás). Foram avaliadas as misturas físicas e os complexos na proporção 1:1 e 1:2, obtendo a maior dissolução com os complexos de ambas substâncias na proporção 1:2 com hidroxipropil- β -ciclodextrina, tendo perfis de dissolução semelhantes para os complexos preparados por *kneading* e co-*evaporação*, tais perfis foram maiores que os da mistura física.

Além desses, pode-se também citar os trabalhos desenvolvidos pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas desta Universidade, que envolvem complexos de inclusão de quercetina, 3-*O*-metilquercetina e genisteína à β -ciclodextrina focados na caracterização dos complexos, bem como à permeação cutânea dos mesmos (BORGHETTI, tese em andamento; SCHWINGEL, 2007; XAVIER, 2005; respectivamente).

Alguns investigadores mostram que as ciclodextrinas podem aumentar a permeabilidade das substâncias ativas através da pele por melhorar sua hidrossolubilidade, através de sua capacidade de carreamento ou ainda por romper ou desorganizar o sistema barreira da pele podendo até extrair alguns componentes lipofílicos, como colesterol e fosfolípídeos do estrato córneo, além de algumas proteínas (MÁSSON et al, 1999).

Com relação à toxicidade da β -ciclodextrina, Legendre e colaboradores (1995) estudaram seus efeitos sobre a pele de rato desprovida de pêlo. Foram realizados dois testes para verificar a interação da β -ciclodextrina com lipossomos e estrato córneo isolado. Os lipossomos foram desenvolvidos a partir de lipídeos, ceramidas tipo III, ácido palmítico, colesterol e sulfato de colesterol (20 μ mol; 4:2,5:2,5:1) incubados junto com a β -ciclodextrina durante 1 hora, obtendo taxas molares de 1, 2, 5, 10, 20, 40, 100 e 200 e medindo-se a fluorescência após esse período. A interação de β -ciclodextrina com o estrato córneo isolado foi realizada incubando-se 30-35 mg de estrato córneo com solução de Ringer contendo β -ciclodextrina por 24 horas a 4 °C e realizando-se cromatografia em camada delgada. O colesterol extraído foi analisado por CLAE e as proteínas pelo método de Lowry. Obteve-se 15 % de fluorescência com a taxa de 70 M de β -ciclodextrina incubada com lipossomos. A 10 mg/ml de β -ciclodextrina houve uma leve redução do colesterol do estrato córneo isolado, sendo dose-dependente.

Iborra e colaboradores (2000) reforçam as conclusões de Legendre e colaboradores (1995) através de seu trabalho, mostrando que a β -ciclodextrina é capaz de captar 50-60 % do colesterol de membranas plasmáticas do esperma de cabra de forma seletiva, sem nenhuma perda do conteúdo de fosfolípídeos. A β -ciclodextrina quando aplicada na concentração de 2 mM promoveu metade do efluxo total de colesterol. Na concentração de 8 mM houve remoção de 47 % de colesterol. A eficiência máxima foi de 65 % de remoção de colesterol, obtida com 16 mM de β -ciclodextrina. Avaliando-se os possíveis efeitos tóxicos da β -ciclodextrina sobre o esperma, após 150 minutos de incubação, observou-se 83-97 % de vitalidade celular para as concentrações variando de 0 a 8 mM de β -ciclodextrina, logo a β -ciclodextrina não apresenta efeitos tóxicos sobre essas células nessas concentrações.

Quanto aos efeitos da β -ciclodextrina sobre os eritrócitos humanos, a maioria da literatura citada é da década de 80. Ohtani e colaboradores (1989) relatam efeitos diferenciais das ciclodextrinas naturais sobre os eritrócitos humanos:

- quanto à indução da mudança de forma de discócito para esferócito: a potência da α -ciclodextrina foi maior que a da γ -ciclodextrina, mas com a β -ciclodextrina a hemólise ocorreu antes que a alteração da forma se completasse;

- quanto ao aumento da intensidade de fluorescência da 1-anilinaftaleno-8-sulfonato em membranas pré-tratadas com ciclodextrinas: a potência observada ocorreu na ordem β -ciclodextrina \gggg γ -ciclodextrina $>$ α -ciclodextrina;

- quanto à liberação de potássio e hemoglobina dos eritrócitos: a potência foi $\beta > \alpha > \gamma$ -ciclodextrina. As potências das ciclodextrinas para solubilizar vários componentes dos eritrócitos foram $\alpha > \beta \gggg \gamma$ para fosfolídeos; $\beta \gggg \gamma > \alpha$ para colesterol e proteínas. Infelizmente, só foi possível ter acesso ao resumo deste trabalho, no qual as concentrações utilizadas não são mencionadas.

Leroy-Lechat e colaboradores (1994) comprovaram o efeito hemolítico das ciclodextrinas naturais e de seus derivados hidroxipropilados sobre eritrócitos humanos e seus efeitos citotóxicos sobre os eritrócitos e as células P388, obtendo a seguinte ordem de citotoxicidade: $\beta > \alpha > \gamma$ -ciclodextrina, tanto para as naturais como para os derivados hidroxipropilados, em ambas as células estudadas. Leroy-Lechat ainda comentam que esse efeito citotóxico não é específico ao tipo de célula, sendo dependente da concentração da β -ciclodextrina utilizada, da presença de componentes séricos e da densidade celular e, ainda confirmam a hipótese de desagregação das membranas pela remoção de constituintes básicos.

Monnaert e colaboradores (2004) observaram o comportamento das ciclodextrinas naturais, em modelo *in vitro*, sobre a barreira sangue-cérebro de ratos, avaliando a toxicidade e a permeabilidade endotelial. A toxicidade foi medida através do efluxo de lipídeos das células endoteliais capilares do cérebro, mostrando que a α -ciclodextrina é capaz de remover fosfolídeos, a β -ciclodextrina remove fosfolídeos e colesterol e a γ -ciclodextrina mostrou-se menos seletiva aos lipídeos, resultando numa ordem de toxicidade de $\alpha > \beta > \gamma$

ciclodextrinas, com limiares de toxicidade de 1, 2,5 e 20 mM, respectivamente. A permeabilidade endotelial foi avaliada pelo coeficiente de permeabilidade da sacarose através da barreira. A liberação de colesterol das células endoteliais por β -ciclodextrina foi dependente de sua concentração. Em dose não tóxica para a integridade da barreira (1 mM), o efluxo de colesterol pela β -ciclodextrina foi de 12 %, enquanto que em concentrações tóxicas de 2,5 e 5 mM, a β -ciclodextrina extraiu 25 e 50 % de colesterol, respectivamente. A liberação de fosfolipídeos (fosfatidilcolina e esfingomiéline) foi estudada na concentração de 5 mM de β -ciclodextrina e houve remoção de 19 % de fosfatidilcolina e 63 % de esfingomiéline das células endoteliais capilares do cérebro.

Irie e Uekama (1997) complementam os demais estudos quando mencionam que a cadeia acila dos fosfolipídeos liga-se fracamente com a extremidade mais larga da β -ciclodextrina, enquanto que a cadeia lateral do colesterol prefere a inclusão na cavidade da β -ciclodextrina.

Os resultados de Ohtani e colaboradores (1989) relativos à remoção de colesterol e proteínas conferem com os relatados por Iborra e colaboradores (2000), exceto pela informação de que a β -ciclodextrina também remove fosfolipídeos. Esta, no entanto, é confirmada pelo trabalho de Monnaert e colaboradores (2004).

Logo, apesar de a β -ciclodextrina causar o efluxo de colesterol, fosfolipídeos e proteínas das membranas celulares, deve-se observar a concentração de uso, sendo que tais efeitos surgem a partir da utilização de concentração iguais ou superiores a 2 mM de β -ciclodextrina.

Não foram encontrados relatos na literatura sobre complexação do coumestrol com ciclodextrinas, especialmente com a β -ciclodextrina, assim como poucos estudos de toxicidade do mesmo (já citados em seções anteriores deste trabalho). Quanto a pesquisas envolvendo a utilização de ciclodextrinas em géis são encontrados poucos trabalhos com HPMC (K4M) com β -ciclodextrina (POSE-VILARNOVO et al., 2004); HPMC (K4M) com hidroxipropil- β -ciclodextrina e metil- β -ciclodextrina (RODRIGUEZ-TENREIRO et al., 2007b). Entretanto, é possível ter acesso a outros tipos de matrizes poliméricas como carbopol com hidroxipropil- β -ciclodextrina e polietileno óxido-poli-3-hidroxibutirato-polietileno óxido

com α -ciclodextrina (RODRIGUEZ-TENREIRO et al., 2007 a; LI et al, 2006; respectivamente).

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e Solventes

Coumestrol, código 27885 (95 % de pureza, sintetizado), obtido do laboratório Sigma-Aldrich do Brasil Ltda., β -ciclodextrina gentilmente fornecida pelo laboratório Roquette et Frères (França) e hidroxipropilmetilcelulose (Methocel F4M) fornecido por Dow Chemical Company.

Solventes: Metanol grau HPLC (Lichrosolv Merck), dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth), ácido trifluoroacético 98% puro - Nuclear), acetona (Nuclear), octanol (Vetec), propilenoglicol (Delaware) e solução fisiológica 0,9 % (pH 6,5).

Outros materiais: membrana de filtração HA em éster de celulose, código HAWPO2500, com 0,45 μ m de diâmetro de poro e 25 mm de diâmetro (Millipore®); membrana para filtração HA em ésteres de celulose (Nitrato 75-80% e acetato), código HAWPO4700, com 0,45 μ m de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro (Durapore®) e; membrana de filtração HLVP0 em PVDF, código HVLPO1300, com 0,45 μ m de diâmetro de poro e 13 mm de diâmetro (Durapore®).

4.2 Equipamentos

- Agitador multiponto com banho de água (IKA®-WERKE) e termostato (IKA® EH4 Basic);
- espectrofotômetro no ultravioleta (Hewlett Packard 8452A – detector Diode Array Spectrophotometer);
- aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência – Shimadzu LC-10AD, provido de injetor automático SIL-10A, detector UV-VIS SPD-10A, integrador LC10, módulo de comunicação CBM-10A, provido do programa computacional CLASS LC-10, coluna de aço inoxidável Phenomenex Gemini, fase estacionária C₁₈, 5 μ m, com identificação OOF-4435-EO e número de série 309960-48 (150 x 4,6 mm), pré-coluna Waters C₁₈, 10 μ m (3,9 x 20 mm) Sentry™ Guard Column (2PK) nº WAT044480;

- banho de ultrassom (Transsonic T460 Elma®/ Ultracleaner 1400A Unique);
- liofilizador modular Edwards MODULYO 4K;
- espectrômetro no infravermelho Shimadzu FTIR-8300;
- calorímetro diferencial exploratório Shimadzu DSC-60 com controlador de gás de purga (nitrogênio) e software de controle e avaliação TA-60, versão 2.0;
- seladora Shimadzu SSC-30, para fechamento de porta-amostras do DSC;
- aparelho de ressonância magnética nuclear, RMN de ^1H e de ^{13}C , BRUKER DRX400 Avance;
- microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM 6060);
- célula de difusão tipo Franz;
- centrífuga para *eppendorffs* (5417R) e para tubos de ensaio (Janetzki T32A);
- paquímetro Mitutoyo (0-25 mm) digimatic micrometer.

4.3 Métodos

4.3.1 Validação dos métodos analíticos para o doseamento de coumestrol

Para o doseamento do coumestrol nos experimentos realizados foram desenvolvidos e validados dois métodos, um utilizando espectroscopia no ultravioleta e outro por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Não sendo comercialmente disponível um padrão de coumestrol, foi utilizado coumestrol código 27885 (Sigma-Aldrich), como substância referência.

4.3.1.a Método de análise por espectroscopia no ultravioleta

Utilizaram-se as seguintes condições para o método ultravioleta: uma amostra de 5 mg de coumestrol foi dissolvido em DMSO (1000 μl) completando-se o volume de 50 ml com metanol P.A., obtendo-se uma solução inicial de 100 $\mu\text{g/ml}$. O comprimento de onda de detecção empregado foi 343 nm. Uma alíquota, exatamente medida desta solução mãe (SM1) de 25,0 ml, foi diluída com metanol a 50,0 ml (SM2) e desta, uma alíquota de 10,0 ml foi diluída a 50,0 ml resultando numa solução contendo 10 $\mu\text{g/ml}$ de coumestrol (SM3). A partir da diluição da solução de 10 $\mu\text{g/ml}$ prepararam-se as seguintes soluções de coumestrol: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 $\mu\text{g/ml}$. Foram realizadas três curvas de calibração para cada concentração,

procedendo-se leituras em triplicata, sendo os resultados expressos como a média das três leituras.

4.3.1.b Método de doseamento por CLAE

Para o método CLAE utilizou-se equipamento Shimadzu LC-10AD, coluna Phenomenex Gemini 5 μ m C₁₈ (150 x 4,6 mm), pré-coluna Waters C₁₈, 10 μ m (3,9 x 20 mm), fase móvel composta de ácido trifluoroacético 0,1 %-metanol grau HPLC (30:70 v/v), fluxo de 0,8 ml/min, volume de injeção de 20 μ l e comprimento de onda de detecção de 343 nm.

Para a obtenção da curva referência do coumestrol foram preparadas as soluções-mãe SM1, SM2 e SM3 conforme descrito no item anterior, entretanto, utilizou-se metanol 50 % (v/v) grau HPLC nas diluições e, partindo-se da solução de 10 μ g/ml preparou-se as concentrações de 0,1; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 μ g/ml. Foram realizadas três curvas e para cada concentração procedeu-se leituras em triplicata, sendo os resultados expressos como a média de três injeções.

Para a validação de ambos os métodos foram utilizados os parâmetros: linearidade, precisão (intermediária e repetibilidade), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e especificidade. Todos esses parâmetros foram medidos e calculados segundo a International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH, 2005) e ANVISA (RDC 899 de 29/05/2003).

4.3.1.1 Linearidade

4.3.1.1.1 Curva referência do coumestrol

A linearidade é a capacidade de obtenção de resultados que são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra em uma dada faixa (ICH, 2005), tendo sido analisada a partir das curvas de referência do coumestrol, indicadas nas seções 4.3.1.a e 4.3.1.b.

Os resultados foram corrigidos, em termos de área, para a pureza do coumestrol (95% puro) e então foram plotados em gráficos, a partir dos quais gerou-se a equação de reta e o coeficiente de regressão linear (R^2). A análise estatística dos resultados foi realizada por meio de análise de regressão e análise de variância por fator único (ANOVA) em nível de significância de 95 % ($p < 0,05$).

4.3.1.2 Precisão

A avaliação da precisão foi realizada intra-dia e inter-dia, correspondendo à repetibilidade e à precisão intermediária, respectivamente. A repetibilidade expressa a precisão sob as mesmas condições de operação durante um pequeno intervalo de tempo, sendo realizada por meio de nove medições do ponto intermediário da curva ($3 \mu\text{g/ml}$) num mesmo dia. Já a precisão intermediária expressa variações por meio de análises em diferentes dias, diferentes analistas ou diferentes equipamentos (ICH, 2005), onde foram analisadas três curvas de calibração do coumestrol, sendo uma curva por dia, durante três dias consecutivos.

4.3.1.3 Exatidão

A exatidão expressa a proximidade entre o valor aceito como valor referência e o valor encontrado (ICH, 2005), sendo realizada a sua medida pela recuperação de quantidades conhecidas da substância referência adicionadas à matriz. A recuperação das quantidades de coumestrol foi executada como segue nos protocolos abaixo.

Tabela 2. Teste de exatidão na análise de coumestrol por espectrofotometria no ultravioleta, 343 nm.

Soluções	Solução referência			Solução adicionada			Massa de coumestrol em 10 ml (µg)	Conc. (%)	Conc. teórica (µg/ml)
	Alíquota (ml)	Conc. (µg/ml)	Massa de coumestrol (µg)	Alíquota (ml)	Conc. (µg/ml)	Massa adicionada de coumestrol (µg)			
S1	4	3	12	2	3	6	18	50	1,8
S2	4	3	12	4	3	12			
S3	4	3	12	6	3	18			
							30	150	3,0

Tabela 3. Teste de exatidão na análise de coumestrol por CLAE, 343 nm.

Soluções	Solução referência			Solução adicionada			Massa de coumestrol em 10 ml (µg)	Conc. (%)	Conc. teórica (µg/ml)
	Alíquota (ml)	Conc. (µg/ml)	Massa de coumestrol (µg)	Alíquota (ml)	Conc. (µg/ml)	Massa adicionada de coumestrol (µg)			
S1	4	3	12	2	3	6	18	50	1,8
S2	4	3	12	4	3	12			
S3	4	3	12	6	3	18			
							30	150	3,0

OBS.: Conc. = concentração.

Adicionalmente, foi realizado teste de exatidão para o doseamento de coumestrol no teste de permeação cutânea por CLAE. A pele de suíno foi colocada em célula de Franz provida somente de meio acceptor (metanol 50 % (v/v) grau HPLC). Esta permaneceu em repouso durante 8 horas em banho-maria a 37 °C, sob agitação. A pele foi então retirada e picada com auxílio de pinça e bisturi e, realizaram-se três triturações da pele com 2 ml de metanol 50 % (v/v) cada, durante 4-5 minutos, utilizando-se homogêinizador de tecidos. Após cada trituração a pele foi sonicada por 5 minutos em tubos de ensaio. Os sobrenadantes foram coletados e diluídos para 10 ml com metanol 50 % (v/v). Desta solução, transferiu-se 2,0 ml para três balões volumétricos de 10 ml. A cada um dos três balões, adicionou-se 2, 4 e 6 ml,

respectivamente, de uma solução de coumestrol 3,0 µg/ml. As três soluções foram analisadas em duplicata, por CLAE.

4.3.1.4 Especificidade

A especificidade é a capacidade de determinar o analito, inequivocadamente, na presença de outros componentes como impurezas ou produtos de degradação (ICH, 2005).

O ensaio de especificidade foi realizado para o método de ultravioleta e CLAE a fim de detectar interferências dos demais componentes da formulação (β -ciclodextrina no ultravioleta e, β -ciclodextrina e hidroxipropilmetilcelulose no CLAE) no pico correspondente ao coumestrol. Preparou-se uma solução de coumestrol 3,0 µg/ml e adicionaram-se quantidades de 1 mg de β -ciclodextrina e 1 mg de HPMC. Preparou-se, também, outra solução contendo apenas os excipientes em metanol 50 % (v/v) e ambas soluções foram analisadas com o método desenvolvido.

Com vistas a avaliar a interferência de componentes da pele, preparou-se uma célula de Franz sem meio doador, apenas com meio acceptor, deixando-a em repouso durante 8 horas em banho-maria a 37 °C, sob agitação. A pele foi então retirada realizando-se três triturações da mesma na presença de 2 ml de metanol 50 % (v/v) cada, durante 4-5 minutos, com auxílio de homogeneizador de tecidos e ultrassom durante 5 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e o volume de 10,0 ml foi completado com metanol 50 % (v/v). Esta solução foi filtrada duas vezes por membranas de 0,45 µm de diâmetro de poro e do filtrado, realizaram-se duas determinações por CLAE.

4.3.1.5 Limite de detecção

O limite de detecção de um procedimento analítico individual é a menor quantidade de analito numa amostra, que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado com um valor exato (ICH, 2005).

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

$$LD = 3 (\sigma/S) \quad (\text{ANVISA, 2003}).$$

Equação 1.

$$LD = 3,3 (\sigma/S) \quad (\text{ICH, 2005}).$$

Equação 2.

4.3.1.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor massa de analito numa amostra, que pode ser determinada, quantitativamente, com precisão e exatidão adequadas.

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

$$LQ = 10 (\sigma/S) \quad (\text{ANVISA, 2003; ICH, 2005}).$$

Equação 3.

4.3.2 Associação da aglicona com b-ciclodextrina

4.3.2.1 Diagrama de solubilidade segundo Higuchi e Connors (1965)

O diagrama de solubilidade foi construído por meio do preparo de soluções, em que diferentes proporções molares de β -ciclodextrina foram dissolvidas em 2,5 ml de água em vidros âmbar, aos quais se adicionou coumestrol em excesso, ou seja, 1,5 mg, constituindo um método de complexação em solução. As proporções molares coumestrol: β -ciclodextrina utilizadas nessas dispersões foram 1:0, 1:1, 1:2 e 1:3. As dispersões aquosas foram mantidas por 48 horas em banho-maria termostatizado a 37 ± 1 °C, sob agitação. Após esse período, as dispersões foram resfriadas até temperatura de 25 °C, e então foram filtradas duas vezes, por

meio de membranas com 0,45 μm de diâmetro nominal de poro para balões volumétricos de 5,0 ml, completando-se o volume com água. De cada uma dessas soluções transferiu-se 1,0 ml para outro balão volumétrico de 5,0 ml e completou-se volume com metanol P.A. A solução resultante foi analisada em ultravioleta, medindo-se a absorvância no comprimento de onda de 343 nm.

Tabela 4. Proporções de coumestrol e β -ciclodextrina utilizadas na obtenção do diagrama de solubilidade de Higuchi & Connors (1965).

Proporção molar coumestrol: β -ciclodextrina	Coumestrol			β -ciclodextrina			Volume final (ml)
	Massa (mg)	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. (mM)	Massa (mg)	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. (mM)	
1:0	1,53	3,23	1,083	0	0	0	5,0
1:1	1,49	12,90	1,055	6,33	1266	1,115	5,0
1:2	1,55	22,85	1,097	12,7	2540	2,237	5,0
1:3	1,52	51,63	1,076	19,01	3802	3,349	5,0

OBS.: Conc. = concentração.

4.3.2.2 Preparação do complexo coumestrol: β -ciclodextrina em meio líquido

No preparo do complexo, a proporção coumestrol: β -ciclodextrina 1:1 (molar) foi utilizada, empregando-se as mesmas condições descritas na seção 4.3.2.1, exceto a última diluição em metanol.

