UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do perfil de permeação cutânea *in vitro* da daidzeína em
nanoemulsão cosmética: uma abordagem com foco na avaliação de
segurança**

Aline Isis Porto Ventura Armelini

Ribeirão Preto
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do perfil de permeação cutânea *in vitro* da daidzeína em nanoemulsão cosmética: uma abordagem com foco na avaliação de segurança

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Aline Isis Porto Ventura Armelini

Orientadora: Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley

Ribeirão Preto
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Armellini, Aline Isis Porto Ventura.

Avaliação do perfil de permeação cutânea *in vitro* da daidzeína em nanoemulsão cosmética: uma abordagem com foco na avaliação de segurança. Ribeirão Preto, 2015.

85 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Bentley, Maria Vitória Lopes Badra.

1. Permeação cutânea. 2. Cosméticos. 3. Daidzeína.
4. Segurança de Cosméticos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aline Isis Porto Ventura Armelini

Avaliação do perfil de permeação cutânea *in vitro* da daidzeína em nanoemulsão cosmética: uma abordagem com foco na avaliação de segurança

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos
Orientadora: Profa. Dra. Maria Vitória
Lopes Badra Bentley

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus adorados familiares, que tanto me apoiaram e tiveram paciência comigo ao longo desta tão incrível e importante jornada, que foi o mestrado para mim. Luis meu amado esposo, Vincenzo meu queridíssimo filho, Mariangela e Osvaldo meus adorados pais, anjos que me receberam aqui nesta terra.

Agradecimento

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, e por ter me presenteado com uma família e amigos inesquecíveis, pessoas de muita luz que têm me acompanhado.

Agradeço ao meu marido, Luis, pela paciência e por ter me apoiado nestes quase três anos de pós-graduação. Por ter confiado em mim e acreditado comigo na importância da decisão tomada.

Agradeço a minha mãe por ter me ajudado tanto, por ter me substituído nas minhas tarefas de dona de casa, esposa e mãe nos momentos em que tive que estar ausente. Da mesma forma agradeço ao meu pai, que mesmo sem perceber, tanto me ajudou. Agradeço aos dois por sempre terem me estimulado a estudar e correr atrás dos meus sonhos. Agradeço principalmente pela preocupação e pelo apoio emocional.

Agradeço à minha orientadora, pelos ensinamentos, por ter me acolhido como sua aluna e pela confiança depositada em mim.

Agradeço às minhas sensacionais gestoras, Fabiana Martin e Elizabete Vicentini, por toda confiança e apoio. São pessoas que a cada dia admiro mais.

Agradeço a todos os amigos da Gerência de Segurança de Produtos da Natura que durante este período compreenderam as minhas ausências e me apoiaram com muito carinho em tudo o que precisei.

Agradeço à Viviane Pieri e seu incrível time técnico: Fernando Santos, Gustavo Oliveira, Karina Moretti, Murilo Brighenti e Shirlei Silva, por terem me autorizado a utilizar livremente toda a estrutura de seus laboratórios e por terem me prestado apoio técnico quando mais precisei.

Agradeço à Natura, empresa que me possibilitou a realização de um antigo sonho, sem que eu tivesse que abrir mão da minha carreira profissional. Empresa que tanto admiro por sua atuação, empresa que apoia seus colaboradores, incentivando seu constante aprimoramento técnico, e fomentando a pesquisa acadêmica no Brasil, provando que é possível fazer pesquisa de verdade mesmo em ambiente empresarial.

Agradeço aos amigos, alunos e funcionários do laboratório de tecnologia farmacêutica da FCFRP, que desde o início me acolheram maravilhosamente bem.

E por fim, agradeço imensamente às colegas Patrícia Mazureki, Mayara Trevisani, Fabíola Garcia e Margarete Moreno, que não só me apoiaram tecnicamente em meus experimentos, como também tão prontamente me acolheram em suas casas sempre que precisei passar alguns dias em Ribeirão Preto.

RESUMO

ARMELINI, A. I. P. V. **Avaliação do perfil de permeação cutânea *in vitro* da daidzeína em nanoemulsão cosmética: uma abordagem com foco na avaliação de segurança.** 2015. 85f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Com o crescente aumento do mercado cosmético e com o consequente aumento da exposição da população às diversas moléculas que os compõem, se faz fundamental os cuidados no desenvolvimento e na avaliação da segurança de produtos cosméticos. Diferentes ferramentas estão disponíveis para compor a estratégia de avaliação de segurança, sendo uma delas a avaliação da retenção e permeação cutânea *in vitro*, técnica que não apenas fornece dados para a avaliação da eficácia de princípios ativos, como também permite um aprofundamento na avaliação toxicológica dos ingredientes e produtos cosméticos. Assim como cresce o interesse da população por produtos cosméticos, observa-se também um aumento considerável na procura por produtos contendo ingredientes botânicos, o que torna ainda mais desafiadora a avaliação de segurança. Sendo as isoflavonas de soja bastante consumidas na alimentação e, em alguns casos, aplicadas a cosméticos, e tendo elas propriedades dérmicas interessantes, este trabalho teve como objetivo estudar o perfil de retenção e permeação cutânea *in vitro* da daidzeína, umas das mais importantes isoflavonas já descritas e estudadas. Para tal, desenvolveu-se uma nanoemulsão cosmética e aplicou-se um extrato botânico de soja rico em daidzeína. Desenvolveu-se e validou-se um método analítico por cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de diodos, e ainda procedeu-se a caracterização da nanoemulsão, a avaliação teórica de segurança de todos os seus ingredientes, além dos estudos de retenção e permeação cutânea *in vitro*, foco central deste trabalho. Como resultados, teve-se que a técnica de emulsificação à quente seguida de sonicação adotada para o preparo da nanoemulsão foi eficiente, possibilitando a obtenção de uma nanoemulsão pouco polidispersa e com tamanho de partícula médio abaixo de 200 nm. A retenção e permeação cutânea foram dependentes do tempo de aplicação, sendo que a nanoemulsão proporcionou uma maior retenção e menor permeação cutâneas da daidzeína comparado com solução controle no tempo de 6 h. A nanoemulsão desenvolvida mostrou-se adequada para a liberação tópica da daidzeína presente em extrato vegetal. Os testes *in vitro* de retenção e permeação cutânea são cruciais para esta etapa de desenvolvimento das formulações, quando os aspectos liberação tópica e possível toxicidade sistêmica são avaliados.

