

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

**Obtenção de fração enriquecida em isoflavonas de *Trifolium pratense* L e
avaliação da permeação cutânea de formononetina e biochanina A
incorporadas em hidrogel de HPMC contendo ciclodextrinas**

PAULA HOLLWEG DIAS

Porto Alegre, 2017

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

**Obtenção de fração enriquecida em isoflavonas de *Trifolium pratense* L e
avaliação da permeação cutânea de formononetina e biochanina A
incorporadas em hidrogel de HPMC contendo ciclodextrinas**

Dissertação apresentada por **Paula Hollweg
Dias** para a obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof Dr José Angelo Silveira Zuanazzi

Porto Alegre, 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 25 de março de 2017, pela banca examinadora constituída por:

Prof(a). Dr. Helder Ferreira Teixeira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof(a). Dra Juliana Maria de Mello Andrade Fasolo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof(a). Dra Miriam Anders Apel
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Dias, Paula Hollweg
Obtenção de fração enriquecida em isoflavonas de
Trifolium pratense L e avaliação da permeação cutânea
de formononetina e biochanina A incorporadas em
hidrogel de HPMC contendo ciclodextrinas / Paula
Hollweg Dias. -- 2017.
108 f.
Orientador: José Angelo Silveira Zuanazzi.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2017.

1. Trifolium pratense L.. 2. Formononetina. 3.
Biochanina A. 4. Permeação cutânea. I. Zuanazzi, José
Angelo Silveira, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Farmacognosia do Departamento de Produção de Matéria-Prima, sob orientação do Prof. Dr. José Angelo Silveira Zuanazzi e colaboração da colega Dra Marina Scopel e no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG) do Departamento de Produção e Controle de Medicamentos da Faculdade de Farmácia UFRGS, com colaboração da Prof. Dra. Valquíria Linck Bassani.

“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu”.

Ana Vilela

AGRADECIMENTOS

À meu orientador, Professor Doutor José Angelo Silveira Zuanazzi, pela oportunidade e por todos conselhos e ensinamentos.

À Professora Doutora Valquiria Link Bassani, que foi colaboradora indispensável e incansável. Fico imensamente grata pela disponibilidade e apoio sempre que precisei.

À amiga e Professora Doutora Marina Scopel, aos seus ensinamentos, conselhos, paciência e, sobretudo pela amizade.

À Mestre Simony Martiny, pelos ensinamentos, companheirismo e disponibilidade sempre que precisei.

Aos colegas, amigos e parceiros do Laboratório de Farmacognosia, em especial Krissie, Mari, Melissa, Marí, Leti, Angélica, Natally, Andressa, Carol, Élen e Marcos, pelos ensinamentos, companheirismo e disponibilidade.

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento Galênico pelo auxílio, apoio e ensinamentos sempre que precisei.

À minha amiga e eterna professora Chana Medeiros da Silva, pela amizade e incentivo dado desde a época da graduação.

Aos meus pais, Tonho e Clarisse, pelo constante incentivo, amor e apoio em todos os momentos.

À minha irmã Mariana, pelo acolhimento e aconchego em Porto Alegre e pelas eternas palavras de incentivo e amor.

A todos os colegas da farmácia Natudermé, por entender minha ausência em muitos momentos durante esses 2 anos e me ajudar e incentivar sempre.

A toda minha família e amigos que sempre acreditaram, me incentivaram, e apoiaram nos momentos de maior desânimo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A formononetina e a biochanina A são as isoflavonas majoritárias nas partes aéreas de *Trifolium pratense* L. (trevo-vermelho) relacionadas com as principais atividades farmacológicas da planta. São chamadas de fitoestrógenos, pois possuem estrutura similar ao do 17- β -estradiol, e são capazes de se ligar aos receptores estrogênicos (ER β e ER α). As isoflavonas agliconas são moléculas de baixa hidrossolubilidade, o que pode limitar sua aplicação em produtos para pele e a expressão de sua atividade biológica. O presente trabalho tem como objetivo obter uma fração enriquecida em isoflavonas de *T. pratense* e avaliar a permeação cutânea das agliconas formononetina e biochanina A individualmente e associadas. Adicionalmente, o efeito de promoção da permeação cutânea em pele de orelha suína também foi objeto do estudo. A fração foi preparada por maceração e após precipitação das isoflavonas agliconas por evaporação do etanol, o precipitado foi separado por filtração e purificado por cromatografia em coluna de poliamida. O produto foi seco e apresentou concentração de isoflavonas de 2,8 mg/g de formononetina e 2,7 mg/g de biochanina A. No entanto, essa concentração ainda não foi suficiente para posterior incorporação em uma formulação visando testes de permeação cutânea. Neste contexto, os estudos de permeação em pele de orelha de suíno (Franz cells) foram realizados com as isoflavonas majoritárias de referência incorporadas à hidrogéis de hidroxipropilmetilcellulose (HPMC). Para avaliar o teor de isoflavonas nas formulações e nas diferentes camadas da pele foi desenvolvido método bioanalítico utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, o qual mostrou-se linear, específico, exato, preciso e robusto. Os hidrogéis foram desenvolvidos utilizando como polímero HPMC (3,5%, m/v) e as isoflavonas (0,1%) foram incorporadas à essa base, individualmente ou associadas, em presença ou ausência de hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) ou metil- β -ciclodextrina (M β CD). Os resultados obtidos na avaliação da permeação cutânea revelaram que as isoflavonas permearam mais quando incorporadas individualmente na base especialmente a formononetina. A biochanina A apresentou maior capacidade de permeação do que a formononetina, alcançando concentrações na epiderme de 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e na derme de 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, representando cerca de 2,7 vezes mais comparando com a concentração de formononetina (respectivamente, 0,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e 0,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). O uso de ciclodextrinas aumentou significativamente a

permeação da formononetina, tanto na epiderme quanto na derme. Para a biochanina A, apenas a retenção na epiderme foi aumentada com a presença de ciclodextrinas. A HP β CD foi a ciclodextrina que apresentou os melhores resultados de promoção da permeação da formononetina na derme e epiderme, proporcionando um aumento de 113%. Para a biochanina A, as duas ciclodextrinas aumentaram a sua concentração na epiderme na mesma proporção (37%). Quando as duas isoflavonas foram incorporadas em misturas 1:1 no hidrogel, a formononetina apresentou menor retenção, tanto na epiderme (0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) quanto na derme (0,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Contrariamente, a biochanina A apresentou retenção semelhante àquela apresentada quando foi incorporada isoladamente no hidrogel, caracterizando-se como uma molécula mais permeável e não sofrendo interferência da formononetina na sua permeação e retenção. Não foi observado efeito significativo da presença das ciclodextrinas na promoção da permeação cutânea das isoflavonas nas misturas, exceto para a formononetina, na epiderme. O conjunto dos resultados demonstrou que a formononetina e biochanina A são capazes de permear a pele sendo majoritariamente retidas na epiderme e na derme, revelando o seu potencial uso em preparações cosméticas destinadas à prevenção do envelhecimento cutâneo. As ciclodextrinas apresentaram acentuado efeito promotor da permeação cutânea apenas para a formononetina, que apresenta menor permeabilidade.

Palavras-chave: *Trifolium pratense* L., formononetina, biochanina A, hidroxipropil beta ciclodextrina, metil beta ciclodextrina, permeação cutânea.

ABSTRACT

The main isoflavones present *Trifolium pratense* L. (red clover) aerial parts are the isoflavones formononetin and biochanin A, related to its pharmacological activities. These compounds are known as phytoestrogens due to its similarity to the structure of 17- β -estradiol, being able to bind to the estrogen receptor (ER β and ER α). Aglicones of isoflavones display low water solubility limiting its incorporation in products for the skin and expression of its biological activity. The present work aims to develop a isoflavones-enriched fraction of *T. pratense* and to evaluate the skin permeation of the aglicones formononetin and biochanin A individually, and in association. Moreover the promoter effect of cyclodextrins on their skin permeation will also be evaluated. The enriched-fraction was prepared by maceration in ethanol 40% (v/v). The ethanol was evaporated and the dispersion was filtered. The supernatant was purified using a column chromatography packet with polyamide. The final product was dried and presented a concentration of 2.8 mg/g of formononetin and 2.7 mg/g of biochanin A. However, these amounts of isoflavones were not enough for subsequent incorporation into a formulation to proceed the cutaneous permeation tests. In this context, the permeation studies were performed using the chemical reference formononetin and biochanin A, incorporated into the hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) hydrogels for the permeation studies on porcine ear skin (Franz cells). To evaluate the isoflavone concentration in the formulations and in the different skin layers, a bioanalytical method was validated using high performance liquid chromatography (HPLC), which showed linearity, specificity, accuracy, precision and robustness. Hydrogels were developed using HPMC (Methocel® K4M) polymer (3.5%, m/v) and the isoflavones were incorporated into this base individually or in combination, in the presence or absence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) or methyl- β -cyclodextrin (M β CD). The results obtained in the cutaneous permeation tests showed higher permeation values when the isoflavones were individually incorporated into the formulations especially for formononetin. Biochanin A showed higher permeation capacity when compared to formononetin, reaching 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in the epidermis and 1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in the dermis, representing about 2.7 times the concentration of formononetin (0.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 0.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). The use of cyclodextrins increased significantly the permeation values of formononetin, both in the epidermis and in the dermis. For biochanin A only the

retention in the epidermis was increased. HP β CD was the cyclodextrin that showed the best results for formononetin as permeation promoter, providing an increasing in the epidermis and dermis of 113%. Both cyclodextrins improved the biochanin A permeation in the same proportion in the epidermis (37%). When the isoflavones were incorporated into hydrogels together (1:1 ratio), formononetin showed less retention in both skin layers (0.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in the epidermis and 0.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in the dermis) and biochanin A remained with similar performance when added alone. In the presence of cyclodextrins, no significant effect was observed in the promotion of skin permeation of isoflavones in mixtures, except for formononetin, in the epidermis. Taken together, the results indicated that formononetin and biochanin A present skin permeation being mostly retained in the epidermis and dermis, revealing its potential use in cosmetic products preparations for preventing skin aging. Cyclodextrins presented a marked skin permeation promoting effect only on formononetin, which molecule presents lower permeability.

Keywords: *Trifolium pratense*, formononetin, biochanin A, hydroxypropyl beta cyclodextrin, methyl beta cyclodextrin, cutaneous permeation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Núcleo fundamental das isoflavonas.....	32
Figura 1.2: Estrutura química das isoflavonas-agliconas presentes em <i>Trifolium pratense</i>	33
Figura 1.3: Representação esquemática da estrutura funcional das CDs (adaptado de FERREIRA <i>et al.</i> , 2009).	40
Figura 1.4: (A) Estrutura química da hidroxipropil- β -ciclodextrina, (B) estrutura química da metil- β -ciclodextrina (adaptado de DAVIS & BREWSTER, 2004).....	42

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
OBJETIVOS	25
Objetivo geral	27
Objetivos específicos	27
1. REVISÃO DA LITERATURA	29
1.1 Aspectos botânicos e químicos de <i>Trifolium pratense</i> L.	31
1.2 Atividade estrogênica das isoflavonas	33
1.3 Pele: estrutura e envelhecimento	37
1.4 Ciclodextrinas	39
2. QUANTIFICATION OF FORMONONETIN AND BIOCHANIN A IN AN ENRICHED FRACTION OF <i>TRIFOLIUM PRATENSE</i> L.	45
Abstract	47
Introduction	47
Experimental	49
Plant Material	49
Chemicals and solvents	49
Preparation of the isoflavones enriched fraction of <i>Trifolium pratense</i>	49
Determination of formononetin and biochanin A in the enriched fraction	50
Purification of the isoflavones enriched fraction	51
Results and Discussion	51
Evaluation of plant material	51
Isoflavones enriched fraction	52
Determination of formononetin and biochanin A in the enriched fraction	52
Purification of the isoflavones enriched fraction	53
Conclusion	54
References	54
3. MANUSCRITO	57
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
5. CONCLUSÕES	95
6. REFERÊNCIAS	99

O *Trifolium pratense* L. (trevo-vermelho) tem recebido considerável interesse como fonte valiosa de isoflavonas. As majoritárias formononetina e biochanina A, assim como as que estão presentes em menores concentrações, daidzeína e genisteína, encontram-se na forma de glicosídeos, ésteres malonatos glicosídicos ou na forma de aglicona (CEGIELA *et al.*, 2012).