4.3.2.3 Secagem por liofilização da dispersão contendo o complexo

A dispersão aquosa contendo coumestrol complexado com β -ciclodextrina foi seca por liofilização, resultando em dispersão sólida. A secagem por liofilização foi realizada nas condições $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, aproximadamente 2×10^{-1} Torr, sob abrigo da luz, após prévio congelamento da dispersão aquosa.

4.3.2.4 Preparação da mistura física de coumestrol:β-ciclodextrina

A mistura física foi obtida pela mistura de coumestrol e β-ciclodextrina na proporção molar 1:1, em gral de vidro durante 20 minutos.

4.3.3 Caracterização do complexo coumestrol:β-ciclodextrina e da mistura física coumestrol:β-ciclodextrina

4.3.3.1 Doseamento do coumestrol por CLAE

O método empregado foi descrito na seção 4.3.1.b. A análise foi executada empregando-se substância de referência, com 95 % de pureza, face da falta de disponibilidade comercial de padrão para aquisição.

4.3.3.2 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS, utilizando-se equipamento Jeol 6060, com metalização prévia das amostras em ouro.

4.3.3.3 Calorimetria diferencial exploratória

A termoanálise das matérias-primas e dispersões sólidas foi realizada na Central Analítica da Faculdade de Farmácia da UFRGS, utilizando-se calorímetro diferencial exploratório do CDTF, calibrado com índio, sob atmosfera de nitrogênio, com aquecimento de 30 °C a 430 °C, com aumento gradual da temperatura de 10 °C/min. Amostras de 1 a 2 mg foram colocadas em recipientes de alumínio, com volume nominal de 50 µl e os porta-amostras foram selados com auxílio de seladora manual.

4.3.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho

As análises de infravermelho foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da UFRGS. Os espectros no infravermelho foram obtidos a partir da mistura das amostras com brometo de potássio 3 % (4,5 mg/150 mg de KBr), que foi previamente dessecado em estufa em 200 °C e mantido em dessecador até a análise. A mistura foi realizada em gral de ágata e submetida à compressão em prensa hidráulica. Foram analisadas as matérias primas coumestrol e β -ciclodextrina, bem como as associações destes (complexo e mistura). Os espectros foram obtidos com transformada de Fourier no modo de transmitância, com 4 cm⁻¹ de resolução e 40 acumulações, cobrindo a faixa de frequência de 4500 a 250cm⁻¹.

4.3.3.5 Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e Modelagem Molecular

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram realizados em espectrômetro Bruker DRX400-*Avance*, pertencente ao Departamento de Química/ICEx – UFMG, empregando-se frequência de 400 MHz para o núcleo de hidrogênio, equipado com unidade controladora de temperatura BVT3000 digital, sonda dual \varnothing 5 mm – BB, detecção direta ¹³C/¹H, sonda multinuclear \varnothing 5 mm, detecção inversa *z*-grad, tendo dimetilsulfóxido, DMSO-*d*6, como solvente e tetrametilsilano, TMS, como referência interna (*d*0,0).

Foram realizados experimentos uni- e bi-dimensionais (homo e heteronuclear) para a atribuição dos sinais de ressonância. Os experimentos foram realizados sob o controle de temperatura, a 27 °C (300 K). Experimentos de detecção direta RMN de ¹H foram realizados sob condições padrões de acordo com a biblioteca do equipamento, assim como os experimentos bidimensionais COSY, HSQC [¹*J*(C, H)] e HMBC [ⁿ*J*(C, H), n = 2, 3 e 4]. Para verificar a existência de interações espaciais entre os hidrogênios pertencentes à ciclodextrina e a sua molécula hóspede foram realizados experimentos bidimensionais de efeito nuclear Overhauser (NOESY). O tempo de mistura ideal para cada experimento foi calculado utilizando-se uma seqüência de pulsos baseada em um experimento de inversão-recuperação, de modo a evitar o aparecimento de manchas de correlação como resultado de difusão de spins e maximizar o efeito $nOe^{1,2,3,4}$.

As análises foram realizadas a partir de soluções saturadas dos analitos (coumestrol, β -ciclodextrina e complexo) dissolvidos em DMSO-*d*₆.

A modelagem molecular foi realizada com auxílio do Software Chem3D Ultra, versão 9.0 Cambridge Soft, utilizando o método de mecânica molecular (MM2), a fim de auxiliar o entendimento de como ocorre o complexo entre as duas substâncias.

4.3.4 Avaliação do perfil de penetração cutânea do coumestrol e das associações

4.3.4.1 Solubilidade do coumestrol no meio acceptor

Para determinar a solubilidade do coumestrol no meio acceptor, este foi adicionado em excesso (1,4 mg) em 5 ml de metanol 50 % (v/v), diluído e filtrado, procedendo-se à leitura por CLAE a 343 nm. O solvente metanol foi testado considerando-se as informações a respeito de sua solubilidade, disponíveis na literatura (THE MERCK INDEX, 1996).

4.3.4.2 Determinação do coeficiente de partição octanol/água

A determinação do coeficiente de partição octanol/água do coumestrol foi realizado em três etapas. Numa primeira etapa, saturou-se os dois solventes (4 ml de cada solvente) por meio de agitação durante 24 horas, estabelecendo-se equilíbrio entre as fases imiscíveis. Numa segunda etapa, uma alíquota de 2 ml de cada fase foi retirada e um excesso de coumestrol (5,6 mg) foi acrescido, mantendo-se a agitação por mais 12 horas. E, por último, foi realizada a centrifugação da mistura final para a separação das fases sendo que a concentração média de coumestrol em cada uma das fases foi determinada por CLAE, após diluição de 100 μ l de cada uma das fases, octanólica e aquosa, em 25 ml ou 10 ml de solução de metanol:água 50 % (v/v), respectivamente. A detecção foi realizada em 343 nm.

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

$$K = [C_{\text{oct}}]/[C_w] \text{ e, } K_p = \log K.$$

Equação 4.

onde: K_p ou coeficiente de partição octanol/água é igual ao quociente entre a concentração de saturação do coumestrol ($\mu\text{g/ml}$), respectivamente, nas fases octanólica (C_{oct}) e aquosa (C_w). Este foi expresso como $\text{Log } P$, que representa o logaritmo do coeficiente de partição.

4.3.4.3 Avaliação do perfil de penetração intrínseca do coumestrol

Para determinar a penetração intrínseca, foram aplicados 100 μl de uma solução de coumestrol ou de suas associações (mistura física ou complexo) em DMSO em cada célula de Franz (1 mg de coumestrol ou 5,2 mg de cada uma das associações em 100 μl de DMSO, por célula), resultando num depósito correspondente a 1 mg de coumestrol, na forma livre ou associada, por célula.

4.3.4.4 Preparação do gel HPMC F4M

O gel de hidroxipropilmetilcelulose foi preparado com Methocel[®] F4M a 3 % em água destilada, em temperatura ambiente.

A formulação foi constituída de coumestrol ou associações na concentração (correspondente a coumestrol) de 0,1 % no gel de HPMC F4M 3 %. A incorporação do coumestrol ou de suas associações no gel foi realizada por prévia dispersão dos mesmos em propilenoglicol (300 μl para a quantia de 1 mg de coumestrol por célula).

4.3.4.5 Experimentos de permeação cutânea *ex vivo*

A determinação da cinética de penetração cutânea *ex vivo* foi realizada em células de difusão tipo Franz, com área de interface correspondente a 2,54 cm^2 e com abertura superior livre.

Foram utilizados cortes circulares de pele retirada da parte posterior de orelha de suínos, desprovidas de pêlos, como interface entre o meio doador e receptor. Com auxílio de bisturi, a parte externa da pele foi removida da cartilagem da orelha e, com auxílio de pinça, removeram-se os restos de vasos sanguíneos e tecidos para obter uma melhor homogeneidade na espessura da pele (em torno de 0,8-1,5 mm). Esses cortes das orelhas foram armazenados

em temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e lentamente descongelados até temperatura ambiente, previamente ao experimento. Antes da sua utilização, as peles foram coladas nas bordas com cola acrílica sobre a célula de Franz e então foram reidratadas por meio do preenchimento do meio acceptor com solução fisiológica 0,9 % (pH 6,5), durante 12 horas, sob refrigeração. Do compartimento acceptor foi retirada a solução fisiológica e o mesmo foi preenchido com metanol 50 % (v/v) grau HPLC.

O meio doador foi preenchido de forma que a substância em solução (DMSO) (permeação intrínseca) ou o gel contendo o coumestrol ou suas associações com β -ciclodextrina (permeação em gel) cobrisse toda a superfície da pele em quantidade mínima para tal ($\sim 2\text{ mm}$ para o gel = 600 mg de gel/célula). O meio acceptor foi mantido sob agitação, em banho-maria, $37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante todo o período de experimento (8 horas).

4.3.4.6 Determinação dos parâmetros de permeabilidade cutânea

Após o início dos testes de cinética de permeabilidade, alíquotas de 3 ml do meio acceptor foram coletadas com auxílio de seringa e catéter de uretra número 4, em intervalos de tempo de 1 hora, para posterior análise e quantificação por CLAE, com detecção por CLAE no ultravioleta em 343 nm.

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação do método de espectrofotometria no ultravioleta, para quantificação de coumestrol

O desenvolvimento do método de quantificação do coumestrol por espectrofotometria no ultravioleta foi realizado utilizando o comprimento de onda de 343 nm, procedendo-se às leituras das soluções metanólicas nas concentrações a seguir:

Tabela 5. Absorvância do coumestrol na obtenção de curva de calibração pelo método UV, 343 nm.

Concentrações (µg/ml)	Média (n = 3)	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)
1,0	0,108	0,003	2,778
2,0	0,213	0,004	1,878
3,0	0,318	0,012	3,773
4,0	0,426	0,006	1,408
5,0	0,529	0,010	1,890

A Tabela 5 e Figura 5 revelam a linearidade do método. Os desvios padrões relativos superiores a 2 % observados na Tabela 5 podem ser atribuídos às pequenas quantidades de substância de referência disponível para pesagem.

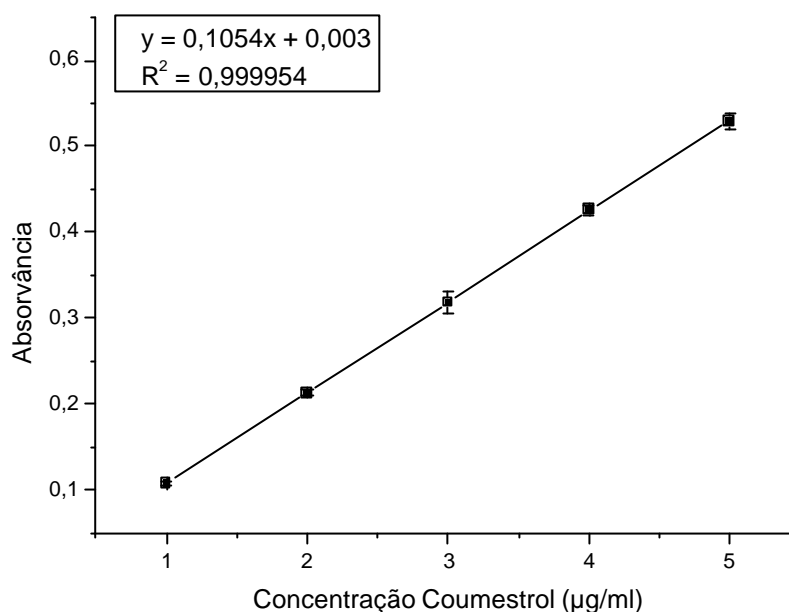


Figura 5. Curva de calibração de coumestrol, obtida pelo método de espectrofotometria no ultravioleta, 343 nm.

Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA (fator único) e análise de regressão linear, obtendo-se a equação de reta: $y = 0,1054x + 0,003$; $R^2 = 0,999$; valor de F calculado de 14,214; valor-p de 0,005 e valor de F crítico de 5,317. A tabela 6 apresenta os parâmetros da análise de regressão linear obtidos para a curva analítica do coumestrol, pelo método ultravioleta.

Tabela 6. Parâmetros da análise de regressão linear da curva analítica do coumestrol por espectrofotômetro no ultravioleta.

Parâmetros	Coefficiente	Erro Padrão	LC inferior	LC superior	Valor-p
Inclinação (a)	0,105	0,000	0,104	0,106	$1,305 \times 10^{-07}$
Interseção (b)	0,003	0,001	-0,001	0,007	0,114

LC = limite de confiança; F calculado = 65840,385 e F de significação = $1,31 \times 10^{-7}$, nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

O método de doseamento do coumestrol por espectrofotômetro no ultravioleta apresentou um coeficiente de regressão linear de 0,999, expressando, portanto, linearidade satisfatória para a finalidade proposta, ou seja, para a determinação do coumestrol no diagrama de solubilidade de fases.

A repetibilidade do método foi avaliada por meio da medida de absorvância (9 medidas) do ponto intermediário da curva, 3 µg/ml. Para esta determinação, obteve-se absorvância média de $0,288 \pm 0,002$ e DPR% 1,002, o que denota a excelente repetibilidade do método.

A precisão inter-dia foi determinada por meio da medida da absorvância do coumestrol nos 5 pontos da curva de calibração, em 3 dias diferentes. Os resultados da precisão inter-dia são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Precisão inter-dia do método de determinação do coumestrol por espectrofotometria no ultravioleta, 343 nm.

Concentração (µg/ml)	Média (n = 3)	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)
1,0	0,108	0,003	2,778
2,0	0,213	0,004	1,878
3,0	0,318	0,013	4,088
4,0	0,426	0,006	1,408
5,0	0,529	0,011	2,079

Os resultados dos testes de precisão inter-dia demonstraram que o método de determinação do coumestrol no ultravioleta é preciso. Os coeficientes de variação superiores a 2 % são peculiares às baixas concentrações dos pontos da curva de referência (1 a 5 µg/ml), partindo-se de pequena massa de coumestrol.

O teste de exatidão do método foi realizado como descrito na metodologia, seção 4.3.4, sendo os resultados apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Teste de exatidão da análise do coumestrol pelo método de espectrofotometria no ultravioleta, 343 nm.

Solução	Massa Coumestrol	Massa coumestrol adicionada	Massa de coumestrol teórica	Recuperação (%)
S1	12 µg	6 µg	18 µg	100,5
S2	12 µg	12 µg	24µg	101,8
S3	12 µg	18 µg	30 µg	99,6
n = 3	Volume: 10 ml			

O método demonstrou ser exato, obtendo-se percentuais de recuperação próximos a 100 %, apesar das pequenas massas utilizadas para a preparação das soluções iniciais.

Os limites de detecção e quantificação do coumestrol pelo método ultravioleta foram calculados segundo ICH (2005) obtendo-se os seguintes resultados: LD = 0,097 e LQ = 0,295 µg/ml.

Esses valores denotam a alta sensibilidade do método à detecção e quantificação do analito. Quanto à especificidade, o método demonstrou ser específico em relação à β-ciclodextrina presente no ensaio de solubilidade de Higuchi e Connors.

O conjunto de resultados obtidos na validação do método de quantificação do coumestrol por espectrofotometria no ultravioleta demonstrou que o método é exato e preciso na faixa de concentração de 1 a 5 µg/ml, bem como específico na presença de β-ciclodextrina. O método também apresentou excelente sensibilidade.

5.2 Validação do método de quantificação de coumestrol por CLAE

O método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi desenvolvido para a análise das concentrações de coumestrol nos testes de coeficiente de partição, solubilidade do coumestrol em metanol 50 % (v/v) e de permeação cutânea. A metodologia empregada está discutida na secção 4.3.1.b e os resultados obtidos na curva da calibração são

apresentados na Tabela 9. O perfil cromatográfico do coumestrol, obtido por CLAE, detecção em 343 nm, é apresentado na Figura 6.

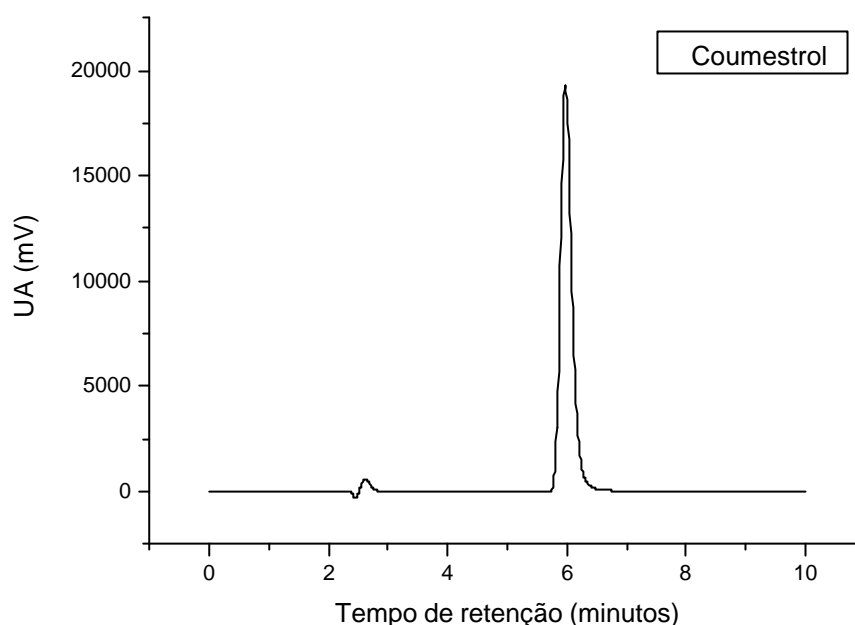


Figura 6. Perfil cromatográfico do coumestrol obtido pelo método CLAE, detecção em 343 nm. (UA = unidade de absorvância).

Tabela 9. Curva de calibração do coumestrol, obtida por CLAE, 343 nm.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Área média ($\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) dos picos (n = 3)	Desvio Padrão (DP)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)
0,1	17224,5	541,64	3,144
1,0	80666,3	1996,57	2,475
2,0	180053,5	3121,04	1,733
3,0	273820,5	4778,99	1,745
4,0	368196,4	4129,72	1,122
5,0	459533,1	2800,93	0,609

A introdução de um ponto adicional na curva, 0,1 $\mu\text{g/ml}$, revelou-se necessária para a utilização do método nos ensaios de permeação, em que a massa de coumestrol detectada no fluido acceptor, nas primeiras horas, são muito pequena. Para os dois pontos da curva, de menor concentração, observa-se o maior desvio padrão relativo, superior a 2 %.

A Figura 7 apresenta a curva de calibração do coumestrol, obtida pelo método de doseamento por CLAE.

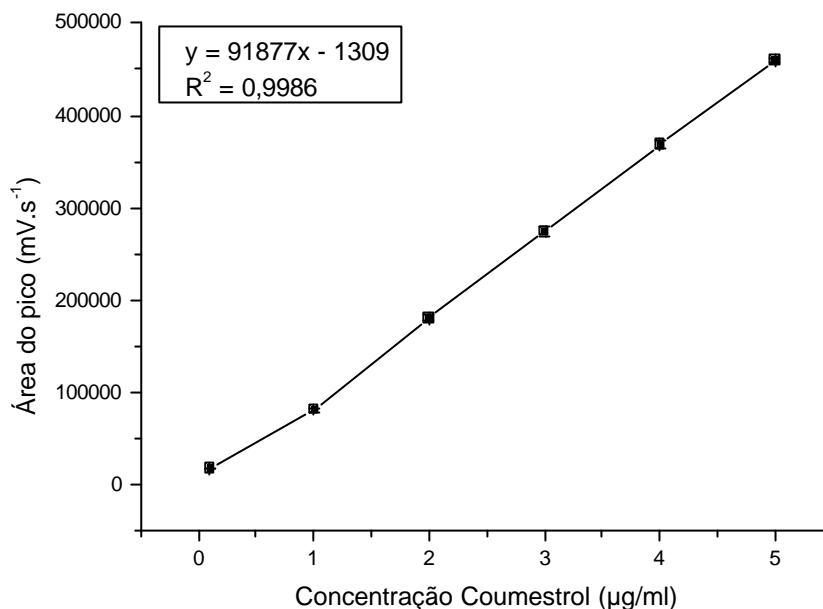


Figura 7. Curva de calibração para o coumestrol, obtido por CLAE, a 343 nm.

A análise estatística da curva de calibração do método de quantificação do coumestrol por CLAE, detecção em 343 nm, foi realizada por ANOVA (fator único) e análise de regressão simples, obtendo-se os seguintes resultados:

Tabela 10. Parâmetros da análise de regressão da curva de calibração do coumestrol por CLAE, 343 nm.

Parâmetros	Coefficientes	Erro Padrão	LCI	LCS	Valor-p
Inclinação (a)	91877,38	1703,688	87147,18	96607,59	$7,078 \times 10^{-07}$
Interseção (b)	-1309,02	5158,639	-15631,7	13013,69	0,812

LCI = limites de confiança inferior; LCS = limite de confiança superior, F calculado = 2908,287 e F crítico = $7,08 \times 10^{-07}$, nível de significância de 5 %.

O método de doseamento por CLAE apresentou um coeficiente de regressão linear de 0,998 e valor de $F_{\text{calculado}}$ (11,029) significativo em relação ao valor $F_{\text{crítico}}$ (4,964), o que demonstra linearidade satisfatória para as determinações dos ensaios de permeação cutânea.

A repetibilidade do método foi avaliada por meio de 9 determinações do ponto intermediário da curva, 3 µg/ml. Para esta análise, obteve-se área média de 275708,7 ± 843,36 e DPR 0,306 % , denotando ótima repetibilidade do método.

A precisão inter-dia foi determinada por meio da medida das áreas dos picos do coumestrol nos 5 pontos da curva de calibração, em 3 dias diferentes. Os resultados da precisão inter-dia estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Resultados da precisão inter-dia do coumestrol por CLAE, 343 nm.