Palavras-chave: permeação cutânea; cosméticos; daidzeína; segurança de cosméticos.

ABSTRACT

ARMELINI, A. I. P. V. **Evaluation of the *in vitro* dermal absorption profile of daidzein in a cosmetic nanoemulsion: an approach focused on the safety assessment.** 2015. 85f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

With the continuous growth of the cosmetic market, and so the increase in the exposure of the population to the different molecules present on these products, the care in the development and the safety assessment of cosmetics plays an important role. Different tools are available to compose the safety assessment strategy, one of which is the dermal absorption *in vitro* assay. This technique does not only give information regarding the efficacy of active ingredients, but also allow a deep toxicological evaluation of cosmetic ingredients and products. As the interest of the population on cosmetic products grows, also grows people's search for products containing botanical ingredients, fact that turns the safety assessment more challenger. As the soy isoflavones are part of the diet and sometimes used in cosmetic products, and as they present interesting dermal properties, this work aimed to study the profile of skin retention and dermal absorption of the daidzein, one of the most important isoflavones ever described and studied. For that, a cosmetic nanoemulsion was developed, in which a soy botanical extract rich in daidzein was added. An analytical method was developed and validated, based in liquid chromatography coupled with a diode array detector. Besides the *in vitro* studies of skin retention and dermal absorption, main focus of this project, the characterization of the nanoemulsion and the theoretical safety assessment of all of its ingredients were also performed. Regarding the results, the technique of hot emulsification followed by sonication used for the preparation of the nanoemulsion could be considered efficient based on the fact that it was less polidisperse and with a medium particle size below 200 nm. The skin retention and permeation were dependent on the time of application, and, it was observed that the nanoemulsion has led to greater retention and lesser skin permeation of daidzein incorporated into the nanoemulsion when compared to the control solution after 6 h of application. The nanoemulsion developed showed to be adequate to topical delivery of daidzein that is present in plant extract. *In vitro* skin retention and skin permeation are critical for this stage of development of the formulations, considering that aspects of topical delivery and systemic toxicity are evaluated.

Keywords: dermal absorption; cosmetics; daidzein; safety of cosmetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação de uma seção transversal da pele humana, demonstrando suas diferentes camadas e apêndices. (Adaptado de WILLIAMS, 2003, do artigo de EL MAGHRABY et al., 2008).....	4
Figura 2. Estrutura da pele visualizada com o auxílio de lentes microscópicas. (Adaptado de SHAI et al., 2009).....	5
Figura 3. Diagrama simplificado da estrutura da pele e macro rotas de transporte de substâncias: (1) através dos dutos sudoríparos; (2) através do estrato córneo ou (3) através dos folículos pilosos com as glândulas sudoríparas associadas. (Adaptado de BARRY, 2001).....	6
Figura 4. Rotas de permeação através do estrato córneo (Extraído de CAROLLO, A. R. H., 2007; Redesenhado de BARRY, 1987)	7
Figura 5. Alguns métodos para otimização das terapias transdérmicas. (Adaptado de BARRY, 2001)	8
Figura 6. Representação esquemática da extrapolação de dados experimentais de animais para seres humanos (adaptado de RENWICK, 1998)	12
Figura 7. Estruturas moleculares das isoflavonas daidzeína e genisteína	18
Figura 8. Cromatógrafo a líquido Waters utilizado ao longo do projeto de pesquisa para doseamento da daidzeína em diferentes extratos botânicos e para as quantificações desta isoflavona nos experimentos de liberação, retenção e permeação cutânea.....	24
Figura 9. Foto dos seis extratos botânicos estudados para doseamento de genisteína e daidzeína	25
Figura 10. Esquema ilustrativo demonstrando de forma resumida o processo de obtenção da nanoemulsão cosmética.....	27
Figura 11. Nanoemulsão cosmética desenvolvida. Os dois frascos representam (A) a nanoemulsão sem adição do extrato e (B) a nanoemulsão contendo 1% do extrato de soja eleito	28
Figura 12. Cromatograma demonstrando seletividade do método analítico. Fase móvel utilizada metanol:água (60:40 v/v), fluxo isocrático de 1,2 mL/min., temperatura ambiente, com o sistema operando em 260 nm.....	34
Figura 13. Curva analítica demonstrando linearidade nas concentrações de 0,098 a 24,0 µg/mL	35

Figura 14: Gráficos de distribuição de tamanho de partículas da nanoemulsão contendo 1% do extrato, antes (a) e após (b) o processo de sonicação 40

Figura 15: Gráfico demonstrando a liberação da daidzeína da nanoemulsão, em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, nos tempos de 2, 6 e 12 h (n=3)..... 44