Conhecidas como fitoestrógenos, as isoflavonas são constituintes vegetais com estrutura química semelhante ao hormônio 17- β -estradiol, podendo atuar como agonistas ou antagonistas nos receptores de estrogênio. Dois subtipos de receptores de estrogênio são relatados para o ser humano, ER α e ER β . O último é comumente distribuído na pele, amplamente expresso na epiderme, especialmente nos queratinócitos, nos vasos sanguíneos e nos fibroblastos dérmicos. Os fitoestrógenos têm se tornado um foco de interesse devido aos benefícios para saúde, especialmente cânceres relacionados a hormônios, doenças cardiovasculares, osteoporose e diversos sintomas pós-menopausa (HALL & PHILLIPS, 2005; KO, 2014).

No processo de envelhecimento cutâneo, a redução do estrogênio altera atividades celulares nos fibroblastos como síntese de colágeno, elastina e ácido hialurônico (SATOR *et al.*, 2001). Na administração cutânea de isoflavonoides, a forma molecular glicosilada não é biologicamente ativa, uma vez que a pele não possui enzimas capazes de causar hidrólise da ligação heterosídica e a liberação da forma ativa aglicona. Entretanto, a forma aglicona tem baixa hidrossolubilidade, o que implica na dificuldade de incorporação em hidrogéis. Neste sentido, diferentes métodos de associação/complexação de isoflavonas de *T. pratense* com ciclodextrinas já foram realizados pelo nosso grupo de pesquisa para melhorar esse comportamento físico-químico. Um dos estudos utilizou a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) e outro a α -ciclodextrina (β CD), e ambos resultaram em aumento na solubilidade das isoflavonas (MAITO, 2015; MARTINY, 2016).

As ciclodextrinas, em uso tópico sobre a pele, têm sido utilizadas como promotores da permeação de moléculas bioativas, devido à sua capacidade de se associar com os lipídeos presentes no estrato córneo e causar sua desorganização (CHALLA *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2009; PINHO, 2014). Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa vem pesquisando a permeação de fitoestrógenos na pele, tais como:

cumestrol, daidzeína e genisteína (XAVIER *et al.*, 2010; BORGHETTI *et al.*, 2011;BIANCHI *et al.*, 2016).

Neste panorama, os conhecimentos existentes sobre as atividades estrogênicas da formononetina e da biochanina A e a baixa hidrossolubilidade destas agliconas, evidenciam o interesse no desenvolvimento de uma fração contendo agliconas majoritárias do trevo-vermelho e a avaliação da permeação cutânea das mesmas incorporadas em gel hidrofílico, com vistas na sua retenção na epiderme e derme. Até o presente, não foram encontrados relatos de estudos de permeação cutânea dessas isoflavonas, aspecto que motivou a realização do presente trabalho.

Neste contexto, a presente dissertação tem como objetivo obter fração enriquecida em isoflavonas de *T. pratense* e estudar a permeação cutânea das agliconas majoritárias, formononetina e biochanina A individualmente e associadas em misturas, incorporadas em gel de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). Além disso, objetiva-se avaliar se a simples adição da HP β CD ou M β CD é capaz de aumentar a permeação cutânea desses constituintes.

A dissertação está estruturada em três capítulos:

- O Capítulo 1 sumariza os aspectos relevantes para desenvolvimento do trabalho: aspectos da pele e envelhecimento cutâneo, atividade estrogênica das isoflavonas, ciclodextrinas e sua utilização para a via tópica e permeação cutânea.
- O Capítulo 2 apresenta os resultados obtidos no desenvolvimento de uma fração enriquecida em isoflavonas de *Trifolium pratense*.
- O Capítulo 3 apresenta os resultados da validação de metodologia bioanalítica por cromatografia líquida de alta eficiência, visando à quantificação da formononetina e biochanina A de *Trifolium pratense* em diferentes camadas da pele bem como os resultados obtidos nos estudos de desenvolvimento de hidrogel contendo formononetina e biochanina A (individualmente ou associadas) a diferentes ciclodextrinas e sua permeação utilizando modelo de célula de Franz e pele de orelha de suíno.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Obter fração enriquecida em isoflavonas de *Trifolium pratense* (trevo-vermelho) e avaliar a permeação cutânea das agliconas majoritárias, formononetina e biochanina A individualmente e associadas, incorporadas em gel hidrofílico.

Objetivos específicos

- Preparar fração enriquecida das isoflavonas agliconas majoritárias presentes em *Trifolium pratense*L.;
- Incorporar a formononetina e biochanina A (isoladas ou associadas em misturas) em gel hidrofílico de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) contendo ou não as ciclodextrinas HP β CD ou M β CD.
- Realizar estudos de permeação cutânea *in vitro* das preparações desenvolvidas utilizando modelo de célula de Franz com pele de orelha de suíno, quantificando as isoflavonas nas diferentes camadas da pele.
- Validar metodologia bioanalítica por CLAE para quantificação e avaliação da retenção dos compostos nas matrizes biológicas.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Aspectos botânicos e químicos de *Trifolium pratense* L.

Estima-se que a família Leguminosae, também conhecida como Fabaceae, exista há aproximadamente 120 milhões de anos compreendendo árvores, arbustos e ervas, com grande variabilidade em seu porte e hábitos. É uma das maiores famílias dentre as dicotiledôneas, possuindo em torno de 946 gêneros reunindo cerca de 24.500 espécies, distribuídas em todo mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (LEWIS *et al.*, 2005; Leguminosae, 2016).

O gênero *Trifolium* L., pertence à família Leguminosae subfamília Papilionoideae, tribo Trifolieae, e compreende cerca de 241 espécies, sendo encontrado em regiões úmidas e temperadas, áreas Mediterrâneas e em algumas partes subtropicais do mundo (FRAME *et al.*, 1997; *Trifolium*, 2017a). No Rio Grande do Sul destaca-se o gênero *Trifolium* L. (trevos) como importantes forrageiras cultivadas, como *T. repens* L., *T. pratense* L. e *T. vesiculosum* Savi, e três espécies nativas *T. rio-grandense* Burkart, *T. polymorphum* Poir e *T. argentinense* Speg (LANGE, 2001; *Trifolium*, 2017b).

As folhas deste gênero são geralmente compostas por três folhetos (trifoliadas), responsáveis pela denominação científica: *Trifolium*. Todas as espécies deste gênero são anuais ou perenes, atingindo no máximo a altura aproximada de 50cm. Os trevos desenvolvem-se bem em uma grande variedade de *habitats*, em especial onde a incidência solar é elevada. Desta forma os trevos podem ser encontrados em regiões montanhosas, florestas abertas e até mesmo em terrenos semi-desérticos (ELLISON *et al.*, 2006).

A floração inicia na primavera e pode estender-se até o outono. A fecundação é cruzada e a polinização é realizada por insetos. O fruto é oval, engrossado no ápice, com 2-3 sementes ovoides, assimétricas, bicolores com a porção caulinar amarela ou castanho-clara e a radicular violeta, quando velhas têm cor de tijolo (LANGE, 2001).

O trevo-vermelho (*Trifolium pratense* L.) é originário do sudeste da Europa e Ásia Menor. Adapta-se melhor em ambientes com climas temperados, sem extremos de calor ou frio; solos férteis, profundos e bem drenados, em pH relativamente alto; podendo ser utilizado como silagem, feno, pasto e melhoramento do solo em muitas regiões do mundo (TAYLOR e QUESENBERRY, 1996).

Na sua composição química o *T. pratense* L. apresenta carboidratos (glicose, ácido glicurônico), cumarinas, isoflavonoides, flavonoides, saponinas, constituintes voláteis, além de outros constituintes (BARNES *et al.*, 2012). Os flavonoides são substâncias fenólicas que se caracterizam por apresentarem 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, tendo por base a estrutura da flavona (2-fenilbenzopirona), com as unidades recebendo denominação e numeração conforme descrito na Figura 1.1 (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003; CUNHA, 2005). Os flavonoides diferem em seus substituintes (na maioria das vezes grupamento hidroxila ou metoxila) e na natureza do açúcar ligado à aglicona, podendo ocorrer na forma O-glicosídeo ou C-glicosídeo (SAMUELSSON, 1999).

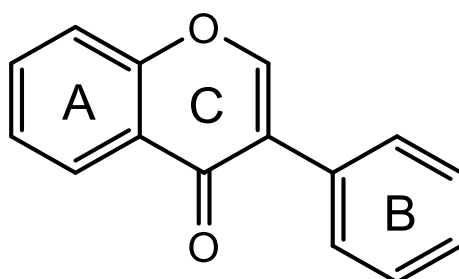


Figura 1.1: Núcleo fundamental das isoflavonas.

As principais isoflavonas do *T. pratense* relacionadas com as principais atividades farmacológicas da planta, são a formononetina (7-hidroxi-4'-metoxiisoflavona), biochanina A (5,7-diidroxi-4'-metoxiisoflavona), genisteína (5,7,4'-triidroxiisoflavona) e daidzeína (7,4'-diidroxi-4-metoxiisoflavona) cujas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 1.2 (BARNES *et al.*, 2012).

Os flavonoides de origem natural apresentam-se frequentemente oxigenados, e um grande número ocorre conjugado com açúcares. Essa forma, chamada de conjugada, também é conhecida como heterosídeo. Quando o flavonoide se encontra sem o açúcar, é chamado de aglicona ou genina, sendo muitas vezes denominada de forma livre (ROUTRAY *et al.*, 2011).

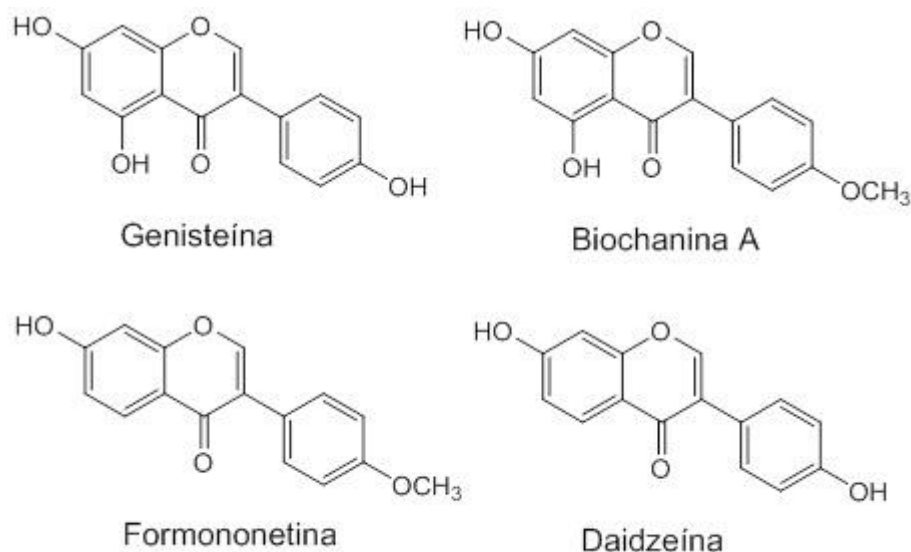


Figura 1.2: Estrutura química das isoflavonas-agliconas presentes em *Trifolium pratense*.

1.2 Atividade estrogênica das isoflavonas

Os estrógenos estão relacionados às características femininas, controle reprodutivo e gravidez. Influenciando as características da pele, ossos, sistema cardiovascular e a imunidade (CLAPAUCH *et al.*, 2002).