Concentração	Área média dos picos (mV.s ⁻¹ ; n = 3)	DP	DPR (%)
0,1	17224,5	560,39	3,253
1,0	80666,3	2279,79	2,826
2,0	180053,5	2726,57	1,514
3,0	273820,5	5656,86	2,066
4,0	368196,4	4669,43	1,268
5,0	459533,1	2916,21	0,634

Através dos resultados de precisão inter-dia, pode-se observar coeficientes de variação maiores nas concentrações mais baixas, no entanto, para a finalidade a que se destina o método pode ser considerado com precisão adequada.

Os resultados dos testes de especificidade, de doseamento de coumestrol por CLAE em relação aos constituintes da pele da orelha de porco e aos excipientes (β-ciclodextrina e hidroxipropilmetilcelulose), conforme descrito na metodologia, item 4.3.1.4, podem ser visualizados nos cromatogramas apresentados abaixo (Figura 8 e 9).

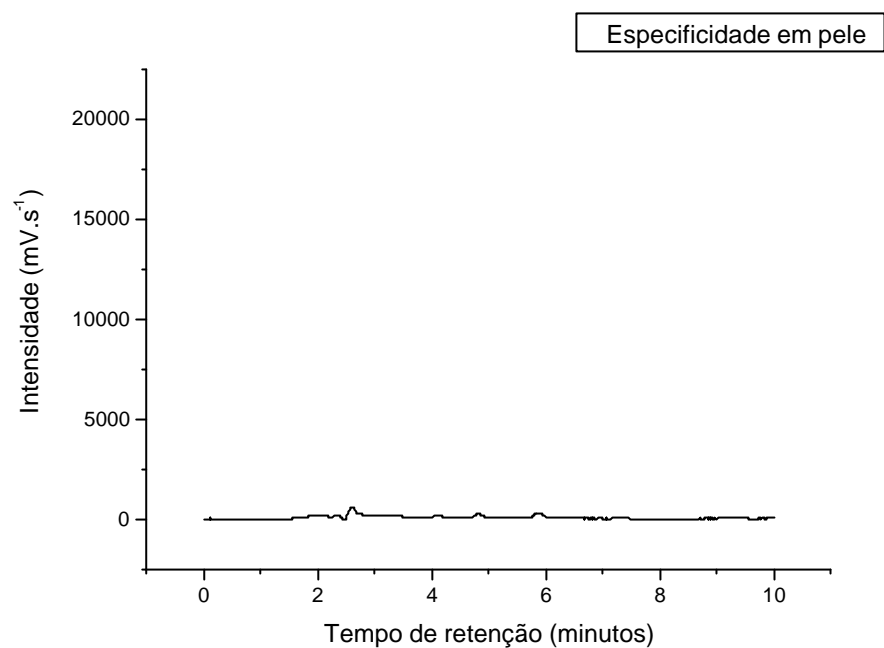


Figura 8. Cromatograma obtido em teste de especificidade de doseamento de coumestrol em pele, quantificado por CLAE, na presença dos constituintes da pele extraídos pela fase aceptora.

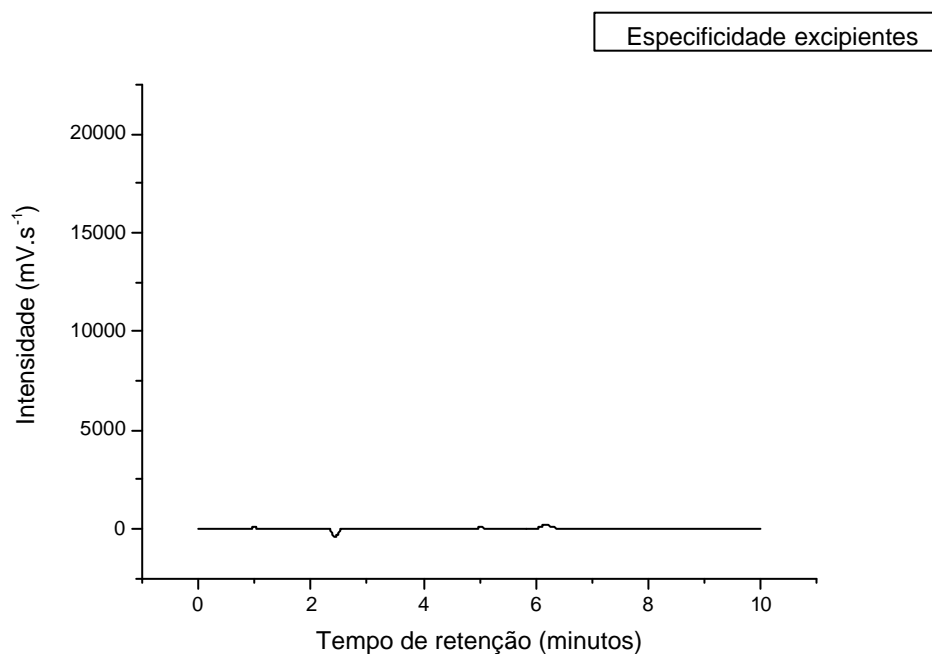


Figura 9. Cromatograma obtido em teste de especificidade em relação aos excipientes (na presença de β -ciclodextrina e hidroxipropilmetilcelulose) por CLAE.

Em ambos os cromatogramas, apenas alterações muito discretas da linha de base são observadas. No caso da Figura 8, no tempo de retenção do coumestrol (5,9 minutos), a alteração da linha de base apresenta área média de pouca magnitude, de 2818, o que demonstra que o método é específico em relação às medições em pele. Na Figura 9, observa-se uma pequena alteração da linha de base, próximo aos 6 minutos, com área média de 2375, sem significância qualitativa. Assim, verifica-se que o método de doseamento do coumestrol por CLAE não sofre interferências de constituintes extraídos da pele (pela trituração em fase aceptora), β -ciclodextrina ou do gel de HPMC, sendo, portanto, específico para o analito.

Da mesma forma que a especificidade, a exatidão foi analisada para a pele (triturada com três porções de 2 ml de fase aceptora e contaminada com diferentes quantidades de solução de coumestrol a 3 $\mu\text{g/ml}$ (2, 4 e 6 ml) e para soluções de coumestrol. Não sendo disponível no mercado o coumestrol padrão, preparou-se duas soluções de 3,0 $\mu\text{g/ml}$ a partir da substância referência, partindo-se de pesagens distintas. À 4 ml de uma das soluções de coumestrol, designada solução de referência (SR, 3 $\mu\text{g/ml}$), foram adicionados volumes de outra solução (SA), correspondente a quantidades conhecidas de coumestrol (6, 12 e 18 μg), resultando em soluções com concentrações teóricas de 18 μg , 24 μg e 30 μg de coumestrol em 10 ml.

Tabela 12. Resultados do teste de exatidão do doseamento de coumestrol em homogeneizado de pele por CLAE, 343 nm.

Soluções	Áreas médias dos picos (mv.s^{-1} , n = 3)	DP	DPR (%)	Recuperações (%)
SR (3 $\mu\text{g/ml}$)	273094	364,16	0,133	-
S1 (0,6 $\mu\text{g/ml}$)	57624	263,044	0,456	100,22
S2 (1,2 $\mu\text{g/ml}$)	110552	947,523	0,857	96,14
S3 (1,8 $\mu\text{g/ml}$)	166222	162,635	0,097	96,37

SP = solução padrão (3 $\mu\text{g/ml}$), S1, S2 e S3 = homogeneizado de pele contaminado com solução SR de coumestrol (com concentração final respectivas de 6, 12 e 18 $\mu\text{g}/10$ ml na fase aceptora).

Tabela 13. Resultados do teste de exatidão do doseamento de coumestrol em soluções de coumestrol por CLAE, 343 nm.

Soluções	Áreas médias dos picos (mV.s ⁻¹ , n = 3)	DP	DPR (%)	Recuperações (%)
SR (3,0 µg/ml)	314712	3,535	0,001123	-
SA (3,0 µg/ml)	297269	4,949	0,001665	-
S1 (1,8 µg/ml)	192325	4,242	0,002206	98,58
S2 (2,4 µg/ml)	252900	2,121	0,000839	98,14
S3 (3,0 µg/ml)	314049	2,121	0,000675	98,06

SP = solução padrão (3 µg/ml), SA = solução amostra (3 µg/ml), S1, S2 e S3 = solução SR contaminada com solução de coumestrol SA (com concentração final respectivas de 18, 24 e 30 µg/10 ml na fase acceptora).

Nas tabelas 12 e 13 observa-se que as recuperações do coumestrol situaram-se entre 90-110%, portanto, entre os limites preconizados pelo ICH (2005), demonstrando que o método de doseamento do coumestrol por CLAE é exato na faixa de concentração testada. Os limites de detecção e quantificação do coumestrol por CLAE foram:

LD = 0,01 µg/ml e, LQ = 0,03 µg/ml; demonstrando alta sensibilidade ao método.

Sumarizando, com base nos resultados apresentados, o método de determinação de coumestrol por CLAE mostrou-se exato e preciso, na faixa de concentração de 0,1 a 5 µg/ml, sendo adequado para a quantificação do analito nos testes de permeação cutânea. Também foi demonstrado que o método é específico para o coumestrol na presença de β-ciclodextrina, gel HPMC F4M e constituintes da pele presentes na fase acceptora. O método também apresentou excelente sensibilidade ao analito.

5.3 Diagrama de solubilidade, segundo Higuchi e Connors

O diagrama de solubilidade do coumestrol em presença de β-ciclodextrina, obtido segundo a metodologia descrita por Higuchi e Connors (1965) é apresentado na Figura 10. Observa-se uma fase linear seguida por uma curvatura positiva. Esta relação ($R^2 = 0,916$) entre o acréscimo da solubilidade do coumestrol e o aumento na concentração de β-ciclodextrina caracteriza a influência da ciclodextrina sobre a solubilidade do coumestrol, classificado por Higuchi e Connors (1965) como do tipo AP. O mesmo perfil AP do diagrama

de solubilidade pode ser observado no trabalho de Schwingel (2007) para a 3-*O*-metilquercetina complexada com β -ciclodextrina. Um aumento da solubilidade do coumestrol em água, acima de 3 vezes, é observado quando emprega-se uma concentração de 1,115 mM de β -ciclodextrina em presença de excesso de coumestrol. Logo, a proporção molar escolhida para o preparo do complexo e da mistura física foi de coumestrol: β -ciclodextrina 1:1 (1,055 mM de coumestrol: 1,115 mM de β -ciclodextrina), contendo 19,23 % de coumestrol. Pelo fato do diagrama de solubilidade do coumestrol ser do tipo AP, não é possível calcular a constante de estabilidade aparente ($K_{1:1}$). A Tabela 14 demonstra os valores do incremento de solubilidade nas proporções molares testadas.

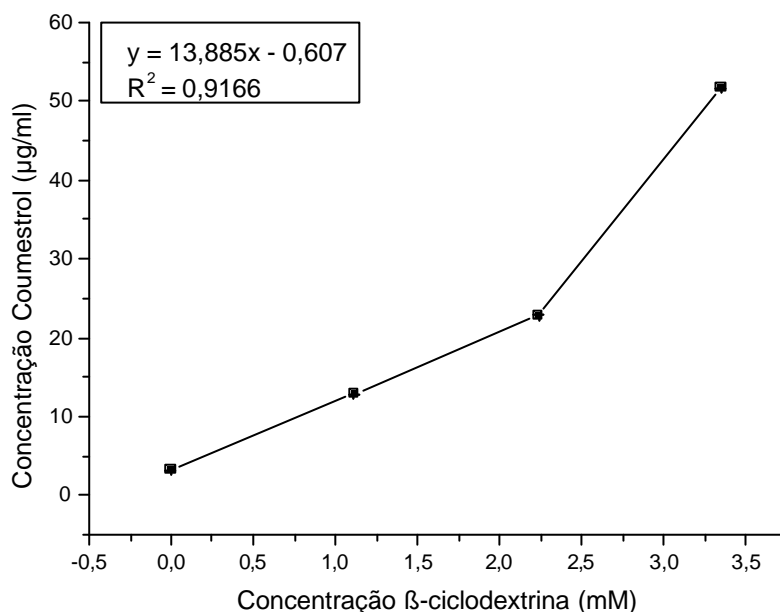


Figura 10. Diagrama de solubilidade do coumestrol, em presença de concentrações crescentes de β -ciclodextrina.

Tabela 14. Valores do incremento de solubilidade do coumestrol nas diferentes proporções molares com β -ciclodextrina.

Proporções molares (coumestrol: β -ciclodextrina)	Incremento de solubilidade
1:0	-
1:1	3,986
1:2	7,064
1:3	15,957

5.4 Análise das associações coumestrol: β -ciclodextrina por microscopia eletrônica de varredura

A análise por microscopia eletrônica de varredura foi realizada para as matérias-primas e respectivas associações de coumestrol: β -ciclodextrina (mistura física e complexo) em três magnificações: 2000 x, 1000 x e 500 x. Os parâmetros utilizados para as análises foram: modo SEI, holder número 2 (para três amostras), altura das amostras inferior a 5 mm, voltagem de 20 kV, WD 11 mm, spotsize 40 e LC de 60 μ A. Ajustes específicos de magnitude, foco, brilho, contraste e astigmatismo foram ajustados para a obtenção de cada uma das imagens, apresentadas a seguir.

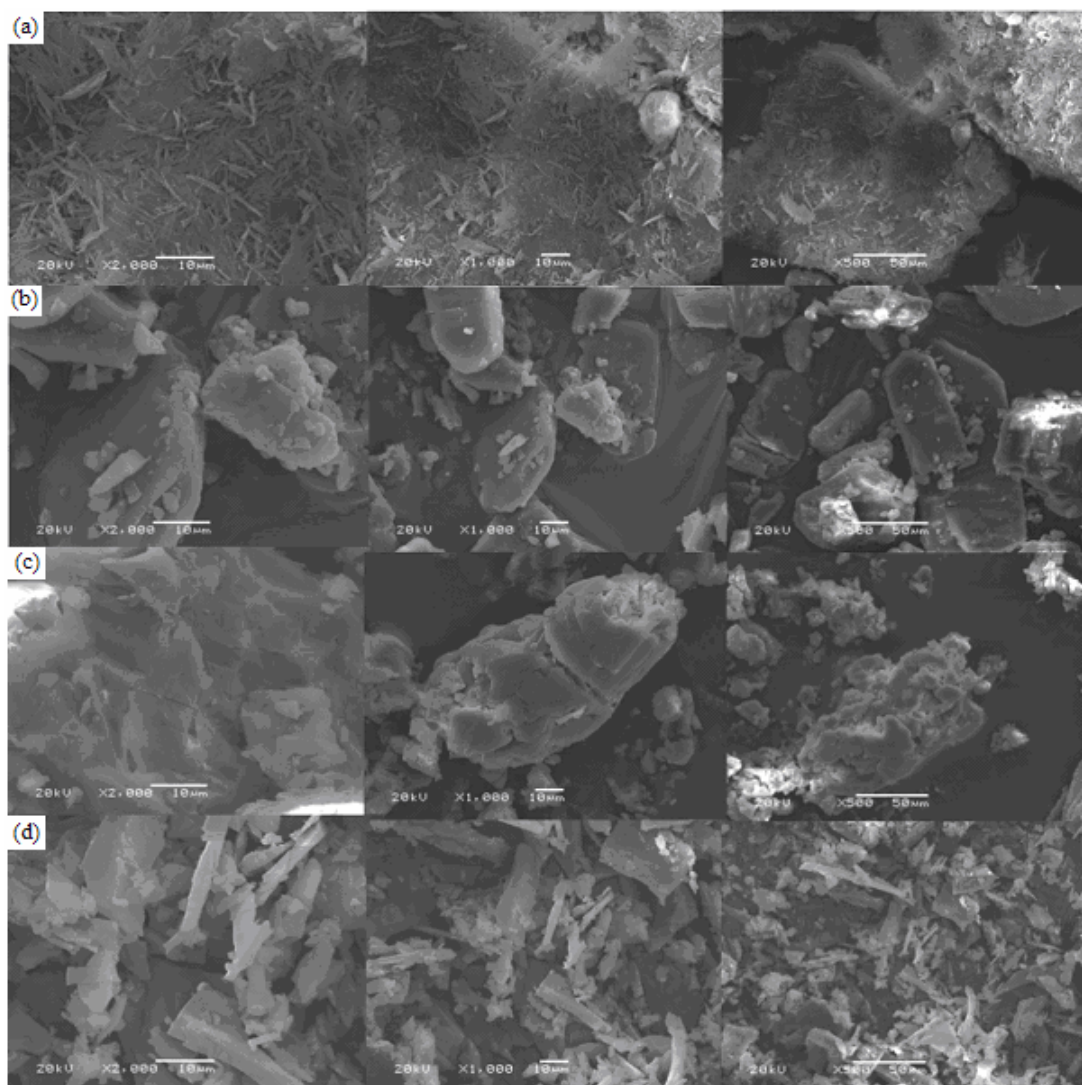


Figura 11. Fotomicrografias do (a) coumestrol, (b) β -ciclodextrina, (c) mistura coumestrol: β -ciclodextrina (1:1) e (d) complexo coumestrol: β -ciclodextrina (1:1) (MEV, magnificação de 2000x, 1000 x e 500 x).

Por meio das fotomicrografias de MEV analisou-se a forma, tamanho e características de superfície das partículas.

O coumestrol apresenta-se na forma de partículas aciculares, de tamanhos variados, em média de, aproximadamente, 10 μm . As partículas apresentam superfícies irregulares, sendo pouco rugosas e não porosas.

A β -ciclodextrina apresenta-se como partículas de tamanho e forma variável, geralmente, em forma de paralelograma. Algumas são grandes, medindo de 30 a 50 μm e outras são pequenas, de 2 a 4 μm de tamanho. Sua superfície é lisa com poucas irregularidades, sendo pouco rugosa e não porosa. Tais características correspondem às já relatadas (THE MERCK INDEX, 1996).

A mistura física coumestrol: β -ciclodextrina apresenta-se na forma de placas menores aderidas a superfície de partículas maiores, sendo as partículas aciculares de coumestrol pouco visualizadas. Daí infere-se sobre a existência de interação entre o coumestrol e a β -ciclodextrina, ou ainda, que tal disposição tenha sido proveniente da aplicação de força durante o preparo da mistura. A predominância de β -ciclodextrina é visualizada na Figura 11(c), no entanto, a heterogeneidade caracteriza a mistura.

Já o complexo apresenta-se, também, como uma massa pouco homogênea de cristais, com tamanho particular em torno de 20 μm , superfície lisa, pouco rugosa e não porosa, podendo-se visualizar uma nova morfologia dos cristais, não sendo possível, por esta técnica inferir sobre maior interação, comparativamente à mistura.

5.5 Análise das associações coumestrol: β -ciclodextrina por calorimetria diferencial exploratória

A calorimetria diferencial exploratória (DSC) é um método termoanalítico amplamente empregado para análise de interações entre substâncias, face à sua praticidade, rapidez e necessidade de emprego de pequena quantidade de amostra. No presente trabalho, os eventos endotérmicos estão apontados como inflexões da linha para baixo e os exotérmicos

para cima, característica peculiar do equipamento empregado. Os parâmetros que seguem foram medidos:

- T_{onset} : temperatura em que a transição começa a desviar-se da linha de base;
- $T_{\text{máx}}$: temperatura medida no ápice do evento térmico (pico);
- ΔH : entalpia envolvida no evento térmico; medida como a área do pico na curva de aquecimento considerando a massa da amostra.

Os termogramas obtidos na análise do coumestrol, β -ciclodextrina e suas associações estão apresentadas na Figura 12.

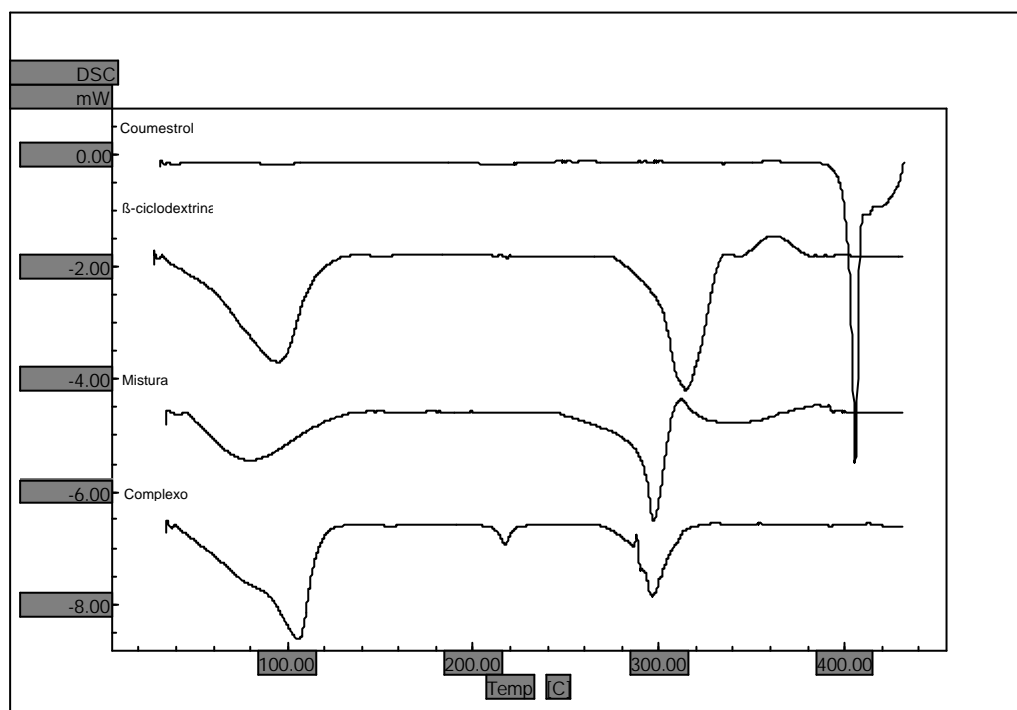


Figura 12. Termogramas (DSC) obtidos para o coumestrol, β -ciclodextrina e associações coumestrol: β -ciclodextrina (1:1), obtidas por mistura física ou por complexação.

