

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

**Avaliação de atividade cicatrizante de fração rica em isoflavonas da soja
incorporada em nanoemulsões dispersas em hidrogéis: estudos *in vitro* e *in vivo***

PATRICIA INÊS BACK

Porto Alegre, 2019

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

Avaliação de atividade cicatrizante de fração rica em isoflavonas da soja incorporada em nanoemulsões dispersas em hidrogéis: estudos *in vitro* e *in vivo*

Dissertação apresentada por
PATRICIA INÊS BACK para
obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gilsane Lino von Poser

Porto Alegre, 2019

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28.03.2019, pela Banca Examinadora constituída por:

Dr^a. Gabriela Meirelles

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Karina Paese

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Marilise Escobar Burguer

Universidade Federal de Santa Maria

Back, Patricia Inês

Avaliação de atividade cicatrizante de fração rica em isoflavonas da soja incorporada em nanoemulsões dispersas em hidrogéis: estudos in vitro e in vivo / Patricia Inês Back. -- 2019.

123 f.

Orientador: Helder Ferreira Teixeira.

Coorientadora: Gilsane Lino von Poser.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Isoflavonas agliconas da soja. 2. Nanoemulsões. 3. Hidrogéis. 4. Atividade cicatrizante. 5. Estudos in vitro e in vivo. I. Teixeira, Helder Ferreira, orient. II. von Poser, Gilsane Lino, coorient. III. Título.

Este trabalho foi subvencionado pela CAPES e realizado nas dependências do Laboratório de Desenvolvimento Galênico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, do Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e do Laboratório de Nanotecnologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal do Rio Grande.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira pelo acolhimento, disponibilidade e pela confiança a mim depositada. Agradeço ainda pela compreensão e flexibilidade em diversos momentos. À prof^a. Dr^a. Gilsane Lino von Poser pela coorientação, disponibilidade e ajuda ao longo desse trabalho.

A todos os colegas do LDG agradeço imensamente a amizade, carinho, risadas e companhia. À Mairique e Simony, agradeço pelos momentos de descontração, amizade e conselhos. À Lucélia pelo companheirismo e ajuda nos experimentos *in vivo*. À Flávia pela disposição, paciência e prontidão em ajudar. À Tainá pelos ensinamentos transmitidos e paciência. À Marina pelos conselhos e orientação mesmo que a distância. Aos demais professores do laboratório agradeço o apoio, carinho e honra do convívio.

Ao grupo de pesquisa da FURG no qual tive a oportunidade de crescer e dividir experimentos. Agradeço pelo carinho, amizade, ajuda e enriquecimento desse trabalho.

Às professoras colaboradoras desse projeto pela oportunidade de agregar conhecimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida para a realização deste trabalho.

As minhas amigas e, em especial, à Graziela e Júlia que acompanharam de perto a minha caminhada no mestrado. Agradeço pelas angústias divididas, apoio em todos os momentos, conselhos, momentos de descontração e amizade incondicional.

Ao Ben que, apesar da distância, me forneceu total apoio e incentivo para a realização dos meus objetivos. Obrigada pelo amor, compreensão, torcida e paciência.

A minha segunda família por todo o apoio, cuidados e amor. Obrigada ainda por terem conferido a mim a grandeza de dois afilhados que me proporcionaram grandes momentos de felicidade, amor, leveza e descontração.

Aos meus pais, Célia e João, aos quais serei eternamente grata pelo amor, educação, ajuda incansável e por me possibilitar conforto para o seguimento dos meus sonhos. A minha irmã por se fazer presente na minha vida.

A Deus por ter me permitido concluir mais esta etapa.

A todos que de alguma maneira colaboraram, torceram ou incentivaram o meu crescimento durante estes dois anos.

RESUMO

Avaliação de atividade cicatrizante de fração rica em isoflavonas da soja incorporada em nanoemulsões dispersas em hidrogéis: estudos *in vitro* e *in vivo*

É crescente o número de novos casos de pacientes com feridas crônicas no mundo, levando a uma busca contínua por novos produtos para o tratamento dessas enfermidades. Feridas cutâneas são caracterizadas pela ruptura da integridade da pele, podendo atingir somente a epiderme ou levar a um dano até o tecido subcutâneo. Para as mulheres, além de estarem relacionadas a comorbidades, como diabetes, e envelhecimento, tem-se demonstrado ainda a dificuldade de cicatrização após a menopausa devido a uma redução significativa dos níveis de estrogênio. Isoflavonas da soja são consideradas, por sua vez, fitoestrógenos com capacidade antioxidante e anti-inflamatória descritas. No entanto, a fim de obter isoflavonas agliconas, suas formas ativas, são necessárias suas hidrólises. Logo, o objetivo dessa dissertação foi obter uma fração enriquecida em isoflavonas agliconas e incorporá-la a nanoemulsões e hidrogéis, visando avaliar seu perfil de retenção/permeação cutânea em pele íntegra e lesada, seguida da avaliação de uma potencial atividade cicatrizante *in vitro* e *in vivo*. Formulações de tamanho manométrico, baixo índice de polidispersão e elevado potencial zeta em módulo foram obtidas. Em estudos *in vitro* utilizando células de Franz, foram observados uma maior retenção de isoflavonas nas camadas superiores da pele íntegra quando em nanoemulsões e um aumento significativo na retenção das mesmas com a sucessiva remoção das camadas da pele. Estudos com queratinócitos *in vitro* demonstraram ausência de citotoxicidade e maior proliferação e migração celular para concentrações de 0,5 µg/mL quando a fração foi incorporada a nanoemulsões. *In vivo*, os efeitos cicatrizantes em modelo murino foram principalmente relacionados à proteção lipídica das isoflavonas, à atividade anti-inflamatória e ao aumento da taxa de re-epitelização no tecido lesionado. Dessa forma, nesse trabalho foi constatado a potencial utilização das formulações desenvolvidas como possíveis produtos para a cicatrização de feridas cutâneas para o modelo utilizado.

Palavras-chaves: Soja, Isoflavonas agliconas, Nanoemulsões, Hidrogéis, Atividade cicatrizante, Estudos *in vitro* e *in vivo*.

ABSTRACT

Evaluation of wound healing activity of soybean isoflavone-rich fraction incorporated into nanoemulsions dispersed in hydrogels: *in vitro* and *in vivo* studies

The number of patients with chronic wounds in the world is increasing, leading to a continuous search for new products for the treatment of these illnesses. Cutaneous wounds are characterized by a rupture in skin integrity, which can only reach the epidermis or lead to larger damages in the subcutaneous tissue. For women, besides being related to co-diseases, such as diabetes, and aging, it has also been demonstrated that healing is more difficult after menopause, due to a significant reduction in estrogen levels. Soybean isoflavones are phytoestrogens with described antioxidant and anti-inflammatory properties. However, in order to obtain isoflavone aglycones, their active forms, hydrolysis is required. Therefore, the objective of this dissertation was to obtain a soybean isoflavone-rich fraction and to incorporate it into nanoemulsions and hydrogels aiming to evaluate its skin retention/permeation in intact and injured skin, followed by a potential *in vitro* and *in vivo* wound healing activity. Formulations with nanometric sizes, low polydispersity index, and high zeta potential in modulus were obtained. *In vitro* studies using Franz diffusion cells showed a higher isoflavones retention in the upper layers of intact skin when in nanoemulsions, and a significant increase in the compounds retention in skin with the successive removal of skin layers. Studies with keratinocytes *in vitro* demonstrated absence of cytotoxicity and an increase in cell proliferation and migration when the fraction was incorporated into nanoemulsions in concentrations of 0.5 µg/mL. *In vivo*, the wound healing effects in a murine model were mainly related to a lipid protection by the isoflavones, to their anti-inflammatory activity, and an increase of re-epithelialization rate at the injured tissue. Therefore, it was shown a potential use of the developed formulations as possible products for the type of cutaneous wound healing testing in our studies.

Keywords: Soybean; Isoflavone aglycones; Nanoemulsions; Hydrogels; Wound healing; *In vitro* and *in vivo* studies

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Esquema demonstrando a epiderme e derme adaptado de Farage e colaboradores (2007)	30
Figura 2. Esquema demonstrando a derme adaptado de Farage e colaboradores (2007)	31
Figura 3. Esquema demonstrando possíveis rotas de permeação através do estrato córneo adaptado de Czajkowska-ko e colaboradores (2019)	33
Figura 4. Esquema representando as etapas do processo cicatrizante adaptado de Gupta e colaboradores (2019)	40
Figura 5. Estrutura química das isoflavonas agliconas	46

CAPÍTULO II

Figure 1. Microscopies obtained by transmission electron microscopy, showing in A) NE _{IAF} , and B) HNE _{IAF}	68
Figure 2. A) Rheological profile and B) viscosity of hydrogels	70
Figure 3. Release rate profiles from NE _{IAF} and HNE _{IAF} , where A) shows the release profile of total isoflavones from formulations, while B) shows genistein release profile	71
Figure 4. Retention/permeation profile of total isoflavones and genistein from control solution, NE _{IAF} , and HNE _{IAF} on A) intact skin, B) after tape stripping, and C) absence of epidermis	72
Table 5. HaCaT cells (immortalized human keratinocytes) qualitative evaluation of morphological alterations and PI incorporation after 24 h of treatment with IAF and NE _{IAF} (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 and 1 µg/mL concentrations).	73

Figure 6. HaCaT cells (immortalized human keratinocytes) phase contrast and PI incorporation fluorescence microphotographs (insert) after 24 h of treatment with IAF and NE_{IAF} (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 and 1 µg/mL concentrations) 74

Figure 7. HaCaT (immortalized human keratinocytes) cell migration (%) after 6, 18, and 24 h of treatment with IAF and NE_{IAF} at A) 0.25 and B) 0.5 µg/mL concentration 75

Figure 8. Wound images with different treatments showing progression over time 77

Figure 9. Wound areas with different treatments showing progression over time 77

Figure 10. Wound's histology on day 12 with Mallory's trichrome coloring, where A) no treatment, B) Dersani®, C) HNE_B, D) HNE_{IAF} 1x/day, E) HNE_{IAF} 2x/day 68

Figure 11. Epithelium thickness after 12 days 79

Figure 12. Wound's new vessels quantification, where A) day 2, B) day 7, and C) day 12 80

Figure 13. Biochemical analyses. A) Myeloperoxidase activity on day 2; B) IL-1 activity on day 2; C) TNFα on day 2; and D) TBARS activity on day 2 81

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Sistemas nanoestruturados contendo isoflavonas agliconas da soja	50
--	----

CAPÍTULO II

Table 1. Formulations composition	60
Table 2. Physicochemical properties of formulations	68
Table 3. Isoflavones content in nanoemulsions and hydrogels	69
Table 4. Stability of nanoemulsions and hydrogels containing nanoemulsions along time	69
Table 5. HaCaT cells (immortalized human keratinocytes) qualitative evaluation of morphological alterations and PI incorporation after 24 h of treatment with IAF and NE _{IAF} (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 and 1 µg/mL concentrations)	74
Table 6. Animals' weight during the experiment	76
Table 7. Wounds temperature during the experiment	76
Table 8. Histological observations	79

LISTA DE ABREVIATURAS

DMEM – *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DMSO – dimetil sulfóxido

ER – receptor de estrogênio

FBS – soro fetal bovino

FIA – fração enriquecida de isoflavonas agliconas

HaCaT – queratinócitos

HNE_B – hidrogel contendo nanoemulsão branca

HNE_{IAF} – hidrogel contendo nanoemulsão com fração enriquecida de isoflavonas agliconas

IAF – fração enriquecida de isoflavonas agliconas

IL-1 – interleucina-1

LogP – coeficiente de partição

MCT – triglicerídeos de cadeia média

MMP – metaloproteinases de matriz

MPO – enzima mieloperoxidase

MTT – sal bromídico de 3,(4,5-dimetil)-2,5 difenil-trarazolim

NE_B – nanoemulsão branca

NE_{IAF} – nanoemulsão contendo fração enriquecida de isoflavonas agliconas

NF- κ β – fator nuclear kappa beta

NT – sem tratamento

PDI – índice de polidispersão

PG_{IAF} – fração de isoflavonas agliconas incorporada em propilenoglicol

PI – iodeto de propídeo

PLGA – poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TEM – microscopia de transmissão eletrônica

TNF α – fator de necrose tumoral alfa

TPGS – *d- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate*

UFLC – cromatógrafo líquido ultra rápido

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
OBJETIVOS	23
Objetivo geral	25
Objetivos específicos	25
CAPÍTULO I – revisão da literatura	27
1. Pele	29
2. Feridas	36
3. Estrogênio	42
4. Soja e atividade cicatrizante	45
5. Nanoemulsões e hidrogéis de uso tópico	49
CAPÍTULO II – artigo científico	53
Hydrogel loaded-nanoemulsions containing soybean isoflavone aglycones-rich fraction for wound healing treatments – <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> studies	55
Abstract	56
1. INTRODUCTION	57
2. MATERIALS AND METHODS	58
2.1. Chemicals	58
2.2. Preparation of isoflavone aglycones-rich fraction	59
2.3. Preparation of nanoemulsions and hydrogels	59
2.4. Isoflavones analyses	60
2.5. Physicochemical characterization of nanoemulsions and hydrogels	61
2.5.1. Droplet size, polydispersity index, and ζ -potential determination	61
2.5.2. pH determination	61
2.5.3. Morphological analyses	61
2.5.4. Viscosity determination	61
2.6. <i>In vitro</i> studies	62
2.6.1. <i>In vitro</i> drug release	62
2.6.2. Skin retention/permeation assay	62
2.6.3. <i>In vitro</i> biological assays	63
2.6.3.1. Cell viability	63