Os fitoestrógenos compreendem vários constituintes presentes em plantas que quando extraídos e purificados, podem potencializar sua atividade biológica, bem como incrementar sua biodisponibilidade. São classificados em quatro grandes grupos: esteróis, terpenoides, saponinas e fenóis. No último grupo, encontram-se isoflavonas, lignanos, coumestanos, flavanóis, flavonas e chalconas. Estas substâncias são absorvidas no intestino, metabolizadas no fígado e excretadas pelos rins. Contudo, pequena parte das isoflavonas é eliminada pela vesícula biliar e pelo intestino (KNIGHT & EDEN, 1996; SETCHELL, 1998; BABER *et al.*, 1999). O interesse nesses constituintes começou há mais de 20 anos com a pesquisa realizada pelo Instituto Nacional do Câncer dos EUA, explorando possíveis propriedades químio preventivas dos fitoestrógenos, especialmente no que se refere ao cancro da mama. A investigação em curso levou à uma pesquisa mais aprofundada destes constituintes em relação à saúde cardiovascular e esquelética, à função cognitiva e ao alívio dos sintomas da menopausa (PREEDY, 2013).

Existem mais de 350 isoflavonas conhecidas, fazendo delas o maior grupo de constituintes na classe dos isoflavonoides. As quatro isoflavonas mais comuns encontradas em plantas ou associadas à extratos fitoestrogênicos são: daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A. (KLEJDUS *et al.*, 2003). A estrutura química destes grupos mostra algumas similaridades com a estrutura e o peso molecular do 17 β -estradiol, por isso, conseguem se ligar aos sítios de ligação dos receptores estrogênicos, justificando a denominação "fitoestrógenos" (BECK *et al.*, 2005).

Uma única planta geralmente contém mais de uma classe de fitoestrógeno. As isoflavonas, genisteína e daidzeína, comumente existem como glicosídeos inativos, seus precursores são a biochanina A e a formononetina. Estes são convertidos em genisteína e daidzeína, respectivamente, após sofrerem degradação por glicosidases intestinais (TRIMARCO, 2016).

Para que os fitoestrógenos exerçam atividade estrogênica alguns aspectos estruturais são necessários, por exemplo, o núcleo da estrutura dos flavonoides com grupos 2,4-hidroxil em certas posições é fundamental para a estrogenicidade, enquanto a metilação dos grupos hidroxila diminui o efeito estrogênico (ZAND *et al.*, 2000; BECK *et al.*, 2005).

Embora estudos mostrem que os efeitos estrogênicos das isoflavonas sejam reduzidos, elas podem ao mesmo tempo exercer efeito agonista, ou seja, anti-estrógenos, competindo pelos sítios de ligação nos receptores de estrógenos presentes na célula. As isoflavonas evitam que este hormônio exerça seus efeitos negativos, como o aumento do risco do câncer de mama nas mulheres. Na ausência de estrogênio (menopausa), essas substâncias apresentarão efeito estrogênico e substituem o hormônio que está sendo produzido em níveis reduzidos, podendo aliviar os sintomas indesejáveis da menopausa e reduzir o risco de doenças cardiovasculares e osteoporose advindos da ausência do estrogênio humano (MUELLER, 2002).

Na forma de glicosídeos as isoflavonas não são absorvidas pelo organismo humano, somente as isoflavonas livres (agliconas) são capazes de atravessar a membrana plasmática. Enzimas hidrolíticas de bactérias intestinais são responsáveis por converter grande parte desses glicosídeos em outras moléculas; no fígado sofrem conjugação com o ácido glicurônico e assim passam a ter biodisponibilidade e exercer

atividade biológica no organismo (SIMÃO, *et al.*, 2008). Na administração cutânea de isoflavonoides, a forma molecular glicosilada não é biologicamente ativa, uma vez que a pele não dispõe de enzimas capazes de hidrolisar a ligação heterosídica. Desta característica decorre a necessidade de incorporação da forma aglicona em preparações farmacêuticas (IOVINE, *et al.*, 2012).

Com a falência ovariana na menopausa ocorre uma redução drástica na produção de estrógenos e, por consequência, uma série de alterações fisiológicas importantes manifestam-se com ondas de calor, insônia, transpiração forte, dor de cabeça, mudança de humor, nervosismo, irritabilidade, depressão, dor vaginal, entre outros (SPEROFF, 2002). A terapia de reposição hormonal para o tratamento de queixas do climatério é discutida controversamente em relação aos efeitos colaterais associados. Esta é uma das principais razões para inclusão de tratamento com extratos derivados de plantas como alternativas terapêuticas. Tais extratos estão disponíveis quer na forma de medicamentos fitoterápicos (Promensil[®], Climadil[®]), mas principalmente como suplementos nutricionais (extratos de soja e trevo-vermelho). Entretanto, na controversa literatura, há relatos de falta de comprovação da eficácia destes constituintes para o tratamento de queixas pós-menopausa, e, além disso, existem preocupações com efeitos secundários e segurança no caso das isoflavonas (DIEL *et al.*, 2017).

Uma das primeiras evidências de que o trevo-vermelho possui atividade estrogênica, foi um estudo realizado na Austrália nos anos 40 (BENNETS *et al.*, 1946). Problemas de infertilidade em massa foram relatados em ovelhas que se alimentavam de pasto rico em trevo-vermelho, os quais foram relacionados à presença de cumestrol e isoflavonas do trevo, originando a chamada "doença do trevo". Nos anos 70 e 80 foram descritos graves distúrbios de fertilidade em bovinos alimentados com silagem de trevo-vermelho indicando estimulação estrogênica. Na década de 50 as isoflavonas de *T. pratense* já haviam sido identificadas como constituintes com atividade estrogênica (BECK *et al.*, 2005).

Um estudo de revisão sistemática com meta-análise avaliou os efeitos de um extrato padronizado de *T. pratense* (Promensil[®]) na dosagem de 80mg por dia sobre os fogachos observados na menopausa. A meta-análise demonstrou uma redução estatística e clinicamente relevante na frequência dos fogachos do grupo que foi tratado com o extrato quando comparado com o grupo placebo. Segundo o estudo,

existem evidências estatísticas e clínicas significativas dos benefícios do uso de 80mg por dia desse extrato (MYERS & VIGAR, 2017).

Na literatura recente existem diversos estudos a respeito da potencial atividade terapêutica da formononetina quando empregada isoladamente. Alguns deles demonstraram que a formononetina possui atividade antitumoral para vários tipos de câncer, como o de pulmão, próstata, mama e cólon (YANG *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014; AUYEUNG *et al.*, 2012). Um estudo recente demonstrou efeitos antitumorais da formononetina sobre culturas de células T24 de carcinoma de bexiga. Os resultados mostraram que a formononetina nas concentrações de 0, 50, 100 e 200 μ M inibiu significativamente a proliferação dessas células de um modo dependente do tempo e da dose e, além disso, as células T24 apresentaram alterações morfológicas características de apoptose e menor invasividade (WU *et al.*, 2017). Outro estudo, realizado por das Neves e colaboradores (2016), demonstrou que a formononetina, isolada do própolis vermelho brasileiro, é responsável pelo efeito antimicrobiano, especialmente contra *Candida ssp.*

Da mesma forma, foram encontrados estudos utilizando somente a biochanina A. Em um deles, Zarmouh e colaboradores (2017) demonstraram que biochanina A é um inibidor potente, reversível e seletivo da monoamino-oxidase-B (MAO-B) e pode ser recomendada para possível utilização no tratamento terapêutico das doenças de Parkinson e de Alzheimer. Chundi e colaboradores (2016) avaliaram a eficácia da biochanina A na dor neuropática induzida por estreptozotocina em ratos e concluíram que na dosagem de 5 mg/kg (por administração intraperitoneal) ela pode ser uma boa candidata a fármaco para dor neuropática.

Alguns estudos com aplicação tópica de isoflavonas-agliconas tais como genisteína, daidzeína, bioquanicina A e formononetina mostraram seu efeito protetor na pele contra a oxidação induzida por UV (WIDYARINI *et al.*, 2001; LIN *et al.*, 2008; KITAGAWA *et al.*, 2010; LIM *et al.*, 2013). Além disso, estudos verificaram o potencial de cicatrização de feridas devido ao efeito combinado destas quatro isoflavonas e a inibição da melanogênese pela biochanina A (LIN *et al.*, 2011; RENDA *et al.*, 2013). No entanto, não foram encontrados estudos de quantificação de formononetina e biochanina A em diferentes camadas da pele. Para realizar estudos de permeação percutânea, a determinação quantitativa do medicamento na pele é necessária para avaliar a permeabilidade das formulações propostas (SILVA *et al.*, 2012).

1.3 Pele: estrutura e envelhecimento

A pele, ou sistema tegumentar, é o maior órgão do corpo humano. Entre suas principais funções estão: proteção dos tecidos subjacentes, regulação da temperatura, reserva de nutrientes e ainda conter terminações nervosas sensitivas. A pele é dividida, histologicamente, em camadas sendo a epiderme a camada mais externa. Esta camada é uma cobertura fina e protetora, com diversas terminações nervosas. É constituída por outras camadas, denominadas de estratos, são eles: estrato córneo (camada superior), lúcido, granuloso e o espinhoso; a camada inferior, o estrato germinativo (camada basal). O estrato córneo é a camada mais externa da pele, muito fino, com permeabilidade seletiva, principal barreira para a entrada de substâncias externas; é capaz de se regenerar, eliminar elementos tóxicos e responder a estímulos sensoriais. A derme é a camada formada por tecido conjuntivo (constituída por colágeno e fibras de elastina) situada abaixo da epiderme, quase 25 vezes mais espessa que a mesma e consiste de duas camadas: papilar e a reticular. Nesta camada que estão os vasos linfáticos e sanguíneos, que fornecem nutrientes para pele (GERSON, 2011).

O envelhecimento cutâneo é um processo natural e gradativo que modifica o aspecto da pele. Ocorre devido a fatores intrínsecos e/ou extrínsecos, tais como: senescência celular, estresse oxidativo, fotoenvelhecimento, alteração do conteúdo de água e influência hormonal. No envelhecimento cronológico, ou intrínseco, ocorre uma redução nas funções vitais do corpo, onde as funções imunológicas são reduzidas e a renovação celular fica comprometida. Outro fator importante é o declínio dos níveis estrogênicos nas mulheres no período pós-menopausa (REBELLO, 2005). Na medida em que o estrogênio se esgota, a pele começa a perder seu tônus. A redução nos glicosaminoglicanos significa menos umidade nos tecidos; também ocorrem diminuição nos queratinócitos (mitose mais lenta), melanócitos e nas trocas celulares (GERSON, 2011).

Já o processo extrínseco é decorrente de fatores ambientais como tabagismo, etilismo, exposição solar abusiva. A exposição aos raios ultravioleta do sol é o principal responsável pela produção de radicais livres, os quais são instáveis e promovem reação em cadeia com constituintes da pele, causando o envelhecimento cutâneo ou fotoenvelhecimento (REBELLO, 2005; RIBEIRO, 2010).

Os estrógenos são esteroides que possuem 18 carbonos, sendo produzidos na mulher desde a adolescência até a menopausa. Sua produção é regulada pelo eixo hipotálamo-pituitária em associação com o ovário (HALL *et al.*,2005). Esses hormônios exercem sua ação na pele através de sua ligação aos receptores estrogênicos (ER). Os receptores estrogênicos estão presentes em todas as células do nosso corpo, existindo dois subtipos: ER α e ER β ; este último comumente distribuído na pele, expresso na epiderme, principalmente nos queratinócitos, vasos sanguíneos e fibroblastos dérmicos (HALL *et al.*, 2005; SON *et al.*, 2005; MLYNARCZUK *et al.*, 2011; THORNTON *et al.*,2013).

Após a menopausa, muitas mulheres apresentam ressecamento e perda de firmeza e elasticidade da pele, seguido pelo aparecimento mais acentuado de rugas resultado da perda das proteínas estruturais da pele: colágeno e elastina. Essa perda deve-se não apenas à diminuição em sua biossíntese, mas também por sua degradação descontrolada, tendo-se observado que aproximadamente 30% do colágeno é perdido no primeiro quinquênio após a menopausa (WINES & WILSTEED, 2001).