Tabela 15. Parâmetros térmicos observados para o coumestrol, β -ciclodextrina, mistura (1:1) e complexo (1:1), obtidos por DSC.

Amostra (mg)	Eventos								
	Endotérmico			Endotérmico			Exotérmico		
	T _{onset} (°C)	T _{máx} (°C)	?H (J/g)	T _{onset} (°C)	T _{máx} (°C)	?H (J/g)	T _{onset} (°C)	T _{máx} (°C)	?H (J/g)
Coumestrol (1,0)	-	-	-	402,13	405,73	213,34	-	-	-
β -CD (1,3)	27,70	94,71	365,94	301,39	314,54	275,27	345,88	360,45	32,10
Mistura (1,9)	48,17	79,08	134,01	290,80	297,07	83,4	379,46	384,15	9,02
Complexo (1,5)	60,84	105,81	310,29	212,04	217,22	10,83	Endotérmico		
							288,03	296,47	92,60

Na curva de aquecimento do coumestrol pode-se observar um único evento endotérmico na temperatura T_{máx} de 405,73 °C, relativa à fusão da substância, temperatura superior à indicada pelo Software Scifinder (2004), de 360 a 385 °C.

A curva termogravimétrica para a β -ciclodextrina apresenta três eventos, os dois primeiros endotérmicos e o último exotérmico. O primeiro evento endotérmico ocorre na temperatura T_{máx} de 94,71 °C, relacionada à perda de água de cristalização da ciclodextrina.

O segundo evento endotérmico ocorre em 314,54 °C (T_{máx}) relativo à fusão da β -ciclodextrina. Segundo Kibbe (2000) a β -ciclodextrina apresenta ponto de fusão de 255 a 265°C, Koester (2001; 2003) apresentou o ponto de fusão da β -ciclodextrina em ~225 °C e ~220 °C no formato de um pequeno pico, respectivamente e, Xavier (2005) obteve um pico pequeno cuja temperatura variou entre 300-320 °C. Entretanto, no trabalho de Karathanos e colaboradores (2007) foi realizado um estudo da inclusão de vanilina (C₈H₈O₃) com β -ciclodextrina e a T_{onset} de fusão encontrada para a β -ciclodextrina foi de aproximadamente 175°C.

O terceiro evento do termograma da β -ciclodextrina ocorre em 360,45 °C, provavelmente indicativo da degradação da β -ciclodextrina.

A curva de aquecimento para a mistura física de coumestrol: β -ciclodextrina apresenta perda de água de cristalização em $T_{m\acute{a}x}$ de 79,08 °C, $T_{m\acute{a}x}$ de fusão em 297,07 °C, possuindo pequenas alterações no formato e intensidade do pico quando comparado ao pico da β -ciclodextrina isolada e um pequeno evento exotérmico com $T_{m\acute{a}x}$ de 384,15 °C, indicativo de degradação. Não se observa o pico de fusão do coumestrol, entretanto, observa-se um deslocamento da T_{onset} para menor temperatura, deslocando-se -10,59 °C em relação à β -ciclodextrina.

A curva de aquecimento para o complexo apresenta um evento endotérmico na $T_{m\acute{a}x}$ de 105,81 °C, correspondente à perda de água de cristalização da β -ciclodextrina, surgimento de um pequeno pico endotérmico em 217,22 °C ($T_{m\acute{a}x}$) e presença do pico de fusão em 296,47 °C ($T_{m\acute{a}x}$), com alteração do formato e intensidade do pico quando comparado à β -ciclodextrina. Ocorre um deslocamento da T_{onset} de -13,36 °C. Não se observa o pico de fusão do coumestrol. Ao surgimento do novo pico endotérmico em 217,22 °C ($T_{m\acute{a}x}$) sugere-se a ocorrência de uma interação entre os componentes, como citado por Liu e Zhu (2006) para o cloreto de prazosin em complexo de inclusão com hidroxipropil- β -ciclodextrina.

O desaparecimento ou transferência de um pico endo ou exotérmico é indicativo da formação de interações, assim como surgimento de novos picos. A ausência do pico de fusão do coumestrol em 405 °C ($T_{m\acute{a}x}$) sugere a interação entre o coumestrol e a β -ciclodextrina, mesmo reconhecendo a menor proporção de coumestrol nas associações (19,23 %), comparativamente à análise da substância isolada.

5.6 Análise do coumestrol e suas associações com β -ciclodextrina por espectroscopia no infravermelho (IR)

O espectro no infravermelho do coumestrol é apresentado na Figura 13, juntamente com sua estrutura química. As principais bandas características estão descritas a seguir.

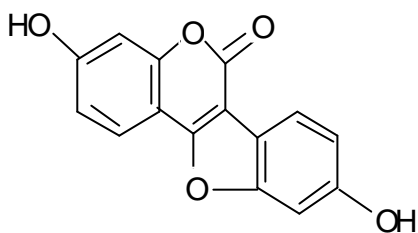
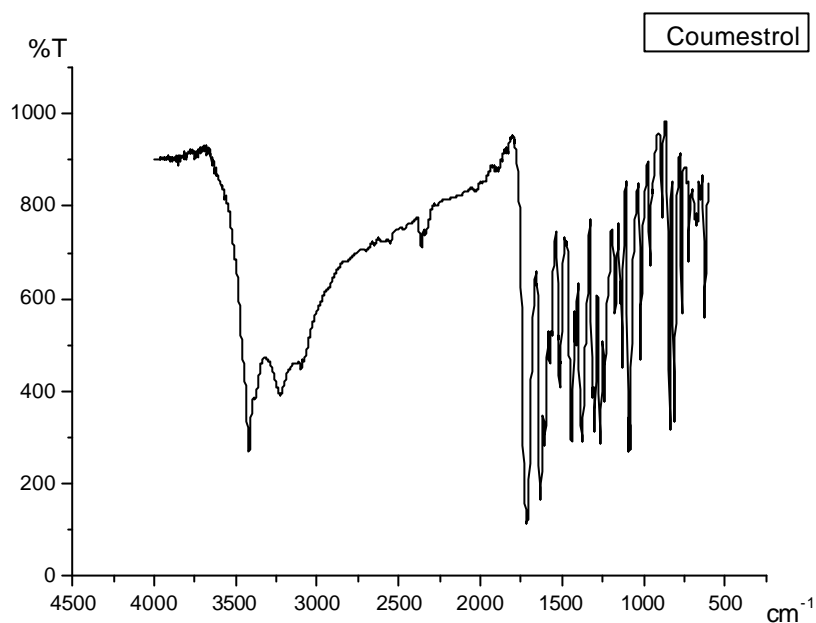


Figura 13. Espectro na região do infravermelho do coumestrol e sua estrutura química.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Referência
~3450, 3000	Região de deformação axial da ligação O-H, ligações de hidrogênio intramoleculares.	P. (p. 26) e NS. (p.179, 220)
~1735	Deformação axial do éster -CO-O- (lactona), com duas bandas em 1300 cm^{-1} .	P. (p.67, 68)
~1650	Deformação axial de C=C do anel pirona.	NS. (p.17 e 47)
~1550	Deformação axial do núcleo fenila.	NS. (p.19)
~1450, 1400	Deformação axial do núcleo fenila (1450) e -CO-O- (carboxilato, 1400).	NS. (p. 170, 174/19 e 40)
~1300	Deformação axial assimétrica da ligação -CO-O-.	NS. (p. 40, 188) e P. (p. 28, 63-65)

~1250	Deformação axial assimétrica da ligação –C-O- do OH fenólico.	NS. (179)
~1100	Deformação axial do OH fenólico ligado a carbono secundário.	NS. (p.26)
~890, 850	Deformação axial de hidrogênio isolado.	NS. (p. 20, 251)

NS = NAKANISHI e SOLOMON, 1977; P. = PAVIA et al., 1996.

A Figura 14 apresenta o espectro da β -ciclodextrina na região do infravermelho.

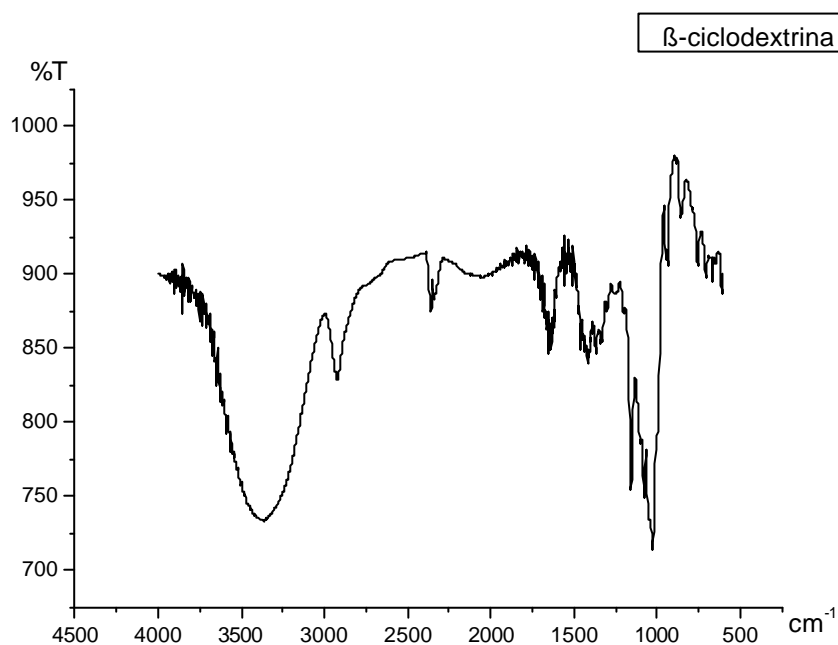


Figura 14. Espectro da β -ciclodextrina na região do infravermelho.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Referência
~3750, 3000	Deformação axial da ligação O-H, ligações de hidrogênio intramoleculares.	L. (p.79), NS. (p.172), P. (p.47) e X. (p. 57)
~2900	Deformação axial da ligação C-H de alcano, próprio de açúcares.	L. (p.79), NS. (p. 14, 184) e X. (p. 57)
~1650	Deformação axial da ligação C-C de alcano	P. (p. 28, 33)

~1450, 1400	Deformação axial da ligação –CH ₂ -CO-.	NS. (p.15)
~1200	Deformação axial da ligação –C-O-.	P. (p. 28) e NS. (p.31)
~1100	Deformação axial do OH secundário.	NS. (p.26)

L. = LONGHINI, 2006; NS = NAKANISHI e SOLOMON, 1977; P. = PAVIA et al., 1996; X. = XAVIER, 2005.

Os espectros no infravermelho da mistura física e do complexo de coumestrol e β -ciclodextrina na proporção molar 1:1 são apresentados nas Figuras 15 e 16 e suas bandas características estão descritas a seguir.

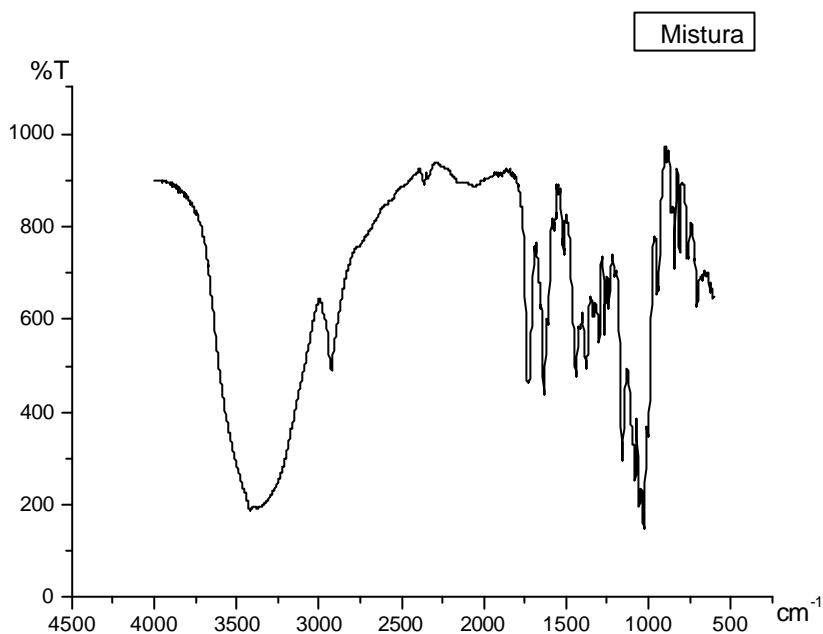


Figura 15. Espectro na região do infravermelho da mistura física coumestrol: β -ciclodextrina (1:1).

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Referência
~3400	Deformação axial da ligação O-H, ligações de hidrogênio intramoleculares.	L. (p. 70) e NS. (p.172) e P. (p.47)
~2950	Deformação axial da ligação C-H.	L. (p. 25, 184, 185) e P. (p.48)
~1750	Deformação axial do éster –CO-O- (lactona), com duas bandas em 1300 cm ⁻¹ .	NS. (p. 40) e P. (p. 67)

~1650	Deformação axial de C=C do anel pirona.	NS. (p.17 e 47)
~1550	Deformação axial do núcleo fenila.	NS. (p.19)
~1450, 1400	Deformação axial do núcleo fenil.	NS. (p. 170, 174)
~1300	Deformação axial assimétrica da ligação –CO-O-.	NS. (p.40, 188) e P. (p. 28)
~1275	Deformação axial assimétrica da ligação –C-O- do OH fenólico.	NS. (p. 179)
~1200	Deformação axial da ligação –C-O-.	P. (p. 28) e NS. (p. 31)
~1100	Deformação axial do OH secundário.	NS. (p. 26)

L. = LONGHINI, 2006; NS = NAKANISHI e SOLOMON, 1977; P. = PAVIA et al., 1996.

Comparando-se o espectro infravermelho da mistura com os espectros do coumestrol e da β -ciclodextrina, pode-se observar que as duas primeiras bandas da mistura, com números de onda de 3400 e 2950 cm^{-1} são semelhantes às apresentadas no espectro da β -ciclodextrina, entretanto, possuem maiores intensidades. Já as bandas de 1750 e 1275 cm^{-1} , indicam a contribuição do coumestrol ao espectro, sendo todas de menores intensidades. A partir de 1200 cm^{-1} , as bandas tornam-se semelhantes à β -ciclodextrina novamente, sendo todas mais intensas. Logo, pode-se concluir que o coumestrol e a β -ciclodextrina estão presentes, entretanto, não há como inferir sobre a interação, por meio das análises no infravermelho realizadas.

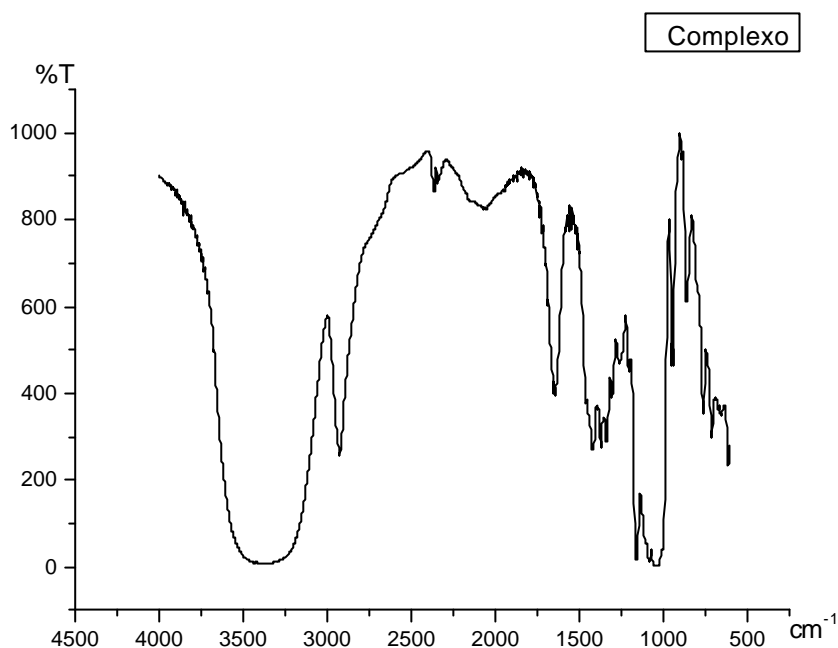


Figura 16. Espectro na região do infravermelho do complexo coumestrol: β -ciclodextrina(1:1).

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Referência
~3400/3380	Deformação axial da ligação O-H, ligações de hidrogênio intramoleculares.	L. (p. 79), NS. (p. 172) e P. (p.47)
~2950	Deformação axial da ligação C-H de alcano.	L. (p.79), NS. (p. 14, 184) e P. (p. 47, 48)
~1650	Deformação axial da ligação C-C de alcano.	P. (p. 28, 33)
~1450, 1400 e 1350	Deformação axial da ligação $-\text{CH}_2-\text{CO}-$.	NS. (p. 15,16)
~1150	Deformação axial da ligação $-\text{CO}-$.	P. (p. 28) e NS. (p. 31)
~1100	Deformação axial do OH secundário.	NS. (p. 26)
~1025	Deformação axial do OH primário.	NS. (p. 26)

L. = LONGHINI, 2006; NS = NAKANISHI e SOLOMON, 1977; P. = PAVIA et al., 1996.

Observando-se o espectro no infravermelho do complexo coumestrol: β -ciclodextrina na proporção molar (1:1) e comparando-se suas bandas com as do coumestrol e da β -ciclodextrina isolados, pode-se notar a ocorrência de ligeiras alterações de formatos, intensidades e pequenos deslocamentos das bandas. Entretanto, diferentemente do espectro da mistura, o espectro do complexo apresenta-se muito semelhante ao da β -ciclodextrina, não tendo nenhum pico característico do coumestrol. Tal fato poderia ser indicação de maior interação entre a molécula de coumestrol e a β -ciclodextrina e/ou pela maior quantidade de β -ciclodextrina presente na amostra.

Os espectros no infravermelho do coumestrol, β -ciclodextrina, mistura física e complexo podem ser visualizados na Figura 17.

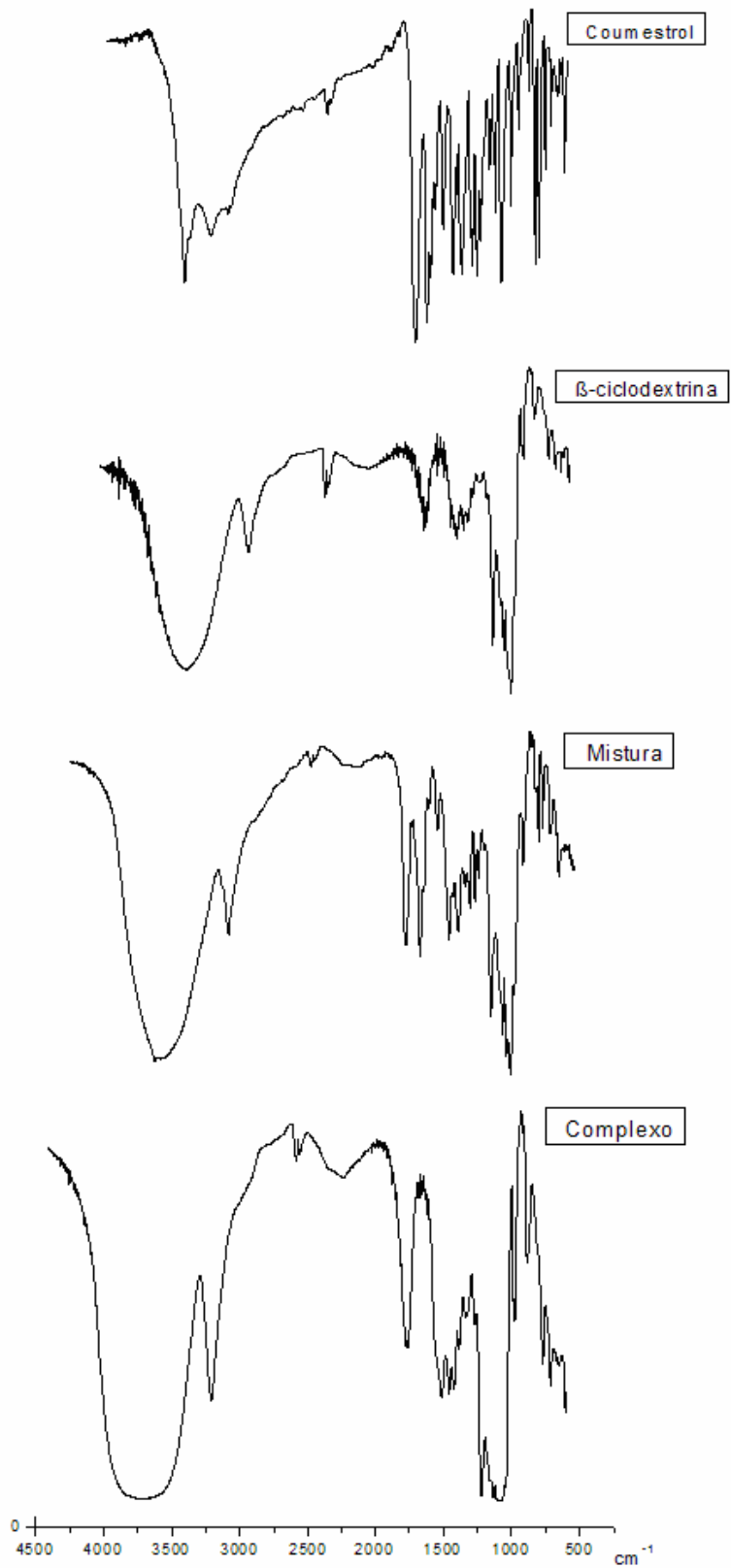


Figura 17. Espectros no infravermelho do coumestrol, β -ciclodextrina, mistura física (1:1) e complexo (1:1), com aproximação do valor das bandas.