2.6.3.2. Cell death by necrosis assay	64
2.6.3.3. HaCaT migration assay	64
2.7. <i>In vivo</i> studies	64
2.7.1. Animals	64
2.7.2. Wound healing model	64
2.7.3. Histological evaluation	66
2.7.4. Determination of myeloperoxidase.....	66
2.7.5. Determination of cytokines.....	66
2.7.7. Total protein determination	67
2.8. Statistical analyses	67
3. RESULTS	68
3.1. Physicochemical characterization of nanoemulsions and hydrogels.....	68
3.2. <i>In vitro</i> studies.....	70
3.2.1. <i>In vitro</i> drug release	70
3.2.2. Skin retention/permeation assay.....	71
3.2.3. <i>In vitro</i> biological assays	73
3.3. <i>In vivo</i> studies	75
4. DISCUSSION	82
5. CONCLUSIONS	87
CONFLICT OF INTEREST	87
ACKNOWLEDGEMENTS	87
REFERENCES	87
DISCUSSÃO GERAL	93
CONCLUSÕES	101
REFERÊNCIAS	105
ANEXOS – autorização de uso de imagens	117
ANEXO 1 - Autorização para uso de imagem como Figura 1 e 2 no Capítulo I.....	119
ANEXO 2 - Autorização para uso de imagem como Figura 3 no Capítulo I.....	121
ANEXO 3 - Autorização para uso de imagem como Figura 4 no Capítulo I.....	123

INTRODUÇÃO

A soja, *Glycine max* (L.) Merr, é uma semente com colheita anual cultivada em escala mundial, sendo o Brasil o segundo maior produtor do mundo e o Rio Grande do Sul o terceiro maior estado produtor do país (EMBRAPA, 2019). Além de fazer parte da dieta tradicional de países orientais, seu consumo hoje é disseminado pelo mundo, grande parte devido aos seus efeitos benéficos à saúde. É considerada uma leguminosa com alto teor de lipídios poli-insaturados e proteínas, e rica em metabólitos secundários, como as isoflavonas, classe de fitoestrógenos pelas quais recebe ainda mais destaque (BALISTEIRO; ROMBALDI; GENOVESE, 2013; NEMITZ et al., 2015a). O consumo de isoflavonas tem sido associado à prevenção de câncer, doenças cardiovasculares, osteoporose e redução de sintomas do climatério durante a menopausa (BALISTEIRO; ROMBALDI; GENOVESE, 2013). Na pele, principalmente a genisteína, isoflavona aglicona majoritária da soja, vem sendo relacionada à capacidade de proteção e reversão da fotocarcinogênese, envelhecimento cutâneo e melhora no tratamento de feridas, cujas atividades foram recentemente revisadas por Nemitz e colaboradores (NEMITZ et al., 2015).

Em relação a feridas cutâneas, diversas são as razões as quais podem ocasionar o retardo no processo de cicatrização, estando entre elas a idade, enfermidades e hábitos de vida (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). Adicionalmente, considera-se crescente o número de novos pacientes que desenvolvem feridas crônicas (GUPTA et al., 2019), gerando gastos que ultrapassam 20 bilhões de dólares para a economia mundial anualmente (KOEHLER; BRANDL; GOEPFERICH, 2018). Logo, destacando-se a importância pela busca de novas estratégias para contribuir ao retorno da homeostase local. Somado a isso, tem-se ainda uma crescente procura por fitofármacos como alternativas a medicamentos sintéticos, nos quais se enquadram as isoflavonas da soja.

Recentemente, em nosso grupo de pesquisa, foi patenteado um processo de incorporação de uma fração enriquecida em isoflavonas da soja em nanoemulsões de uso tópico [BR 102015024240-9 A2] (NEMITZ et al., 2015). A metodologia de isolamento e purificação de isoflavonas agliconas incluiu diferentes etapas, como o desengorduramento, extração em meio hidroetanólico, hidrólise em meio enzimático e extração líquido-líquido. Cabe destacar que essa metodologia permitiu a obtenção de

uma fração de isoflavonas com alto grau de pureza, a qual apresentou um potencial cicatrizante, visualizado através de um aumento significativo na proliferação de queratinócitos *in vitro* (NEMITZ et al., 2017). Na sequência, foi demonstrada a retenção das isoflavonas a partir de nanoemulsões veiculadas em hidrogéis nas camadas da pele íntegra de orelha suína por meio de estudos de retenção/permeação *in vitro* (células de Franz) (NEMITZ; VON POSER; TEIXEIRA, 2019).

Considerando o conjunto de resultados obtidos até o momento e a busca crescente pela utilização de espécies vegetais como possíveis alternativas a medicamentos tradicionais, a presente dissertação de mestrado visa avaliar as potencialidades de nanoemulsões contendo uma fração enriquecida em isoflavonas da soja veiculada a hidrogéis sobre a atividade de proliferação celular *in vitro* e regeneração tecidual cutânea *in vivo*.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o perfil de retenção/permeação cutânea em pele íntegra e lesada e a atividade proliferativa de queratinócitos *in vitro* de uma fração enriquecida em isoflavonas agliconas da soja incorporada em nanoemulsões, bem como sua atividade cicatrizante *in vivo* quando incorporada a hidrogéis.

Objetivos específicos

- Preparar um extrato hidrolisado da soja contendo isoflavonas agliconas;
- Purificar e quantificar uma fração enriquecida de isoflavonas agliconas (FIA);
- Preparar e caracterizar nanoemulsões contendo FIA;
- Preparar e caracterizar hidrogéis contendo as nanoemulsões;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* das formulações desenvolvidas;
- Avaliar o perfil de retenção/permeação cutânea *in vitro* das formulações desenvolvidas quando em pele íntegra e lesada, simulando ferimentos superficiais e profundos;
- Avaliar a atividade proliferativa, toxicidade e migração celular *in vitro* de queratinócitos quando em contato com a FIA de maneira isolada ou em nanoemulsões;
- Avaliar em modelo murino a regeneração e cicatrização de lesões cutâneas após aplicação de hidrogéis contendo FIA incorporada em nanoemulsões.

CAPÍTULO I

Revisão da literatura

1. Pele

A pele é o órgão que faz a divisa entre o meio interno e externo, sendo responsável por uma série de funções, dentre as quais destacam-se a regulação da homeostase, prevenção de perda de água percutânea, proteínas e eletrólitos, manutenção da temperatura corporal, percepção sensorial ao toque, dor e calor, sinais fisiológicos de rubor, suor e palidez e proteção à radiação ultravioleta. Além disso, constitui uma importante barreira imunológica e inflamatória, podendo refletir quadros de algumas doenças, como hipertireoidismo e diabetes (SHU; MAIBACH, 2011; TSAKOVSKA et al., 2017; WONG et al., 2016). É formada por ligamentos, vasos sanguíneos e linfáticos, e regiões de tecido conjuntivo frouxo, responsável pelo deslizamento da pele sob a contração muscular. Possui entre 155 e 174 proteínas diferentes, sendo elas colágeno (I, II, III, VI, XII e XIV), proteínas de matriz extracelular, queratina e proteínas celulares (e.x.: actina, miosina, tubulina, laminina, histonas e anexinas). É ainda dividida em três camadas distintas: epiderme, derme e hipoderme (WONG et al., 2016).

A espessura da epiderme varia entre 75 e 150 μm , sendo a camada mais externa da pele e biologicamente ativa (WONG et al., 2016). É composta de queratinócitos, células de Langerhans, melanócitos e células de Merkel, responsáveis pela transdução de sinais nervosos. É dividida em camada ou estrato córneo, lúcido, granuloso, espinhoso e germinativo ou basal (FARAGE et al., 2007; WONG et al., 2016). Um esquema dessa camada da pele pode ser visualizado na Figura 1.

O estrato córneo é a sua porção mais externa (10-20 μm), formada por queratinócitos originados na junção dermo-epidérmica que passaram por um processo chamado de descamação. Nesse ocorre a perda do núcleo e do formato hexagonal das células, as quais adquirem nessa camada um formato achatado; são preenchidas por queratina e passam a ser chamadas de corneócitos. Devido à perda de atividade metabólica, essa camada é frequentemente referida como epiderme inviável. As células são conectadas entre si através de corneodesmossomos e são embebidas em uma matriz lipídica multilamelar composta de ceramidas, colesterol e ácidos graxos gerados pelo estrato granuloso (FARAGE et al., 2007; JEPPS et al., 2013; WONG et al., 2016). Possuem espessura de 0,1 a 1 μm , sendo a camada composta por cerca de 60% de

proteínas estruturais, 20% de água e 20% de lipídios. Confere flexibilidade e firmeza à camada epidérmica e exerce contato direto com o meio externo, favorecendo a termorregulação e impedindo a evaporação de água transepidermal, cuja perda excessiva ocasiona o ressecamento da pele e a perda da proteção barreira contra patógenos e demais substâncias do meio externo (FARAGE et al., 2007; WONG et al., 2016).

A camada mais interna da epiderme (estrato basal) mantém-se em renovação contínua com a produção de novos queratinócitos sobre a membrana basal, a qual é vastamente composta por colágeno do tipo IV, laminina, heparina e proteoglicanos. Tais proteínas fazem parte da junção dermo-epidérmica, que promove a ligação entre a derme e a epiderme, dando resistência mecânica e atuando como barreira de patógenos (WONG et al., 2016).

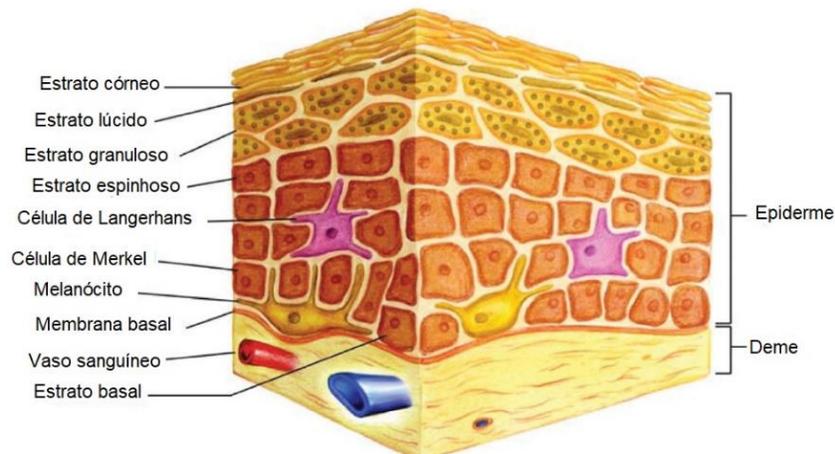


Figura 1. Esquema demonstrando a epiderme e derme adaptado de Farage e colaboradores (2007).

Já a derme usualmente tem espessura menor que 2 mm, podendo chegar a 4 mm nas costas de um adulto. Um esquema dessa camada da pele pode ser visualizado na Figura 2. Contém inervações, vasos sanguíneos, linfáticos e glândulas sudoríparas, exercendo a função de suporte nutricional, barreira protetora contra infecções e reserva de água (CZAJKOWSKA-KO; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019; TSAKOVSKA et al., 2017). As células responsáveis pela manutenção da estrutura da camada são os

fibroblastos, os quais secretam colágeno, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, fatores de crescimento e citocinas (SHU; MAIBACH, 2011). Divide-se em derme papilar e derme reticular (mais profunda), suportando a epiderme e ligando-se à hipoderme. É formada de tecido conjuntivo contendo elastina e colágeno, apresenta a inervação de folículos pilosos e glândulas écrinas, contém fibras nervosas, receptores sensoriais, ácido hialurônico – responsável pela retenção de água, e glicosaminoglicanos de suporte (GAGs), podendo conter também células adiposas, mastócitos e leucócitos infiltrados. As fibras de colágeno são responsáveis pela resistência à tração, enquanto a elastina confere elasticidade e resiliência. A derme papilar possui fibras de colágeno de diâmetro pequeno intercaladas a fibras elásticas, fibrócitos, água, proteínas plasmáticas e polissacarídeos. Já a derme reticular é constituída de fibras de colágeno de grande diâmetro, menos densamente compactadas e envolvidas em fibras elásticas (FARAGE et al., 2007; JEPPS et al., 2013; SHAHZAD et al., 2015; WONG et al., 2016). Existem 14 tipos de colágeno na pele, sendo o colágeno predominante o tipo I (80-90%), seguido do tipo III (10-20%) (FARAGE et al., 2007; SHU; MAIBACH, 2011; WONG et al., 2016). Ao longo da vida, no entanto, o colágeno torna-se mais escasso, espesso e desorganizado, sendo um dos principais representantes do envelhecimento cutâneo (SHU; MAIBACH, 2011).

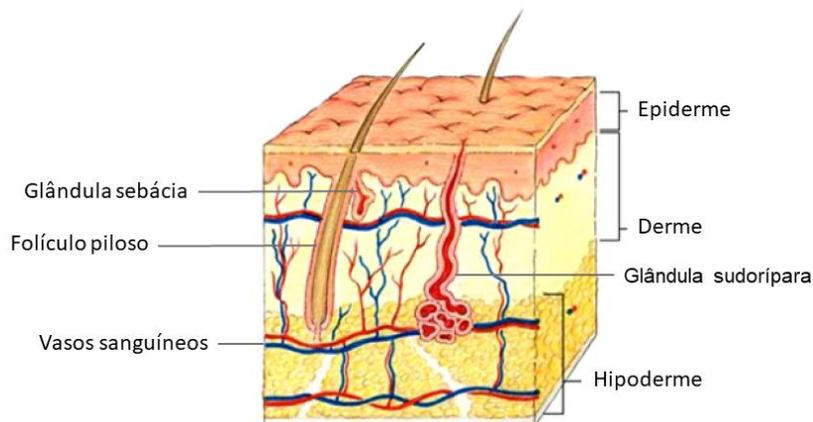


Figura 2. Esquema demonstrando a derme adaptado de Farage e colaboradores (2007).