Figura: 16: Gráfico ilustrando a retenção e a permeação cutânea da daidzeína nos tempos de 2, 6 e 12 h, para a nanoemulsão e para o controle (n=3)..... 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação de alguns métodos alternativos ao uso de animais atualmente disponíveis para a avaliação de segurança pré-clínica	15
Tabela 2 – Extratos botânicos estudados para doseamento de genisteína e daidzeína	36
Tabela 3 – Cálculo da precisão (coeficiente de variação) para verificação da precisão intra-corrida, nas concentrações baixa (0,614 µg/mL), média (3,84 µg/mL) e alta (24,0 µg/mL).....	36
Tabela 4 – Cálculo da precisão (coeficiente de variação) para verificação da precisão inter-corrida	37
Tabela 5 – Coeficiente de variação de 10 injeções do limite de quantificação do método analítico, realizadas em dois dias diferentes.....	38
Tabela 6 – Coeficiente de variação das concentrações de daidzeína (n=3), realizadas com diferentes proporções de fase móvel para avaliação da robustez	38
Tabela 7 – Concentrações de daidzeína encontrada em cada um dos seis extratos	39
Tabela 8 – Concentrações de genisteína encontrada em cada um dos seis extratos	40
Tabela 9 – Dados de polidispersidade e de tamanho de partícula (média por intensidade), da formulação contendo 1% de extrato, antes e após sonicação... 41	
Tabela 10 – Codificação dos lotes produzidos e resultados de polidispersidade e tamanhos de partícula médios por intensidade.....	42
Tabela 11 – Resultados de polidispersidade e tamanhos de partícula médios por intensidade dos 3 lotes acompanhados por 90 dias	42
Tabela 12 – Resultados de polidispersidade e tamanho de partícula (média por intensidade) do lote F2 acompanhado por 90 dias, em diferentes temperaturas.....	42
Tabela 13 – Resultados de potencia zeta (<i>zeta average</i>) dos 3 lotes acompanhados por 90 dias.....	43
Tabela 14 – Acompanhamento da estabilidade, por 90 dias, da nanoemulsão lote F12, utilizado nos experimentos de liberação, retenção e permeação cutânea	44

Tabela 15 – Valores de liberação da daidzeína da nanoemulsão em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, nos tempos de 2, 6 e 12 h. Média de três replicatas com seus respectivos valores de desvio padrão entre parênteses (n=3).....	47
Tabela 16 – Valores de daidzeína retida e permeada nos tempos de 2, 6 e 12 h com seus respectivos valores de desvio padrão entre parênteses (n=3)	49
Tabela 17 – p-valor para as comparações realizadas num intervalo de confiança de 95%.....	50
Tabela 18 – Cálculo da margem de segurança (MoS) dos ingredientes da nanoemulsão	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIHPEC	Associação Brasileira das Indústrias de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
bw/d	Peso corpóreo por dia
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
CE	<i>Comunidade Europeia</i>
CIR	<i>Cosmetic Ingredient Review</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodos
Dap	<i>Dermal Absorption</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
IARC	<i>International agency for research on cancer</i>
INCI	<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i>
Kg	Quilogramas
Mg	Miligramas
mg/kg bw/d	Miligramas por quilo de peso corpóreo por dia
MoS	<i>Margin of Safety</i>
MSDS	<i>Material Safety Data Sheet</i>
ND	Não detectável
NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i>
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
p/p	Peso/peso
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
rpm	Rotações por minuto
SCCS	<i>Scientific Committee on Consumer Safety</i>
SED	<i>Systemic Exposure Dose</i>
TTC	<i>Threshold of Toxicological Concern</i>
v/v	Volume/volume
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
1 Introdução.....	1
1.1 Pele.....	2
1.1.1 Sistemas de liberação de ativos na pele.....	7
1.2 Cosméticos.....	9
1.2.1 Aspectos legais e segurança de cosméticos.....	10
1.2.2 Segurança de ingredientes botânicos.....	16
1.3 Daidzeína.....	17
2 Objetivos.....	20
2.1 Objetivos específicos.....	21
3 Material e Métodos.....	22
3.1 Método analítico para detecção e quantificação da daidzeína.....	23
3.2 Escolha do Extrato Botânico.....	24
3.3 Desenvolvimento da nanoemulsão.....	25
3.4 Caracterização da nanoemulsão e estudo de estabilidade.....	28
3.5 Ensaio de liberação em membrana sintética.....	29
3.6 Ensaio in vitro de retenção e permeação cutânea.....	29
3.7 Avaliação toxicológica dos ingredientes da nanoemulsão.....	31
4 Resultados e Discussão.....	33
4.1 Resultados.....	34
4.1.1 Método Analítico para detecção e quantificação da daidzeína.....	34
4.1.2 Escolha do extrato botânico.....	38
4.1.3 Desenvolvimento da Nanoemulsão.....	39
4.1.4 Caracterização da nanoemulsão e estudo de estabilidade.....	40

4.1.5 Ensaio de liberação em membrana sintética	43
4.1.6 Ensaio in vitro de retenção e permeação cutânea	45
4.1.6.1 Sink Condition	45
4.1.6.2 Eficiência de recuperação	45
4.1.6.3 Ensaios de retenção e permeação cutânea	46
4.1.6.4 Avaliação estatística dos resultados dos ensaios in vitro de retenção e permeação cutânea.....	48
4.1.7 Avaliação toxicológica dos ingredientes da nanoemulsão.....	50
4.2 Discussão.....	51
 5 Conclusões	54
 6 Referências	56
 Apêndice	63

1 Introdução

A pele, sendo o maior órgão do corpo humano, exerce uma série de papéis de extrema relevância para o ser humano. Uma de suas principais funções é proteger o corpo contra a entrada de microrganismos e outros agentes externos (LUCCA e LACERDA, 2012). No entanto, com o avanço da ciência no campo da medicina e da cosmética, descobriu-se na pele uma via bastante promissora para a administração de medicamentos e princípios ativos destinados ao tratamento e ao embelezamento da pele. Por sua estrutura semi-permeável, é possível o desenvolvimento de formulações seguras e eficazes, que são capazes de entregar moléculas específicas com ação biológica desejável na pele. Trabalhos publicados por B. W. BARRY tratam da questão dos promotores de permeação e de acordo com LIU et. al. (2011), algumas estratégias podem ser utilizadas para melhorar a entrega de ativos na pele.