5.7 Análises de ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H) e modelagem molecular

As análises de ressonância magnética nuclear foram realizadas conforme descrito na seção 4.3.9.5, utilizando $\text{DMSO-}d_6$ como solvente. Na figura 18 são apresentadas as estruturas químicas das moléculas envolvidas.

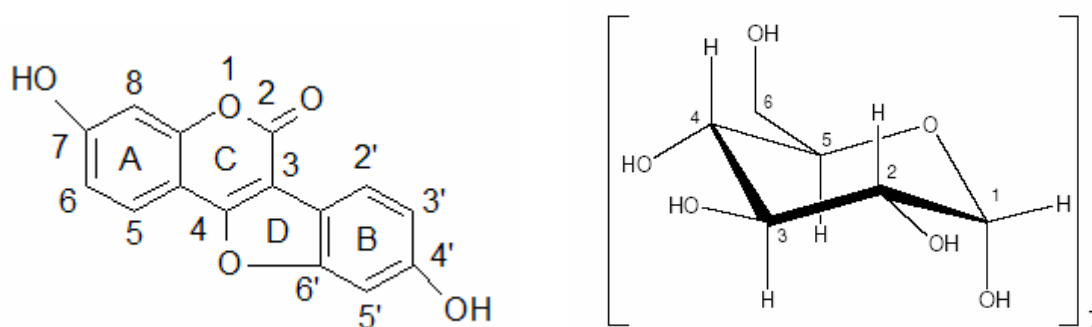


Figura 18. Estruturas químicas (a) do coumestrol e (b) da β -ciclodextrina.

As atribuições dos sinais de ressonância do coumestrol e da β -ciclodextrina foram realizadas por comparação com os trabalhos de Moravcová (2001) para o coumestrol e, para a β -ciclodextrina, por comparação com os relatos de Schneider (1998) e Xavier (2005). A análise da interação destes foi realizada por correlação no mapa de contornos de NOESY. O espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H) do coumestrol e β -ciclodextrina podem ser visualizados nas Figuras 19 e 20 e as atribuições dos sinais aos átomos de hidrogênios na Tabela 16.

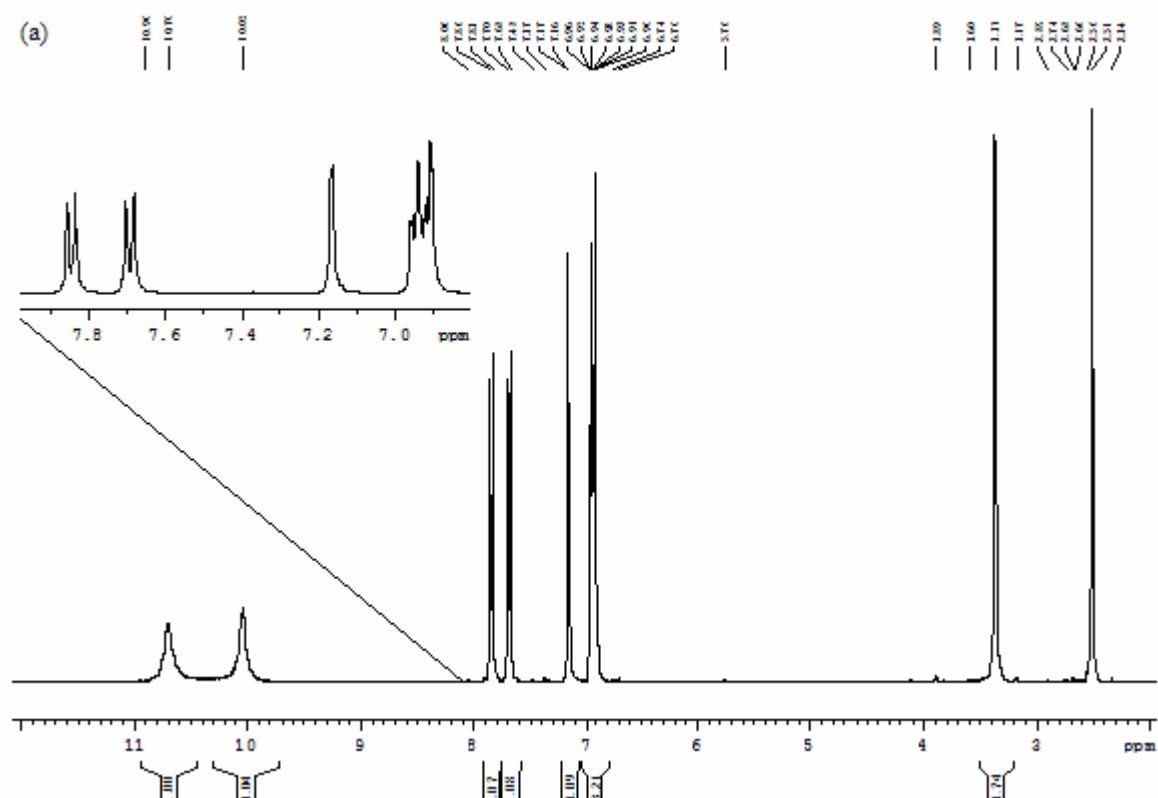


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H do coumestrol: (a) expansão da região de ressonância dos hidrogênios aromáticos ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz).

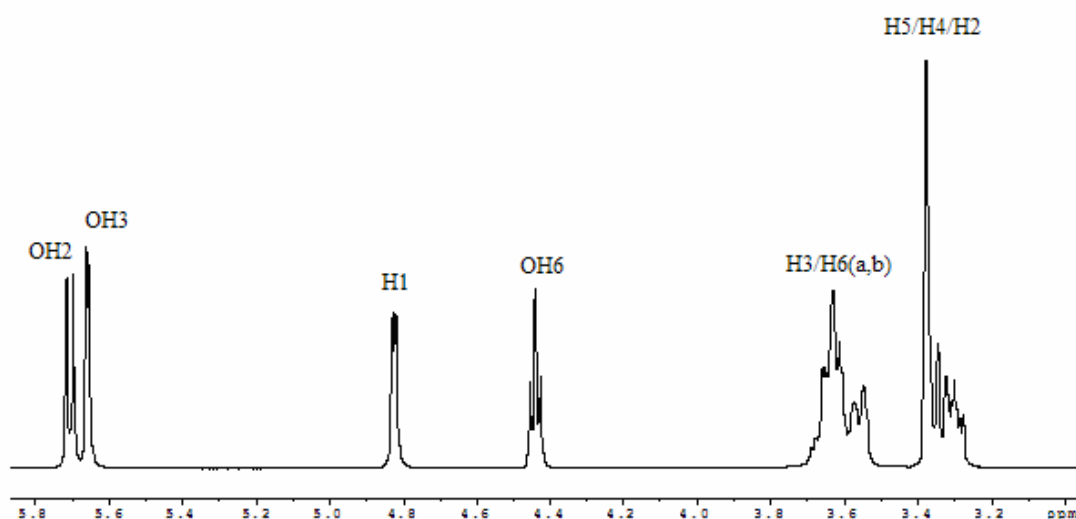


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H para a β -ciclodextrina em $\text{DMSO}-d_6$ (400 MHz). Identificação dos picos segundo Schneider (1998) e Xavier (2005).

A seguir apresenta-se a tabela das atribuições para o coumestrol e para a β -ciclodextrina obtidas por RMN de ^1H .

Tabela 16. Atribuições dos sinais do espectro de RMN de ^1H aos átomos de hidrogênio do coumestrol e da β -ciclodextrina.

Átomos do Coumestrol	δ^{H} (ppm)*	Átomos da β -ciclodextrina	δ^{H} (ppm)*	Átomos da β -ciclodextrina (Schneider, 1998)	δ^{H} (ppm)*
H5	7,84	H1	4,83	H1	4,82
H6	6,93	H2	3,28-3,30	H2	3,29
H8	6,90	H3	3,61-3,67	H3	3,64
H2'	7,69	H4	3,32-3,38	H4	3,34
H3'	6,95	H5	3,55-3,61	H5	3,59
H5'	7,16	H6	3,61-3,67	H6a,b	3,64

Os experimentos realizados permitiram a observação das atribuições dos sinais sobrepostos de H6/H8 e H3', mostrando correlações cruzadas desencontradas dando uma idéia do deslocamento químico de cada um dos sinais dentro do multipletto $\sim\delta$ 7,00. Os sinais em 3,3 ppm e 2,5 ppm são característicos dos solventes utilizados para as análises (resquísios de água de metanol e DMSO, respectivamente). Os sinais nos deslocamentos químicos encontrados para a β -ciclodextrina, correspondem aos já relatados por Schneider (1998) e Xavier (2005).

Além da análise das substâncias isoladas, foi realizada, também, a análise de RMN de ^1H para o complexo coumestrol: β -ciclodextrina (1:1) (Figura 21) e o mapa de contornos de NOESY (Figura 22).

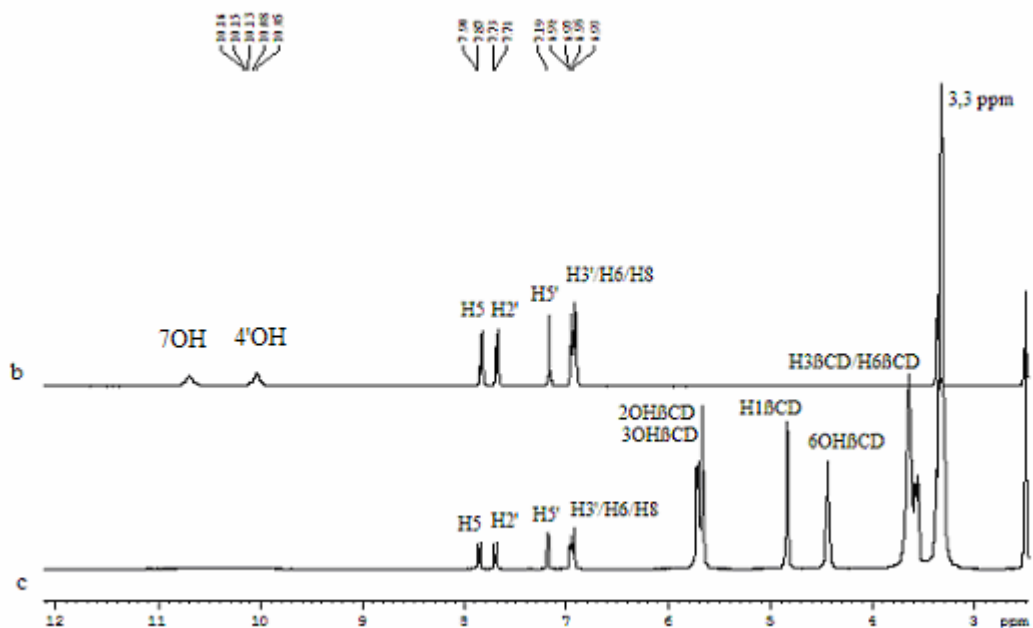


Figura 21. Espectros de RMN de ^1H (a) do coumestrol e (b) do complexo coumestrol: β -ciclodextrina (1:1) em $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.

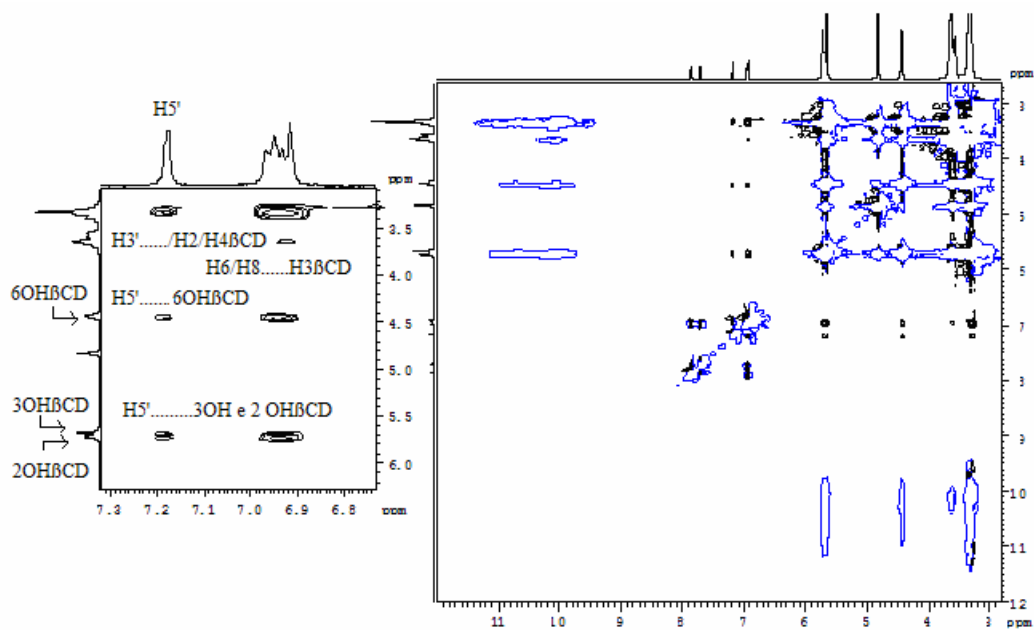


Figura 22. Mapa de contornos NOESY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) do complexo coumestrol: β -ciclodextrina (a) expansão da região de ressonância dos hidrogênios aromáticos ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz). Numeração de hidrogênios da β -ciclodextrina conforme o trabalho de Schneider (1998).

Na Figura 21, com espectro relativo ao complexo, pode-se notar a coalescência dos sinais de ressonância dos grupos OH em função da preparação do mesmo e pequenos deslocamentos de 0,1 ppm nos sinais do coumestrol e da β -ciclodextrina. No mapa de contornos NOESY são observadas correlações indicativas de NOE entre os hidrogênios H6 e H8 do coumestrol com o H3 da β -ciclodextrina. A observação desta correlação sugere a inclusão do anel A do coumestrol na cavidade da β -ciclodextrina denotando presença de complexo em solução de DMSO- d_6 .

Observa-se também, uma variação no deslocamento químico do sinal de ressonância atribuído ao hidrogênio H5 (δ 7,84), além do H8 (δ 6,90) e do H6 (δ 6,93) do anel A do coumestrol e, aos hidrogênios H2' (δ 7,69) e H3' (δ 6,95) do anel B do coumestrol. Ainda, enfatiza-se, o deslocamento químico referente ao H3 (δ 3,61-3,67) da cavidade da β -ciclodextrina. No mapa de contornos NOESY do complexo (tempo de mistura 600 ms, 400 MHz, DMSO- d_6) podem ser observadas correlações indicativas de acoplamento dipolar entre os hidrogênios do anel A e B do coumestrol com o hidrogênio H3 da cavidade da β -ciclodextrina, somente justificáveis pela formação do complexo de inclusão coumestrol: β -ciclodextrina. Os deslocamentos químicos do complexo indicam que houve a formação de três tipos de complexação:

- inserção do anel A do coumestrol na cavidade da β -ciclodextrina;
- inserção do anel B na cavidade da β -ciclodextrina;
- inserção de duas moléculas de coumestrol na cavidade da β -ciclodextrina, por ambas as extremidades.

Para a análise da interação entre as moléculas de coumestrol e β -ciclodextrina e complementação da análise de RMN, utilizou-se o Software Chem3D Ultra e Chem Draw (versão 9.0, Cambridge Soft), obtendo a estrutura conformacional de menor energia para ambas moléculas, por meio do método empírico de mecânica molecular (MM2). Os átomos de carbono da molécula estão representados pelas esferas em cinza, os átomos de oxigênio estão em vermelho e os de hidrogênio em branco (Figura 23 e 24).

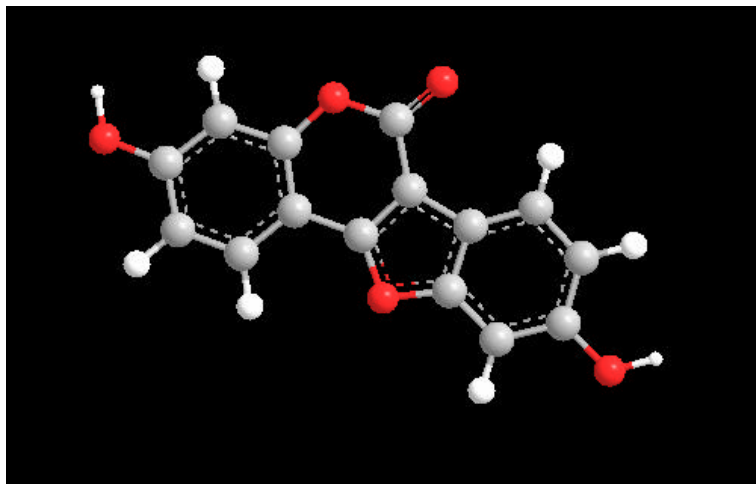


Figura 23. Simulação da estrutura tridimensional do coumestrol por MM2 (Chem3D Ultra).

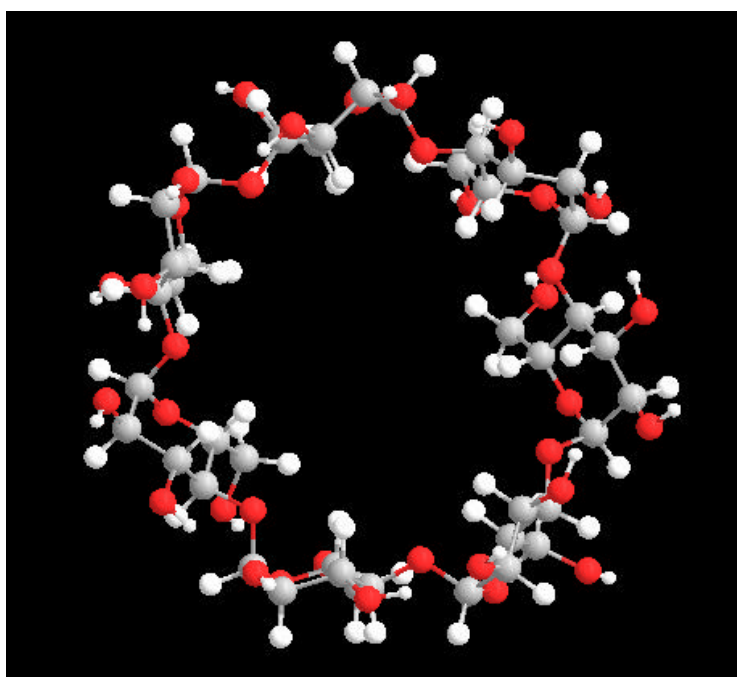


Figura 24. Simulação da estrutura tridimensional da β -ciclodextrina por MM2 (Chem 3D Ultra).

A simulação da complexação (por MM2) foi realizada com a inserção manual do coumestrol em posição vertical, no interior da cavidade da β -ciclodextrina, através das bordas das hidroxilas primárias ou secundárias e, perpendicular ao diâmetro da mesma (Figuras 25 e 26). Os cálculos de dinâmica molecular foram realizados por MM2 a 300 Kelvins, sendo os resultados apresentados na Tabela 17.

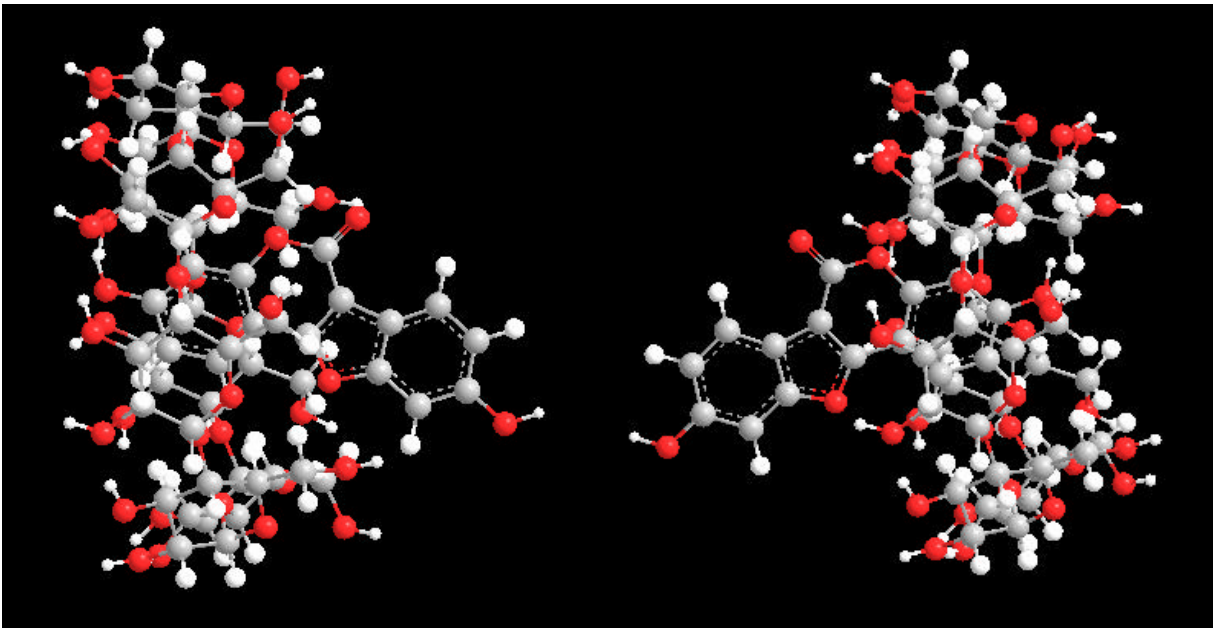


Figura 25. Simulação da complexação de uma molécula de coumestrol e uma molécula de β -ciclodextrina por meio da inserção do anel A do coumestrol pelas bordas das hidroxilas primárias e secundárias da β -ciclodextrina, respectivamente.