A hipoderme localiza-se abaixo da derme, sendo formada por tecido adiposo envolto por tecido conjuntivo frouxo, ligando a pele a órgãos internos. Tem a função de

amortecer, regular a temperatura e conferir estabilidade à pele (FARAGE et al., 2007). É rica em proteoglicanos e glicosaminoglicanos, os quais possuem capacidade de atrair água ou fluído intersticial e conferem à camada propriedades parecidas com mucosas, regulando a pressão osmótica de capilares quando as mesmas são excedidas, como por exemplo, durante um processo inflamatório. Fibroblastos, adipócitos e macrófagos estão presentes nessa camada, sendo responsáveis pela homeostase local na obesidade, estimulando a termogênese de lipídios durante a realização de exercícios físicos e durante a exposição a baixas temperaturas. Os adipócitos organizam-se, por sua vez, em lóbulos polixagonais, ricos em tecido sanguíneo e linfático para promover a nutrição das células, e tecido fibrótico em torno (WONG et al., 2016).

Como apêndices, são encontrados glândulas sebáceas, folículos pilosos e glândulas sudoríparas. A glândula sebácea é responsável pela produção do sebo, transporte de antioxidantes endógenos para a pele visando a manutenção da sua integridade, combate a bactérias e ao excesso de umidade e calor. É composta principalmente de triglicerídeos, ésteres de cera, esqualeno e colesterol. Já os folículos pilosos são vascularizados, os quais conectam-se às glândulas sebáceas. As glândulas sudoríparas écrinas, por sua vez, são responsáveis pela produção do suor a fim de ajudar a resfriar o corpo, melhorar a aderência e sensibilização da pele. Tem origem na camada mais profunda da derme ou na hipoderme, desembocando na superfície cutânea através de ductos. Estes, por sua vez, são capazes de reabsorver água, sal e eletrólitos caso necessário para manutenção da homeostase. Glândulas apócrinas não tem sua função e produto secretado bem estabelecido na literatura, já as apoécrinas surgem na adolescência e possuem função parecida às écrinas (JEPPS et al., 2013).

Considerando sua grande extensão e sua facilidade de acesso, a pele é um órgão de fácil utilização para aplicação de produtos tópicos visando efeitos locais (GARCÊS et al., 2018). No entanto, a permeabilidade de ativos e fármacos pela pele é restrita principalmente pela presença do estrato córneo, o qual devido a sua composição rica em lipídios, atua como barreira a compostos hidrofílicos (CZAJKOWSKA-KO; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019; GARCÊS et al., 2018). A penetração de substâncias pode ocorrer via transepidermal, através do estrato córneo, podendo acontecer intra ou intercelularmente,

sucedendo-se essencialmente por transporte passivo; ou através de apêndices (folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas) (CZAJKOWSKA-KO; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019; JEPPS et al., 2013). Moléculas hidrofílicas tentem a permear através do transporte intracelular, entrando e saindo de corneócitos, visto que esses possuem queratina hidratada no seu interior. Já moléculas lipofílicas tentem a ser transportadas em torno dos corneócitos, justamente considerando que a matriz extracelular do estrato córneo é rica em lipídios (CZAJKOWSKA-KO; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019; SHAHZAD et al., 2015).

Um esquema simplificado com as possíveis rotas de permeação cutânea pode ser visualizado na Figura 3. No entanto, qualquer ruptura nessa estrutura leva a um perfil de permeação diferente de ativos (ČUŘÍKOVÁ et al., 2017). Na ausência de estrato córneo, as demais camadas da epiderme agem como barreira para compostos altamente lipofílicos. Além disso, a presença de proteínas de transporte na derme e a sua alta vascularização favorecem a melhor distribuição de compostos pela camada, sofrendo influência de compostos vasodilatadores e vasoconstritores (JEPPS et al., 2013).

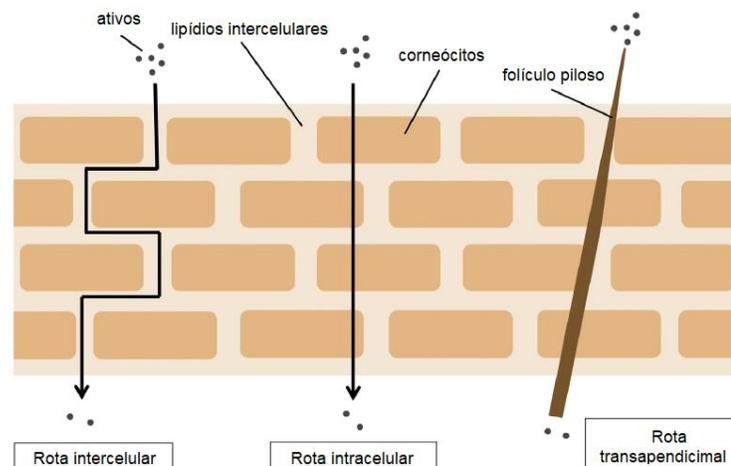


Figura 3. Esquema demonstrando possíveis rotas de permeação através do estrato córneo adaptado de Czajkowska-ko e colaboradores (2019).

Já no caso de permeação através de apêndices, o mecanismo pelo qual moléculas chegam às camadas da pele está ainda sendo estudado, mas reconhece-se que a produção de sebo pelas glândulas sebáceas interligadas a folículos pilosos favorece a

difusão de compostos lipofílicos através dos mesmos (JEPPS et al., 2013). No entanto, acredita-se que a permeação através destes deva ser pequena, visto que a pele humana é recoberta apenas em 0,1% de folículos. Ainda assim, essa rota pode, de alguma forma, ser significativa na difusão de compostos de alto peso molecular e que possuem taxas de difusão lenta, como pode ser o caso de sistemas nanoestruturados (LANE, 2013). Por fim, é possível ocorrer não somente o acúmulo de compostos nas camadas da pele, como também interações com estruturas do tecido, tais como lipídios, queratina e receptores. Dessa forma, uma difusão lenta ou até mesmo uma cristalização do ativo pode ser ocasionada, resultando em uma dificuldade de atravessar camadas e uma menor absorção sistêmica. Adicionalmente, fármacos e ativos podem ainda sofrer metabolização na pele, resultando em uma menor concentração do mesmo no seu sítio de ação (LANE, 2013).

A absorção percutânea, por sua vez, é dividida em penetração, em que o ativo ou fármaco é liberado do veículo e atinge o estrato córneo por partição; permeação, em que há a passagem do mesmo de uma camada da pele para outra; e absorção sistêmica, em que o mesmo pode vir a atingir vasos linfáticos e sanguíneos encontrados na derme. Para tais processos, segue-se a lei de Fick's, em que considera-se que a taxa de absorção ou fluxo de uma substância através de uma barreira seja proporcional à diferença de concentração entre as barreiras (equação 1) (CZAJKOWSKA-KO; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019).

$$J = \left(\frac{D \cdot K_m}{L}\right) C_v \quad (\text{Equação 1}), \text{ onde}$$

J = fluxo

D = coeficiente de difusão através do estrato córneo

K_m = coeficiente de partição entre o estrato córneo e o veículo

L = largura da membrana a ser atravessada

C_v = concentração do composto no veículo

Dessa forma, a composição do veículo é de extrema importância para promover a penetração cutânea, visto que o mesmo pode modificar o coeficiente de partição e difusão na pele, assim como componentes da formulação podem exercer efeitos sobre a estrutura cutânea ao interagir, por exemplo, com lipídios da pele (CZAJKOWSKA-KO; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019; GHAFOURIAN et al., 2010; GUJJAR; BANGA, 2014). Estudos indicam que veículos hidrofílicos podem ainda permitir uma maior saída de ativos lipofílicos dos mesmos, levando a uma possível maior penetração na pele (GUJJAR; BANGA, 2014; KIKWAI et al., 2002; MARWAH et al., 2016; MINGHETTI et al., 2007). Além disso, idealmente, as moléculas devem apresentar baixo peso molecular (< 500 Da), serem moderadamente lipofílicas (log P 1-3), possuírem ponto de fusão abaixo de 150 °C e alta potência, em que baixas doses já exerceriam efeito cutâneo (CZAJKOWSKA-KO; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019). Adicionalmente, a integridade cutânea, característica anatômica do local de aplicação, doenças, circulação sanguínea local, densidade de folículos e metabolização por enzimas são também parâmetros a serem levados em consideração (CZAJKOWSKA-KO; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019; GHAFOURIAN et al., 2010). Devido a isso, se torna difícil prever e afirmar o comportamento de um ativo ou fármaco ao entrar em contato com a pele sem a realização de experimentos prévios, tanto com pele íntegra, quanto lesionada.

Como estratégias para facilitar a permeação de ativos através da pele pode-se, além de promover o aumento da saída do ativo a partir do veículo, provocar uma desorganização do estrato córneo, aumentar o fluxo sanguíneo no local utilizando, por exemplo, temperatura, assim como utilizar técnicas como iontoforese, microagulhamento (produção de microcanais), magnetoforese, ultrassom, pró-fármacos, promotores de absorção (por exemplo, fosfolipídios, surfactantes e solventes orgânicos) e nanosistemas (CZAJKOWSKA-KO; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019; GHAFOURIAN et al., 2010; SHAHZAD et al., 2015).

Para estudos de permeação e retenção cutânea, o padrão ouro é o uso de pele humana. No entanto, devido à alta variabilidade relacionada a diferentes raças, gêneros, idade de doadores e local de obtenção, somados à dificuldade de obtenção, são utilizadas peles de rato, camundongo, cobra ou orelha suína a fim de demonstrar a função

barreira da pele quando mantida em forma intacta (GUJJAR; BANGA, 2014; PRAÇA et al., 2018). Entretanto, muitos produtos são destinados à aplicação sobre uma pele previamente lesionada devido à presença de uma eventual doença, como uma ferida, levando a mudanças no perfil de permeação cutânea e a possíveis efeitos sistêmicos. Logo, estudos que simulem algum tipo de lesão na pele devem ser realizados a fim de melhor prever a permeação de compostos (GUJJAR; BANGA, 2014).

2. Feridas

É crescente o número de novos casos de pacientes com feridas crônicas no mundo e ainda que possam acometer populações de todas as idades, são principalmente relacionados a comorbidades, como o diabetes, e ao envelhecimento da população. De fato, estima-se um crescimento anual em torno de 6 a 7% no número de novos casos de úlceras venosas e por pressão e 9% de úlceras diabéticas no mundo (GUPTA et al., 2019). Nos Estados Unidos, cerca de 2 a 4,5 milhões de pessoas são acometidas por feridas crônicas, gerando um custo de 25 bilhões de dólares à economia americana por ano (DERAKHSHANDEH et al., 2018). Em 2013, na União Europeia, estimou-se que 2,2 milhões de pessoas estavam recebendo tratamento para feridas e apenas 61% delas foram curadas, gerando um gasto de 5,3 milhões de libras, representando 4% do gasto anual em saúde pública (GUPTA et al., 2019). No mundo, gastos com feridas chegaram a 20 bilhões de dólares em 2016 (KOEHLER; BRANDL; GOEPFERICH, 2018).

Dentre as razões para a dificuldade de cura de feridas cutâneas encontra-se o envelhecimento, o qual confere uma maior fragilidade à pele e, conseqüentemente, a deixa mais exposta e suscetível a traumas mais frequentes. Além disso, a pele reduz a sua propriedade de regeneração com a idade, levando a um maior retardo na cicatrização. Inclusive, a dificuldade de tratamento de feridas agudas tende a permitir o aparecimento de infecções locais, abertura de feridas e uma evolução a feridas crônicas que não cicatrizam. Devido a isso, úlceras venosas e de pressão são enquadradas como potenciais riscos de saúde em idosos (SHU; MAIBACH, 2011). Dessa forma, é crescente o número de investimentos para tratamento de feridas e melhora da aparência de cicatrizes (DERAKHSHANDEH et al., 2018).

Feridas são caracterizadas pela ruptura da integridade da pele, podendo atingir somente a epiderme, classificadas como superficiais; levar a um dano vascular ou atingir a derme, no caso de feridas de espessura parciais; ou atingir até o tecido subcutâneo, sendo chamadas de feridas com espessura total (BOATENG et al., 2008; GUPTA et al., 2019). Podem ser ocasionadas por um evento cirúrgico ou um trauma agudo, sendo estas escoriações ou rasgos, queimaduras ou lesões químicas causadas por radiação, eletricidade, produtos químicos ou fontes térmicas. Nesses casos, a temperatura, assim como o tempo de exposição influenciam no grau da queimadura (BOATENG et al., 2008). No caso de traumas cirúrgicos, a cicatrização tende a ocorrer mais rapidamente devido à intervenção realizada, em que a sutura ajuda na re-estruturação do epitélio. Já em traumas agudos em que há um extenso dano ao epitélio, é necessário o envolvimento e a reprodução de muitas células e formação de uma nova matriz dérmica, ocasionando uma demora no processo (GUPTA et al., 2019). Em indivíduos saudáveis, o processo inflamatório da cicatrização tende a ser finalizado dentro de alguns dias ou semanas (normalmente de 8 a 12 semanas). Já quando as feridas se tornam crônicas, esse pode levar de meses (acima de 3) a anos para ser finalizado (DERAKHSHANDEH et al., 2018; GUPTA et al., 2019).

Feridas crônicas são normalmente derivadas de úlceras venosas na perna, úlceras de pé diabético e úlceras por pressão, em que uma ou mais etapas do processo cicatrizante não é finalizada (BOATENG et al., 2008; DERAKHSHANDEH et al., 2018; GUPTA et al., 2019). O protocolo de tratamento costuma ser individualizado de acordo com a lesão e sua gravidade. Úlceras venosas na perna localizam-se entre a articulação do tornozelo e o joelho de pacientes com doença venosa crônica ou hipertensão venosa nos membros inferiores, como varizes e lipodermatoesclerose (DERAKHSHANDEH et al., 2018; GUIMARÃES BARBOSA; NOGUEIRA CAMPOS, 2010). O tratamento desse tipo de ferida pode incluir repouso, terapia compressiva, terapia tópica para manutenção do local úmido e limpo, com absorção do exsudato, e uso de antibióticos sistêmicos (GUIMARÃES BARBOSA; NOGUEIRA CAMPOS, 2010).