Assim como os efeitos biológicos são possíveis através da permeação de certas moléculas através da pele, efeitos sistêmicos tóxicos também podem ocorrer. Desta forma, conhecer a composição e as características das formulações para uso tópico é de extrema importância, tanto para garantir a eficácia quanto a segurança de produtos médicos e cosméticos. Neste contexto, as técnicas analíticas de caracterização (identificação e quantificação) de compostos assim como os métodos disponíveis para o estudo da retenção/permeação cutânea de moléculas são peça chave para o sucesso dos produtos de uso tópico disponibilizados para a população (NOHYNEK, 2010).

Com base nisso, a proposta de trabalho deste projeto de pesquisa, teve como objetivo o aprofundamento tanto prático quanto teórico nas questões acerca do tema da permeação cutânea.

1.1 Pele

A pele é uma membrana de camada dupla que envolve toda a superfície exterior do corpo, estendendo-se pelos vários orifícios naturais por meio das membranas mucosas que revestem esses orifícios (HARRIS, 2009). É um importante órgão do corpo humano, sendo responsável por diversas funções, dentre elas, proteger o organismo contra agentes externos (como microrganismos e radiação UV), além de atuar na regulação da temperatura corpórea, atuar como órgão sensorial e também na proteção contra traumatismos físicos e térmicos

(LUCCA e LACERDA, 2012). Segundo SHAI e colaboradores (2009), a pele, maior órgão do corpo humano e de espessura variando de 1 a 4 mm nas diferentes partes do corpo, atua como barreira protetora, transmite sensações, auxilia na regulação da temperatura do corpo, produz vitamina D e ainda exerce papel fundamental nas interações sociais.

A pele é basicamente composta por três camadas, sendo elas a epiderme, a derme e a hipoderme. Sua estrutura e seus anexos podem ser visualizados na figura 1, e a figura 2 traz uma imagem microscópica da estrutura da pele humana.

Abaixo seguem breves descrições destas três importantes camadas:

Epiderme: A epiderme representa a camada mais externa da pele e em sua base as células estão em constante divisão, gerando novas células. As células vão sendo direcionadas para a superfície da pele devido ao surgimento de novas células abaixo delas. Este é o processo de divisão e renovação celular que leva aproximadamente 28 dias para ocorrer. A epiderme é normalmente fina, principalmente na região dos olhos onde tem aproximadamente 0,1 mm de espessura. Já na sola dos pés e na palma das mãos, a sua espessura chega a aproximadamente 1 mm. (SHAI, et al. 2009). A epiderme consiste de cinco diferentes camadas, sendo elas o estrato germinativo, o estrato espinhoso, o estrato granuloso, o estrato lucido e o estrato córneo. Na sequência em que foram apresentados, o estrato germinativo é o mais profundo e o estrato córneo o mais superficial (BARRY, 1983).

Derme: A derme é a camada que fica logo abaixo da epiderme e é principalmente composta de fibras de colágeno e elastina. A derme possui também vasos sanguíneos, nervos, órgãos sensoriais, glândulas sebáceas e sudoríparas e folículos pilosos. A derme é mais espessa do que a epiderme, principalmente nas costas, onde chega a ter de 3 a 4 mm de espessura (SHAI, et al. 2009). BARRY (1983) cita, além das proteínas fibrosas (colágeno e elastina), a presença de gel interfibrilar de glicosaminoglicanos, sais e água na derme.

Hipoderme: a hipoderme fica abaixo da derme e consiste basicamente de células de gordura. Com relação a sua espessura, esta tende a ser mais espessa na região abdominal e mais fina no rosto (SHAI, et al. 2009).

Grande parte da responsabilidade pelo efeito de barreira física é atribuída ao estrato córneo, estrutura presente na epiderme. O estrato córneo é formado por corneócitos e pela matriz lipídica (BARRY, 1983; SILVA E JACQUES, 2012). Os corneócitos fornecem suporte estrutural e proteção mecânica, agindo também como reservatório de umidade necessária para manter os processos fisiológicos e enzimáticos. E a matriz lipídica age como barreira antimicrobiana e antioxidante, além de exercer um papel importante na regulação da permeabilidade da pele (SILVA E JACQUES, 2012). Apesar de no passado alguns autores se referirem ao estrato córneo como uma camada de células mortas, como é citado por BARRY (1983), atualmente, o estrato córneo é tido como uma estrutura metabolicamente ativa, com participação na resposta inflamatória (LUCCA e LACERDA, 2012).

Figura 1: Representação de uma seção transversal da pele humana, demonstrando suas diferentes camadas e apêndices. (Adaptado de WILLIAMS, 2003, do artigo de EL MAGHRABY et al., 2008).

Figura 2: Estrutura da pele visualizada com o auxílio de lentes microscópicas. (Adaptado de SHAI et al., 2009).