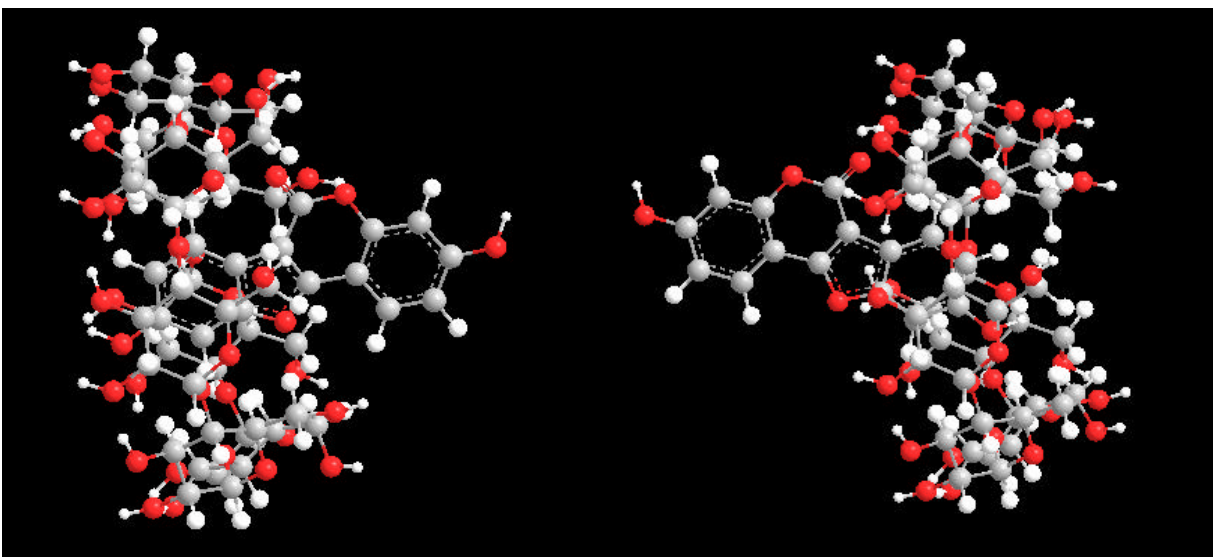


Figura 26. Simulação da complexação de uma molécula de coumestrol e uma molécula de β -ciclodextrina por meio da inserção do anel B do coumestrol pelas bordas das hidroxilas primárias e secundárias da β -ciclodextrina, respectivamente.

Tabela 17. Resultados de energia (kJ/mol) da análise conformacional dos complexos formados por uma molécula de coumestrol e uma molécula de β -ciclodextrina, calculados por MM2.

	Anel A OH 1°	Anel A OH 2°	Anel B OH 1°	Anel B OH 2°
Estiramento	9,9729	9,6237	10,2693	9,8208
Dobramento	73,5834	72,7191	74,8977	73,3770
Estiramento- Dobramento	4,9454	4,7810	5,0178	4,7787
Torção	16,5383	17,9049	19,0720	18,0955
Van der Waals “não 1-4”	-74,7168	-72,1311	-73,6400	-74,6571
Van der Waals “1-4”	95,4011	97,3078	96,4021	97,1777
Dipolo/Dipolo	-17,8410	-21,9886	-21,3536	-22,7825
Total	107,8834	108,2169	110,6653	105,8101

Também foi possível simular a complexação de duas moléculas de coumestrol com uma molécula de β -ciclodextrina, inserindo os anéis A e B do coumestrol de quatro formas diferentes nas extremidades das hidroxilas secundárias e primárias da β -ciclodextrina.

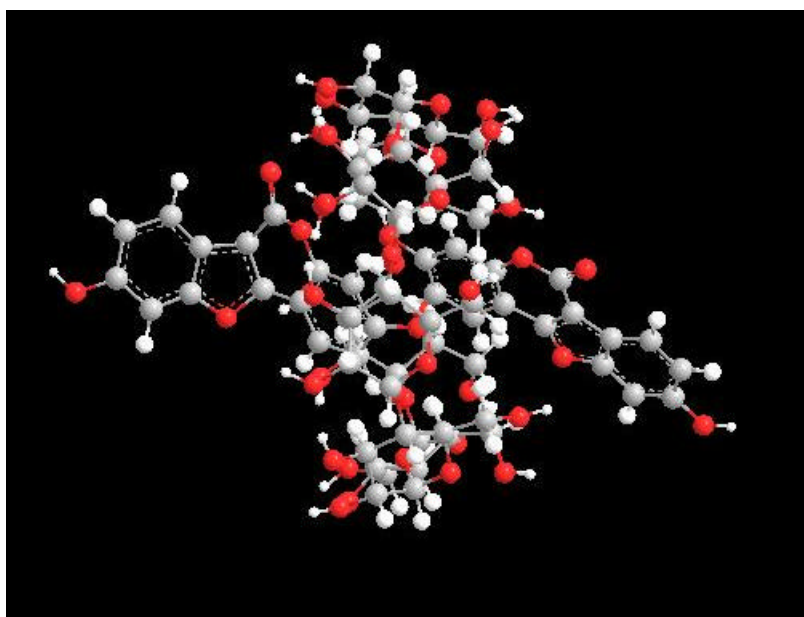


Figura 27. Simulação da complexação de duas moléculas de coumestrol com uma molécula de β -ciclodextrina por meio da inserção do anel A de ambas moléculas de coumestrol pelas bordas das hidroxilas secundárias e primárias da β -ciclodextrina, respectivamente.

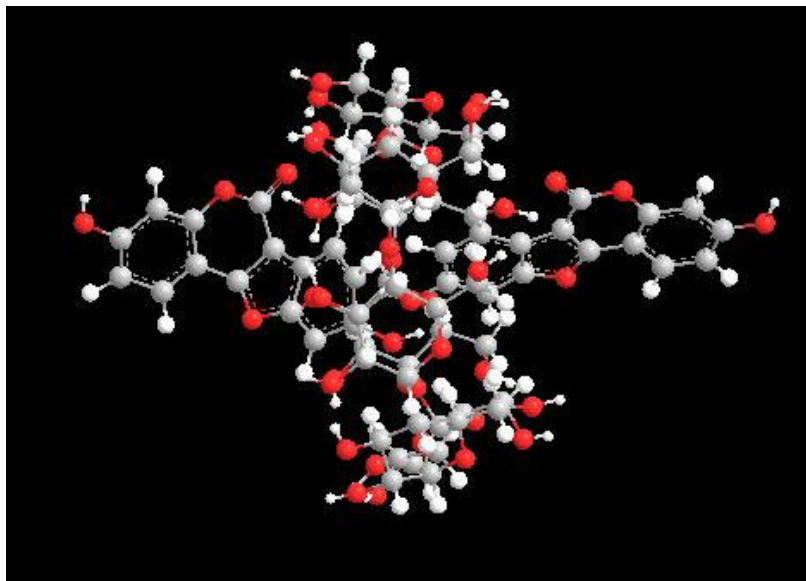


Figura 28. Simulação da complexação de duas moléculas de coumestrol com uma molécula de β -ciclodextrina por meio da inserção do anel B de ambas moléculas de coumestrol pelas bordas das hidroxilas secundárias e primárias da β -ciclodextrina, respectivamente.

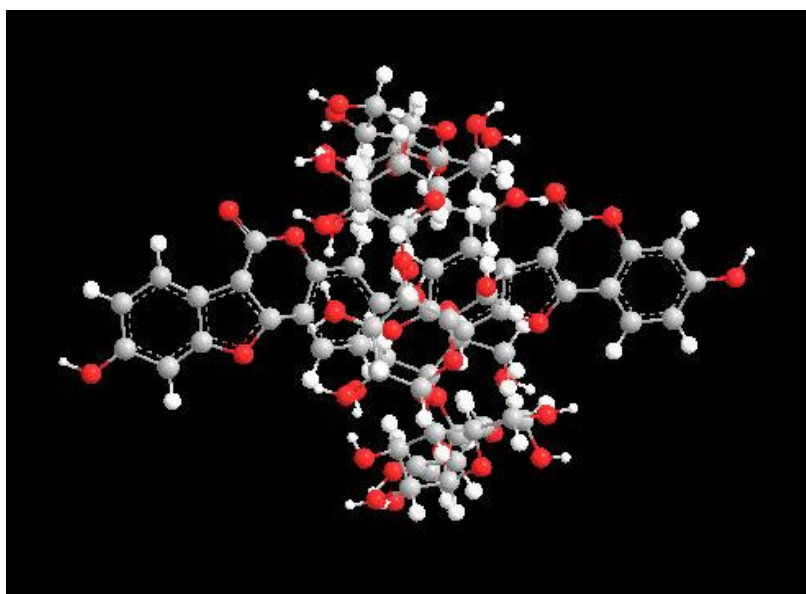


Figura 29. Simulação da complexação de duas moléculas de coumestrol com uma molécula de β -ciclodextrina por meio da inserção do anel A de uma das moléculas de coumestrol pela borda das hidroxilas secundárias e, por meio da inserção do anel B da outra molécula de coumestrol pela borda das hidroxilas primárias da β -ciclodextrina, respectivamente.

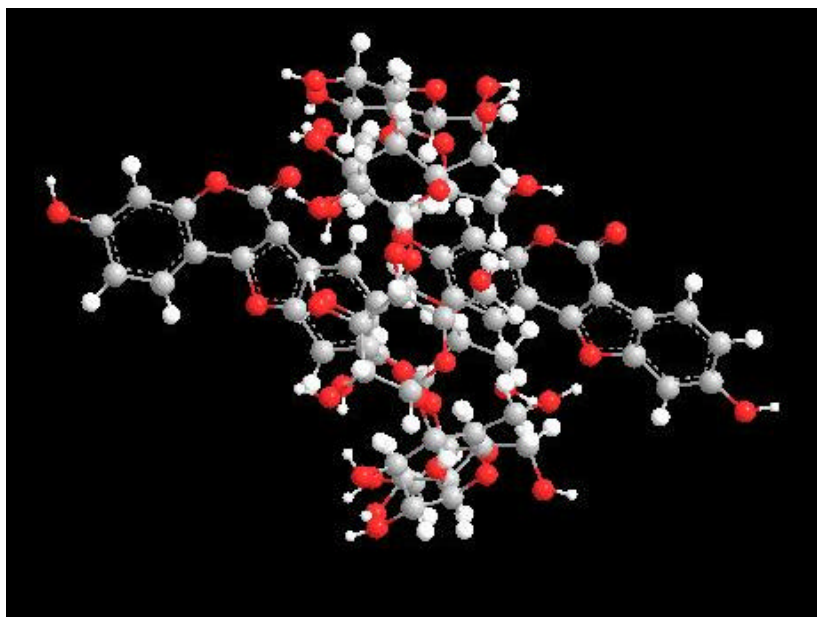


Figura 30. Simulação da complexação de duas moléculas de coumestrol com uma molécula de β -ciclodextrina por meio da inserção do anel B de uma das moléculas de coumestrol pela borda das hidroxilas secundárias e, por meio da inserção do anel A da outra molécula de coumestrol pela borda das hidroxilas primárias da β -ciclodextrina, respectivamente.

Tabela 18. Resultados de energia (kJ/mol) da análise conformacional dos complexos formados por duas moléculas de coumestrol e uma molécula de β -ciclodextrina, calculados por MM2.

	Anel A OH 1° e Anel A OH 2°	Anel B OH 1° e Anel B OH 2°	Anel A OH 2° e Anel B OH 1°	Anel B OH 2° e Anel A OH 1°
Estiramento	10,5334	10,6197	11,0477	10,7217
Dobramento	87,2179	87,6472	88,0420	87,5172
Estiramento- Dobramento	4,2873	4,0471	4,4412	4,3194
Torção	-0,2321	-0,8681	1,2250	-1,6160
Van der Waals “não 1-4”	-107,0827	-114,0011	-101,3809	-103,2298
Van der Waals “1-4”	99,9948	100,4408	99,0303	99,3584
Dipolo/Dipolo	-16,4944	-13,8146	-13,6471	-13,9704
Total	78,2242	74,0712	88,7582	83,1004

Logo, por meio dos estudos de modelagem molecular, pode-se inferir que todos os modelos de complexação são energeticamente favoráveis. Os valores de energia total obtidos foram muito próximos entre si quando se simulou a complexação de uma molécula de coumestrol com uma molécula de β -ciclodextrina.

Entretanto, obtiveram-se menores valores de energia total ao complexar duas moléculas de coumestrol com uma molécula de β -ciclodextrina, sendo que a complexação mais provável de ocorrer seria a entrada de duas moléculas de coumestrol por meio da inserção de ambos os anéis B nas extremidades primária e secundária da β -ciclodextrina devido a apresentar a menor energia total, de 74 kJ/mol.

5.8 Avaliação do perfil de penetração cutânea do coumestrol e de suas associações com β -ciclodextrina

5.8.1 Solubilidade do coumestrol no meio acceptor

Com base na baixa solubilidade do coumestrol (THE MERCK INDEX, 1996), metanol 50 % (v/v) grau HPLC foi testado como meio acceptor para os experimentos de permeação cutânea. Uma solução foi preparada com um excesso de coumestrol (1,4 mg) em 5 ml de metanol 50 %, e o procedimento de determinação da solubilidade foi realizado de acordo com especificações da Farmacopéia Brasileira (V2.21, 1988). A análise do coumestrol solúvel foi realizada por CLAE, 343 nm, nas diluições necessárias. A solubilidade do coumestrol em metanol 50 % (v/v) foi de 0,196 mg/ml. Desta forma, o metanol 50 % foi escolhido como meio acceptor, aplicando-se 1 mg de coumestrol por célula, contendo 10 ml de meio acceptor.

5.8.2 Determinação do coeficiente de partição octanol/água

O coeficiente de partição octanol/água foi realizado como descrito na metodologia, seção 4.3.4.2. Obtiveram-se as concentrações de 1356,43 $\mu\text{g/ml}$ na fase octanólica e 129,79 $\mu\text{g/ml}$ na fase aquosa. Assim, na forma logarítmica, obteve-se $K_p = 10,450$ e $\log K_p = 1,019$, a 24 °C. Esse resultado corrobora que o coumestrol possui maior afinidade pela fase octanólica ($K_p > 1$). Segundo análise com Software Scifinder (2004), o coeficiente de partição

do coumestrol seria superior, $K_p = 2,938 \pm 1,288$ em temperatura de 25 °C. Não se encontrou explicação para esta diferença, no entanto, a possível existência de polimorfos de diferentes hidrossolubilidades não pode ser descartada, como foi evidenciado recentemente por Borghetti (2006) para a quercetina.

5.8.3 Experimentos de permeação *ex vivo* em pele de orelha de suíno

5.8.3.1 Permeação intrínseca do coumestrol e suas associações com β -ciclodextrina

Os estudos de permeação intrínseca exigem a aplicação da substância em questão num solvente volátil para garantir que somente a substância estará agindo sobre a pele e somente ela permeará. Os testes com coumestrol iniciaram-se aplicando 1 mg deste em 300 μ l de acetona por célula, entretanto, o coumestrol não é solúvel em acetona, bem como a β -ciclodextrina, nem mesmo é dispersível. Houve a formação de um compacto no fundo do *ependorff*, não sendo possível suspendê-lo completamente nem através de agitação manual vigorosa, nem por sonicação por 10 minutos. Mesmo assim, o teste de permeação foi realizado e se obtiveram quantidades permeadas bastantes distintas de uma célula para outra, resultante da heterogeneidade de distribuição do coumestrol aplicado sobre cada célula. A fim de sobrepujar esta limitação, passou-se a aplicar o coumestrol e suas associações com a mínima quantidade possível de DMSO para solubilizá-los (100 μ l/1 mg de coumestrol ou 5,2 mg das associações/célula). É sabido que o DMSO é um agente de penetração, podendo este interferir nos resultados por auxiliar a penetração através da dissolução de lipídeos da pele ou da desestruturação das camadas da pele, entretanto, a falta de alternativa de solvente volátil em que o coumestrol é solúvel definiu seu emprego nos testes, optando-se pelo menor volume possível (100 μ l). Os testes de penetração intrínseca foram realizados para o coumestrol, mistura coumestrol: β -ciclodextrina 1:1 e complexo coumestrol: β -ciclodextrina 1:1, com $n = 4$, cujos cálculos foram corrigidos considerando o grau de pureza do coumestrol (95 %) e o volume da célula de Franz (em média 10 ml). Os perfis das cinéticas de permeação são apresentados a seguir.

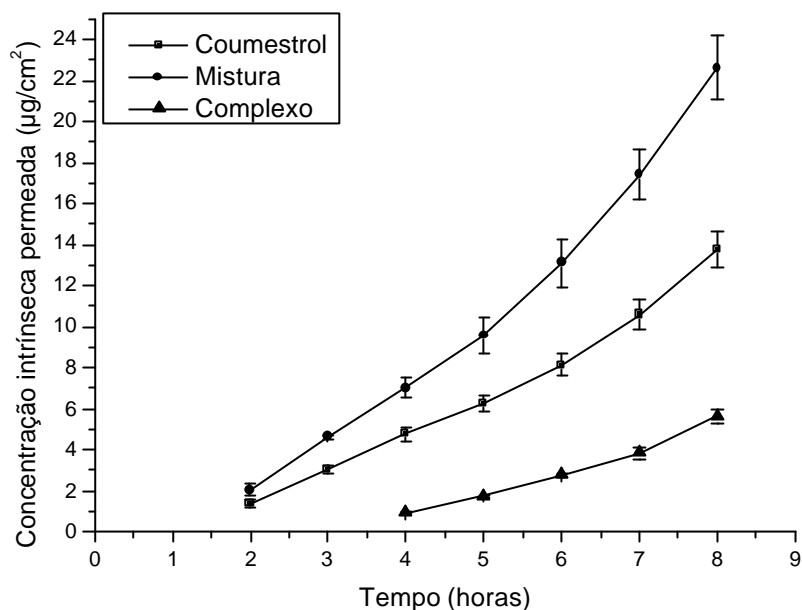


Figura 31. Perfis das cinéticas de permeação intrínseca para o coumestrol, mistura coumestrol: β -ciclodextrina (1:1) e complexo coumestrol: β -ciclodextrina (1:1).

Pela figura 31 pode-se observar que a mistura apresentou a maior quantidade permeada em 8h de ensaio ($22,625 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), sendo superior ao coumestrol ($13,751 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e ao complexo ($5,629 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

A respeito de fluxo (inclinação), o coumestrol apresentou fluxo médio de $1,987 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ e, a mistura e o complexo apresentaram, respectivamente, fluxo médio de $3,335$ e $1,151 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente; logo, a mistura foi a que mais permeou e teve o maior fluxo médio.

O tempo de latência para o coumestrol foi de 1,557 horas, para a mistura foi de 1,728 horas e para o complexo foi de 3,400 horas. Observa-se que o complexo, cuja cinética apresentou a menor permeação teve maior tempo de latência que a mistura ou o coumestrol. Esses últimos tiveram tempos de latência bem próximos.

O fato da mistura coumestrol: β -ciclodextrina ter apresentado permeação intrínseca superior ao complexo é favorável no sentido do seu preparo ser mais simples e rápido que o do complexo e, para fins de produção industrial em maior escala. Esses resultados sugerem que a β -ciclodextrina livre exerce papel promotor de penetração do coumestrol. Este efeito

pode ocorrer por meio de sua interferência na estrutura da pele, como já relatado por Ohtani (1989), Legendre (1995), Iborra (2000) e Monnaert (2004).

As tabelas com os valores das quantidades permeadas, fluxo e tempo de latência são apresentadas nos anexos.

5.8.3.2 Permeação em gel do coumestrol e suas associações com β -ciclodextrina incorporados em gel de HPMC

Os ensaios de permeação cutânea do coumestrol ou de suas associações com β -ciclodextrina incorporados em gel hidrofílico foram realizados pela aplicação de 600 mg de gel HPMC F4M a 3 %, contendo 0,1 % de coumestrol.

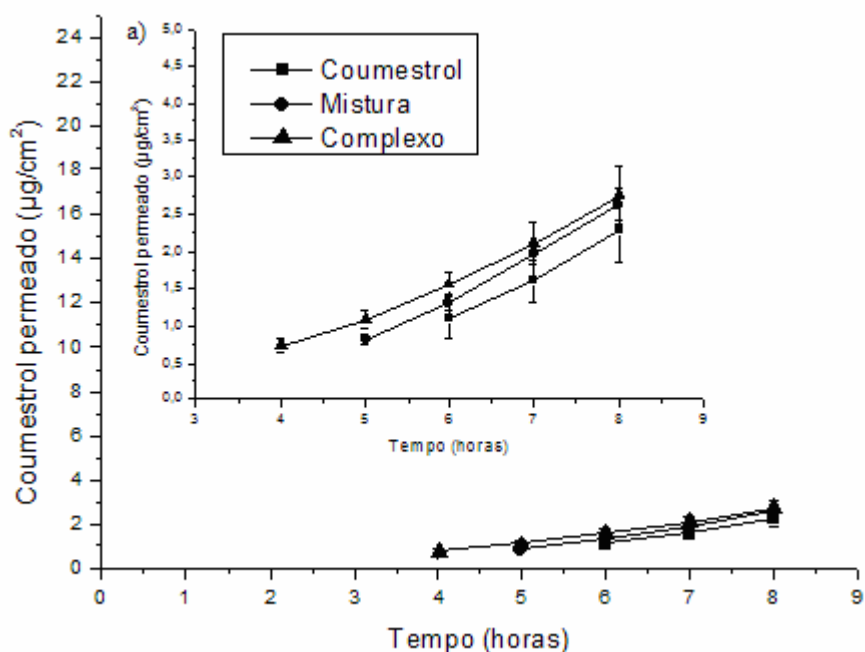


Figura 32. Perfis das cinéticas de permeação em gel para o coumestrol, mistura coumestrol: β -ciclodextrina (1:1) e complexo coumestrol: β -ciclodextrina (1:1) incorporados em gel de HPMC na concentração de 0,1 % (m/m) de coumestrol e, (a) escala ampliada para facilitar a diferenciação dos perfis.