Por sua vez, as úlceras de pé diabético caracterizam-se por feridas abaixo do tornozelo, comumente provocadas por uma lesão repetitiva, estendem-se por toda a

derme, sendo uma complicação comum decorrente de um diabetes não controlado (DERAKHSHANDEH et al., 2018). O tratamento atual pode envolver utilização de tules de nylon, carvão ativado, hidrogéis, debridamento, hidrocoloides, antibioticoterapia por via oral ou endovenosa em casos de infecções, imobilização, uso de sapatos especiais e cirurgia (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

Já úlceras por pressão caracterizam-se por lesões na pele e tecido inferior decorrente de uma pressão prolongada no local, ocorrendo normalmente sobre regiões ósseas, como calcâneos, cóccix, tornozelos e quadris (DERAKHSHANDEH et al., 2018). Protocolos de tratamento incluem curativos absorventes para reduzir exsudatos, antimicrobianos, analgésicos, agentes hidratantes, películas protetoras, aceleradores de regeneração, hidrocoloides, agentes promotores de debridamento e hidrogéis (SILVA, 2018).

Inflamação crônica, infecção, baixo aporte nutricional, aumento da pressão local e perfusão inadequada são fatores que podem retardar a cicatrização local. A baixa concentração de oxigênio no tecido e a alta quantidade de proteínas favorece a proliferação bacteriana. Assim, para promover uma cicatrização adequada, deve-se melhorar a vascularização local, a fim de permitir um adequado aporte de oxigênio e nutrição, e a carga bacteriana deve ser reduzida. Alguns estudos, no entanto, relatam que a presença de uma pequena quantidade de bactérias no local pode favorecer a cicatrização por promover a digestão de detritos através de enzimas bacterianas e estimular a liberação de proteases por neutrófilos (DERAKHSHANDEH et al., 2018).

Dentre outros fatores que podem dificultar a cicatrização de feridas, podem ser citados isquemias, cirurgias, corpos estranhos e edemas (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). Além disso, doenças como o diabetes mellitus, em que é conhecida a demora no tempo de cicatrização, sendo este um dos sinais mais significativos da doença (EO; LEE; LIM, 2016), HIV positivos, deficiência de vitaminas, hipotireoidismo, fármacos antineoplásicos, alterações de coagulação, traumas graves, queimaduras, sepses, insuficiência hepática, renal e respiratória, radioterapia, uso de corticoides e idade são potenciais modificadores de cicatrização (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; GUPTA et al., 2019).

Para as mulheres, tem-se estudado ainda a dificuldade de cicatrização após a menopausa, momento da vida em que há uma redução bastante significativa de estrogênio. Tal fato tem sido relacionado ao aumento de sintomas de envelhecimento, visto que esse hormônio tem papel importante na regulação, manutenção e regeneração da pele; acredita-se ainda que a diminuição de estrogênio intrínseco esteja relacionada com a redução da capacidade de cicatrização da pele, o que pode levar ao desenvolvimento de feridas crônicas com o decorrer do tempo, estando, portanto, relacionado à alta morbidade (EMMERSON et al., 2010).

A regeneração de uma ferida, por sua vez, é seguida de uma série de eventos bioquímicos, moleculares e celulares, os quais são desencadeados visando à restauração do equilíbrio local, fenômeno este chamado de cicatrização (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). Esse processo é usualmente dividido em três fases: inflamatória, proliferativa ou de granulação, e remodelação ou maturação, muitas vezes havendo sobreposição de eventos (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; EO; LEE; LIM, 2016; GUPTA et al., 2019). Um esquema do processo cicatrizante pode ser visualizado na Figura 4.

A fase inflamatória tem início logo após uma lesão no tecido, havendo a degranulação de plaquetas, o que leva, conseqüentemente, à ativação da cascata de coagulação e do complemento (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Há formação de coágulo através da união de colágeno, plaquetas e trombina, o qual é utilizado como reservatório para produção de citocinas e fatores de crescimento; vasodilatação; e aumento da permeabilidade vascular, o que aumenta a presença de enzimas, nutrientes e a migração de macrófagos e leucócitos, incluindo neutrófilos e linfócitos, os quais permitem a limpeza do tecido danificado e possíveis contaminantes (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; DERAKHSHANDEH et al., 2018; LI; CHEN; KIRSNER, 2007; PARK et al., 2011). Os macrófagos iniciam a replicação do endotélio, contribuindo para a fibroplastia, angiogênese e síntese de matriz extracelular. Estes tendem a permanecer durante todo o processo cicatricial. Já os neutrófilos produzem radicais livres visando à eliminação de um possível agente bacteriano e estão presentes principalmente na fase inflamatória.

Estes sofrem apoptose, fagocitose por macrófagos ou desbridamento autolítico uma vez terminada suas funções (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; GUPTA et al., 2019). Sinais típicos de inflamação, tais como rubor, dor, inchaço e calor, encontram-se presentes (GUPTA et al., 2019).

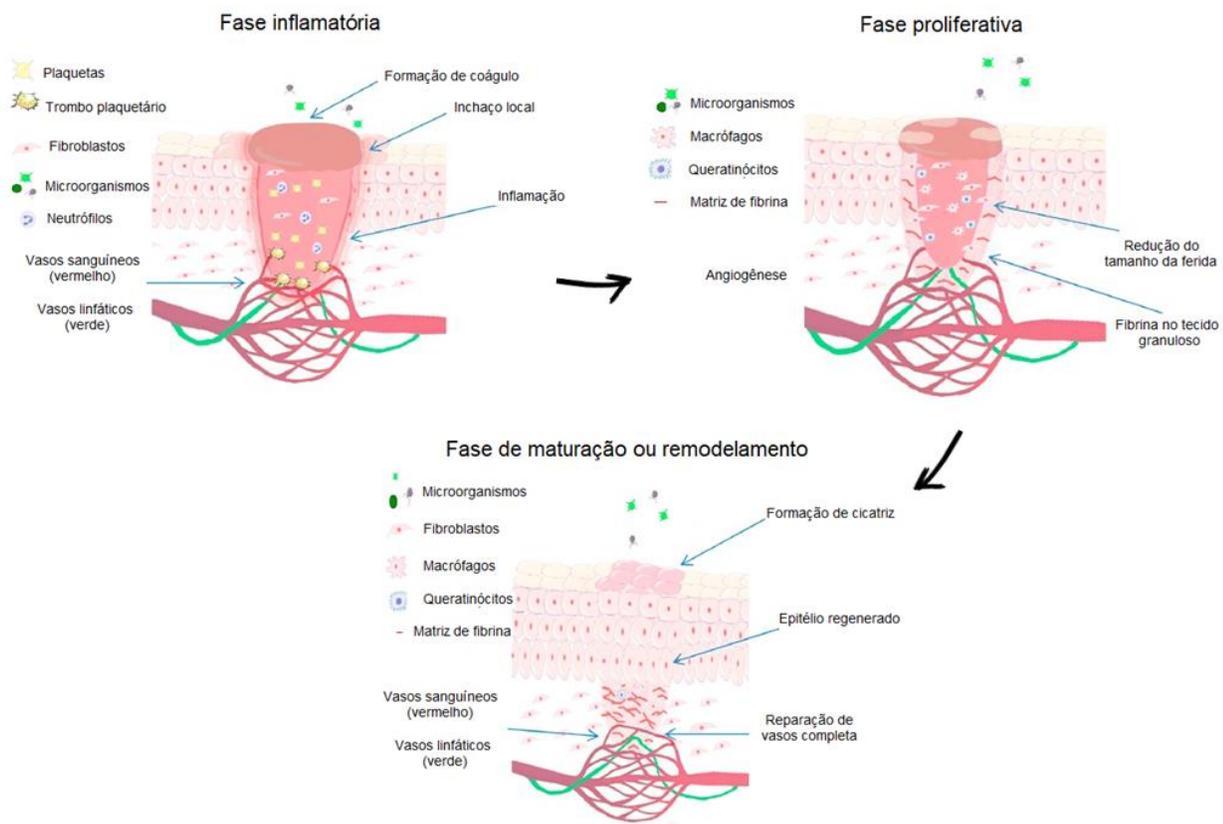


Figura 4. Esquema representando as etapas do processo cicatrizante adaptado de Gupta e colaboradores (2019).

Após, tem-se início a fase proliferativa, a qual é dividida em quatro etapas: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). Há a formação de um novo epitélio sobre a ferida através da migração e proliferação de células epiteliais do entorno da mesma (GUPTA et al., 2019). A angiogênese, caracterizada pela formação de novos capilares, permite a migração de células endoteliais. Ao fim dessa fase, tem-se o crescimento de tecido granuloso para preencher o espaço ocupado pela ferida e a

proliferação de fibroblastos, que produzem colágeno tipo I, transformando-os em miofibroblastos, que, por sua vez, atuam na contração da ferida (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Há ainda a formação de colágeno tipo III que fornece a força inicial para a formação da cicatriz. Os fibroblastos secretam também fatores de crescimento para formação de uma matriz extracelular temporária, a qual serve de suporte para o crescimento de outras células (DERAKHSHANDEH et al., 2018). A fibronectina, glicoproteína da matriz extracelular, promove a migração e o direcionamento dos queratinócitos e aumenta o influxo de fibroblastos, promovendo a deposição de colágeno. No entanto, quando há um grande aumento de neutrófilos em casos inflamatórios, ocorre um aumento da produção de elastase, protease responsável pela degradação de fibronectina. Além disso, a presença duradoura e em grandes quantidades de elastase promove uma degradação da junção dermo-epidérmica e inibição da adesão da fibronectina ao fibroblasto, dificultando a cicatrização (ASHCROFT et al., 1999).

Por último, ocorre a fase de maturação ou remodelamento, em que há deposição do colágeno de forma mais organizada, visando a formação da cicatriz propriamente dita, sendo, por isso, a fase de maior importância clínica. Leucócitos e fibroblastos atuam secretando colagenases que destroem a matriz de colágeno antiga, permitindo a deposição da nova com maior força de tração (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

O fechamento de feridas, no entanto, não depende somente do processo de cicatrização, mas também da saúde do paciente, do ambiente em que este vive, do meio social a qual está vinculado e ao tratamento medicamentoso propriamente dito (BOATENG et al., 2008). Feridas tendem a ocasionar baixa qualidade de vida, altos índices de morbidade e mortalidade, ao levar pacientes a dores intensas, prejuízo de função do local e graves infecções, gerando gangrena, amputações e sepse (SAMI; HEIBA; ABDELLATIF, 2019). Além disso, considerando a existência de mais de um tipo de ferida e estágio de cicatrização, se faz importante o estudo de mais de um tipo de possível tratamento, assim como a sua avaliação de performance clínica, visando melhorar a qualidade de vida desses pacientes (BOATENG et al., 2008).

3. Estrogênio

O estrogênio, hormônio sexual feminino, age em inúmeros órgãos, sendo a pele o maior órgão não-reprodutor a sofrer sua ação. Dentre seus receptores, ER β e ER α , existe uma maior concentração de ER β distribuída na pele de homens e mulheres (HALL; PHILLIPS, 2005). ER β é encontrado predominante na epiderme, fibroblastos dérmicos, vasos sanguíneos e folículos capilares do couro cabeludo (HALL; PHILLIPS, 2005; SHU; MAIBACH, 2011). Queratinócitos expressam ambos os receptores, aumentando sua proliferação quando em contato com estrogênio. Já fibroblastos, apesar de apresentarem ambos receptores, respondem em menor intensidade ao hormônio (HALL; PHILLIPS, 2005). No entanto, estudos indicam que o aumento de estrógeno leva a um aumento na proliferação de fibroblastos, aumentando a síntese de colágeno e reduzindo a expressão de metaloproteinases de matriz, enzimas responsáveis pela degradação de colágeno (SHU; MAIBACH, 2011). Além disso, células inflamatórias também possuem receptores para estrogênio, indicando a regulação de processos imunes pelo hormônio (ASHCROFT et al., 1999).

Diversos estudos *in vitro*, *in vivo* e clínicos correlacionam os efeitos de estrogênio sobre a pele a partir da privação do mesmo no período pós-menopausa. Dentre os efeitos descritos destacam-se a diminuição de colágeno e demora na cicatrização de feridas, fenômenos os quais tendem a melhorar com a suplementação hormonal (HALL; PHILLIPS, 2005). Na cicatrização cutânea, diversos estudos sugerem uma forte relação entre a ausência de estrógeno e a demora no processo (SHU; MAIBACH, 2011). Calvin e colaboradores (1998) demonstraram uma demora ao retorno da homeostase local quando ratas fêmeas foram ovariectomizadas em relação ao grupo controle (CALVIN et al., 1998); Outros estudos demonstram a aceleração do processo em homens e mulheres quando tratados com estrogênio tópico (SHU; MAIBACH, 2011). Logo, devido ao fato de existirem receptores estrogênicos em diversas células participantes do processo cicatrizante, como queratinócitos, fibroblastos, células do sistema imune e células endoteliais vasculares, acredita-se na potencialidade do estrógeno em regular e potencializar o fechamento de feridas (SHU; MAIBACH, 2011).

Há estudos demonstrando ainda a redução de 30 a 40% no desenvolvimento de úlceras venosas em pacientes idosos com a administração de estrogênio, assim como sugerindo o envolvimento do fator de inibição de migração de macrófagos (HALL; PHILLIPS, 2005). Outros demonstram a redução do processo inflamatório, aumento da re-epitelização e deposição de colágeno, seguido de uma diminuição da área da ferida e aumento da contração local estimulados pela administração de estrogênio exógeno (MUKAI et al., 2014). Nesse mesmo estudo, comparou-se a administração tópica de estrogênio com a administração subcutânea do mesmo. Como resultados, observou-se que a redução das áreas das feridas em camundongos fêmeas foi ainda maior quando aplicado topicamente, assim como o aparecimento de novos vasos sanguíneos e miofibroblastos (MUKAI et al., 2014).