Muitos trabalhos vêm sendo publicados acerca do tema da permeação cutânea, em grande parte objetivando a otimização da disponibilização de fármacos na indústria farmacêutica. Muitas publicações citam ingredientes para uso tópico que agem como promotores de permeação, rompendo a barreira cutânea ou carreando o fármaco de interesse para as camadas mais internas da pele. Essas pesquisas têm altíssimo valor e vêm contribuindo enormemente com a indústria farmacêutica, uma vez que a razão de ser deste segmento industrial, é a entrega de substâncias eficazes e eficientes no tratamento de doenças. Em casos em que a via de administração do fármaco é a via dérmica, precisa-se garantir que a molécula alcance o compartimento adequado para oferecer o efeito. O estrato córneo é a camada mais externa da pele, e para a maioria das substâncias, não é fácil passar através dele (LIU et al., 2011). Por isso, muitos artifícios são utilizados para a liberação dérmica e transdérmica, conforme já publicado em muitos artigos científicos. Alguns estudos publicados por B. W. BARRY, por exemplo, demonstram comprovada ação de terpenos, ureia e propilenoglicol como promotores de permeação de fármacos. Outras estratégias utilizadas são, segundo LIU et al. (2011), a preparação de sistemas supersaturados com o fármaco, moléculas eletricamente dirigidas para dentro ou através dos tecidos por iontoforese, e a ruptura física da estrutura da pele por eletroporação ou sonoforese. Ainda segundo LIU et al. (2011), a utilização de microemulsões é uma técnica bastante promissora

para a disponibilização dérmica e transdérmica de drogas tanto lipofílicas quanto hidrofílicas.

A figura 3 ilustra as principais rotas de permeação de fármacos, sendo elas: (1) através dos dutos sudoríparos; (2) através do estrato córneo ou (3) através dos folículos pilosos.

Figura 3: Diagrama simplificado da estrutura da pele e macro rotas de transporte de substâncias: (1) através dos dutos sudoríparos; (2) através do estrato córneo ou (3) através dos folículos pilosos com as glândulas sudoríparas associadas. (Adaptado de BARRY, 2001)

Ao tocar a pele, as substâncias se deparam com microrganismos, sebo e outros materiais que não interferem significativamente na sua permeação. A molécula encontra três possíveis rotas de permeação, como é ilustrado na figura 3: através dos folículos pilosos associados às glândulas sebáceas, através dos dutos sudoríparos ou através do estrato córneo contínuo por entre os seus apêndices.

O estrato córneo intacto, com a sua estrutura de “tijolos e cimento”, é a principal barreira para a entrada de moléculas através da pele. Nesta analogia à uma parede, os corneócitos são os tijolos em contato com o cimento, que são as múltiplas camadas lipídicas de ceramidas, álcoois graxos, colesterol e ésteres de colesterol. Muitas moléculas penetram a pele através desta via intercelular, e por isso, muitas técnicas de permeação objetivam romper ou ultrapassar essa arquitetura (BARRY, 2001). A figura 4 abaixo ilustra essa estrutura:

Figura 4: Rotas de permeação através do estrato córneo (Extraído de CAROLLO, A. R. H., 2007; Redesenhado de BARRY, 1987).

Se olharmos para o mercado cosmético, em que as formulações são bastante complexas e ricas em diversidade de classes de ingredientes, o cenário do ponto de vista da permeação cutânea é outro. Dependendo do conhecimento que se tem do novo ingrediente, não seria desejado que houvesse permeação além da epiderme. Além disso, muitas vezes o novo ingrediente, não se trata de uma substância pura, mas sim de um conjunto de moléculas, o que torna ainda mais complexa a avaliação de segurança. Diante disso, os conhecimentos em torno da estrutura da pele bem como da composição da formulação a ser aplicada sobre a mesma, são de fundamental importância para o formulador e para o profissional responsável pela avaliação da segurança e da eficácia dos ingredientes e produtos tópicos em geral.

1.1.1 Sistemas de liberação de ativos na pele

A pele em si pode ser o local de ação de fármacos e outros compostos ativos que visam melhorar o estado geral do tecido, ou tratar infecções e outras doenças de pele (LUPO et al., 2007). Em alguns casos, é desejado que o ingrediente ativo mantenha-se localizado nas camadas superficiais da pele. Protetores solares, por exemplo, devem agir na superfície da pele, a fim de exercer sua função protetora (ALVAREZ-ROMAN et al., 2004). Por outro lado, outros compostos ativos devem atravessar o estrato córneo para alcançar as camadas viáveis da pele, de forma que

possam tratar infecções e outras doenças. Nesta situação, a retenção do composto na pele deve ser associada a um sistema de liberação transdérmico.

Segundo BARRY (1983), a pele humana é uma barreira efetiva e seletiva à permeação de moléculas. E ainda segundo este mesmo autor (2001), a epiderme (especificamente o estrato córneo) é que garante o maior controle da passagem de substâncias. Por estes motivos, a indústria farmacêutica e até mesmo a indústria cosmética, investe em artifícios para driblar a barreira cutânea, fazendo com que princípios ativos possam atingir as camadas mais profundas da pele ou até mesmo a circulação sistêmica em alguns casos.

A penetração na pele inclui a difusão pela epiderme intacta e apêndices cutâneos. A melhoria da partição e da difusão de agentes dermatológicos pode ser obtida com o uso de sistemas de liberação. Um sistema adequado pode modificar a liberação dos compostos, sua localização na pele, sua estabilidade, bem como reduzir a incidência de efeitos adversos, que são indesejáveis para o uso terapêutico de alguns compostos. Como resultado, podem ser alcançadas melhorias na eficácia e na segurança do produto, associadas a uma maior adesão do paciente (SAHOO et al., 2004).

Existem diversas maneiras de se otimizar a permeabilidade de fármacos na/através da pele. A figura 5 ilustra diferentes técnicas, classificadas em cinco diferentes categorias: (1) interações fármaco/veículo, (2) vesículas e partículas, (3) modificação do estrato córneo, (4) remoção/transpasse do estrato córneo e (5) métodos eletricamente assistidos.