Além do estímulo à biossíntese de componentes da matriz extracelular, os estrógenos também aumentam a vasodilatação na microcirculação cutânea, e, após a menopausa, essa microcirculação periférica é diminuída, trazendo como consequência a diminuição no aporte de nutrientes e perda do controle vascular, ocasionando as "ondas de calor" ou fogachos(HARRIS, 2009).

Mulheres tratadas com terapia de reposição hormonal não têm perdas tão significativas de colágeno como aquelas não tratadas. O tratamento com estrogênio reverte as alterações dessas fibras, o que favorece uma melhora na elasticidade da pele das mulheres pós-menopausa (CALLEJA-AGIUS,2013).

Com a terapia de reposição hormonal tópica, nota-se também uma diminuição das formações de ligações cruzadas e da degradação das fibras existentes. O uso da terapia de reposição hormonal tópica contribui ainda para a melhoria da produção de sebo e da hidratação cutânea, promovendo a manutenção do manto hidrolipídico, o que é particularmente importante para as pacientes atópicas, que se beneficiam com o aumento de lipídeos epidérmicos (RAINE-FENNING, 2003; PHILLIPS *et al.*,2001; SATOR *et al.*,2001).

Os fitoestrógenos podem ter efeito anti-envelhecimento na pele através de receptores de estrogênio ou através do aumento da produção de ácido hialurônico, colágeno, proteínas da matriz extracelular ou através da promoção da vascularização da pele, proliferação celular, proteção contra estresse oxidativo e apoptose (CHUA, *et al.*, 2012; GOPAUL *et al.*, 2012; PATRIARCA, *et al.*, 2013; THORNTON, 2013).

Na pele, não são encontradas enzimas capazes de hidrolisar as moléculas glicosiladas, diferentemente do que acontece pela via oral, onde a transformação das isoflavonas na forma conjugada para a forma livre ocorre através da passagem pelo trato gastrointestinal. Portanto, é recomendável que estas moléculas estejam na sua forma livre ao serem incorporadas às formulações de uso tópico (SCHMID, 2003).

Ainda que o mecanismo da relação entre os estrógenos e a bioquímica cutânea não esteja completamente elucidado, o uso de terapia de reposição hormonal tem mostrado que todos esses sintomas associados ao envelhecimento são diminuídos, podendo-se assim retardar o processo (HARRIS, 2009).

1.4 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos constituídos de 6 (α -ciclodextrina), 7 (β -ciclodextrina), 8 (γ -ciclodextrina) ou mais unidades de glicose (glicopiranoose) unidos por ligação α -(1,4). Elas podem ser obtidas pela degradação do amido pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase, produzidas pelo metabolismo de certos microrganismos, como o *Bacillus macerans* (JEANG *et al.*, 2005). Dependendo do tipo de microrganismo que produz a enzima e das condições de reação, são produzidos diferentes tipos de CDs. Atualmente, as CDs são obtidas por processos biotecnológicos em larga escala com preços relativamente acessíveis, o que tem permitido o aumento significativo de estudos de investigação científica, assim como a sua aplicação a nível industrial (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

As ciclodextrinas apresentam-se na forma de um cone truncado (Figura 1.3), como consequência da conformação das unidades de glicopiranoose determinada pelas ligações α -(1,4). Os grupos hidroxila posicionados externamente conferem características hidrofílicas às CDs tornando-as solúveis na água e insolúveis na maioria dos solventes orgânicos. O interior da cavidade é constituído por ligações dos

grupos C-H e C-O e ligações glicosídicas entre as unidades de glicose, conferindo à cavidade características hidrofóbicas (MURA, 2014).

Como resultado dessa estrutura, as CDs possuem forte capacidade de formar complexos com moléculas, variando de substâncias polares, como álcoois, ácidos, aminas, e ânions inorgânicos pequenos, neste caso os complexos não são necessariamente de inclusão, e a substâncias apolares, como hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, neste caso, podendo formar complexos de inclusão ou não-inclusão (HAPIOT, 2006).

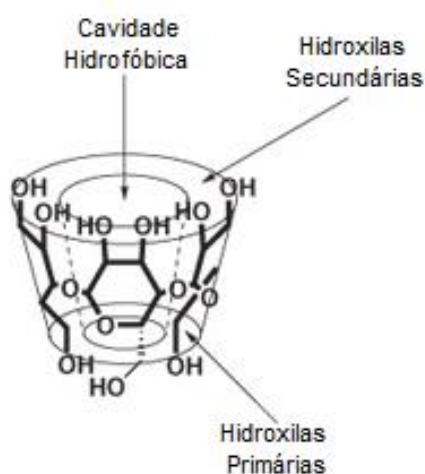


Figura 1.3: Representação esquemática da estrutura funcional das CDs (adaptado de FERREIRA *et al.*, 2009).

Cada ciclodextrina apresenta capacidades próprias para formar complexos de inclusão com moléculas específicas, capacidades essas que dependem do ajuste adequado da molécula hóspede na cavidade hidrofóbica da CD. A formação dos complexos de inclusão é determinada pelas características das moléculas hóspede, como a polaridade, o tamanho, e a geometria, que devem ser adequadas às características hidrofóbicas e ao tamanho da cavidade da CD (LOFTSSON & BREWSTER, 1997).

As forças que contribuem para a formação e estabilização dos complexos são as interações eletrostáticas, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Por outro lado, em solução aquosa, as moléculas de água que preenchem a cavidade central das CDs encontram-se numa situação termodinâmica

desfavorável. Na formação do complexo, as moléculas de água são substituídas por moléculas hóspedes de caráter menos polar, processo que é energeticamente favorável em termos de entalpia e entropia, diminuindo a energia total do sistema (BREWSTER & LOFTSSON, 2007).

Na indústria farmacêutica, as CDs têm sido particularmente usadas devido as suas propriedades complexantes, por aumentar: a solubilidade e dissolução dos fármacos pouco hidrossolúveis, sua biodisponibilidade e estabilidade, diminuir a irritação gástrica, dérmica ou ocular causada por determinados fármacos, diminuir ou eliminar odores ou sabores desagradáveis, prevenir interações entre diferentes fármacos ou entre fármacos e excipientes (GUEDES, 2008). Embora as estruturas supramoleculares mais referidas sejam os complexos de inclusão entre moléculas hóspede e ciclodextrina, a possibilidade de formação de complexos de não-inclusão vem sendo relatada mais recentemente (ZIME-DIAWARA *et al.*, 2012).

O uso farmacêutico das ciclodextrinas naturais (α CD, β CD e γ CD) vem sendo gradativamente substituído, ao longo dos anos, pelos seus derivados semi-sintéticos que oferecem maior capacidade de inclusão, solubilidade aquosa, estabilidade e menor toxicidade, devido às alterações das suas propriedades físico-químicas originais (GUEDES, 2008).

Existem centenas de derivados, mas apenas alguns são de maior interesse farmacêutico. Entre eles, os derivados hidroxialquilados, isto é, os derivados hidroxipropil da β CD e γ CD (HP β CD e HP γ CD, que derivam da substituição dos grupos hidroxílicos em C₂, C₃ e C₆ por substituintes 2-hidroxipropil); os metilados da β CD, como, por exemplo, 2,3,6-metil- β CD, derivado randômico (aleatório) na posição C₂, C₃ ou C₆, cuja designação anglo-saxônica é randomly methylate –cyclodextrin (RM β CD) e as sulfobutil-éter β CD (SBE β CD), poli-aniônica, cuja substituição em R = (CH₂)₄SO₃⁻Na⁺ poderá complexar moléculas neutras, não somente pela inclusão na cavidade das CDs, mas também, por interação com as cadeias alquilas dos substituintes (OKIMOTO, 1996; THOMPSON, 1997; ZIA, *et al.*, 2001).

Monografias sobre as ciclodextrinas já são encontradas em muitas farmacopeias. As monografias da β CD e a α CD são encontradas nas Farmacopeias Japonesa, Europeia e Americana. A β CD e a γ CD foram incluídas na lista do Food and Drug Administration (FDA) como aditivos alimentares seguros. A HP β CD (Figura 1.4) foi recentemente incorporada à Farmacopeia Europeia (SUVARNA, 2017). Ela

apresenta maior hidrossolubilidade e menor toxicidade podendo ser utilizada tanto para a via parenteral quanto para realizações de testes biológicos que utilizam culturas de células (DEL VALLE, 2004).

Tanto a β -CD como a metil- β CD (M β CD) são capazes de remover o colesterol das membranas celulares, atividade mais proeminente para a forma metilada. A M β CD (Figura 1.4) é conhecida por formar complexos de inclusão com colesterol, aumentando assim a sua solubilidade em solução aquosa. Este efeito pode ser explorado para a preparação de produtos isentos de colesterol: a molécula de colesterol volumosa e hidrofóbica é facilmente alojada dentro de anéis de ciclodextrina que são então removidos, ou para a promoção da permeação cutânea de moléculas bioativas. Por outro lado, esta característica é responsável pela toxicidade destas ciclodextrinas quando administradas pela via parenteral, causando hemólise (RODAL, 1999).

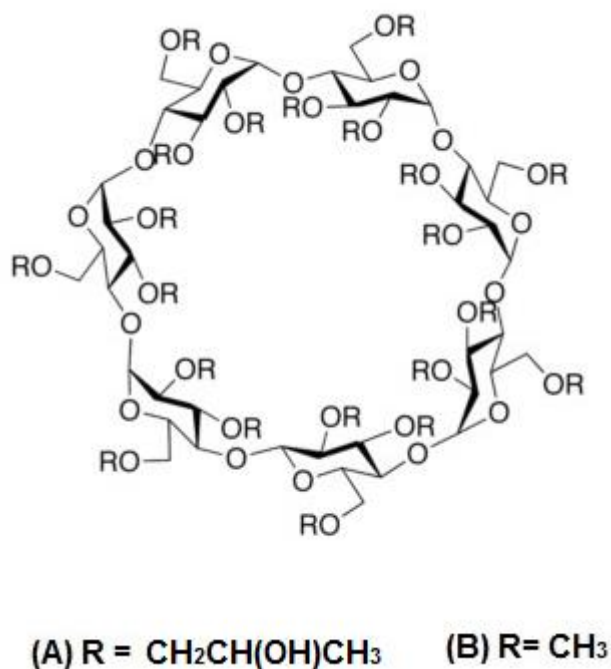


Figura 1.4: (A) Estrutura química da hidroxipropil- β -ciclodextrina, (B) estrutura química da metil- β -ciclodextrina (adaptado de DAVIS & BREWSTER, 2004).

A pele é uma membrana biológica muito menos permeável do que um epitélio devido ao estrato córneo e apresenta também uma camada aquosa externa muito menor, o que dificulta a dissolução do fármaco. Para que um fármaco administrado topicamente atinja o seu local de ação é necessário atravessar o estrato córneo, o que

muitas vezes não é possível, limitando o efeito clínico de muitas moléculas. Os promotores de absorção químicos como etanol ou tensoativos, aumentam a permeação do fármaco penetrando nas membranas e diminuindo as suas propriedades barreira, através de um aumento da hidratação, alterando o seu poder solvente ou modificando a estrutura lipídica. Estes promotores de absorção são inespecíficos, atuando sobre fármacos hidrossolúveis e lipossolúveis, mas também sobre outros produtos potencialmente tóxicos. A desestabilização lipídica geralmente confere-lhes propriedades irritantes à pele (WILLIAMS & BARRY, 2004).

Aplicações de CDs em formas farmacêuticas semi-sólidas podem favorecer o aumento da liberação do fármaco da base, sua permeação, além de promover sua estabilização na formulação e diminuição da irritação tópica (MATSUDA & ARIMA, 1999). Entretanto, o seu papel no incremento da penetração de fármacos através da pele não está ainda completamente elucidado. As moléculas das CDs são relativamente grandes e seu exterior é hidrofílico, praticamente não atravessam a pele, pois não apresentam afinidade pela membrana lipofílica (OLIVEIRA, 2009).