Em um estudo clínico realizado por Ashcroft e colaboradores (1999), foi demonstrado uma melhora na extensão de feridas em homens e mulheres idosos após a aplicação tópica de estrógeno (na forma de patches) imediatamente antes da excisão da pele e em dose única 24 horas após a produção da ferida, demonstrando que o estrogênio pode ser usado tanto para prevenção quanto para tratamento. Os resultados foram relacionados com a ação do estrogênio sobre neutrófilos, reduzindo a expressão de L-selectina na superfície dos mesmos, proteína responsável por possibilitar a localização de sítios inflamatórios, levando, portanto, a redução de quimiotaxia de neutrófilos. Dessa forma, houve redução da atividade da elastase expressa por neutrófilos, o que promoveu a diminuição da degradação *in vitro* de fibronectina e, conseqüentemente, aumento de deposição da mesma no tecido *in vivo* após 7 dias de tratamento, promovendo um aumento do influxo de fibroblastos, e, portanto, levando a uma maior deposição de colágeno. Além disso, considerando que elastases ativam metaloproteinases de matriz, enzimas responsáveis pela degradação de colágeno, a redução das mesmas permite a diminuição da decomposição do colágeno, favorecendo mais uma vez, a cicatrização. Foi ainda relatado o aumento de colágeno como sendo ainda mais significativo em mulheres, relacionado, possivelmente, a um maior número de receptores estrogênicos na pele das mesmas em comparação a homens (ASHCROFT et al., 1999).

A citocina pró-inflamatória - fator inibitório de migração de macrófagos, produzida por monócitos, células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos, também tem sua expressão regulada por estrogênio, estando presente quando há inflamação excessiva em feridas abertas. É capaz de promover o aumento do tamanho de ferida, menor força de tração de cicatrizes e menor deposição de colágeno tipo I. Logo, quando realiza-se reposição hormonal, ocorre uma melhora no processo de cicatrização, pois o estrogênio é capaz de inibir sua produção (SHU; MAIBACH, 2011). Esse processo foi demonstrado em ratos e humanos, comprovando nesses últimos que a ausência de estrogênio na menopausa leva a um aumento dessa citocina sistemicamente e localmente na pele, havendo uma piora no progresso de cicatrização. Logo, é indicativo de que há uma forte correlação entre a presença dessa citocina e a demora no fechamento de feridas (SHU; MAIBACH, 2011).

Em outro estudo, a aplicação tópica de estrogênio em camundongas fêmeas diabéticas provocou um aumento de células progenitoras endoteliais, responsáveis pela neovascularização, e mesenquimais, células pluripotentes responsáveis pela capacidade de diferenciação e regeneração do tecido cicatricial. Demonstrou-se, dessa forma, que o aumento dessas células contribui para uma aceleração na cicatrização de feridas diabéticas após 6 dias de tratamento, havendo também maior deposição de colágeno no local (ZHUGE et al., 2018).

Em relação à influência dos níveis de estresse durante a cicatrização de feridas, Romana-Souza (2014) demonstrou que a cicatrização em homens e mulheres são mediadas diferentemente e, enquanto hormônios androgênicos masculinos possuem um efeito pró-inflamatório, levando ao aumento dos mediadores inflamatórios devido ao acréscimo do fator inibitório de migração de macrófagos; nas mulheres, o estrogênio exerce um efeito anti-inflamatório. O estrogênio tende a acelerar mais a cicatrização quando comparado a hormônios androgênicos em homens. Foi demonstrado que o estresse diminuiu a proliferação e migração de queratinócitos em camundogos, dificultando a etapa de re-epitelização, assim como levou a uma redução na diferenciação miofibroblástica e na neoangiogênese, provocando uma maior demora para a deposição de colágeno e, conseqüentemente, da contração do ferimento. A remoção dos testículos

em machos levou a uma melhora desse processo, enquanto a remoção dos ovários em fêmeas, ocasionou uma piora do mesmo (ROMANA-SOUZA et al., 2014).

Em contrapartida, estudos sugerem que ainda que o estrogênio acelere o processo cicatrizante, há uma piora na aparência da cicatriz em relação à cor, textura e contorno em pacientes com níveis de estrogênio mais elevados no corpo, como em jovens e mulheres em terapia de reposição hormonal. Cicatrizes de idosas pós-menopausa tendem a ser mais claras e planas, enquanto a de jovens são mais pigmentadas e evetidas. Já microscopicamente, há maior tendência de formação de novos vasos sanguíneos na derme papilar e a uma melhor organização de colágeno em idosas, enquanto em jovens, tem-se uma junção dermoepidérmica mais plana e camadas paralelas mais densas de colágeno cicatricial. Os autores sugerem que essas diferenças estejam relacionadas à expressão de TGF β por fibroblastos, citocina mediada por estrógeno. Logo, no final do processo cicatrizante, um antagonista de receptores estrogênicos, como o tamoxifeno, poderia ser uma melhor opção de tratamento (ASHCROFT et al., 1997).

4. Soja e atividade cicatrizante

A soja, *Glycine max*, é uma leguminosa consumida e cultivada em escala mundial, sendo originada no continente asiático. Apresenta um elevado teor de lipídios poli-insaturados e proteínas (30-45%), sendo também composta de carboidratos, minerais e metabólitos secundários, como saponinas e isoflavonas (BALISTEIRO; ROMBALDI; GENOVESE, 2013; NEMITZ et al., 2017). Sabe-se que a incidência de alguns tipos de cânceres, como o de mama e próstata, assim como osteoporose, doenças cardiovasculares, diabetes e redução dos sintomas do climatério é significativamente menor em países orientais, sendo estes relacionados ao alto consumo de soja, tornando-a uma semente largamente estudada e atrativa pela população ocidental (MAZUMDER; HONGSPRABHAS, 2016; NEMITZ et al., 2015a). Ainda que estejam presentes em torno de 1 a 3 mg/g de grão de soja, tais efeitos são relacionados principalmente à presença de isoflavonas, sendo a genisteína, isoflavona aglicona majoritária, o composto com efeitos mais promissores descritos (MAZUMDER; HONGSPRABHAS, 2016). Na pele, é

relacionada à capacidade de proteção e reversão da fotocarcinogênese, envelhecimento cutâneo e melhora no tratamento de feridas (NEMITZ et al., 2015a).

Isoflavonas são consideradas fitoestrógenos, substâncias análogas à estrutura do estradiol (EMMERSON et al., 2010; EO; LEE; LIM, 2016), as quais, considerando os efeitos do hormônio feminino sobre a pele, podem ser capazes de reduzir a inflamação e levar à estimulação da re-epitelização da pele, acelerando, portanto, o processo cicatricial (EMMERSON et al., 2010). São capazes de se ligar a receptores ERs, com maior afinidade aos ER β , apresentando menor correlação a cânceres estrógeno-dependentes (SHU; MAIBACH, 2011). Portanto, devido aos seus efeitos benéficos e menores efeitos colaterais, fitoestrógenos como as isoflavonas vem sendo estudadas como alternativas naturais ao hormônio endógeno (MARINI et al., 2010).

As isoflavonas encontradas na soja incluem as agliconas daidzeína, gliciteína e genisteína, seus glicosídeos daidzina, glicitina e genistina, e conjugados malonilglicosídeos e acetilglicosídeos (YUAN et al., 2008), sendo formados por dois anéis aromáticos ligados a um anel heterocíclico, apresentando substituintes tais como hidroxilas e metoxila (Figura 5) (NEMITZ et al., 2015a).

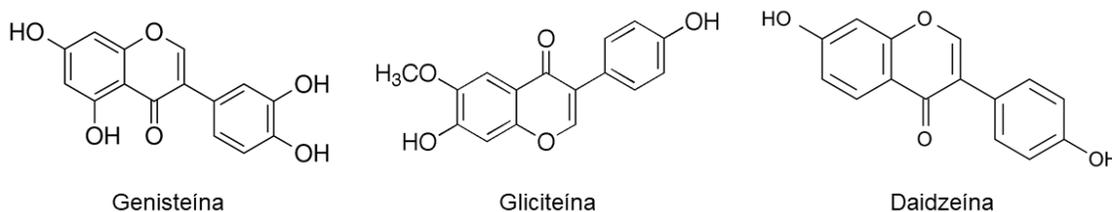


Figura 5. Estrutura química das isoflavonas agliconas.

Ainda que sejam as isoflavonas em suas formas glicosiladas as prevalentes nos grãos de soja *in natura*, sabe-se que para que as mesmas se tornem ativas, é necessária sua hidrólise (SCHMID et al., 2003). Esta pode ser realizada tanto por meios ácido, alcalino ou enzimático, sendo a via enzimática o método de escolha segundo Nemitz e colaboradores (NEMITZ et al., 2017), visto que a mesma é seletiva às isoflavonas, não

gerando compostos citotóxicos como o 5-hidroximetilfurfural e 5-etoximetil-2-furfural, resultantes da degradação de açúcares presente na soja (NEMITZ et al., 2016; NEMITZ; TEIXEIRA; VON POSER, 2015).

Dentre as diversas atividades biológicas que vêm sendo relatadas na literatura a respeito de isoflavonas da soja e que poderiam estar associadas com uma atividade cicatrizante, estão estudos que demonstram a capacidade antioxidante das mesmas (BACK et al., 2018; BALISTEIRO; ROMBALDI; GENOVESE, 2013; IOVINE et al., 2014; MAZUMDER; HONGSPRABHAS, 2016; MITCHELL et al., 1998; SZYMCZAK et al., 2017; WEI et al., 2002). Essa tem sido relacionada aos grupamentos hidroxilas das moléculas, permitindo as mesmas a agirem como quelantes de metais, sequestradores de radicais livres (BALISTEIRO; ROMBALDI; GENOVESE, 2013) e interferentes na atividade de enzimas antioxidantes endógenas, como glutathione peroxidase e redutase, catalase e superóxido desmutase (PARK et al., 2011). Ainda que a presença de radicais livres seja importante durante a fase inflamatória, a sua presença excessiva inibe a migração e a proliferação de células, assim como pode afetar a expressão e a função de mediadores de inflamação (PARK et al., 2011).

A genisteína vem sendo também relacionada, além da maior proteção ao estresse oxidativo, a propriedades anti-inflamatórias, ambos fenômenos demonstrados como propriedades envolvidas na cicatrização (EMMERSON et al., 2010; EO; LEE; LIM, 2016; PARK et al., 2011; TIE et al., 2013). Por último, estudos demonstram a capacidade das isoflavonas em promover a proliferação de queratinócitos (EMMERSON et al., 2010; NEMITZ et al., 2017) e fibroblastos e, conseqüentemente, aumentar a produção de colágeno (EMMERSON et al., 2010; SÜDEL et al., 2005), processos diretamente envolvidos no processo final de cicatrização. Tais atividades parecem estar relacionadas a receptores de estrogênio, obtendo-se uma melhora dos sintomas em tratamentos com a isoflavona genisteína em ratas ovarietomizadas (EMMERSON et al., 2010).

Em relação à atividade cicatrizante propriamente dita, Zhang e colaboradores (2007) relataram o aumento da proliferação de queratinócitos *in vitro* quando tratados com isoflavonas agliconas, além de uma atividade estrogênica em baixas concentrações relacionadas à daidzeína e genisteína (ZHANG et al., 2007). Resultados similares

demonstram a capacidade de uma fração enriquecida em isoflavonas agliconas em promover a proliferação de queratinócitos *in vitro* em baixas concentrações (NEMITZ et al., 2017). Já em cultura de fibroblastos, a genisteína presente em extratos de soja demonstrou um aumento da produção de colágeno (SÜDEL et al., 2005).

In vivo, o estudo realizado por Hwang e colaboradores (2001) mostrou-se em concordância com o descrito por Südel e colaboradores (SÜDEL et al., 2005), ao relatar que a genisteína aumentou a deposição de colágeno em feridas após o uso tópico em ratos (1 mg/200 g e 4 mg/200 g) por 14 dias (HWANG et al., 2001). Já Marini e colaboradores (2010) demonstraram os efeitos a longo prazo da administração subcutânea de genisteína (1 e 10 mg/kg) em ratas ovariectomizadas com subsequente produção de feridas, a qual resultou em uma melhora no processo cicatrizante e aumento da força de tensão das feridas, sendo a melhor resposta relacionada à menor dose do ativo (MARINI et al., 2010).

Em um estudo realizado por Emmerson e colaboradores (2010), camundongos fêmeas ovariectomizadas foram tratadas com injeções subcutâneas de 50 mg/kg de genisteína. A fim de investigar se os efeitos obtidos estavam relacionados a receptores estrogênicos (ER), utilizou-se o antagonista ICI (Tocris). Como resultados, observou-se efeitos na re-epitelização das feridas bem significativos para a genisteína, os quais foram ainda superiores aos obtidos por 17- β -estradiol. Os mesmos foram confirmados *in vitro* através de uma maior migração de queratinócitos, estando relacionados a ERs. Além disso, observou-se um aumento na migração *in vitro* de fibroblastos e macrófagos, os quais, no entanto, foram relacionados a mecanismos independentes de ERs. Demonstrou-se ainda um efeito anti-inflamatório para a isoflavona, em que mediadores pró-inflamatórios foram identificados como ER-dependentes, enquanto a redução de neutrófilos e macrófagos no local de ação como sendo ER-independentes. Por fim, a produção de metaloproteinases de matriz (MMP-9), responsáveis pela decomposição de matriz extracelular, incluindo a fibra colágena, foi diminuída com a presença de genisteína por mecanismos ER-dependentes (EMMERSON et al., 2010).