Figura 5: Alguns métodos para otimização das terapias transdérmicas. (Adaptado de BARRY, 2001)

A proposta de se utilizar emulsões em escalas micro e nanométricas tem sido considerada promissora para permitir penetração através do estrato córneo. Conforme estudado por KONG et al. (2011), nanoemulsões de ácido hialurônico podem ser utilizadas com sucesso como carreador percutâneo de ingredientes ativos lipofílicos em aplicações cosméticas. Em comparação com o controle escolhido (solução etanólica), as nanoemulsões apresentaram capacidade de permeação transdérmica desejável, sendo capazes de penetrar através do estrato córneo e se difundir mais profundamente na derme. (KONG et al., 2011). Este estudo avaliou também o potencial irritativo destas nanoemulsões e não verificou efeitos negativos na derme e na superfície da pele. Um estudo conduzido por VICENTINI, et al. (2008) demonstrou a penetração da quercetina no estrato córneo e na fração epiderme + derme, quando aplicada em microemulsão A/O. Não se verificou permeação transdérmica, e a aplicação tópica por 2 dias, não evidenciou sinais de irritação.

1.2 Cosméticos

O mercado cosmético é um mercado que vem tendo um crescimento muito expressivo nos últimos anos, uma vez que o interesse da população por este tipo de produto aumenta cada vez mais. Se no passado um ou dois produtos eram suficientes para os cuidados pessoais, nos últimos anos a população vem utilizando dezenas destes diariamente. Não apenas mulheres em idade adulta, como também os homens, as crianças e os idosos, têm o hábito de cuidar de sua aparência de diferentes maneiras, e a principal delas, é através do uso de cosméticos. Estima-se que nos grandes centros urbanos, as pessoas fazem uso diário de aproximadamente 25 produtos cosméticos e de higiene pessoal (CAETANO, 2012).

Em 2012 o Brasil já havia alcançado o posto de terceiro maior mercado de cosméticos, perfumaria e higiene pessoal do mundo, e conforme publicado em relatório da ABIHPEC – Associação Brasileira das Indústrias de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, o setor cosmético vem apresentando um crescimento médio anual de 10% nos últimos 17 anos, chegando a um faturamento de R\$ 34 bilhões em 2012.

Diferentemente de muitos medicamentos, os cosméticos são de livre acesso, e a imensa quantidade de empresas fabricantes deste tipo de produto, faz com que os mesmos sejam acessíveis a praticamente todas as camadas da sociedade.

1.2.1 Aspectos legais e segurança de cosméticos

A avaliação de segurança de um produto cosmético normalmente leva em consideração os dados toxicológicos dos ingredientes que o compõem, e após uma profunda avaliação de todo o contexto, o toxicologista responsável pela avaliação de segurança pode considerar necessária a condução de testes pré-clínicos e/ou clínicos que o auxiliem na tomada de decisão com relação à segurança no uso de tal produto. Esta avaliação deve levar em consideração fatores de exposição, como, por exemplo, a finalidade para a qual o produto cosmético se destina, o modo de uso (produto com ou sem enxágue, aplicação no corpo todo ou em regiões específicas, possibilidade de contato com mucosas, etc.), o público alvo (ex. adultos, bebês, etc.) e a presença de promotores de permeação e/ou a possibilidade de formação de produtos decorrentes da reação entre os ingredientes que o compõem (SCCS/1501/12).

No que se refere às questões regulatórias, as legislações em vigor atualmente definem cosméticos de maneira muito semelhante entre si. Em se tratando da legislação brasileira, de acordo com o Anexo I da Resolução RDC 04/14 da ANVISA, “Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado”. Analisando-se a definição de cosméticos acima citada, poderíamos considerar que seus ingredientes não deveriam ultrapassar o estrato córneo. No entanto, sabemos que produtos cosméticos destinados a tratamento de rugas faciais e celulite, por exemplo, não teriam ação se isso não acontecesse.

No passado, esta definição, que é muito similar à citada nas legislações europeia e americana, era bem mais clara, pois os cosméticos realmente eram apenas destinados a hidratar, limpar e colorir. Conforme abordado por SHAI et al. (2009), um cosmético (não sendo um medicamento) não deve alterar a estrutura ou a função da pele. No entanto, de acordo com o que apontam os autores, esta definição restrita vem se tornando cada vez mais “turva”. Hoje em dia, existe uma gama de cosméticos com apelos como “acelera a renovação celular”, “repara a pele

danificada pelo sol” e “repara o envelhecimento cutâneo”. Todos estes efeitos não seriam possíveis se os cosméticos seguissem as definições conhecidas, uma vez que se referem a mudanças na estrutura e função dos tecidos (SHAI et al., 2009). Segundo NOHYNEK e colaboradores (2010), praticamente toda substância aplicada sobre a pele humana é capaz de produzir alterações fisiológicas. Por exemplo, sabonetes podem causar irritação local, algumas águas minerais podem ter ação anti-inflamatória e antialérgica, e até mesmo os cremes cosméticos podem aumentar a hidratação da pele ocasionando alterações fisiológicas.