A Figura 32 apresenta o comportamento do coumestrol e de suas associações em gel durante 8 horas de permeação. As quantidades totais permeadas em 8 horas foram de 2,279 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para o coumestrol, 2,622 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para a mistura e 2,751 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para o complexo.

O coumestrol apresentou fluxo de 0,590 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, a mistura teve fluxo de 0,607 e o complexo de 0,503 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

Os tempos de latência foram 4,193; 3,718 e 2,683 horas, para o coumestrol, mistura e complexo, respectivamente.

Assim, a ordem de permeação do coumestrol a partir de gel HPMC é: complexo > mistura > coumestrol, sendo que o complexo e a mistura tiveram perfis semelhantes e quantidades permeadas bem próximas. Em pele de suíno, utilizando matriz HPMC F4M, a maior permeação cutânea foi obtida com o complexo coumestrol: β -ciclodextrina (1:1), esta ainda revela-se pouco significativa.

Como efeito ilustrativo, uma figura contendo todas as permeações intrínsecas do coumestrol e em gel é apresentada na seqüência. Um claro efeito de modulação do coumestrol pelo gel é evidenciado nas condições ensaiadas até o presente.

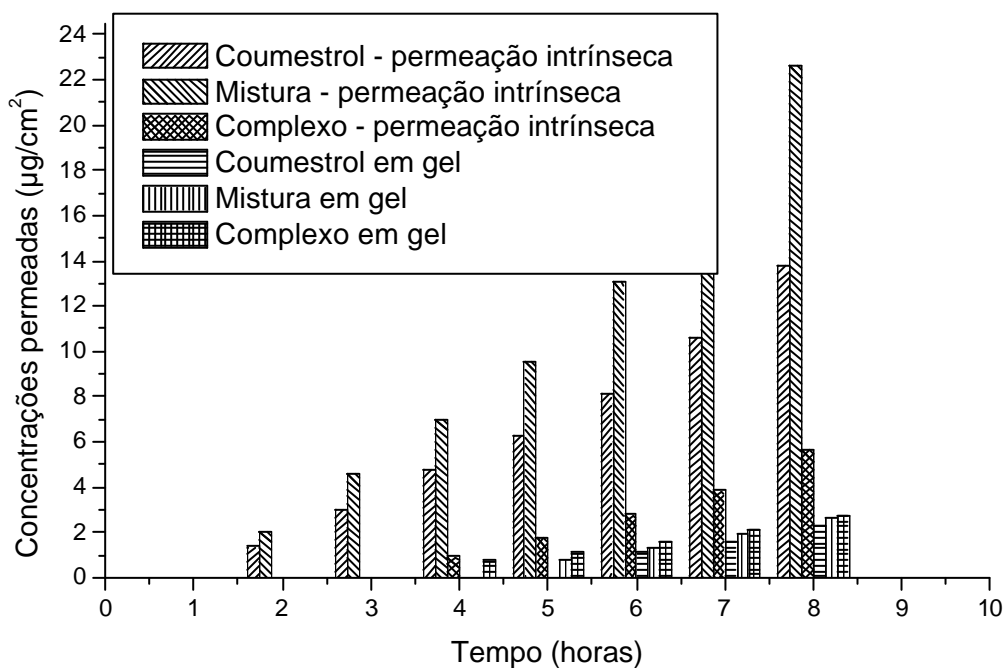


Figura 33. Permeações intrínsecas e em gel do coumestrol, mistura coumestrol: β -ciclodextrina (1:1) e complexo coumestrol: β -ciclodextrina (1:1).

É possível observar que o coumestrol e a mistura na permeação intrínseca começam a permear a partir de 2 horas, enquanto que o complexo inicia em 4 horas. Já nas permeações em gel, o coumestrol inicia apenas em 6 horas, a mistura em 5 horas e o complexo em 4 horas, mostrando a resistência causada pelo gel para a liberação do ativo.

Logo, tratando-se de permeação de uma substância pura (intrínseca), a mistura mostrou ter maior capacidade de permeação que o coumestrol ou complexo quando aplicados com DMSO. Já na forma de gel, o complexo teve a maior permeação (muito próximo à mistura) e seria uma destas associações, a forma a ser utilizada para a veiculação e aplicação do produto, visando fins comerciais.

Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Xavier (2005) para a genisteína, cuja estrutura molecular assemelha-se a do coumestrol. A genisteína permeou $28,81 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ quando aplicada em acetona e $4,12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ quando aplicada em gel HPMC K4M (3 % com 0,1% de ativo). Xavier (2005) obteve um incremento de solubilidade para a genisteína de 3,31 vezes quando complexada à β -ciclodextrina na proporção molar 1:1. A mistura genisteína: β -ciclodextrina 1:1 em gel permeou $5,29 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e o complexo genisteína: β -ciclodextrina 1:1 em gel permeou $\sim 35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Deve-se ressaltar, entretanto, que se fosse possível comparar os resultados obtidos na permeação intrínseca e na em gel, a intrínseca apresentou resultados bem mais altos que os da permeação em gel. Esta observação pode ser relacionada pelo fato que a utilização do gel retarda a liberação do produto, pois este não está disponível diretamente sobre a pele, sendo preciso difundir-se através da matriz polimérica para alcançar o estrato córneo e então, difundir-se por meio dos lipídeos da pele até o meio receptor. A utilização de DMSO nos testes de permeação intrínseca e um possível efeito promotor do mesmo não pode ser descartada, embora, Legendre (1995) tenha relatado que o pré-tratamento de pele de rato com DMSO 70% (v/v) não tenha influenciado significativamente os resultados das permeações de piribedil (agonista dopaminérgico) e S-9977 (promotor) quando interagem com RAMEB (β -ciclodextrina randomicamente metilada).

As tabelas com os valores das quantidades permeadas, fluxo e tempo de latência são apresentadas nos anexos. Em relação às quantidades permeadas, é possível observar alguns

desvios padrão relativos acima de 15 % nos experimentos de permeação intrínseca e em gel do coumestrol, tal fato deve-se provavelmente à baixa solubilidade. O gel contendo coumestrol livre apresentou, visualmente, partículas de coumestrol íntegras e dispersas na matriz, sendo até mesmo difícil garantir a homogeneidade da aplicação sobre as células.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

O conjunto de resultados obtidos na investigação da complexação do coumestrol com a β -ciclodextrina e da permeação dos sistemas desenvolvidos em pele de orelha de suíno, permitiram concluir o que segue:

- Os métodos de quantificação de coumestrol (por espectroscopia no ultravioleta e cromatografia líquida de alta eficiência) desenvolvidos apresentaram linearidade, repetibilidade e especificidade e foram precisos e exatos nas condições testadas, cumprindo a sua finalidade.
- O diagrama de solubilidade do coumestrol demonstrou um incremento de sua solubilidade em água na proporção de três vezes em relação a sua solubilidade intrínseca, quando associado à β -ciclodextrina, na proporção molar 1:1.
- A avaliação das associações do coumestrol: β -ciclodextrina, mistura física 1:1 e complexo 1:1 por microscopia eletrônica de varredura indica que a mistura física caracterizou-se pela presença de partículas com distribuição heterogênea, de β -ciclodextrina e de coumestrol, sendo as primeiras predominantes. Já o complexo apresentou-se com aspecto pouco homogêneo, com alteração da morfologia dos cristais, não sendo possível, por esta técnica, inferir sobre qual associação apresentou maior interação entre coumestrol e β -ciclodextrina.
- A análise por calorimetria diferencial exploratória das associações do coumestrol: β -ciclodextrina, mistura física 1:1 e complexo 1:1, evidencia a existência de interação entre o coumestrol e a β -ciclodextrina tanto no complexo como na mistura. Já a

avaliação por espectrofotometria no infravermelho da mistura e do complexo sugere maior interação entre o coumestrol e a β -ciclodextrina no complexo.

- A análise por RMN de ^1H e a modelagem molecular sugerem a complexação do coumestrol na cavidade da β -ciclodextrina, com possibilidade de inclusão tanto do anel A como de anel B do coumestrol na cavidade da β -ciclodextrina.
- A modelagem molecular ainda sugere que a inclusão do anel B de duas moléculas de coumestrol por ambas extremidades da molécula de β -ciclodextrina representa a interação de menor energia para a formação do complexo, sugerindo a ocorrência preferencial desta conformação.
- A comparação entre a permeação cutânea intrínseca, em condição sink, do coumestrol, mistura física e complexo demonstrou que a mistura física coumestrol: β -ciclodextrina apresentou a maior quantidade permeada ($22,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e o maior fluxo ($3,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$). Seguiram a esta o coumestrol e o complexo, em ordem decrescente. O maior tempo de latência foi o do complexo: 3,4 horas.
- Na avaliação da permeação cutânea do coumestrol, mistura física e do complexo incorporados em gel, o complexo teve a maior quantidade permeada em 8h, sendo esta de $2,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, com um fluxo de $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. E tempo de latência de 2,68 horas. Seguiram em ordem de quantidade permeada a mistura ($2,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e o coumestrol ($2,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). O maior tempo de latência foi o do coumestrol: 4,1 horas.
- Em seu conjunto, os resultados demonstram que o emprego do coumestrol na forma de gel de aplicação tópica, incorporado como mistura física ou complexado à β -ciclodextrina, apresenta melhor permeação cutânea, do que na sua forma livre. O efeito modulador do gel também fica evidente. A incorporação destas associações em outras bases, bem como a utilização de outros promotores de penetração e a avaliação do efeito estrogênico e antioxidante das mesmas constituem perspectivas da pesquisa em pauta.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AL-MAHARIK, N.; BOTTING, N. P. A new short synthesis of coumestrol and its application for the synthesis of [6,6a-11a-¹³C₃] coumestrol. **Tetrahedron**, United Kingdom, v. 60, p. 1637-42, 2004.

ANTONELLI, M. L.; FABERI, A.; PASTORINI, E.; SAMPERI, R. and LAGANÀ, A. Simultaneous quantification of free and conjugated phytoestrogens in Leguminosae by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Talanta**, Italy, v. 66, p. 1025-33, 2005.

ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. RDC 899 de 29/05/2003. In: www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm.

BANDELE, O. J.; OSHEROFF, N.. Bioflavonoids as poisons of human topoisomerase IIa and IIβ. **Biochemistry**, Tennessee, v. 46, p. 6097-108, 2007.

BECK, V.; ROHR, U.; JUNGBAUER, A. Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to estrogen replacement therapy? **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, Austria, v. 94, p. 499-518, 2005.

BENASSAYAG, C.; PERROT-APPLANAT, M.; FERRE, F. Phytoestrogens as modulator of steroid action in target cells. **Journal of Chromatography B**, France, v. 777, p. 233-48, 2002.

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

BICKOFF, E. M.; LYMAN, R. L.; LIVINGSTON, A. L.; BOOTH, A. N. Characterization of coumestrol, a naturally occurring plant estrogen. **Western Utilization Research and Development Division – Agricultural Research Service**, United States, v. 80, p.3969-71, 1958.

BICKOFF, E. M.; LIVINGSTON, A. L.; BOOTH, A. N. Estrogenic activity of coumestrol and related compounds. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, United States, v. 88, n. 2, p. 262-6, 1960.

BORGHETTI, G. S.; COSTA, I. M.; PETROVICK, P. R.; PEREIRA, V. P.; BASSANI, V. L. Characterization of different samples of quercetin in solid-state: indication of polymorphism occurrence. **Pharmazie**, Brasil, v. 61, p. 802-4, 2006.

BORGHETTI, G. **Associação quercetina/ β -ciclodextrina: avaliação do perfil de penetração cutânea, da fotoestabilidade e da atividade antioxidante.** Porto Alegre: UFRGS, tese em andamento com conclusão prevista em 2009. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BROZIC, P.; SMUC, T.; GOBEC, S. and RIZNER, T. L. Phytoestrogens as inhibitors of the huan progesterone metabolizing enzyme AKR1C1. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Slovenia, v. 259, p. 30-42, 2006.

BUROW, M. E.; BOUE, S. M.; COLLINS-BUROW, B. M.; MELNIK, L. I.; DUONG, B. N.; CARTER-WIENTJES, C. H.; LI, S.; WIESE, T. E.; CLEVELAND, T. E. and McLACHMAN, J. A.. Phytochemical glyceollins, isolated from soy, mediate antihormonal effects through estrogen receptor α and β . **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, United States, v. 86, n. 4, p. 1750-8, 2001.

CALABRÒ, M. L.; TOMMASINI, S.; DONATO, P.; RANERI, D.; STANCANELLI, R.; FICARRA, P.; FICARRA, R.; COSTA, C.; CATANIA, S.; RUSTICHELLI, C. and GAMBERINI, G.. Effects of α - and β -cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Italy, v.35, p. 365-77, 2004.

CAVALLI, R.; PEIRA, E.; CAPUTO, O.; GASCO, M. R. Solid lipid nanoparticles as carriers of hydrocortisone and progesterone complexes with β -cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, Italy, v. 182, p. 59-69, 1999.

CORONADO, C.; ZUANAZZI, J. A. S.; SALLAUD, C.; QUIRION, J.-C.; ESNAULT, R.; HUSSON, H.-P.; KONDOROSI, A.; RATET, P. Alfalfa root production is nitrogen regulated. **Plant Physiology**, France, v. 108, p. 533-542, 1995.

CUPRI, V.; FICARRA, R.; GUARDO, M.; MAJOLINO, D.; STANCANELLI, R. and VENUTI, V.. UV-vis and FTIR-ATR spectroscopic techniques to study the inclusion complexes of genistein with β -cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Italy, v. 44, p. 110-7, 2007.

DEL VALLE, E. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, Spain, v. 39, p. 1033-46, 2004.

DERMATOLOGIA.NET. Envelhecimento cutâneo. **Dermatologia**. 2005. Disponível em: <www.dermatologia.net/neo/base/estetica/est_fotoenv.htm>. Acesso em: 09 nov. 2005.

DIEL, P.; OLFF, S.; SCHMIDT, S. and MICHNA, H.. Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms. **Toxicology Letters**, Germany, v. 127, p. 217-24, 2002.

DIXON, A. J.; DIXON, B. F. Ultraviolet radiation from welding and possible risk of skin and ocular malignancy. **The medical Journal of Australia**, Australia, v. 181, n. 3, p. 155-7, 2004.

DUKE, J. A. **Medicago sativa L.** - Handbook of energy crops. Unpublished. Purdue University – Center for New Crops & Plants Procedure, p.1-7, 1998. Disponível em: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Medicago_sativa.html>. Acesso em: 14 dez. 2005.

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

ELSWIJK, D. A. ; SCHOBEL, U. P. ; LANSKY, E. P. ; IRTH, H. and GREEF, J. Van der.. Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. **Phytochemistry**, Netherlands, v.65, p. 233-41, 2004.

ERKOÇ, F.; YILMAZER, M.; ERKOÇ, S. Theoretical investigations of the equol molecule: semi-empirical and density functional theory calculations. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, Turkey, v. 713, p. 37-42, 2005.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA – Parte I. 4^a ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FICARRA, R.; TOMMASINI, S.; RANERI, D.; CALABRÒ, M. L.; Di BELLA, M. R.; RUSTICHELLI, C.; GAMBERINI, M. C. and FICARRA, P.. Study of flavonoids/ β -cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation. **Journal of Pharmaceuticals and Biomedical Analysis**, Italy, v. 29, p. 1005–14, 2002.

FONTES, H. A. F. Flavonóides. **Copacabana : O espaço dos corredores**. 2004. Disponível em: <www.copacabanarunners.net/flavonóides.html>. Acesso em: 25 out. 2005.

FORGO, P.; VINCZE, I. and KOVÉR, K. E.. **Inclusion complexes of ketosteroids with β -cyclodextrin**. *Steroids*, Hungary, v. 68, p. 321-7, 2003.

GANRY, O. Phytoestrogens and prostatic cancer risk. **Preventive Medicine**, France, v. 41, p. 1-6, 2005.

GAREY, J.; MORGAN, M. A.; FROHLICH, J.; McEWEN, B. S. and PFAFF, D. W.. Effects of the phytoestrogen coumestrol on locomotor and fear-related behaviors in female mice. **Hormons and Behavior**, New York, v. 40, p. 65-76, 2001.

GENNARO, A. R.. **REMINGTON – The Science and Practice of Pharmacy**. 21st edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J. R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. **Thermochemica Acta**, Italy, v. 380, p. 123-51, 2001.

GRYNKIEWICZ, G. ; KZYCINSKA, H.; RAMZA, J. and ZAGRODZKA, J.. Chromatographic quantification of isoflavones (why and how). **Acta Chromatographica**, Poland, n. 15, p. 31-65, 2005.

HACHICH, N. F.; MULLER, R. E.; REIS, M. Radiação solar: índices UV e efeitos biológicos. Universidade Federal de Santa Catarina. 2007. Disponível em: <www.biofisica.ufsc.br/index.jsp?page=arquivos/radiação.htm>. Acesso em: 10 jan. 2008.

HALL, G; PHILLIPS, T. J. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. **Journal of American Academy of Dermatology**, Boston, v. 53, p. 555-68, 2005.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medicinal significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, Germany, v.96, p. 67-202, 2002.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, L. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. **Journal of Nutritional Biochemistry**, United States, v. 13, p.572-84, 2002.

HERNANDEZ, M.; MERCIER-FRESNEL. **Manual de Cosmetologia**. Capítulos 3 e 4. 3ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999.

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

HODNICK, W. F.; KUNG, F. S.; ROETTGER, W. J.; BOHMONT, C. W.; PARTIDINI, R. S. Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids. A structure activity study. **Biochemical Pharmacology**, [S.I.], v. 35, n. 4, p. 2345-57, 1986.

HUNTLEY, A. L.; ERNST, E. Soy for the treatment of perimenopausal symptoms – a systematic review. **Muritas – The European Menopausal Journal**, United Kingdom, v. 47, p. 1-9, 2004.

IBORRA, A. ; COMPANYÓ, M. ; MARTÍNEZ, P. ; MORROS, A. Cholesterol efflux promotes acrossome reaction in goat spermatozoa. **Biology of Reproduction**, Spain, v. 62, p. 378-83, 2000.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. **Validation of analytical procedures : text and methodology Q2(R1)**, november 2005.

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

IRIE, T. ; UEKAMA, K.. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Japan, v. 86, n. 2, p. 147-62, 1997.

JACOB, D. A. ; TEMPLE, J. L. ; PATISAUL, H. B. ; YOUNG, L. J. and RISSMAN, E. F.. Coumestrol antagonizes neuroendocrine actions of estrogen via the estrogen receptor α . **Experimental Biology and Medicine**, Atlanta, v. 226, n. 4, p. 301-6, 2001.

JEFFERSON, W. N.; PADILLA-BANKS, E.; CLARK, G. and NEWBOLD, R. R.. Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse uterotrophic responses. **Journal of Chromatography B**, United States, v. 777, p. 179-89, 2002.

KANJI, S. S.; KUOHUNG, W.; LABAREE, D. C. and HOCHBERG, R. B.. Regiospecific esterification of estrogens by lecithin: cholesterol acyltransferase. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** United States of America, v. 84, n. 7, p. 2481-8, 1999.

KARATHANOS, V. T. et al. Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complex of vanillin with β -cyclodextrin. **Food Chemistry**, Greece, v. 101, p. 652-8, 2007.

KIBBE, A. H. **Handbook of Pharmaceutical excipients**, 3rd. edition. Washington: American Pharmaceutical Association, 2000.

KLEIJN, M. J. J. ; SCHOUW, Y. T. Van der ; WILSON, P. W. F. ; ADLERCREUTZ, H. ; MAZUR, W. ; GROBBEE, D. E. and JACQUES, P. F.. Intake of dietary phytoestrogens is low in postmenopausal women in the United States: the Framingham study. **Nutritional Epidemiology**, United States, v. 131, p. 1826-32, 2001.

KOESTER, L. S.; GUTERRES, S. S.; LE ROCH, M.; EIFFLER-LIMA, V. L.; ZUANAZZI, J. A.; BASSANI, V. L.. Ofloxacin/ β -cyclodextrin complexation. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, Brasil, v. 27, n. 6, p. 533-40, 2001.

KOESTER, L. S.. **Modulação da liberação de carbamazepina por meio de matrizes poliméricas de hidroxipropilmetilcelulose e β -ciclodextrina**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

KOHEN, R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress – New approaches for their evaluation. **Biomedical & Pharmacotherapy**, Israel, v. 53, p. 181-92, 1999.

KOUKI, T.; OKAMOTO, M.; WADA, S.; KISHITAKE, M.; YAMANOUCHI, K.. Suppressive effect of neonatal treatment with a phytoestrogen, coumestrol, on lordosis and estrous cycle in female rats. **Brain Research Bulletin**, Japan, v. 64, p. 449-54, 2005.

KRAZEISEN, A.; BREITLING, R.; MOLLER, G. and ADAMSKI, J.. Phytoestrogens inhibit human 17 β -hydroxysteroid desidrogenase type 5. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Germany, v. 171, p. 151-62, 2001.

KRISTAN, K. ; KRAJNC, K. ; KONC, J. ; GOBEC, S. ; STOJAN, J. and RIZNER, T. L.. Phytoestrogens as inhibitors of fungal 17- β -hydroxysteroid dehydrogenase. **Steroids**, Slovenia, v. 70, p. 694-703, 2005.

KULLING, S. E.; METZLER, M. Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogens coumoestrol. **Food and Chemical Toxicology**, Germany, v. 35, p. 605-13, 1997.

KULLING, S. E.; LEHMANN, L.; METZLER, M. Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens. **Journal of Chromatography B**, Germany, v. 777, p. 211-8, 2002.

LAMPE, J. W. Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. Biomarkers of Nutritional Exposure and Nutritional Status. **Journal of Nutrition**, Washington, v. 133, p. 9565-9645, 2003.