EO e colaboradores (2016) demonstraram que após duas semanas de suplementação dietética de genisteína em camundongos diabéticos (0,025 e 0,1%), a

velocidade de cicatrização foi aumentada, estando esta relacionada à modulação/diminuição de processos inflamatórios e estresse oxidativo (EO; LEE; LIM, 2016). Já em um estudo em porcos com biomateriais contendo isoflavonas, carboidratos e proteínas da soja obtidos a partir de extração hidroetanólica de grãos de soja, mostrou-se um aumento na síntese de colágeno e angiogênese e um adequado número de neutrófilos na ferida, o que poderia ser capaz de reduzir o risco de infecções em feridas crônicas (SHEVCHENKO; SANTIN, 2014).

Park e colaboradores (2011) demonstraram que a suplementação dietética de genisteína (0,025% e 0,1%) em camundongos por duas semanas levou a uma redução no estresse oxidativo através do aumento da atividade antioxidante de enzimas endógenas (glutathione peroxidase, superóxido desmutase e catalase), sendo essa dose-dependente. Foi relatada ainda uma modulação da atividade pró-inflamatória das citocinas NF- κ B and TNF- α , assim como uma redução no tamanho da ferida dose-dependente (PARK et al., 2011). Já Tie e colaboradores (2013) demonstraram que a isoflavona genisteína foi capaz de melhorar a cicatrização, também relatando o fechamento das feridas como dependente da dose. A cicatrização foi resultante de um aumento na angiogênese, demonstrada *in vitro* e *in vivo*, e através de mecanismos antioxidantes após uma dose de 5 mg/kg/dia do composto via subcutânea em ratos diabéticos (TIE et al., 2013). Logo, considerando os estudos já descritos na literatura, isoflavonas agliconas advindas da soja podem ser possíveis candidatas a ativos incorporados em formulações de uso tópico visando a ação cicatrizante da pele.

5. Nanoemulsões e hidrogéis de uso tópico

As isoflavonas agliconas são consideradas compostos de reduzida hidrossolubilidade, apresentando uma eficiente taxa de associação em sistemas de base nanotecnológica, como nanoemulsões, lipossomas e nanopartículas lipídicas sólidas para uso tópico, como recentemente descritos na patente BR 102015024240-9 A2 (NEMITZ et al., 2015b). Os coeficientes de partição (Log P) das isoflavonas majoritárias da soja, daizeína, gliciteína e genisteína, estão compreendidos entre cerca de 2,78, 2,57 e 2,98, favorecendo a penetração nas camadas da pele (NEMITZ et al., 2015a). Na

literatura, tem-se já descrito a incorporação de isoflavonas agliconas da soja em diversos sistemas nanoestruturados, como podem ser visualizados na tabela 1.

Tabela 1. Sistemas nanoestruturados contendo isoflavonas agliconas da soja.

Composto	Sistema	Referência
Genisteína	Lipossoma	(SCHMID et al., 2003)
Genisteína	Nanoemulsão	(SILVA et al., 2009)
Genisteína	Nanoemulsão	(VARGAS et al., 2012)
Genisteína	Carreador lipídico nanoestruturado	(ZHANG et al., 2013)
Genisteína	Nanocápsula	(ZAMPIERI et al., 2013)
Genisteína	Nanopartícula lipídica sólida e CLN	(ANDRADE et al., 2014)
Genisteína	Lipossoma	(AZAMBUJA et al., 2015)
Genisteína	Nanopartícula de PLGA e PLGA-TPGS	(WU et al., 2016)
Genisteína	Nanopartícula de ouro	(STOLARCZYK et al., 2017)
Genisteína	Lipossoma	(NIMMANO et al. 2018)
Daidzeína	Lipossoma	(DWIECKI et al, 2009)
Daidzeína	CLN com nanofibra de PLGA	(SONG et al. 2016)
Fração enriquecida de isoflavonas	Nanopartícula lipídica sólida	(DESHMUKH & AMIN, 2013)
Fração enriquecida de isoflavonas	Nanoemulsão	(NEMITZ et al., 2015)

CLN: carreador lipídico nanoestruturado

Considerando a natureza lipofílica de nanoestruturas e o tamanho reduzido, há uma maior facilidade em promover a entrega de compostos ao estrato córneo, assim como possivelmente permitir a permeação de ativos através de folículos capilares. Inclusive, estudos indicam a proteção de ativos ao evitar processos de hidrólise e foto-oxidação, assim como a penetração de compostos até camadas mais profundas,

evitando, no entanto, na maioria dos casos, processos de absorção sistêmica (GARCÊS et al., 2018).

Nanocarreadores lipídicos, por sua vez, apresentam como uma das vantagens a utilização de lipídios biodegradáveis, não irritantes e não tóxicos. Além disso, devido ao tamanho nanométrico, permitem a formação de um filme sobre o estrato córneo, o que acaba proporcionando uma maior penetração de ativos na pele (CZAJKOWSKA-KO; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019). Dentre esses sistemas encontram-se as nanoemulsões, as quais foram utilizadas recentemente na tese de doutorado de uma colaboradora do nosso grupo de pesquisa ao incorporar frações purificadas de isoflavonas agliconas da soja (NEMITZ, 2017).

Nanoemulsões caracterizam-se por dispersões óleo em água (o/a) em escala nanométrica, estabilizadas por um filme interfacial de tensoativos (KUMAR; SINGH, 2012; SILVA et al., 2009). Elas possibilitam a incorporação de um ativo em seu núcleo oleoso e/ou interface óleo/água, aumentando a solubilidade e biodisponibilidade de substâncias lipofílicas (KUMAR; SINGH, 2012), assim como sua estabilidade (NEMITZ et al., 2015a). Possuem ainda como vantagem a possibilidade de aumentar a porcentagem de retenção/permeação cutânea da substância estudada e aumentar o tempo de permanência da mesma nas camadas da pele devido ao aumento da superfície de contato, aumentando, dessa forma, os efeitos tópicos desejados (SILVA et al., 2009).

A fim de facilitar a aplicação das nanoemulsões, espalhabilidade e estabilidade, o desenvolvimento de um sistema gelificado se torna interessante. Devido a sua viscosidade mais elevada, formulações semissólidas tendem a permanecer no local de aplicação por mais tempo, prolongando o tempo de contato do ativo com a pele e facilitando a permeação. Dentre as opções, sistemas de caráter hidrofílicos, como hidrogéis, são mais fáceis de aplicar e normalmente são as formulações escolhidas por consumidores (GARCÊS et al., 2018). Estes são formados por redes poliméricas com alta afinidade pelo meio aquoso, as quais devido a sua estrutura porosa, permitem a incorporação de uma grande quantidade de água ou fluídos biológicos, como exsudatos, no seu interior. Além disso, podem ser facilmente removidos da lesão, se necessário, sem danificar o tecido, considerando a propriedade adesiva limitada da maioria dos

hidrogéis (GUPTA et al., 2019). Ainda, promovem um ambiente úmido e ligeiramente resfriado favorecendo a cicatrização e a redução de dor, respectivamente, e facilitando desbridamentos autolíticos de células (THAKKAR et al., 2016).

Dentre os polímeros disponíveis, encontra-se os derivados de ácido acrílico (carbômeros), polímero de escolha por outros autores para incorporação de sistemas nanoestruturados contendo isoflavonas agliconas da soja (DESHMUKH; AMIN, 2013; NEMITZ et al., 2015c; VARGAS et al., 2012), sendo também utilizado para sistemas visando a atividade cicatrizante (DUA et al., 2016; FLORES et al., 2015; GÜRSOY et al., 2014; HOTKAR et al., 2015; KHAN et al., 2013; KOEHLER et al., 2017). Possuem origem sintética, sendo bem caracterizados, e apresentando baixos riscos de contaminação em comparação a polímeros naturais (GRIP et al., 2017). Além disso, devido ao seu baixo custo, mostra-se como uma alternativa interessante para incorporação de ativos nanotecnológicos.

CAPÍTULO II

Artigo científico

O texto completo do capítulo II, que na dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 55 – 92, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico.

DISCUSSÃO GERAL

Tem crescido o número de pessoas acometidas por feridas crônicas no mundo, devido principalmente a diabetes mal controlado (pés diabéticos), falta de movimentação corporal ocasionadas por estadias longas a camas hospitalares, por exemplo (úlceras por pressão), e ainda, doenças de caráter endovenoso/circulatório (úlceras venosas) (BOATENG et al., 2008; DERAKHSHANDEH et al., 2018; GUPTA et al., 2019). Conseqüentemente, é crescente a busca por novas alternativas de tratamento, que cresce junto ao interesse pela utilização de espécies de origem vegetal (DERAKHSHANDEH et al., 2018).

Dessa forma, a proposta do presente trabalho foi incorporar uma fração rica em isoflavonas agliconas da soja em nanoemulsões e hidrogéis e avaliar o efeito de retenção/permeação cutânea *in vitro* quando em pele íntegra e lesionada, bem como verificar a viabilidade e proliferação de queratinócitos *in vitro* e avaliar a atividade de cicatrização cutânea em modelo murino. Ainda que os estudos descritos na literatura relatando a atividade cicatrizante das isoflavonas agliconas tenham sido realizados unicamente com a genisteína (EMMERSON et al., 2010; EO; LEE; LIM, 2016; HWANG et al., 2001; PARK et al., 2011; TIE et al., 2013), tem-se investigado as demais isoflavonas da soja, daidzeína e gliciteína, frente à capacidade anti-inflamatória (GOTTSTEIN et al., 2003; IOVINE et al., 2011) e antioxidante (FOTI et al., 2005; HUANG et al., 2008; LIU; ZHANG; ZENG, 2006). Estudos indicam ainda um efeito sinérgico quando as mesmas estão presentes concomitantemente em comparação as formas isoladas (BACK et al., 2018; IOVINE et al., 2011; KAO; CHEN, 2006; RANDO et al., 2009). Além disso, o único estudo localizado na busca da literatura que avaliou a atividade cicatrizante da genisteína através de uma formulação de uso tópico utilizou uma pomada contendo etanol a fim de contornar a baixa hidrossolubilidade da isoflavona. No entanto, o mesmo pode ser um solvente irritante ao entrar em contato com ferimentos de larga amplitude como um pé diabético ou úlceras.

Dessa forma, estudos contendo as três isoflavonas majoritárias da soja, daidzeína, gliciteína e genisteína, incorporadas a formulações sem adição de solvente orgânico e de caráter nanométrico, visando uma maior entrega dos compostos às camadas

cutâneas e, conseqüentemente, utilizando uma menor dose dos ativos, poderia se tornar uma estratégia promissora para o tratamento de feridas cutâneas.

Nesse estudo foram desenvolvidas nanoemulsões e hidrogéis contendo nanoemulsões com isoflavonas agliconas da soja com tamanho de gotícula entre 140 e 240 nm, satisfatórios para o método de emulsificação espontânea utilizado (BACK et al., 2018). Obteve-se valores de potencial zeta elevados em módulo, indicativos de estabilidade das formulações, e baixos índices de polidispersão, indicando a homogeneidade da distribuição do tamanho das gotículas (FACHEL et al., 2018). Os hidrogéis desenvolvidos apresentaram comportamento não-Newtoniano pseudoplástico, proporcionando uma melhor espalhabilidade da formulação utilizando-se uma pequena força de aplicação.

A fim de entendermos o perfil de retenção/permeação cutânea das isoflavonas, estudos de liberação *in vitro* foram conduzidos utilizando células de difusão do tipo Franz. A liberação, seguida de penetração, são influenciadas pela saída das moléculas dissolvidas ou suspensas na formulação e pelo coeficiente de partição interfacial com o tecido cutâneo. Logo, quanto maior a liberação, possivelmente maior será a penetração dos compostos para a pele (MARWAH et al., 2016). Em nossos estudos, demonstrou-se um perfil de liberação para isoflavonas totais relativamente menor em hidrogéis em comparação às nanoemulsões líquidas.

Já durante a avaliação do perfil de retenção/permeação cutânea *in vitro*, isoflavonas totais foram quantificadas em quantidades reduzidas nas camadas da pele a partir da solução de propilenoglicol, utilizada como controle, possivelmente indicando a baixa preferência dos compostos pela pele. No entanto, foi possível quantificar os mesmos quando veiculados a nanoemulsões em concentrações significativamente mais elevadas. Além disso, a maior retenção de isoflavonas no estrato córneo, seguido de derme e epiderme ocorreu a partir do hidrogel, sugerindo uma possível hidratação do estrato córneo pelo polímero, o que possivelmente promoveu a permeação (MARWAH et al., 2016).

Entretanto, considerando que o modelo animal escolhido neste trabalho foi o de feridas cutâneas de caráter profundo, estudos de retenção/permeação foram também realizados utilizando pele de orelha suína rasurada em diferentes níveis: com a camada superior da epiderme (estrato córneo) danificada e sem a camada epidérmica. Esses estudos demonstraram um aumento crescente na permeação das isoflavonas com a crescente remoção das camadas da pele, havendo uma maior permeação dos compostos advindos de nanoemulsões em relação a hidrogéis, possivelmente relacionado a menor viscosidade e maior liberação das isoflavonas a partir dessas formulações. Tal fato era esperado, visto que a partição dos compostos a partir dos veículos e posterior permeação na pele pode apresentar-se alterada quando a estrutura original do tecido encontra-se comprometida (GUJJAR; BANGA, 2014). Com o dano ao estrato córneo, as isoflavonas apresentaram maior tendência a serem retidas na epiderme. Foi demonstrado ainda a permeação até o fluido receptor após 4 e 6 horas advindas de nanoemulsões e hidrogéis, respectivamente. Com a remoção total da epiderme, isoflavonas foram detectadas após 2 horas no fluido receptor para ambas as formulações, concentrando-se na camada dérmica. Em contrapartida, em ambos os modelos, houve menor retenção e permeação de isoflavonas a partir da solução de propilenoglicol, demonstrando os efeitos positivos das formulações nanotecnológicas ao permitirem uma maior concentração dos compostos no local de ação.