Alguns autores, tem sugerido que as ciclodextrinas atuam diretamente nas membranas complexando e solubilizando os seus componentes, como colesterol e fosfolipídeos. Este fenômeno tornaria as membranas menos resistentes, modificando as suas propriedades de transporte e facilitando a absorção de fármacos (UEKAMA *et al.*, 1998). Outro mecanismo de atuação das CDs como promotores de absorção de fármacos complexados em veículos aquosos é provavelmente através do aumento da quantidade total de fármaco dissolvido, elevando assim o gradiente de concentração na camada aquosa externa à membrana. Isto conduz a um maior fluxo de fármaco livre disponível à superfície da membrana, promovendo a sua penetração (LOFTSSON & DUCHENE 2007). As CDs, ao aumentarem a hidrossolubilidade de fármacos lipofílicos, elevam também a sua atividade termodinâmica em determinados veículos, promovendo assim a sua liberação e conseqüentemente a sua biodisponibilidade à superfície da pele (LOFTSSON & MASSON, 2001).

Nosso grupo de pesquisa vem estudando a complexação de fitoestrógenos, como daidzeína e genisteína com β CD e a incorporação das associações em hidrogéis avaliando-se a permeação cutânea (XAVIER *et al.*, 2010; BORGHETTI *et al.*, 2011). O cumestrol e sua complexação com β -CD e HP β CD também já foram objeto de estudo (FRANCO *et al.*, 2009; BIANCHI, 2014). Recentemente foi realizada

a associação das isoflavonas formononetina e biochanina A de uma fração enriquecida de *T. pratense* à β -CD, onde devido à complexibilidade de composição da fração, não foi possível evidenciar claramente o tipo de interação existente (MARTINY, 2016). Já o estudo realizado por Maito (2015), que avaliou a complexação das isoflavonas isoladas formononetina e biochanina A com HP β CD, evidenciou que os complexos obtidos foram do tipo de não inclusão.

2. QUANTIFICATION OF FORMONONETIN AND BIOCHANIN A IN AN ENRICHED FRACTION OF *TRIFOLIUM PRATENSE* L.

Quantification of formononetin and biochanin A in an enriched fraction of *Trifolium pratense* L.

Dias, P.H. ¹; Scopel, M. ¹; Martiny, S. ¹; Dall`Agnol, M.²; Bassani, V.L.¹ Zuanazzi, J.A. ¹.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

² Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia/ Faculdade de Agronomia, UFRGS

Abstract

Isoflavones are the constituents of greater interest in red clover (*Trifolium pratense* L.), being formononetin and biochanin A the main ones. These compounds have many activities of therapeutic interest, among them estrogenic activity, which gave rise to the name phytoestrogens. Our research group has been studying the possibility of obtention of isoflavone-aglycone-enriched fraction and to promote its water solubility in order to obtain raw material for oral products. In the present work the fraction enriched in formononetin and biochanin A was obtained from extractive solution prepared by maceration of the plant with 40% (v/v) hydroethanol mixture. The elimination of ethanol by rotary evaporation yielded a precipitate which was separated by filtration. The supernatant was purified using through polyamide column yielding the enriched fraction. This fraction contained 2.8mg formononetin and 2.7mg biochanin A per gram of the fraction. The use of polyamide increased the isoflavones amount (17 and 28%, respectively) and improved the sensorial characteristics of the enriched fraction of isoflavones, removing the chlorophyll-like compounds which presented initially a brownish-green color, making it suitable for formulations of cutaneous use in its new yellowish color.

Key-words: *Trifolium pratense*, formononetin, biochanin A, isoflavone-enriched fraction.

Introduction

Trifolium pratense L., one of the most used forage legumes in the world agriculture, contains the isoflavones formononetin and biochanin A, and in lower

concentrations daidzein and genistein. These compounds have gained much interest due to reports of their benefits to human health (RAMOS, 2010). In 2009, *T. pratense* L. was included in the Brazilian National List of Medicinal Plants of interest to Federal Health System (RENISUS), which contains medicinal plants with the potential to generate products to be produced and distributed by Federal Health System (BRASIL, 2009).

Flavonoids are a group of naturally occurring compounds that are ubiquitous in all vascularized plants (MANACH, et al., 2004). To date, more than 8000 different flavonoids have been described, with their main classes being flavonols, flavones, flavanones, flavans, isoflavonoids and anthocyanins (FLAMBO, 2013). Among the most important properties of isoflavonoids is the estrogenic activity of isoflavones, they have similarity in structure with the human female hormone 17- β -estradiol, which can bind to both α and β estrogen receptors, and mimic the action of estrogens on target organs, thereby exerting many health benefits when used in some hormone-dependent diseases (VITALE *et al.*, 2013).

Some studies have verified the healing potential of wounds due to the combined effect of genistein, daidzein, biochanin A and formononetin and inhibition of melanogenesis by biochanin-A (LIN *et al.*, 2011; RENDA *et al.*, 2013). In addition, studies with topical application of these four isoflavones have shown their protective effect on the skin against UV-induced oxidation (WIDYARINI *et al.*, 2001; LIN *et al.*, 2008; KITAGAWA *et al.*, 2010; LIM *et al.*, 2013). However, no quantification studies of formononetin and biochanin A on different skin layers have been found so far. To perform percutaneous permeation studies, quantitative determination of the drug in the skin is necessary in order to evaluate its permeation from the proposed formulations (SILVA *et al.*, 2012).

In previous studies performed by our research group, Maito (2015) reported the development of a fraction of isoflavones-aglycones of *T. pratense*, and its association, association with HP β CD in order to produce a freeze-dried extract for oral administration. Martiny (2016) associated a similar isoflavones-aglycones fraction with β CD in order to spray drying it. In both studies the hydrossolubility of the isoflavones was increased with the use of cyclodextrins. In the first one the formation of non-inclusion complex was reported. Although both extract presented in their composition the isoflavones in the aglycone form, with is a good characteristic to reach

homogeneous absorption in oral route or cutaneous permeation, the extract presented brownish-green color, what represents a limitation for cutaneous administration.

In this context, the present work aims to develop enriched isoflavones-aglycones fraction using *T. pratense* L and to remove the color compound by using of polyamide for further incorporation in cutaneous formulation.

Experimental

Plant Material

The collection of the plant material was performed in Bagé (Rio Grande do Sul, Brazil), by Dr. Miguel Dal`Agnoll. Approximately 55 kg of fresh plant was collected at the end of November 2015.

The plant material was washed using running tap water and the aerial parts were separated. Afterwards, the material was dried using a circulating air oven at 40 °C (Lawes model 30 B/CLP) until obtaining a moisture content of 8-14%, according to the specification of the Brazilian Pharmacopoeia (ANVISA, 2010). The dried leaves were powdered in a knife mill, resulting in 3.5 kg of *T. pratense* dried grounded leaves.

Chemicals and solvents

Formononetin (98%, HPLC purity) and biochanin A (97%, HPLC purity) were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). Acetonitrile (HPLC grade, JTBaker), trifluoroacetic acid (analytical grade, Nuclear) and ultra-pure water from Milli-Q system (Millipore) were used for the mobile phase preparation. Polyamide (Roth, 0,315 mm). All other chemicals were analytical grade.

Preparation of the isoflavones enriched fraction of *Trifolium pratense*

The powdered leaves of *T. pratense* were weighed (2 kg), macerated for 7 days in 40% hydroethanol solution (v/v) in plant:solvent ratio of 1:15 (MARTINY, 2016).

The ethanol from the extractive solution (40%) was eliminated in a rotary evaporator (Büchi, Switzerland), and the aqueous dispersion filtered through a 0.45

µm PVDF membrane. The supernatant was dried overnight in an oven at 40 °C and named enriched fraction. Later, a solution prepared using this fraction was submitted to quantification of formononetin and biochanin A by HPLC.

The loss on drying of the enriched fraction was determined according to the method described in the Brazilian Pharmacopoeia (ANVISA, 2010). The sample was weighed (~ 1g) in a weighing bottle, previously dried for 30 minutes, and left in an oven at 105 °C for 5 hours. After drying, it was placed in desiccator at room temperature and weighed until constant weight. The percentage of loss on drying was obtained by the equation:

$$W (\%) = \frac{W_1 - W_2}{W_a}$$

where, W_1 represent the weight of the bottle, W_2 weight of the bottle weighed with the sample after desiccation and W_a sample weight.

Determination of formononetin and biochanin A in the enriched fraction

Formononetin and biochanin A, the major isoflavones present in the enriched fraction from *T.pratense* were quantified using High Performance Liquid Chromatography (HPLC), according to the validated methodology described by Maito (2015) with minor modifications.

Table 1: Chromatographic conditions for the analysis of the isoflavones in enriched fraction of *Trifolium pratense*

Characteristics	Description
Chromatograph	Waters Alliance® e2695 - USA
Detector	UV/Vis – Photodiode array detector – 2998 PDA detector (data acquisition by Empower software)
Column	Phenomenex Synergi® Fusion-RP C18 (150 x 4.6 mm, 4 µm)
Pre-column	Phenomenex Fusion-RP C18 (4 x 3.0 mm)
Eluting system	Gradient (especificiedin Table 2)
Mobile phase	A: Acetonitrile: water: trifluoroacetic acid 20:80:0.01 (v/v/v) B: Acetonitrile: trifluoroacetic acid 100:0.1 (v/v)

Flow rate	0.8 mL.min ⁻¹
Injection volume	10.0 µL
Detection wavelength	260 nm

Table 2: Gradient system used in the liquid chromatography analysis of *Trifolium pratense* isoflavones

Time (min)	Phase A (%)	Phase B (%)
0.0 – 13.0	80-75	20-25
13.0 – 18.0	75-71.4	25-28.6
18.0 – 20.0	71.4-0	28.6-100
20.0 – 27.0	0-80	100-20

Purification of the isoflavones enriched fraction

Polyamide (1g;Roth, 0.315mm) was packed in a column (adapted glass syringe) of 10 mL (Genovese & Lajolo, 2001). The system was preconditioned with 20 mL of methanol and 60 mL of water. The enriched fraction was dispersed in water and applied at the top of polyamide column followed by washing with 20 mL of water. The isoflavones were eluted using 50 mL of methanol through the column. The collected methanol was evaporated and the residue resuspended in a mixture of acetonitrile:water (1:1), filtered and injected to proceed the quantification of formononetin and biochanin A.

Results and Discussion

Evaluation of plant material

The total amount of fresh *T. pratense* at the beginning of the work was around 55 kg and, after drying and ground, it resulted in 3.5 kg of material. We can observe, around 93% of the mass of the plant material corresponded to water or volatile substances, which indicates the considerable percentage of water in their leaves and

justify the importance of the drying step to guarantee the stability of the secondary metabolites present in the raw material.

Isoflavones enriched fraction

The macerate containing 40 % of ethanol in the solvent was removed using a rotary evaporator and the resulting aqueous dispersion was filtered through a 0.45 µm membrane and the supernatant was dried in an oven at 40°C. The precipitation of isoflavones took place in aqueous media due their poor solubility (KETUDAT CAIRNES & ESEN, 2010). This purification process yielded 8.7g of a brownish-green which was kept in a vial protected from light and stored in desiccator for further experiments. The loss on drying of the dried powder was 4.01%. This value was taken into account in the quantification of formononetin and biochanin A.

Determination of formononetin and biochanin A in the enriched fraction

The analysis of the content of formononetin and biochanin A in the enriched fraction of the aerial parts of *T. pratense* revealed, respectively, concentrations of 2.4 mg and 2.1 mg per gram of the enriched fraction, respectively. Comparing of these amounts with previously reported data, Saviranta and collaborators (2008), found, respectively, 7.47 mg and 9.69 mg per gram of formononetin and biochanin A, as well as Maito (2015), which found, respectively, 6.38 and 4.53 mg per gram. Without ruled out the differences among the purification methods, these differences can also be related to the fact that the raw materials, which had different origins, since that the authors did not report the isoflavone concentration into the raw material. As demonstrated by Sivesind and Seguin (2005) the environment has a considerable effect on red clover isoflavones concentration. The cultivars studied by them also differed in the concentration of isoflavones, where the total concentration of them (formononetin and biochanin A) varied between 0.15 and 1.67%.