Recentemente, uma publicação brasileira específica sobre cosmecêuticos, abordou também esta questão. “Atualmente já existem cosméticos que fazem mais do que limpar, embelezar e manter em boas condições a pele”. O atual cenário mundial indica com muita clareza a discrepância entre a definição de cosméticos e os avanços no conhecimento e nas tecnologias existentes (CAETANO, 2012). O termo “cosmecêuticos” (do inglês “*cosmeceuticals*”) surgiu pela primeira vez nos anos 80, sendo popularizado pelo dermatologista e professor Albert Kligman. Este termo, que representa algo intermediário entre “cosméticos” e “produtos farmacêuticos”, surgiu como uma tentativa de se cobrir a lacuna existente entre ambos (SHAI et al., 2009). No entanto, do ponto de vista regulatório, esta terminologia não é reconhecida na maioria dos países, exceto no Japão, que adota o termo *quasi-drugs* para cosméticos que podem causar alguma modificação no corpo, como um creme anticelulite, por exemplo. NOHYNEK e colaboradores (2010) que citam “cosmecêuticos” como sendo “cosméticos com atividades farmacológicas e/ou terapêuticas”, consideram em sua revisão, este termo como “enganoso” (do inglês, *misleading*).

Uma ampla revisão sobre a avaliação de segurança de produtos cosméticos e seus ingredientes, foi publicada em 2010 por NOHYNEK e colaboradores. Os autores discutem inclusive os aspectos legais e as terminologias adotadas em cada geografia para classificar os diferentes tipos de cosméticos. Os autores citam também, a diferença entre as legislações americana, europeia e japonesa no que se refere a cosméticos de maior grau de preocupação, como é o caso dos OTC (*Over-the-counter*) nos Estados Unidos, e dos *quasi-drugs*, termo adotado no Japão. Apenas para exemplificar, filtros solares são considerados como cosméticos na Europa, e como OTC nos Estados Unidos. Tinturas capilares são considerados cosméticos na Europa, e *quasi-drugs* no Japão. Estas classificações demandam

requisitos distintos para as empresas cosméticas poderem regularizar e comercializar seus produtos nos diferentes mercados.

Diante de todo este cenário, e considerando que os métodos clássicos que utilizam animais de laboratórios já estão praticamente banidos, os estudos *in vitro* para avaliação da retenção e permeação cutânea, ganham cada vez mais espaço. Eles são importantes não só para avaliação da eficácia dos produtos, mas principalmente por uma questão de segurança. Vale citar também a importância dos ensaios de retenção e permeação cutânea *in vitro* para atendimento ao Regulamento Europeu (1223/2009). No caso de substâncias cujos dados de exposição sistêmica não estejam disponíveis, faz-se fundamental a condução destes ensaios para evidenciar a não permeação do ingrediente em questão para a circulação sistêmica. Adicionalmente, os dados de permeação cutânea são necessários para os cálculos de Margem de Segurança (MoS), exigidos pela legislação europeia. Nos casos em que não se dispõe do valor de permeação cutânea, a recomendação é utilizar o valor de 100%. Quando não se atinge o valor mínimo de 100 para a Margem de Segurança de um dado ingrediente, pode-se determinar o valor real de permeação cutânea *in vitro*, o que em alguns casos, pode tornar viável a sua utilização num produto cosmético.

O valor da Margem de Segurança (MoS) é usado para extrapolar de um grupo de animais de teste para a média da população, e subsequentemente para extrapolar da média dos seres humanos para populações sensíveis (SCCS/1501/12), conforme segue ilustrado na figura 6.

Figura 6: Representação esquemática da extrapolação de dados experimentais de animais para seres humanos (adaptado de RENWICK, 1998).

A Organização Mundial da Saúde (WHO) propõe um valor mínimo de 100 e normalmente se aceita que uma substância tenha uma MoS de no mínimo 100 para ser considerada segura para uso humano (SCCS/1501/12).

A Margem de Segurança é obtida a partir dos cálculos expostos a seguir (SCCS/1501/12):

$$\text{MoS} = \text{NOAEL}/\text{SED}$$

$$\text{SED} = A \text{ (mg/kg bw/day)} \times C \text{ (\%)/100} \times \text{DAp (\%)/100}$$

Onde:

MoS: Margem de Segurança (do inglês, *Margin of Safety*)

NOAEL: Dose em que não se observam efeitos adversos (do inglês, *No Observed Adverse Effect Level*)

SED: Dose de Exposição Sistêmica (do inglês, *Systemic Exposure Dose*)

A: Exposição diária estimada

C: Concentração do ingrediente no produto

DAp: Absorção Dérmica (do inglês, *Dermal Absorption*)

Ainda dentro do contexto dos métodos alternativos aos testes em animais para cosméticos, cabe citar a sua atual e crescente importância. Na década de 30, quando se acreditava que os métodos em animais eram uma excelente ferramenta qualitativa para prever efeitos no homem, não se trabalhou muito na correlação quantitativa e na extrapolação de dados de animais para humanos. Adicionalmente, muitos testes em animais começaram a ser questionados quanto a sua subjetividade, como é o caso do teste de irritação ocular de Draize. Apesar de se reconhecer que dificilmente se conseguiria substituir totalmente os animais por outras alternativas, por questões éticas e científicas se passou a minimizar o uso de animais. A Europa e os Estados Unidos passaram a estimular e fomentar o desenvolvimento de métodos alternativos. Na Europa, foi criado o Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM - *European Center for Validation of Alternative Methods*), e em paralelo, nos Estados Unidos, criou-se o (ICCVAM - *Interagency Coordinating Committee for the Validation of Alternative Methods*), sendo ambos destinados ao suporte, ao desenvolvimento, à validação e à aceitação destes novos métodos (NGO e MAIBACH, 2010).

Diante deste cenário, vale citar aqui, quais destes testes alternativos estão atualmente disponíveis para a avaliação de segurança de ingredientes e produtos cosméticos. De maneira ampla e do ponto de vista de aceitação regulatória destes métodos, existem duas classificações para os métodos alternativos: os validados e os válidos. Abaixo segue uma breve explanação sobre a diferença entre ambos, com base no documento SCCS/1501/12:

Métodos validados: os métodos considerados validados são aqueles para os quais relevância e confiança já foram claramente demonstradas para um propósito específico. Métodos validados são publicados no formato de protocolos da OECD assim que passam por todo o processo de validação.