LAPCIK, O. ; STURSA, J.; KLEINOVÁ, T.; VÍTKOVÁ, M.; DVORÁKOVÁ, H.; KLEJDUS, B. and MORAVCOVÁ, H.. Synthesis of hapten and conjugates of coumestrol and development of immunoassay. **Steroids**, Czech Republic, v. 68, p. 1147-55, 2003.

LÊ BAIL, J. C.; LAROCHE, T.; MARRE-FOURNIER, F. and HABRIOUX, G.. Aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibition by flavonoids. **Cancer Letters**, France, v.133, p. 101-6, 1998.

LEGENDRE, J. Y.; RAULT, I.; PETIT, A.; LUIJTEN, W.; DEMUYNCK, I.; HORVATH, S.; GINOT, Y. M.; CUINE, A.. Effects of β -cyclodextrins on skin: implications for the transdermal delivery of piribedil and a novel cognition enhancing-drug S-9977. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, France, v. 3, p. 311-22, 1995.

LEROY-LECHAT, F.; WOUESSIDJEW, D.; ANDREUX, J.-P.; PUISIEUX, F.; DUCHÊNE, D.. Evaluation of the cytotoxicity of cyclodextrins and hydroxypropylated derivatives. **International Journal of Pharmaceutics**, France, v. 101, n. 1-2, p. 97-103, 1994.

LI, J.; LI, X.; NI, X.; WANG, X.; LI, H.; LEONG, K.W.. Self-assembled supramolecular hydrogels formed by biodegradable PEO-PHB-PEO triblock copolymers and α -cyclodextrin for controlled drug delivery. **Biomaterials**, Singapore, v. 27, p. 4132-40, 2006.

LIRA, K. M. Benefícios da luz solar. 2007. Disponível em:
<www.karynemlira.com/beneficios-da-luz-solar/>. Acesso em:10 jan. 2008.

LIU, L.; ZHU, S.. Preparation and characterization of inclusion complexes of prazosin hydrochloride with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, China, v. 40, p. 122-7, 2006.

LYN-COOK, B.D.; SCOTTMAN, H. L.; YAN, Y.; BLANN, E.; KADLUBAR, F. F. and HAMMOS, G. J.. The effects of phytoestrogens on human pancreatic tumor cells in vitro. **Cancer Letters**, United States of America, v. 142, p. 111-9, 1999.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Iceland, v. 85, n. 10, p. 1017-25, 1996.

LONGHINI, R. **Avaliação de interações do ácido gálico frente a adjuvantes empregados em formas farmacêuticas sólidas**. Porto Alegre: UFRGS, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A.. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum. São Paulo: Nova Odessa:, 2002.

LUCAS, R. M.; PONSONBY, A.-L. Considering the potencial benefits as well as adverse effects of sun exposure: can all the potencial benefits be provided by oral vitamin D supplementation? **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, Australia, v. 92, p. 140-9, 2006.

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

McGARVEY, C. ; CATES, P. S.'; BROOKS, A. N.; SWANSON, I. A.; MILLIGAN, S. R.; COEN, C. W. and O'BYRNE, K. T.. Phytoestrogens and gonadotropin-releasing hormone pulse generation activity and pituitary luteinizing hormone release in the rat. **Endocrinology**, United States, v. 142, n.3.p.1202-8, 2001.

MAGNUSSON, B. M.; WALTERS, K. A.; ROBERTS, M. S. Veterinary drug delivery: potencial for skin penetration enhancement. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Australia, v. 50, p. 205-27, 2001.

MALLIS, L. M. ; SARKAHIAN, A. B. ; HARRIS, H.A. ; ZHANG, M.-Y. and McCONNELL, O. J.. Determination of rat oral bioavalability of soy-derived phytoestrogens using an automated on-column extration procedure and electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, United States of America, v. 796, p. 71-86, 2003.

MALPEZZI, L.; FRONZA, G.; FUGANTI, C; MELE, A. and BRUCKNER, S.. Crystal architechture and conformational properties of the inclusion complex, neohesperidin dihydrochalcone-cyclomaltoheptaose (β -cyclodextrin), by X-ray diffraction. **Carbohydrate Research**, Italy, v. 339, p. 2117-25, 2004.

MÁSSON, M. ; LOFTSSON, T. ; MÁSSON, G. and STEFÁNSSON, E.. Cyclodextrins as permeation enhancers : some theoretical evaluations and in vivo testing. **Journal of Controlled Release**, Iceland, v. 59, p. 107-18, 1999.

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

MEDLOCK, K. L.; BRANHAM, W. S.; SHEEHAN, D. M. The effects of phytoestrogens on neonatal rat uterine growth and development. **Experimental Biology and Medicine**, Arkansas, v. 208, p. 307-13, 1995.

MEI, J.; YEUNG, S. S. C. ; KUNG, A. W. C. High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, China, v. 86, n. 11, p. 5217-21, 2001.

MITCHELL, J. H. ;GARDNER, P. T.; McPHAIL, D. B.; MORRICE, P. C.; COLLINS, A. R. and DUTHIE, G.G.. Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, United Kingdom, v. 360, n. 1, p. 142-8, 1998.

MITCHELL, A. E.; HONG, Y.-J.; KOH, E.; BARRETT, D. M.; BRYANT, D. E.; DENISON, R. F.; KAFFKA, S. Ten-year comparison of the influence of organic and conventional crop management practices on the content of flavonoids in tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, United States of America, p. 1-15, 2007.

MONNAERT, V.; TILLOY, S.; BRICOUT, H.; FENART, L.; CECHELLI, R.; MONFLIER, E.. Behavior of α -, β - and γ -cyclodextrins and their derivatives on an in vitro model of blood-brain barrier. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, France, v. 310, n. 2, p. 745-51, 2004.

MORAVCOVÁ, J.; KLEINOVÁ, T. The determination of isoflavones and coumestrol by capillary electrophoresis. **Czech Journal of Food Sciences**, Praga, v. 19, n. 4, p. 132-8, 2001.

MORAVCOVÁ, J. ; KLEINOVÁ, T.; LOUCKA, R.; TYROLOVÁ, I.; KVASNICKA, F.; DUSEK, M.; CEROVSKY, M. and MATUCHA, P.. Coumestrol content of alfalfa following ensilage. **Animal Feed Science and Technology**, Praga, v. 115, p. 159-67, 2004.

MUKHERJEE, S.; MUKHERJEE, A.; SAHA, A. QSAR modeling on binding affinity of diverse estrogenic flavonoids: electronic, topological and special functions in quantitative approximation. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, India, v. 715, p. 85-90, 2005.

MUNRO, I. C.; PALMER, J.; STALCUP, A. M. and LANDER, J. P.. Safety assessment of γ -cyclodextrin. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, United States, v. 39, p. S3-S23, 2004.

NAKANISHI, K.; SOLOMON, P.H. **Infrared Absorption Spectroscopy**. 2nd edition. San Francisco: Holden-Day Inc., 1977.

NEWALL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. **Fitoterapia: Plantas medicinais. Guia para profissional da saúde**. São Paulo: Editorial Premier, 2002.

NOGOWSKI, L. Effects of phytoestrogen – coumestrol on lipid and carbohydrate metabolism in Young ovariectomized rats may be independent of its estrogenicity. **Journal of Nutricional Biochemistry**, New York , v. 10, p. 664-9, 1999.

OHTANI, Y.; IRIE, T.; UEKAMA, K.; FUKUNAGA, K.; PITHA, J.. Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. **European Journal of Biochemistry**, Japan, v. 186, n. 1-2, p. 17-22, 1989.

PAIVA, D. L.; LAPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy – A guide for students of organic chemistry**. 2nd edition. Washington: Harcourt Brace College Publishers, 1996.

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

POCOCK, V. J.; SALES, G. D.; MILLIGAN, S. R. Comparision of the oestrogenic effects of infant milk formulae, oestradiol and the phytoestrogen coumestrol delivered continuously in the drinking water of ovariectomised mice. **Food and Chemical Toxicology**, United Kingdom, v. 40, p. 643-51, 2002.

POLYDORO, M.; SOUZA, K. C. B. de; ANDRADES, M. E.; Da SILVA, E. G.; BONATO, F.; HEYDRICH, J.; DAL-PIZZOL, F.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L. and MOREIRA, J. C. F.. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureoides* extracts. **Life Sciences**, Porto Alegre, v. 74, p. 2815-26, 2004.

POSE-VINARNOVO, B.; RODRÍGUEZ-TENREIRO, C.; SANTOS, J. F. dos; VÁZQUEZ-DOVAL, J.; CONCHEIRO, A.; ALVAREZ-LORENZO, C.; TORRES-LABANDEIRA, J. J.. Modulating drug release with cyclodextrins in hydroxypropyl methylcellulose gels and tablets. **Journal of Controlled Release**, Spain, v. 94, p. 351-63, 2004.

RODRIGUEZ-TENREIRO, C. DIEZ-BUENO, L.; CONCHEIRO, A.; TORRES-LABANDEIRA, J.J.; ALVAREZ-LORENZO, C.. Cyclodextrin/carbopol micro-scale interpenetrating networks (ms-IPNs) for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, Spain, v. xx, p. xxx-xxx, 2007a.

RODRIGUEZ-TENREIRO, C.; ALVAREZ-LORENZO, C.; RODRIGUEZ-PEREZ, A.; CONCHEIRO, A.; TORRES-LABANDEIRA, J. J.. Estradiol sustained release from high affinity cyclodextrin hydrogels. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Spain, v. 66, p. 55-62, 2007b.

ROSSITER, R. C. Physiological and ecological studies on the oestrogenic isoflavones in subterranean clover (*T. subterraneum* L.). VII. Effects on nitrogen supply. Part VI. **Australian Journal of Agricultural Research**, Australia, v. 20, n. 25, p. 1043-51, 1969.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; GIACCHI, M.; PASQUALE, A. de and BONINA, F.. Influence of different penetration enhancers on in vitro skin permeation and in vivo photoprotective effect of flavonoids. **International Journal of Pharmaceutics**, Italy, v. 175, p. 85-94, 1998.

SARTORELLI, P.; ANDERSEN, H. R.; ANGERER, J.; CORISH, J.; DEXLER, H.; GOEN, T.; GRIFFIN, P.; HOTCHKISS, S. A. M.; LARESE, F.; MONTOMOLI, L.; PERKINS, J.; SCHMELZ, M.; SANDT, J. van de and WILLIAMS, F.. Percutaneous penetration studies for risk assessment. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Italy, v. 8, p. 133-52, 2000.

SATOR, P.-G.; SCHMIDT, J. B.; RABE, T. and ZOUBOULIS, Ch.C.. Skin aging and sex hormones in women-clinical perspectives for intervention by hormone replacement therapy. **Experimental Dermatology**, Denmark, v. 13, n. 4, p. 36-40, 2004.

SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K.; BRENNEISEN, P.; WENK, J.; HERRMANN, G.; MA, W.; KUHR, L.; MEEWES, C and WLASCHEK, M.. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. **Experimental Gerontology**, Germany, v. 35, p. 307-16, 2000.

SCHNEIDER, H.-J.; HACKET, F.; RUDIGER, V.. NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **Chemical Review**, Germany, v. 98, p. 1755-85, 1998.

SCHWINGEL, L. C.. **Associação da 3-O-metilquercetina com b-ciclodextrina: avaliação da complexação e penetração cutânea**. Porto Alegre: UFRGS, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

SILVA, A. J. M.; MELO, P. A.; SILVA, N. M. V.; BRITO, F. V.; BUARQUE, C. D.; SOUZA, D. V.; RODRIGUES, V. P.; POÇAS, E. S. C.; NOEL, F.; ALBUQUERQUE, E. X. and COSTA, P. R. R.. Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of coumestans with different patterns of oxygenation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Rio de Janeiro, v.11, p. 283-6, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 5ª edição. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC e UFRGS, 2004.

SINCLAIR, C. Risks and benefits of sun exposure: implications for public health practice based on the Australian experience. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, Australia, v. 92, p. 173-8, 2006.

SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U. C. Biotechnological applications of cyclodextrins. **Biotechnology Advances**, India, v. 20, p. 341-59, 2002.

SHIMPI, S.; CHAUHAN, B.; SHIMPI, P. Cyclodextrins: Application in different routes of drug administration. **Acta Pharmaceutical**, India, v. 55, p. 139-56, 2005.

SEKKAT, N.; KALIA, Y.N.; GUY, R. H. Biophysical study of porcine ear skin *in vitro* and its comparison to human skin *in vivo*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Switzerland, v. 91, p. 2376-81, 2002.

SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T.. Potencial health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biology & Medicine**, United States of America, v. 29, n. 3/4, p. 375-83, 2000.

SOFTWARE CHEMBIO OFFICE, editon 2005. ChemBio 3D and ChemBio Draw Ultra versão 9.0. Cambridge Soft.

SOFTWARE SCIFINDER SCHOLAR, edition 2004, Chemical Society. Disponível em: <www.cas.org/SCIFINDER/SCHOLAR>. Acesso em: 15/08/2006.

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

SZEFTLI, J. Cyclodextrin Technology. London: Kluwer Academic Publisher, 1988.

TAMIR, S.; IZRAEL, S.; VAYA, J. The effect of oxidative stress on ER α and ER β expression. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, Israel, v. 81, p. 327-32, 2002.

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

TAYLOR, L. P.; GROTEWOLD, E. Flavonoids as developmental regulators. **Current Opinion in Plant Biology**, United States, v. 8, p. 317-23, 2005.

THE MERCK INDEX, **An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**. 12th edition, New Jersey: Merck & CO Inc. 1996.

THORNTON, M. J.; TAYLOR, A. H.; MULLIGAN, K.; AL-AZZAWI, F.; LYON, C. C.; O'DRISCOLL, J. and MESSENGER, A. G.. Oestrogen receptor beta is the predominant oestrogen receptor in human scalp skin. **Experimental Dermatology**, Denmark, v. 12, p. 181-90, 2003.

TILLER, S. A.; PARRY, A. D.; EDWARDS, R. Changes in the accumulation of flavonoid and isoflavonoid conjugates associated with plant age and nodulation of alfalfa (*Medicago sativa*). **Physiologia Plantarum**, United Kingdom, v. 91, p. 27-36, 1994.

TOKADA, E.; SAKURAI, K.; FUKATA, H.; MIYAGAWA, H.; UZUKI, M.; OMORI, M.; OSADA, H.; IKEZUKI, Y.; TSUTSUMI, O.; IGUCHI, T. and MORI, C.. Fetal exposure to phytoestrogens – the difference in phytoestrogen status between mother and fetus. **Environmental Research**, Japan, v. 99, p. 195-203, 2005.

TOMMASINI, S.; CALABRO, M. L.; DONATO, P.; RANERI, R.; GUGLIELMO, G.; FICARRA, P. and FICARRA, R. Comparative photodegradation studies on 3-hydroxyflavone: influence of different media, pH and light sources. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Italy, v. 35, p. 389-97, 2004.

TRUEBA, G. P. Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. **Revista Cubana Investigaciones Biomédicas**, Cuba, v. 22, p. 48-57, 2003.

URANO, R.; SAKABE, K.; SEIKI, K. and OHKIDO, M.. Female sex hormone stimulates cultured human keratinocytes proliferation and its RNA- and protein-synthetic activities. **Journal of Dermatological Science**, Japan, v. 9, p. 176-84, 1995.

VIJAYA SRI, K.; KONDAIAH, A.; VIJAYA RATNA, J.; ANNAPURNA, A.. Preparation and characterization of quercetin and rutin cyclodextrin inclusion complexes. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, India, v. 33, p. 245-53, 2007.

WANG, C.-C.; PRASAIN, J. K. and BARNES, S.. Review of the methods used in the determination of phytoestrogens. **Journal of Chromatography B**, United States of America, v. 777, p. 3-28, 2002.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, United Kingdom, v. 56, p. 603-18, 2004.

WILLIAMS III, R. O.; MAHAGUNA, V.; SRIWONGJANYA, M. Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, United States of America, v. 46, p. 355-60, 1998.

WHITEHEAD, S. A.; RICE, S.. Endocrine-disrupting chemicals as modulators of sex steroid synthesis. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, United Kingdom, v. 20, n. 1, p. 45-61, 2006.

WHITTEN, P. L.; PATISAUL, H. B.; YOUNG, L. J. Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavonoids in rodents. **Neurotoxicology and Teratology**, United States, v. 24, p.47-54, 2002.

WOERDENBAG, H. J.; PRAS, N.; FRIJLINK, H. W.; LERK, C. F. and MALINGRÉ, T. M.. Cyclodextrin-facilitated bioconversion of 17 β -estradiol by a phenoloxidase from *Mucuna pruriens* cell cultures. **Phytochemistry**, Netherlands, v. 29, n. 5, p. 1551-4, 1990.

WOLF, A. S. Phytoestrogens – value and significance during menopause. **Menopause Andropause, Hormone replacement therapy through the ages**. New cognition and therapy concepts. Krause & Pachernegg GmbH, Veriag Fur Medizin und Wirtschaft, p. 51-9, 2001. Disponível em: <www.kup.at/cd-buch/8-inhalt.html>. Acesso em: 21/06/2005.

XAVIER, C. R.. **Associação da isoflavona genisteína com b-ciclodextrina. Avaliação da penetração cutânea**. Porto Alegre: UFRGS, 2005, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

XU, Y.; FISHER, G. J.. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. **Journal of Dermatological Science Supplement**, United States of America, v. 1, p. S1-S8, 2005.

YE, S-F.; ICHIMURA, K.; NAGAI, T.; SHINODA, M. and MATSUZAKI, S.. Coumestrol as well as isoflavones in soybean extract prevent bone resorption in ovariectomized rats. **Endocrine regulations**, Japan, v. 37, p. 145-52, 2003.

ZAND, R. S. R.; JENKINS, D. J. A.; DIAMANDIS, E. P. Flavonoids and steroid hormone-dependent cancers. **Journal of Chromatography B**, Canada, v. 777, p. 219-32, 2002.

ZARZYCKI, P. K.; SMITH, R. Separation of steroids using temperature-dependent inclusion chromatography. **Journal of Chromatography A**, Poland and Australia, v. 912, p. 45-52, 2001.

ZHANG, H.-Y.; WANG, L-F. Theoretical elucidation of structure-activity relationship of coumarins to scavenge peroxy radical. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, China, v.673, p. 199-202, 2004.

ZUANAZZI, J. A. S.; CLERGEOT, P. H.; QUIRION, J.-C.; HUSSON, H.-P.; KONDOROSI, A.; RATET, P. Production of *Sinorhizobium meliloti* nod gene activator and repressor flavonoids from *Medicago sativa* roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, France, v. 11, n. 8, p. 784-94, 1998.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1: Tabela dos resultados das permeações intrínsecas.

Quantidade permeada de coumestrol em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$				Quantidade permeada de mistura em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$			Quantidade permeada de complexo em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$		
Tempo (horas)	Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	1,373	0,218	15,888	2,047	0,259	12,678	-	-	-
3	3,024	0,223	7,384	4,607	0,101	2,204	-	-	-
4	4,759	0,355	7,469	7,011	0,510	7,274	0,919	0,030	3,296
5	6,228	0,409	6,576	9,563	0,853	8,926	1,745	0,039	2,278
6	8,139	0,535	6,580	13,086	1,183	9,044	2,787	0,096	3,448
7	10,585	0,696	6,578	17,402	1,194	6,863	3,835	0,309	8,075
8	13,751	0,900	6,545	22,625	1,554	6,869	5,629	0,371	6,599

Anexo 2: Tabela de fluxo e tempo de latência das permeações intrínsecas.

Coumestrol				Mistura			Complexo		
Célula	a	Fluxo	tlag	a	Fluxo	tlag	a	Fluxo	tlag
1	-2,701	1,823	1,481	-6,097	3,481	1,751	-4,639	1,301	3,565
2	-3,139	2,205	1,550	-5,345	3,085	1,732	-3,856	1,147	3,360
3	-3,321	2,145	1,548	-6,361	3,618	1,757	-3,706	1,092	3,391
4	-3,226	1,953	1,651	-5,282	3,156	1,673	-3,488	1,062	3,283
Média	-3,097	1,987	1,557	-5,771	3,335	1,728	-3,922	1,151	3,400
DP	0,273	0,134	0,070	0,539	0,255	0,038	0,500	0,106	0,119

Obs.: a = intercepção; fluxo = inclinação ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) e tlag = tempo de latência (horas).

Anexo 3: Tabela dos resultados das permeações em gel.

Quantidade permeada de coumestrol em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$				Quantidade permeada de mistura em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$			Quantidade permeada de complexo em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$		
Tempo (horas)	Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	0,743	0,098	13,254
5	-	-	-	0,816	0,065	7,963	1,092	0,122	11,225
6	1,099	0,255	23,255	1,313	0,106	8,077	1,566	0,166	10,600
7	1,608	0,279	17,411	1,972	0,133	6,770	2,107	0,289	13,735
8	2,279	0,427	18,773	2,622	0,216	8,267	2,751	0,382	13,893

Anexo 4: Tabela de fluxo e tempo de latência das permeações em gel.

Coumestrol				Mistura			Complexo		
Célula	a	Fluxo	tlag	a	Fluxo	tlag	a	Fluxo	tlag
1	-2,477	0,575	4,305	-2,595	0,680	3,815	-0,868	0,389	2,232
2	-2,140	0,513	4,165	-1,858	0,526	3,527	-1,671	0,574	2,911
3	-2,382	0,555	4,292	-2,562	0,645	3,967	-1,549	0,569	2,719
4	-2,869	0,715	4,009	-2,061	0,578	3,565	-1,374	0,479	2,869
Média	-2,467	0,590	4,193	-2,269	0,607	3,718	-1,366	0,503	2,683
DP	0,303	0,087	0,137	0,367	0,068	0,209	0,353	0,087	0,311

Obs.: a = intercepção; fluxo = inclinação ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) e tlag = tempo de latência (horas).