Visando avaliar a segurança da fração nanoemulsionada quando em contato com queratinócitos, células responsáveis pela re-epitelização do tecido danificado, estudos de viabilidade celular em queratinócitos foram conduzidos *in vitro*. Nesses, foi demonstrada a ausência de toxicidade pelo ensaio de MTT e iodeto de propídeo (morte por necrose), além de um aumento na proliferação e migração celular até 0,5 µg/mL de isoflavonas totais para nanoemulsões em 24 horas, concentração superior aos resultados obtidos pela fração na sua forma isolada (0,25 µg/mL), demonstrando um efeito positivo das nanoemulsões. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Zhang e colaboradores (2007), os quais relataram atividade estrogênica para 0,4 µg/mL de isoflavonas (ZHANG; NG; LUO, 2007); assim como Nemitz e colaboradores (2017), os quais demonstraram um aumento da viabilidade celular até 0,1 µg/mL de isoflavonas agliconas em 24 horas e 0,5 µg/mL em 48 horas (NEMITZ et al., 2017).

Tais resultados mostraram-se em acordo aos obtidos *in vivo*, no qual foi demonstrado uma aceleração no processo de re-epitelização do tecido lesado quando isoflavonas foram administradas aos ferimentos na forma de hidrogéis contendo nanoemulsões. Além disso, a presença das isoflavonas provocou um aumento na espessura do epitélio em desenvolvimento após 12 dias. Emmerson e colaboradores (2010) também relataram efeitos semelhantes quando a isoflavona genisteína foi administrada subcutaneamente a camundongos (EMMERSON et al., 2010).

Durante os estudos *in vivo*, foi ainda demonstrada uma redução significativa na área das feridas tratadas com formulações contendo isoflavonas agliconas em nanoemulsões quando comparadas àquelas de animais que não receberam tratamentos. Os resultados positivos foram comparáveis ($p > 0,05$) aos resultados obtidos pelo Dersani®, produto atualmente muito utilizado para o tratamento de feridas. Foi constatada ainda diferença estatística ($p < 0,05$) entre animais tratados duas vezes ao dia com a fração de isoflavonas em hidrogéis contendo nanoemulsões àqueles que receberam apenas uma vez ao dia a formulação, demonstrando um efeito positivo no aumento das administrações diárias. Já em um estudo realizado por Eo e colaboradores (2016), foi visualizado a regressão de feridas de ratos diabéticos recebendo suplementação de genisteína maior do que grupos que não estavam recebendo a isoflavona (EO; LEE; LIM, 2016). Park e colaboradores (2011) observaram 50% de redução no tamanho das feridas em três dias quando os ratos foram tratados com uma dieta suplementada em genisteína a 0,1%, 30% a mais que ratos que não receberam a isoflavona. Já em concentração mais baixa (0,025%), não observou-se diferença em relação ao grupo controle (PARK et al., 2011). Tie e colaboradores (2013) demonstram que o fechamento da ferida foi mais pronunciado quando camundongos receberam 5 mg/kg de genisteína subcutânea por dia (TIE et al., 2013).

A fase inflamatória está ligada à proteção contra patógenos e regeneração do tecido. No entanto, a inflamação e ação oxidante excessiva podem provocar um atraso na cicatrização de feridas (PARK et al., 2011). No pé diabético, por exemplo, tem-se um prejuízo na fase inicial relacionado a uma exacerbação da produção de radicais livres ocasionados por quadros hiperglicemiantes e o desequilíbrio de defesas antioxidantes

endógenas (EO; LEE; LIM, 2016). Dessa forma, o uso de anti-inflamatórios e antioxidantes, como as isoflavonas, poderia oferecer um benefício para o tratamento. Nossos resultados demonstraram um aumento da citocina pró-inflamatória IL-1 para ratos tratados com a fração de isoflavonas agliconas uma vez ao dia e uma tendência à redução quando tratados duas vezes ao dia, estando essa citocina está relacionada à sinalização para um aumento no influxo de células para o local do ferimento (EO; LEE; LIM, 2016). Foi avaliada também a presença de TNF α na ferida, para o qual foi demonstrado uma tendência a um menor valor quando os animais foram tratados com a fração de isoflavonas. Esse resultado está de acordo com estudos prévios que demonstram uma redução dessa citocina na fase inflamatória para a genisteína quando em doses mais elevadas, sugerindo que esse mediador inflamatório esteja relacionado à dose administrada da isoflavona (EMMERSON et al., 2010; EO; LEE; LIM, 2016; PARK et al., 2011).

O dano oxidativo a lipídios foi menor quando os ratos foram tratados com hidrogéis contendo nanoemulsões em relação ao Dersani® e ao grupo sem tratamento, indicando um efeito antioxidante na pele a partir das formulações desenvolvidas. Adicionalmente, existem relatos de um efeito positivo da genisteína em aumentar enzimas antioxidantes endógenas, como glutathione peroxidase, superóxido desmutase e catalase (EO; LEE; LIM, 2016; PARK et al., 2011). Em conjunto, esses efeitos podem estar reduzindo significativamente o estresse oxidativo local, evitando dano tecidual e o prolongamento do processo cicatricial (PARK et al., 2011).

As análises histológicas demonstraram ainda uma tendência a maior formação de novos vasos sanguíneos em 48 horas para animais tratados com isoflavonas. Esse resultado está de acordo com estudos anteriores, os quais demonstraram aumento na neoangiogênese quando animais foram tratados com genisteína em doses superiores (MARINI et al., 2010; TIE et al., 2013).

Considerando os efeitos relatados na literatura para as isoflavonas da soja e os resultados obtidos durante a realização desse trabalho, são esperados efeitos promissores na aceleração do processo cicatrizante de uma fração enriquecida quando incorporada a nanoemulsões e hidrogéis de ácido acrílico. Ainda que as formulações

desenvolvidas tenham aumentado a retenção/permeação cutânea de isoflavonas na pele, é possível que doses maiores e um aumento do tempo de permanência das formulações no local da aplicação possam contribuir ainda mais com o processo de cicatrização. Estudos prévios relatam os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes como sendo dose-dependentes para genisteína. Além disso, o único estudo que demonstrou a aplicação tópica da genisteína (em veículo alcoólico e base neutra contendo óleos e petrolato), essa foi administrada em doses significativamente maiores (HWANG et al., 2001). Logo, estudos utilizando uma dose mais elevada de isoflavonas, assim como em outros modelos cicatrizantes *in vivo*, devem ser conduzidos a fim de melhor elucidar os efeitos cicatrizantes *in vivo* dessa fração de isoflavonas agliconas incorporada a hidrogéis contendo nanoemulsões.

CONCLUSÕES

- A partir de grãos de soja foi obtida, com rendimento satisfatório, uma fração enriquecida de isoflavonas agliconas (FIA).
- Nanoemulsões e hidrogéis contendo FIA demonstraram gotículas nanométricas, índice de polidispersão baixo e potencial zeta negativo e alto em módulo, mantendo-se estáveis ao longo de três meses.
- Os valores de pH obtidos para os hidrogéis espessados com Carbopol® demonstraram-se adequados para a via tópica e local de administração.
- A viscosidade de nanoemulsões contendo FIA foi levemente superior a nanoemulsões na ausência de FIA. Os hidrogéis contendo FIA apresentaram comportamento não-newtoniano pseudoplástico.
- A liberação de isoflavonas totais demonstrou-se menor para hidrogéis contendo FIA em relação a nanoemulsões, mas maior do que a solução controle em propilenoglicol. Em relação à genisteína, foi observada uma menor liberação a partir de nanoemulsões.
- Em pele intacta, isoflavonas totais e genisteína apresentaram maiores taxas de retenção quando incorporadas a formulações nanométricas, sendo detectadas em maiores quantidades no estrato córneo, seguidas da derme.
- A permeação de isoflavonas aumentou significativamente com a remoção sucessiva das camadas superiores da pele, atingindo o fluído acceptor.
- Estudos com queratinócitos *in vitro* demonstraram ausência de citotoxicidade e morte por necrose. Nanoemulsões contendo FIA apresentaram maior proliferação e migração celular em relação à FIA isolada em concentrações de 0,5 µg/mL.
- *In vivo*, nanoemulsões contendo FIA incorporadas a hidrogéis demonstram-se promissoras na melhora do processo cicatrizante, possibilitando o fechamento mais acelerado das feridas em comparação aos animais não tratados.
- Foi observado uma maior proteção oxidativa para formulações nanométricas contendo FIA ao reduzirem a peroxidação lipídica *in vivo*.

- *In vivo*, foi também demonstrada uma tendência a redução de citocinas inflamatórias IL-1 e TNF α .
- Histologicamente, foi observado *in vivo* uma tendência ao aumento do número de novos vasos sanguíneos em 48 horas para formulações contendo FIA.
- Formulações contendo FIA promoveram uma maior velocidade de re-epitelização, apresentando epitélio mais espesso comparado à formulação comercial Dersani®.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, L. M. et al. Impact of lipid dynamic behavior on physical stability, in vitro release and skin permeation of genistein-loaded lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 88, p. 40–47, 2014.

ASHCROFT, G. S. et al. Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF-beta1 levels. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 11, p. 1209–1215, 1997.

ASHCROFT, G. S. et al. Topical Estrogen Accelerates Cutaneous Wound Healing in Aged Humans Associated with an Altered Inflammatory Response. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 155, n. 4, p. 1137–1146, 1999.

AZAMBUJA, C. R. L. et al. Physico-chemical characterization of asolectin – genistein liposomal system: An approach to analyze its in vitro antioxidant potential and effect in glioma cells viability. **Chemistry and Physics of Lipids**, [s. l.], v. 193, p. 24–35, 2015.

BACK, P. I. et al. Skin permeation and oxidative protection effect of soybean isoflavones from topical nanoemulsions — a comparative study of extracts and pure compounds. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 3029–3039, 2018.

BALISTEIRO, D. M.; ROMBALDI, C. V.; GENOVESE, M. I. Protein, isoflavones, trypsin inhibitory and in vitro antioxidant capacities: Comparison among conventionally and organically grown soybeans. **Food Research International**, [s. l.], v. 51, p. 8–14, 2013.

BOATENG, J. S. et al. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 97, n. 8, p. 2892–2923, 2008.

CALVIN, M. et al. The effects of ovarian hormone deficiency on wound contraction in a rat model. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, [s. l.], v. 105, p. 223–227, 1998.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 51–58, 2007.

ČUŘÍKOVÁ, A. B. et al. Simplified stratum corneum model membranes for studying the effects of permeation enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 534, p. 287–296, 2017.

CZAJKOWSKA-KO, A.; SZEKALSKA, M.; WINNICKA, K. Nanostructured lipid carriers: A

potential use for skin drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, [s. l.], v. 71, p. 156–166, 2019.

DERAKHSHANDEH, H. et al. Smart bandages: The future of wound care. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 36, n. 12, p. 1259–1274, 2018.

DESHMUKH, K.; AMIN, P. Formulation and evaluation of solid – lipid nanoparticle based 0.1% soy isoflavone dermal gels. **Journal of Pharmaceutical and BioSciences**, [s. l.], v. 1, p. 7–18, 2013.

DUA, K. et al. Norfloxacin and metronidazole topical formulations for effective treatment of bacterial infections and burn wounds. **Interventional Medicine & Applied Science**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 68–76, 2016.

DWIECKI, K. et al. Biology antioxidant activity of daidzein, a natural antioxidant, and its spectroscopic properties in organic solvents and phosphatidylcholine liposomes. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, [s. l.], v. 96, p. 242–248, 2009.

EMBRAPA SOJA. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja> (Acessado em março de 2019).

EMMERSON, E. et al. The phytoestrogen genistein promotes wound healing by multiple independent mechanisms. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 321, p. 184–193, 2010.

EO, H.; LEE, H.-J.; LIM, Y. Ameliorative effect of dietary genistein on diabetes induced hyper-inflammation and oxidative stress during early stage of wound healing in alloxan induced diabetic mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 478, p. 1021–1027, 2016.

FACHEL, F. N. S. et al. Box-Behnken design optimization of mucoadhesive chitosan-coated nanoemulsions for rosmarinic acid nasal delivery—In vitro studies. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 199, p. 572–582, 2018.

FARAGE, M. A. et al. Characteristics of the aging skin: A review. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, [s. l.], v. 26, p. 343–357, 2007.

FLORES, F. C. et al. Hydrogels containing nanocapsules and nanoemulsions of tea tree

oil provide antiedematogenic effect and improved skin wound healing. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, [s. l.], v. 15, p. 800–809, 2015.

FOTI, P. et al. Comparison between daidzein and genistein antioxidant activity in primary and cancer lymphocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 433, p. 421–427, 2005.

GARCÊS, A. et al. Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 112, p. 159–167, 2018.

GHAFOURIAN, T. et al. Modelling the effect of mixture components on permeation through skin. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 398, p. 28–32, 2010.

GOTTSTEIN, N. et al. Effect of genistein and daidzein on platelet aggregation and monocyte and endothelial function. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 89, p. 607–615, 2003.

GRIP, J. et al. Sprayable Carbopol hydrogel with soluble beta-1,3/1,6-glucan as an active ingredient for wound healing – Development and in-vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 107, p. 24–31, 2017.

GUIMARÃES BARBOSA, J.; NOGUEIRA CAMPOS, L. Diretrizes para o tratamento da úlcera venosa. **Enfermaria Global**, [s. l.], v. 20, p. 1–13, 2010.

GUJJAR, M.; BANGA, A. K. Vehicle influence on permeation through intact and compromised skin. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 472, p. 362–368, 2014.

GUPTA, A. et al. The production and application of hydrogels for wound management: A review. **European Polymer Journal**, [s. l.], v. 111, p. 134–151, 2019.