Studies have shown that those levels may also vary according to the other factors including the seasons. A study conducted by Booth and co-workers (2006) revealed that leaves had higher isoflavone content than flowers and, in addition, it was

verified that formononetin and biochanin A had their concentration peaks in early September. According to Ramos and co-workers(2010), observing *T.pratense*, in its reproductive stageduring the spring, lower concentrations of isoflavones are found when compared to the winter time (the plant is in itvegetative stage).A study by Sivesing & Seguin (2005) and later confirmed by Saviranta (2008) indicates that if *T. pratense* is harvested in its initial stages, a higher yield of its main isoflavones is obtained.In the present study, the plants were collected at the end of november, therefore, the decrease in isoflavone concentration is consistent with that described in the literature.

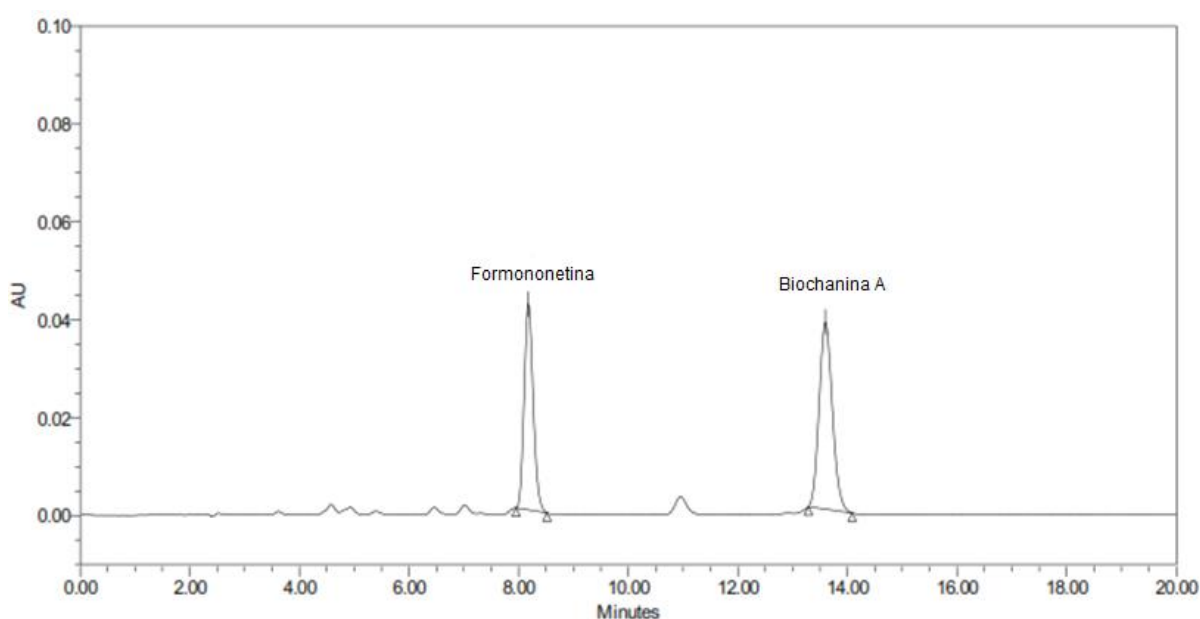


Figure 1: LC chromatogram obtained for enriched fraction.

Purification of the isoflavones enriched fraction

A next step of this research will be the incorporation of the isoflavone enriched fraction into a hydrogel formulation in a concentration of 0.1% of isoflavones. Once the amount of formononetin and biochanin A were low in the enriched fraction, the quantity of dry extract necessary to reach the equivalent amount needed in the hydrogel added to its brownish-green color, was unfeasible. Therefore, the increase of the isoflavones concentration in the enriched fraction, as well as the eliminating of brownish-green color constituents, became necessary. In order to reach this objective an attempt to purify this sample was carried out using polyamide column. The eliminating of the brownish-green-color substances was successfully reached. The final isoflavones

enriched fraction presented the slightly yellowish. However, the polyamide purification procedure did, not significantly improved the isoflavone concentration into the fraction. The final fraction presented 2.8 mg of formononetin and 2.7 mg of biochanin A per gram. Further investigation are still necessary to improve this concentration.

Conclusion

The proposed extraction and purification methods yielded an enriched fraction of *T. pretense* isoflavones, containing 0.28 (% w/w) of formononetin, and 0.27 (% w/w) of biochanin A. Although this concentration of the isoflavones-aglycones is still not enough for further skin permeations tests, the proposed method was efficient for eliminating the brownish-green-color from the fraction, improving the sensorial characteristics of the enriched fraction of isoflavones, making it suitable for cutaneous formulations.

References

ANVISA, F. C. **Farmacopeia Brasileira**, v. 2, n. 5: Brasília. 1:546 p. 2010.

BOOTH, N. L.; OVERK, C. R.; YAO, P.; TOTURA, S.; DENG, Y. F.; HEDAYAT, A. S.; BOLTON, J. L.; PAULI, G. F.; FARNSWORTH, N. R. Seasonal variation of red clover (*Trifolium pratense* L., Fabaceae) isoflavones and strogenic activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1277-1282, 2006.

BRASIL, R. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/renisus.pdf>. Acesso em, 11 abril 2017.

FLAMBÓ, D. **Atividades biológicas dos flavonoides: Atividade antimicrobiana**. 2013 (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa.

GENOVESE, M. I; LAJOLO, F.M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. **Ciência e Tecnologia do Alimento**, v .21, n. 1, p. 86-93, 2001.

IOVINE, A. *et al.* Comparative Analysis of the Photo-Protective Effects of Soy Isoflavones in Their Aglycone and Glucoside Forms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 16444-16456, 2012.

KETUDAT CAIRNS, J.; ESEN, A. β -Glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 20, p. 3389-3405, 2010.

KITAGAWA, S.; INOUE, K.; TERAOKA, R.; MORITA, S. Enhanced Skin Delivery of Genistein and Other Two Isoflavones by Microemulsion and Prevention against UV Irradiation-Induced Erythema Formation. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 3, p. 398-401, 2010.

LIM, T. G., *et al.* MLK3 is a direct target of biochanin A, which plays a role in solar UV-induced COX-2 expression in human keratinocytes. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, p. 896–903, 2013.

LIN, J. Y.; TOURNAS, J. A.; BURCH, J. A.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; ZIELINSKI, J. Topical isoflavones provide effective photoprotection to skin. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 24, p. 61-66, 2008.

LIN, V. C. *et al.* In Vitro and in Vivo Melanogenesis Inhibition by Biochanin A from *Trifolium pratense*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 75, n. 5, p. 914-918, 2011.

MAITO, T. F. **Multicomplexação de isoflavonas de *Trifolium pratense* L. com Hidroxipropil- β -ciclodextrina**. 2015. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia, Universidade federal do Rio Grande do Sul.

MANACH, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p.727-747, 2004.

MARTINY, S. **Desenvolvimento de fração enriquecida de isoflavonas de *Trifolium pratense* L. com emprego de tecnologias limpas e associação à β -ciclodextrina por *spray drying***. 2016. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia, Universidade federal do Rio Grande do Sul.

RAMOS, G. P. **Estudo químico de diferentes acessos de trevo-vermelho (*Trifolium pratense* L.) e atividades biológicas**. 2010. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia, Universidade federal do Rio Grande do Sul.

RENDA, G., *et al.* Comparative assessment of dermal wound healing potentials of various *Trifolium* L. extracts and determination of their isoflavone contents as potential active ingredients. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 423–432, 2013.

SAVIRANTA, N.M.M.; ANTONEN, M.J.; WRIGHT, A.V.; KARJALAINEN, R.O. Red Clover (*Trifolium pratense* L.) isoflavones: determination of concentrations by plant stage, flower colour, plant part and cultivar. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 125-132, 2008.

SILVA, L. M. Development and Validation of a Simple and Rapid Liquid Chromatography Method for the Determination of Genistein in Skin Permeation Studies. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 11, p. 1986-1990, 2012.

SIVESIND, E.; SEGUIN, P. Effects of the environment, cultivar, maturity, and preservation method on red clover isoflavone concentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p. 6397–6402,2005.

SIVESING, E.; SEGUIN, P. Effects of the environment, cultivar, maturity, and preservation method on red clover isoflavone concentration. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 53, p. 6397-6402, 2005.

WIDYARINI, S.; SPINKS, N.; HUSBAND, A. J.; REEVE, V. E. Isoflavonoid Compounds from Red Clover (*Trifolium pratense*) Protect from Inflammation and Immune Suppression Induced by UV Radiation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 3, p. 465–470, 2001.

VITALE, D. C.; PIAZZA, C.; MELILLE, B.; DRAGO, F.; SALOMONE, S. Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. **European Journal Drug Metabolism and Pharmacokinet**, v. 38, p. 15-25, 2013

A seguir encontra-se disposto o manuscrito intitulado "**Skin permeation/retention of semi-solid formulations containing the isoflavones formononetin and biochanin A**", a ser submetido para publicação. Este artigo apresenta estudo de permeação cutânea de hidrogéis contendo as isoflavonas biochanina A e formononetina. O ensaio foi utilizado o modelo de células de Franz e o conteúdo de isoflavonas foi quantificado nas diferentes camadas da pele usando um método de HPLC-PDA validado. Os resultados encontrados nesse trabalho serão apresentados dentro das normas para ser submetido à revista Pharmaceutical and Biomedical Analysis.

O texto completo do Capítulo 3, que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 61-88, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A deficiência de estrogênio após a menopausa resulta em alterações e aceleração do envelhecimento da pele. Sua deficiência deixa a pele mais fina, causa diminuição do colágeno, da elasticidade e da vascularização e aumento das rugas e desidratação (THORNTON, 2013). Ainda que a relação entre os estrógenos e a bioquímica cutânea não esteja compreendido, o uso de terapia de reposição hormonal tem mostrado que todos esses sintomas associados ao envelhecimento são diminuídos, podendo-se assim, retardar o processo (HARRIS, 2009).

Os fitoestrogênios são substâncias de origem vegetal com estrutura química e funções semelhantes às dos estrogênios, podendo se ligar aos receptores estrogênicos (ER α e ER β) (GIORNO, 2010). Neste contexto, a formononetina e a biochanina A ganham destaque devido à sua similaridade estrutural com o 17 β -estradiol e consequente atividade estrogênica, despertando interesse em avaliar o potencial de sua utilização na prevenção do envelhecimento cutâneo.

A administração tópica de substâncias tais como isoflavonas requer o conhecimento de suas propriedades químicas, físico-químicas e biológicas, uma vez que estas devem penetrar na pele em concentrações ativas, além de ser capaz de alcançar o sítio de ação. As isoflavonas livres (agliconas) caracterizam-se por uma reduzida hidrossolubilidade e sua incorporação em formas farmacêuticas cosméticas de natureza hidrofílica necessita de estratégias que aumentem sua hidrossolubilidade. A principal proposta desse trabalho foi obter uma fração enriquecida em isoflavonas de *T. pratense* L. e avaliar a permeação cutânea destas agliconas majoritárias, formononetina e biochanina A, individualmente e associadas em misturas, incorporadas em gel de HPMC, adicionadas ou não de ciclodextrinas (HP β CD ou M β CD) com vistas ao desenvolvimento de produtos para prevenção do envelhecimento cutâneo. Com estes objetivos a dissertação foi organizada em três capítulos.