GÜRSOY, K. et al. Effect of topically applied sildenafil citrate on wound healing: experimental study. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 125–131, 2014.

HALL, G.; PHILLIPS, T. J. Estrogen and skin: The effects of estrogen, menopause, and

hormone replacement therapy on the skin. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s. l.], v. 53, n. 4, p. 555–568, 2005.

HOTKAR, M. S. et al. Preliminary investigation of topical nitroglycerin formulations containing natural wound healing agent in diabetes-induced foot ulcer. **International Wound Journal**, [s. l.], v. 12, p. 210–217, 2015.

HUANG, Z.-R. et al. In vitro and in vivo evaluation of topical delivery and potential dermal use of soy isoflavones genistein and daidzein. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 364, p. 36–44, 2008.

HWANG, K. et al. The effect of topical genistein on soft tissue wound healing in rats. **The Journal of Histotechnology**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 95–99, 2001.

IOVINE, B. et al. Synergic effect of genistein and daidzein on UVB-induced DNA damage: An effective photoprotective combination. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [s. l.], v. 2011, p. 1–8, 2011.

IOVINE, B. et al. Isoflavones in aglycone solution enhance ultraviolet B-induced DNA damage repair efficiency. **Clinical and Experimental Dermatology**, [s. l.], v. 39, p. 391–394, 2014.

JEPPS, O. G. et al. Modeling the human skin barrier — Towards a better understanding of dermal absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 65, p. 152–168, 2013.

KAO, T.-H.; CHEN, B.-H. Functional components in soybean cake and their effects on antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 54, p. 7544–7555, 2006.

KHAN, A. W. et al. Formulation development, optimization and evaluation of aloe vera gel for wound healing. **Pharmacognosy Magazine**, [s. l.], v. 9, n. Suppl 1, p. S6–S10, 2013.

KIKWAI, L. et al. Effect of vehicles on the transdermal delivery of melatonin across porcine skin in vitro. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 83, p. 307–311, 2002.

KOEHLER, J. et al. pH-modulating poly(ethylene glycol)/alginate hydrogel dressings for the treatment of chronic wounds. **Macromolecular Bioscience**, [s. l.], p. 1–11, 2017.

KOEHLER, J.; BRANDL, F. P.; GOEPFERICH, A. M. Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds. **European Polymer Journal**, [s. l.], v. 100, p. 1–11, 2018.

KUMAR, S. L. H.; SINGH, V. Nanoemulsification - a novel targeted drug delivery tool. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 40–45, 2012.

LANE, M. E. Skin penetration enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 447, p. 12–21, 2013.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, [s. l.], v. 25, p. 9–18, 2007.

LIU, H.; ZHANG, C.; ZENG, W. Estrogenic and antioxidant effects of a phytoestrogen daidzein on ovarian germ cells in embryonic chickens. **Domestic Animal Endocrinology**, [s. l.], v. 31, p. 258–268, 2006.

MARINI, H. et al. Genistein aglycone improves skin repair in an incisional model of wound healing: A comparison with raloxifene and oestradiol in ovariectomized rats. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 160, p. 1185–1194, 2010.

MARWAH, H. et al. Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. **Drug Delivery**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 564–578, 2016.

MAZUMDER, A. R.; HONGSPRABHAS, P. Genistein as antioxidant and antibrowning agents in in vivo and in vitro: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 82, p. 379–392, 2016.

MINGHETTI, P. et al. Ex vivo study of transdermal permeation of four diclofenac salts from different vehicles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 96, n. 4, p. 814–823, 2007.

MITCHELL, J. H. et al. Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 360, n. 1, p. 142–148, 1998.

MUKAI, K. et al. 17 β -Estradiol administration promotes delayed cutaneous wound

healing in 40-week ovariectomised female mice. [s. l.], p. 1–9, 2014.

NEMITZ, M. C. et al. Bioactive soy isoflavones: extraction and purification procedures, potential dermal use and nanotechnology-based delivery systems. **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], v. 14, p. 849–869, 2015. a.

NEMITZ, M. C. et al. **Carreadores lipídicos de tamanho nanométrico compreendendo fração enriquecida de isoflavonas agliconas da soja, processo de obtenção dos mesmos e formulações compreendendo os mesmos**, BR 102015024240-9 A2, 2015. b.

NEMITZ, M. C. et al. A versatile, stability-indicating and high-throughput ultra-fast liquid chromatography method for the determination of isoflavone aglycones in soybeans, topical formulations, and permeation assays. **Talanta**, [s. l.], v. 134, p. 183–193, 2015. c.

NEMITZ, M. C. et al. Determination of the main impurities formed after acid hydrolysis of soybean extracts and the in vitro mutagenicity and genotoxicity studies of 5-ethoxymethyl-2-furfural. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 129, p. 427–432, 2016.

NEMITZ, M. C. et al. Soybeans isoflavone aglycone-rich extracts: Optimization by different bioprocesses and production of a purified fraction with promising wound healing property. **Industrial Crops & Products**, [s. l.], v. 105, p. 193–202, 2017.

NEMITZ, M. C. **Fração enriquecida em isoflavonas agliconas da soja (Glycine max): Estudos farmacotécnicos, físico-químicos, analíticos e de permeação cutânea**. 2017. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [s. l.], 2017.

NEMITZ, M. C.; TEIXEIRA, H. F.; VON POSER, G. L. A new approach for the purification of soybean acid extract: Simultaneous production of an isoflavone aglycone-rich fraction and a furfural derivative-rich by-product. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 67, p. 414–421, 2015.

NEMITZ, M. C.; VON POSER, G. L.; TEIXEIRA, H. F. In vitro skin permeation/retention of daidzein, genistein and glycitein from a soybean isoflavone rich fraction-loaded nanoemulsions and derived hydrogels. **Journal of Drug Delivery Science and**

Technology, [s. l.], v. 51, p. 63–69, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.02.034>>

NIMMANO, N.; SOMAVARAPU, S.; TAYLOR, K. M. G. Aerosol characterisation of nebulised liposomes co-loaded with erlotinib and genistein using an abbreviated cascade impactor method. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 542, p. 8–17, 2018.

PARK, E. et al. Effects of genistein on early-stage cutaneous wound healing. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 410, p. 514–519, 2011.

PRAÇA, F. S. G. et al. Evaluation of critical parameters for in vitro skin permeation and penetration studies using animal skin models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 111, p. 121–132, 2018.

RANDO, G. et al. Differential effect of pure isoflavones and soymilk on estrogen receptor activity in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 237, p. 288–297, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.022>>

ROMANA-SOUZA, B. et al. Brain, behavior, and immunity gonadal hormones differently modulate cutaneous wound healing of chronically stressed mice. **Brain Behavior and Immunity**, [s. l.], v. 36, p. 101–110, 2014.

SAMI, D. G.; HEIBA, H. H.; ABDELLATIF, A. Wound healing models: A systematic review of animal and non-animal models. **Wound Medicine**, [s. l.], v. 24, p. 8–17, 2019.

SCHMID, D. et al. Penetration and metabolism of isoflavones in human skin. **Cosmetics & Toiletries**, [s. l.], v. 118, n. 9, p. 71–74, 2003.

SHAHZAD, Y. et al. Breaching the skin barrier through temperature modulations. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 202, p. 1–13, 2015.

SHEVCHENKO, R. V.; SANTIN, M. Pre-clinical evaluation of soybean-based wound dressings and dermal substitute formulations in pig healing and non-healing in vivo models. **Burns & Trauma**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 187–195, 2014.

SHU, Y. Y.; MAIBACH, H. I. Estrogen and skin: Therapeutic options. **American Journal**

of **Clinical Dermatology**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 297–311, 2011.

SILVA, A. P. C. et al. Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein. **Pharmazie**, [s. l.], v. 64, p. 32–35, 2009.

SILVA, M. J. S. **Protocolo de cuidados e tratamento para lesão por pressão**. 2018. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, [s. l.], 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018**. [s.l: s.n.].

SONG, J.; FAN, X.; SHEN, Q. Daidzein-loaded nanostructured lipid carriers-PLGA nanofibers for transdermal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 501, p. 245–252, 2016.

STOLARCZYK, E. U. et al. Synthesis and characterization of genistein conjugated with gold nanoparticles and the study of their cytotoxic properties. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 96, p. 176–185, 2017.

SÜDEL, K. M. et al. Novel aspects of intrinsic and extrinsic aging of human skin: Beneficial effects of soy extract. **Photochemistry and Photobiology**, [s. l.], v. 81, p. 581–587, 2005.

SZYMCZAK, G. et al. Evaluation of isoflavone content and antioxidant activity of selected soy taxa. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], v. 57, p. 40–48, 2017.

THAKKAR, V. et al. Development and characterization of novel hydrogel containing antimicrobial drug for treatment of burns. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 158–168, 2016.

TIE, L. et al. Genistein accelerates refractory wound healing by suppressing superoxide and FoxO1/iNOS pathway in type 1 diabetes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [s. l.], v. 24, p. 88–96, 2013.

TSAKOVSKA, I. et al. Quantitative structure-skin permeability relationships. **Toxicology**, [s. l.], v. 387, p. 27–42, 2017.

VARGAS, B. A. et al. Development of topical hydrogels containing genistein-loaded nanoemulsions. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, [s. l.], v. 8, p. 330–336, 2012.

WEI, H. et al. Inhibition of ultraviolet light-induced oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by isoflavone genistein. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 185, p. 21–29, 2002.

WONG, R. et al. The dynamic anatomy and patterning of skin. **Experimental Dermatology**, [s. l.], v. 25, p. 92–98, 2016.

WU, B. et al. Genistein-loaded nanoparticles of star-shaped diblock copolymer mannitol-core PLGA – TPGS for the treatment of liver cancer. **Materials Science & Engineering C**, [s. l.], v. 59, p. 792–800, 2016.

YUAN, D. et al. An improved method for basic hydrolysis of isoflavone malonylglucosides and quality evaluation of chinese soy materials. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 56, p. 1–6, 2008.

ZAMPIERI, A. L. T. de C. et al. Biodegradable polymeric nanocapsules based on poly(DL-lactide) for genistein topical delivery: Obtention, characterization and skin permeation studies. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, [s. l.], v. 9, p. 527–534, 2013.

ZHANG, E. J.; NG, K. M.; LUO, K. Q. Extraction and purification of isoflavones from soybeans and characterization of their estrogenic activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 55, p. 6940–6950, 2007.

ZHANG, W. et al. Design, characterization, and in vitro cellular inhibition and uptake of optimized genistein-loaded NLC for the prevention of posterior capsular opacification using response surface methodology. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 454, p. 354–366, 2013.

ZHUGE, Y. et al. The effect of estrogen on diabetic wound healing is mediated through increasing the function of various bone marrow-derived progenitor cells. **Journal of Vascular Surgery**, [s. l.], p. 127S-135S, 2018.

ANEXOS

Autorização de uso de imagens

ANEXO 1. Autorização para uso de imagem como Figura 1 e 2 no Capítulo I.

 **Copyright Clearance Center**  **RightsLink®** [Home](#) [Account Info](#) [Help](#)

informa
healthcare

Title: Structural Characteristics of the Aging Skin: A Review
Author: Miranda A. Farage, , Kenneth W. Miller, et al
Publication: Cutaneous and Ocular Toxicology
Publisher: Taylor & Francis
Date: Jan 1, 2007
Rights managed by Taylor & Francis

Logged in as:
Patricia Ines Back
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Account #:
3001439943
[LOGOUT](#)

Thesis/Dissertation Reuse Request

Taylor & Francis is pleased to offer reuses of its content for a thesis or dissertation free of charge contingent on resubmission of permission request if work is published.

[BACK](#)

[CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2019 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#).
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customer@copyright.com

ANEXO 2. Autorização para uso de imagem como Figura 3 no Capítulo I.

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

May 25, 2019

This Agreement between Universidade Federal do Rio Grande do Sul -- Patricia Ines Back ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4580880654838
License date	May 02, 2019
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Pharmacological Reports
Licensed Content Title	Nanostructured lipid carriers: A potential use for skin drug delivery systems
Licensed Content Author	Anna Czajkowska-Kośnik, Marta Szekalska, Katarzyna Winnicka
Licensed Content Date	Feb 1, 2019
Licensed Content Volume	71
Licensed Content Issue	1
Licensed Content Pages	11
Start Page	156
End Page	166
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Original figure numbers	Fig. 1
Title of your thesis/dissertation	Avaliação de atividade cicatrizante de fração rica em isoflavonas da soja incorporada em nanoemulsões dispersas em hidrogéis: estudos in vitro e in vivo
Expected completion date	May 2019
Estimated size (number of pages)	105
Requestor Location	Universidade Federal do Rio Grande do Sul Av. Ipiranga, 2752 Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90610-000 Brazil Attn: Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

ANEXO 3. Autorização para uso de imagem como Figura 4 no Capítulo I.

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

May 02, 2019

This Agreement between Universidade Federal do Rio Grande do Sul -- Patricia Ines Back ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4573180170325
License date	Apr 20, 2019
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	European Polymer Journal
Licensed Content Title	The production and application of hydrogels for wound management: A review
Licensed Content Author	Abhishek Gupta, Marek Kowalczyk, Wayne Heaselgrave, Stephen T. Britland, Claire Martin, Iza Radecka
Licensed Content Date	Feb 1, 2019
Licensed Content Volume	111
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	18
Start Page	134
End Page	151
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Original figure numbers	Fig. 1
Title of your thesis/dissertation	Avaliação de atividade cicatrizante de fração rica em isoflavonas da soja incorporada em nanoemulsões dispersas em hidrogéis: estudos in vitro e in vivo
Expected completion date	May 2019
Estimated size (number of pages)	105
Requestor Location	Universidade Federal do Rio Grande do Sul Av. Ipiranga, 2752 Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90610-000 Brazil Attn: Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	