O primeiro capítulo deste trabalho foi dedicado à revisão bibliográfica do tema em questão. Para contextualizar a obtenção de uma fração enriquecida em isoflavonas agliconas do trevo-vermelho e o estudo de permeação cutânea delas, foi apresentado um breve histórico sobre os aspectos botânicos e químicos da espécie. Em seguida, foi abordada a atividade estrogênica das isoflavonas, estrutura e envelhecimento da pele e a utilização de ciclodextrinas com a finalidade de aumentar a hidrossolubilidade e de promover a permeação cutânea das substâncias de

interesse. O capítulo forneceu subsídios que demonstraram que as isoflavonas apresentam uma importante atividade estrogênica capaz de melhorar o aspecto cutâneo de mulheres pós menopausa e, além disso, demonstrou que para alcançar esse efeito estrogênico é necessária a promoção da permeação da formononetina e da biochanina A até a camada basal da epiderme e derme, com finalidade de alcançar o maior número de receptores de estrogênio. Recentemente trabalhos realizados pelo grupo evidenciaram a viabilidade da obtenção de fração enriquecida de *T. pratense* e o uso de ciclodextrinas como agente de promoção da penetração cutânea de isoflavonas. Ao final desse capítulo teórico colocou-se em evidência a proposta formulada para a presente dissertação, que trouxe um aspecto inédito: a quantificação de formononetina e biochanina A em diferentes camadas da pele, associadas ou não à HP β CD e M β CD.

O segundo capítulo, tratou da obtenção de fração enriquecida de *T. pratense* L. Estudos recentes de nosso grupo de pesquisa (MARTINY, 2016) evidenciaram a viabilidade da obtenção de fração enriquecida de *T. pratense*. No entanto, quando a mesma metodologia foi empregada para obtenção de fração enriquecida para a via cutânea, observou-se que o produto não apresentava concentração suficiente de isoflavonas para viabilizar os testes biológicos necessários, tampouco características sensoriais apropriadas para a referida via. A fração continha a concentração de 2,4 mg formononetina e 2,1 mg biochanina A por grama e cor marrom-esverdeada. Com a finalidade de aumentar a concentração de isoflavonas para posterior incorporação em gel hidrofílico, bem como de eliminar constituintes que conferiam a cor marrom-esverdeada foi realizada uma purificação da fração com uso de poliamida. O aumento da concentração ainda não foi satisfatório, alcançando 2,8 mg formononetina e 2,7 mg de biochanina A por grama de fração.

No entanto, o uso da poliamida foi capaz de eliminar a coloração marron-esverdeada intensa deixando-a amarelo claro. Este aspecto revela-se de suma importância para o desenvolvimento de cosméticos contendo essas isoflavonas extraídas de *T. pratense*. Estudos futuros, mais aprofundados, visando aumentar a concentração de isoflavonas na fração revelam-se ainda necessários com vistas na viabilização de testes de permeação cutânea.

No terceiro capítulo, foi realizada de forma inédita a permeação cutânea de formononetina e biochanina A isoladas, com base na hipótese destas apresentarem

grande atividade para a prevenção do envelhecimento cutâneo. Com vistas à subsidiar o estudo, foi desenvolvida metodologia bioanalítica para quantificação dessas isoflavonas em diferentes camadas da pele (estrato córneo, epiderme e derme). Foi realizada também a validação do método para as matrizes complexas que foram objeto de análise. Os parâmetros cromatográficos utilizados para as análises foram estabelecidos a partir de experimentos prévios e com base em estudos anteriores de quantificação de isoflavonas (MAITO, 2015).

A reduzida hidrossolubilidade das isoflavonas representa um fator limitante ao seu emprego em formulações biofarmacêuticas e cosméticas. Com base em estudos anteriores do grupo de complexação de isoflavonas de *T. pratense* com HP β CD e β CD, onde não foram caracterizados sistemas de inclusão, optou-se por apenas adicionar as ciclodextrinas HP β CD e M β CD no gel hidrofílico afim de analisar se haveria um aumento da permeação ou não.

O método bioanalítico desenvolvido mostrou-se específico. A base hidrofílica em que as isoflavonas foram incorporadas, as tiras de fita adesiva utilizadas para remover o estrato córneo e os componentes da pele apresentaram tempos de retenção diversos aos da formononetina e da biochanina A, não interferindo em suas análises. Tais características revelaram a excelente especificidade do método. Além disso, o método foi validado segundo os compêndios oficiais, FDA (2013) e ICH (2001), mostrando-se linear, exato, preciso e robusto na faixa de 0,1 a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Foram desenvolvidas três formulações diferentes, contendo as isoflavonas individualmente ou associadas e utilizando ou não ciclodextrinas (HP β CD ou M β CD). Os resultados obtidos na avaliação da permeação cutânea revelaram que as isoflavonas permearam mais quando incorporadas individualmente na base, especialmente a formononetina. A biochanina A apresentou maior capacidade de permeação do que a formononetina, alcançando concentrações na epiderme cerca de 2,7 vezes maiores. O uso de ciclodextrinas aumentou significativamente a permeação da formononetina, tanto na epiderme quanto na derme. Para a biochanina A, apenas a retenção na epiderme foi aumentada com a presença de ciclodextrinas. A HP β CD foi a ciclodextrina que apresentou os melhores resultados de promoção da permeação da formononetina, enquanto para a biochanina, as duas ciclodextrinas aumentaram na mesma proporção a sua concentração na epiderme. Quando incorporadas em misturas (1:1) no hidrogel, a formononetina apresentou menor retenção, tanto na

epiderme quanto na derme. Contrariamente, a biochanina A apresentou retenção semelhante àquela apresentada quando foi incorporada isoladamente no hidrogel. Em presença de ciclodextrinas não foi observado efeito significativo das ciclodextrinas na promoção da permeação cutânea das isoflavonas nas misturas, exceto para a formononetina, na epiderme.

Em resumo, o capítulo III demonstrou que a formononetina e a biochaninaA são capazes de permear através das camadas da pele, sendo majoritariamente retidas na epiderme e na derme, onde a presença de receptores estrogênicos (ER α e ER β) é maior, revelando o seu potencial uso em preparações cosméticas destinadas à prevenção do envelhecimento cutâneo. As ciclodextrinas apresentaram acentuado efeito promotor da permeação cutânea apenas da formononetina especialmente na ausência de biochanina A. Além disso, o capítulo descreveu a validação de um método por CLAE que se mostrou adequado para quantificação de formononetina e biochaninaA em estudos de permeação de formulações de hidrogel em pele suína.

5. CONCLUSÕES

- O método utilizado para obtenção da fração de isoflavonas-agliconas presentes em partes aéreas de *T. pratense* L. resultou em fração mais concentrada, mas não suficiente para viabilização de testes de permeação cutânea, no entanto, o método obteve êxito na melhoria das características visuais da fração enriquecida em isoflavonas, eliminando a sua cor marrom-esverdeada, tornando-a adequada para formulações de uso cutâneo.

- A validação da metodologia bioanalítica para quantificação de formononetina e biochanina A por CLAE nas diferentes camadas da pele mostrou-se linear, precisa, exata, específica e robusta nas condições testadas, cumprindo a sua finalidade para aplicação em estudos de permeação cutânea em pele de orelha de suíno a partir de formulações de hidrogel de HPMC.

- Os testes de permeação cutânea das isoflavonas em pele de orelha de suínos revelaram que a formononetina e biochanina A são capazes de permear todas as camadas da pele até a derme. No entanto, esta capacidade é mais acentuada para a biochanina A do que para a formononetina, sendo que, a última permeia melhor quando em ausência de biochanina A.

- O uso das ciclodextrinas HP β CD e M β CD aumentaram a concentração total de isoflavonas na pele, especialmente da formononetina isolada, sendo os melhores resultados de permeação obtidos com o uso de HP β CD.

Em suma, os resultados inéditos do presente trabalho revelaram a potencialidade do uso das isoflavonas formononetina e biochanina A em formulações de uso cutâneo, visando a prevenção do envelhecimento cutâneo. O emprego de promotores de permeação como as ciclodextrinas revelaram-se úteis especialmente para o emprego da formononetina na forma isolada. Para o uso de frações enriquecidas em isoflavonas a partir de *Trifolium pratense* nestes produtos, ainda são necessários estudos adicionais que permitam a obtenção de fração contendo maior conteúdo das mesmas.

6. REFERÊNCIAS

AUYEUNG, K. K.; LAW, P. C.; KO, J. K. Novel anti-angiogenic effects of formononetin in human colon cancer cells and tumor xenograft. **Oncology Reports**, v. 28, p. 2188-2194, 2012.

BABER R.; TEMPLEMAN, C.; MORTON T.; KELLY, G.; WEST, L. Randomized placebo controlled trial of an isoflavone supplement and menopausal symptoms in women. **Climacteric**, v.2, p.85-92, 1999.

BARNES, J.; ANDERSON, L.; PHILLIPSON, J. Fitoterápicos. **Porto alegre: Artmed**, 2012.

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

BENNETS, H. W.; UNDERWOOD, E. J.; SHIER, F. L. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia, Aust. **Veterinary Journal**, v. 22, p. 2–12, 1946.

BIANCHI, S. E. **Associação de cumestrol à hidroxipropil- β -ciclodextrina: desenvolvimento, caracterização, avaliação da permeação cutânea e do efeito cicatrizante**. 2014. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia, Universidade federal do Rio Grande do Sul.

BIANCHI, S. E.; TEIXEIRA, H. F.; KAISER, S.; ORTEGA, G. G.; SCHNEIDER, P. H.; BASSANI, V. L. A bioanalytical HPLC method for coumestrol quantification in skin permeation tests followed by UPLC-QTOF/HDMS stability-indicating method for identification of degradation products. **Journal of Chromatography B**, v. 1020, p. 43-52, 2016.

BORGHETTI, G. S. et al. Daidzein/cyclodextrin/hydrophilic polymer ternary systems. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 37, n. 8, p. 886-893, 2011.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrin as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 645-666, 2007.

CALLEJA-AGIUS, J; BRINCAT, M; BORG, M. Skin connective tissue and ageing. **Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v.27, p. 727–740, 2013.

CEGIELA, U.; FOLWARCZNA, J.; PYTLIK, M.; ZGÓRKA, G. Effects of Extracts from *Trifolium medium* L. and *Trifolium pratense* L. on Development of Estrogen Deficiency-Induced Osteoporosis in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 11 pages, 2012.

CHALLA, R. et al. Cyclodextrins in Drug Delivery: Na Updated Review. **Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 6, n. 2, p. 329-357, 2005.

CHUA, L. S., LEE, S. Y., ABDULLAH, N., SARMIDI, M. R. Review on *Labisia pumila* (Kacip Fatimah): bioactive phytochemicals and skin collagen synthesis promoting herb. **Fitoterapia**, v. 83, p. 1322–1335, 2012.

CHUNDI, V., *et al.* Biochanin-A attenuates neuropathic pain in diabetic rats. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, v. 7, p. 231-237, 2016

CLAPAUCH, *et al.* Fitoestrogênios: posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 6, p. 670-695, 2002.

CUNHA, A. P. **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbernkian, 2005. 670 p.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 1023-1035, 2004.

DEL VALLE, E. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process biochemistry**, v. 39, n.1-2, p.1033-1046, 2004.

DIEL, P.; KURRAT, A.; ODEN, C.; HANKE, L. Risk and benefit of nutritional supplement for the treatment of postmenopausal complains. **Gesundheitsforschung -Health Research - Health Protection**, v. 60, n. 3, p. 297-304, 2017.

ELLISON, N. W. *et al.* Molecular phylogenetics of the clover genus (*Trifolium-Leguminosae*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 39, n. 3, p. 688-705, 2006.

FDA. **Food and Drug Administration (FDA), Center for drug evaluation and research, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation: 1-34 p.** 2013.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; SILVA, F. C. Pontencialidade e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 623-638, 2009.

FRAME, J.; CHARLTON, J.F.L.; LAIDLAW, A.S. **Temperate forage legumes**, Reino Unido: Biddles, Guildford and King's Lynn. 1997, p. 181-189.

FRANCO, C. *et al.* Studies on coumestrol/ β -cyclodextrin association: Inclusion complex characterization. **International journal of pharmaceuticals**, v. 369, n. 1, p. 5-11, 2009.

GERSON, J. *et al.* **Fundamentos da Estética 3: Ciências da pele**. Cengage Learning Editora, 2011.

GIORNO, C. D., *et al.* Efeitos do *Trifolium pratense* nos sintomas climatéricos e sexuais na pós-menopausa. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 5, p. 558-562, 2010.

GOPAUL, R., KNAGGS, H.E., LEPHART, E.D. Biochemical investigation and gene analysis of equol: a plant and soy-derived isoflavonoid with antiaging and antioxidant properties with potential human skin applications. **Biofactors** v. 38, p. 44–52, 2012.

GUEDES, F. L., *et al.* Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, p. 220-225, 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**, v. 53, p. 555-68, 2005.

HAPIOT, F., TILLOY, S., MONFIER, E. Cyclodextrins as supramolecular hosts for organometallic complexes. **Chemical Reviews**, v. 106, p. 767–781, 2006.

HARRIS, M. I. **Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento**. Editora Senac São Paulo, 2009.

International Conference on Harmonization (ICH). Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. 2001, 1-25.

International Conference on Harmonization (ICH). Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 2005, 1-13.

JEANG, C. L.; LIN, D.G.; HSIEH, S.H. Characterization of cyclodextrin glycosyltransferase of the same gene expressed from *Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, and *Escherichia coli*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6301–6304, 2005.

KITAGAWA, S.; INOUE, K.; TERAOKA, R.; MORITA, S. Enhanced Skin Delivery of Genistein and Other Two Isoflavones by Microemulsion and Prevention against UV Irradiation-Induced Erythema Formation. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 3, p. 398-401, 2010.

KLEJDUS, B.; STERBOVA, D.; STRATIL, P.; KUBAN, V. Identification and characterization of isoflavones in plant material by HPLC-DAD-MS tandem. **Chemické Listy**, v. 97, p. 530–539, 2003.

KNIGHT, D. C.; EDEN, J. A. A review of the clinical effects of phytoestrogens. **Obstetrics and Gynecology**, v. 87, p. 897-904, 1996.

KO, K. P. Isoflavones: Chemistry, Analysis, Functions and Effects on Health and Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 17, p. 7001-7010, 2014.

LANGE, O. **Caracterização isoenzimática de oito espécies do gênero *Trifolium* L., ocorrentes no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 2001. 188f. Dissertação (Mestrado).

LEE, M. H.; YU, M. W.; KAP, L.; LIN, C. C. Enhancement of the Encapsulation and Transmembrane Permeation of Isoflavone-Containing Red Clover Extracts in Phospholipid-Based Microemulsions Using Different Extraction Processes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 9489-9495, 2009.

Leguminosae in The Plant List (2013). Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/>. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Leguminosae/>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2017.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005. 577p.

LIM, T. G., *et al.* MLK3 is a direct target of biochanin A, which plays a role in solar UV-induced COX-2 expression in human keratinocytes. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, p. 896–903, 2013.

LIN, J. Y.; TOURNAS, J. A.; BURCH, J. A.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; ZIELINSKI, J. Topical isoflavones provide effective photoprotection to skin. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 24, p. 61-66, 2008.

LIN, V. C. *et al.* In Vitro and in Vivo Melanogenesis Inhibition by Biochanin A from *Trifolium pratense*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 75, n. 5, p. 914-918, 2011.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrines as pharmaceutical excipients. **Pharmaceutical Technology Europe**, v. 5, p. 26-34, 1997.

LOFTSSON, T.; DUCHENE, D. Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 96, p. 2532-2546, 2007.

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, p. 15-39, 2001.

MAITO, T. F. **Multicomplexação de isoflavonas de *Trifolium pratense* L. com Hidroxipropil- β -ciclodextrina**. 2015. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia, Universidade federal do Rio Grande do Sul.

MARTINY, S. **Desenvolvimento de fração enriquecida de isoflavonas de *Trifolium pratense* L. com emprego de tecnologias limpas e associação à β -ciclodextrina por *spray drying***. 2016. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia, Universidade federal do Rio Grande do Sul.

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

MLYNARCZUK, J.; WRÓBEL, M. H.; KOTWICA, J. Adverse Influence of Coumestrol on Secretory Function of Bovine Luteal Cells in the First Trimester of Pregnancy. **Environmental Toxicology**, v. 10, p. 1-8, 2011.

MUELLER, S. O. Overview of in tools to asses the estrogenic and antiestrogenic activity of phytoestrogens. **Journal of Chromatography B.**, v. 777, p. 155-165, 2002.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 238–250, 2014.

MYERS, S.P.; VIGAR, V. Effects of a standardised extract of *Trifolium pratense* (Promensil) at a dosage of 80 mg in the treatment of menopausal hot flushes: A systematic review and meta-analysis. **Phytomedicine**, v. 24, p. 141–147, 2017.

NEVES, M. V.;da SILVA, T. M.; LIMA, E. O.; OLIVEIRA, E. J. Isoflavone formononetin from red própolis acts as a fungicide against *Candida sp.* **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 159-166, 2016.

OKIMOTO, K. *et al.* The interaction of charged and uncharged drugs with neutral hydroxypropyl- β -cyclodextrin and anionically charged sulfobutylether- β -cyclodextrins. **Pharmaceutical Research**, v. 13, p. 256-264, 1996.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; COELHO, P. Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. **Revista da Faculdade de Ciências e Saúde**, v. 06, p. 70-83, 2009.

PATRIARCA, M.T., *et al.* Hyaluronic acid concentration in postmenopausal skin after topical estradiol and genistein treatment: a double-blind, randomized clinical trial of efficacy. **Menopause**, v. 20, p. 336–341, 2013. facial

PHILLIPS, T. J.; DEMIRCAY Z.; SAHU M. Hormonal effects on skin aging. **Clinics and Geriatric Medicine Journal**, v. 17, p. 661–672, 2001.

PINHO, E. *et al.* Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 121-135, 2014.

PREEDY, V. R. Isoflavones: chemistry, analysis, function and effects. **The Royal Society of Chemistry**, 2013.

RAINE-FENNING, N. J. *et al.* Skin Ging and Menopause: Implications and Treatment. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 4(5), p. 371-178, 2003.

REBELLO, T. **Guia de Produtos Cosméticos**, 6 ed. São Paulo: Senac, p. 131132, 2005.

RENDA, G., *et al.* Comparative assessment of dermal wound healing potentials of various *Trifolium L.* extracts and determination of their isoflavone contents as potential active ingredients. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 423–432, 2013.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia Aplicada a Dermoestética**, 2 ed. São Paulo: Pharmabooks, v. 17; p. 206-212, 2010.

RODAL, S. K.; *et al.* Extration of cholesterol with methyl- β -cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. **Molecular biology of the cell**, v. 10, p. 961-974, 1999.

ROUTRAY, W.; ORAT, V. Microwave-Assisted Extraction os Flavonoids: A Review. **Food Bioprocess Technol**, v. 5, p. 409-424, 2011.

SAMUELSSON, G. **Drugs of Natural Origin: a textbook of pharmacognosy**, 4. ed. Estocolmo: Apotekarsocieteten, 1999, 551p.

SATOR, P. G.; SCHIMIDT, J. B.; SATOR, M. O.; HUBER, J. C.; HÖNIGSMANN, H. The influence of hormone replacement therapy on skin ageing. A pilot study. **Maturitas**, v. 39, p. 43–55, 2001.

SCHMID, D.; ZULLI, F; NISSEN, H-P.; PRIEUR, H. Penetration and metabolism of isoflavones in human skin. **Cosmetics and Toiletries**, v. 118, p. 71-74, 2003.

SETCHELL, K. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.68, p.1333-1346, 1998.

SILVA, L. M. Development and Validation of a Simple and Rapid Liquid Chromatography Method for the Determination of Genistein in Skin Permeation Studies. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 11, p. 1986-1990, 2012

SIMÃO, A. N.C. et al. Importância da ingestão de soja nos sintomas do climatério, osteoporose e doenças cardiovasculares. **Arquivo de Ciências da Saúde Unipar**, Umuarama, v. 12, n. 1, p. 67-75, 2008.

SON, E.D.; LEE, J. Y.; KIM, M.S.; LEE, B.G.; CHANG, I.S. Topical application of 17 β estradiol increases extracellular matrix protein sunthesis by stimulating TGF β signaling in aged human skin in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 124, p. 1149 - 1161, 2005.

SPEROFF, L. The perimenopause: definitions, demography, and physiology. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 29, p. 397-410, 2002.

SUVARNA, V.; GUJAR, P.; MURAHARI, M. Complexation of phytochemicals with cyclodextrin derivates – An insight. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 1122-1144, 2017.

TAYLOR, N.L.; QUESENBERRY, K.H. Red Clover Science. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**, 1996, 226p.

THOMPSON, D.O. Cyclodextrins-Enabling excipientes: Their present and future use in pharmaceuticals. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.14, p.1-104, 1997.

THORNTON, M.J. Estrogens and aging skin. **Dermatoendocrinology**, v. 5, p. 264–270, 2013.

Trifolium in UniProt: the universal protein knowledgebase Nucleic Acids Res. 45: D158-D169 (2017). Disponível em: <<http://www.uniprot.org/taxonomy/3898>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2017a.

Trifolium in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB101182>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2017b.

TRIMARCO, V. *et al.* Effects of a new combination of nutraceuticals on postmenopausal symptoms and metabolic profile: a crossover, randomized, double-blind trial. **International Journal of Women's Health**, v. 8, p. 581-587, 2016.

UEKAMA, K.; *et al.* Cyclodextrin drug carrier systems. *Chem. Rev.*, v. 98. P. 2045-2076, 1998.

WIDYARINI, S.; SPINKS, N.; HUSBAND, A. J.; REEVE, V. E. Isoflavonoid Compounds from Red Clover (*Trifolium pratense*) Protect from Inflammation and Immune Suppression Induced by UV Radiation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 3, p. 465–470, 2001.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetrations enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 603-618, 2004.

WINES, N.; WILSTEED, E. "Menopause and Skin", **Australian Journal of Dermatology**, v. 42, p. 149-160, 2001.

WU, Y.; ZHANG, X.; LI, Z.; YAN, H.; QIN, J.; LI, T. Formononetin inhibits human bladder cancer cell proliferation and invasiveness via regulation of miR-21 and PTEN. **The Royal Society of Chemistry Journal**, DOI: 10.1039/c6fo01535b, 2017.

XAVIER, C. R. *et al.* Improvement of genistein content in solid genistein/cyclodextrin complexes β . **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 587-590, 2010.

YANG, Y.; ZHAO, Y.; AI, X.; CHENG, B.; LU, S. Formononetin suppresses the proliferation of human non-small cell lung cancer through induction of cell cycle arrest and apoptosis. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, p. 8453-8461, 2014.

ZAND, S. R.; JENKINS, D. J.; DIAMANDIS, E.P. Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 62, p. 35-49, 2000.

ZARMOUH, N. O.; EYUNNI, S. K.; SOLIMAN, K. F. The Benzopyrone Biochanin-A as a reversible, competitive, and selective monoamine oxidase B inhibitor. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, p. 1-13, 2017.

ZHANG, X.; BI, L.; YE, Y.; CHEN, J. Formononetin induces apoptosis in PC-3 prostate cancer cells through enhancing the Bax/Bcl-2 ratios and regulating the p38/Akt pathway. **Nutrition and Cancer**, v. 66, p. 656-661, 2014.

ZIA, V.; RAJEWSKI, R. A.; STELLA, V. J. Effect of cyclodextrin charge on complexation of neutral and charged substrates: Comparison of sulfobutylether- β -cyclodextrin to hydroxypropil- β -cyclodextrin. **Pharmaceutical Research**, v.18, p. 668-673, 2001.

ZIME-DIAWARA, H. Understanding the interactions between artemisinin and cyclodextrins: spectroscopic studies and molecular modeling. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 74, p. 305–315, 2012.

ZUANAZZI, J, A.; MONTANHA, J, A. Flavonoides. In: SIMÕES, et al (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Açegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/Ed. Da UFSC, 2003.