Métodos válidos: Os métodos considerados válidos, por sua vez, são aqueles que ainda não passaram pelo processo completo de validação, mas já possuem dados científicos suficientes que demonstrem sua relevância e confiança.

Do ponto de vista prático, tanto os métodos validados quanto os métodos válidos podem e devem ser utilizados para compor a avaliação de segurança de ingredientes e produtos cosméticos.

A tabela 1 traz uma listagem de alguns métodos alternativos comumente utilizados para a avaliação de segurança no segmento cosmético. Os protocolos detalhados podem ser acessados diretamente no site da OECD.

Tabela 1: Relação de alguns métodos alternativos ao uso de animais atualmente disponíveis para a avaliação de segurança pré-clínica

Finalidade do teste	Nome do modelo	Validado?	Código do protocolo oficial
Avaliação do potencial citotóxico	3T3 Neutral Red Uptake (NRU) Cytotoxicity Assay	não	-
Avaliação da corrosividade cutânea	TER test (rat skin transcutaneous electrical resistance test)	sim	OECD 430
	EpiSkin	sim	OECD 431
	EpiDerm	sim	OECD 431
	SkinEthic	sim	OECD 431
	EST-1000 (epidermal skin test-1000)	sim	OECD 431
Avaliação da irritação cutânea	EpiSkin	sim	OECD 439
	Modified Epiderm Skin Irritation Test (SIT)	sim	OECD 440
	SkinEthic Reconstructed Human Epidermis (RHE)	sim	OECD 441
Avaliação da irritação ocular e de mucosas	ICE (Isolated Chicken Eye)	sim	OECD 438
	BCOP (Bovine Cornea Opacity Permeability)	sim	OECD 437
	HET-CAM (Hen's Egg Test-Chorio Allantoic Membrane)	não	-
Avaliação da sensibilização dérmica	Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)	não	-
	KeratinoSens	não	-
Avaliação da permeação cutânea	Skin absorption - <i>in vitro</i> method	sim	OECD 428
Avaliação da Toxicidade Repetida	não disponível alternativa <i>in vitro</i>	-	-
Avaliação da Toxicidade Reprodutiva	não disponível alternativa <i>in vitro</i>	-	-
Avaliação da Mutagenicidade	Bacterial Reverse Mutation Test	sim	OECD 471
	In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test	sim	OECD 476
	In Vitro Micronucleus Test	sim	OECD 487
Avaliação da Genotoxicidade	In vitro Mammalian Chromosome Aberration Test	sim	OECD 473
Avaliação da Carcinogenicidade	não disponível alternativa <i>in vitro</i>	-	-
Avaliação da Toxicocinética	não disponível alternativa <i>in vitro</i>	-	-
Avaliação do potencial fototóxico	3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity Test (3T3 NRUPT)	sim	OECD 432

Além dos métodos *in vitro*, existem ainda as ferramentas *in silico* que são consideradas também como alternativas ao uso de animais, e vêm cada vez mais sendo utilizadas na estratégia pré-clínica para a avaliação de segurança de ingredientes cosméticos. Tratam-se de bancos de dados toxicológicos ou ferramentas estatísticas capazes de prever eventuais alertas de toxicidades diversas de ingredientes, partindo da estrutura molecular. Estas ferramentas são conhecidas como QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*). Dentre as ferramentas privadas mais conhecidas podemos citar o Derek, o Leadscope e o TIMES, mas existem também ferramentas de acesso público que trazem respostas bastante robustas, sendo algumas delas o Vega, o OECD ToolBox e o ToxTree.

Outro conceito importante é o conceito do TTC, limiar de preocupação toxicológica (do inglês, *Threshold of Toxicological Concern*). Este conceito surgiu na

indústria de alimentos, mas vem se difundindo para o mercado cosmético. Ele se aplica apenas aos ingredientes minoritários dos produtos cosméticos, como é o caso, por exemplo, das impurezas e dos produtos de reação, que aparecem presentes como traços nas matérias-primas.

O TTC parte do princípio de que, para toda substância caracterizada, existe uma dose, abaixo da qual não há riscos consideráveis à saúde humana, quando se trata de exposição sistêmica. Além disso, a exposição aos compostos isolados de uma mistura é, na maioria das vezes, muito pequena (CRAMER, et al., 1978). Este conceito foi inicialmente utilizado pelo FDA no intuito de se avaliar o risco que algumas substâncias que migravam dos materiais de embalagem poderiam estar oferecendo para a população. O valor adotado na época era de 1,5 µg/pessoa/dia, com base em dados de estudos em animais (FRAWLEY, 1967).

Mais adiante, foi proposta uma árvore decisória com base na estrutura molecular, onde as substâncias eram classificadas em três categorias. Essas três categorias ficaram conhecidas como classes de Cramer I, II e III, sendo o grau de preocupação crescente do I para o III (CRAMER et. al., 1978). Depois, foram ainda atribuídos valores específicos de TTC para cada classe de moléculas, ou classe de Cramer. Os valores máximos definidos para cada classe e que são até hoje adotados são os seguintes: Classe de Cramer I – 1800 µg/pessoa/dia, Classe de Cramer II – 540 µg/pessoa/dia e Classe de Cramer III – 90 µg/pessoa/dia (MUNRO et al., 1996).

Ainda mais recentemente, algumas publicações trouxeram a extensão do conceito do TTC para a avaliação de ingredientes cosméticos (KROES et al., 2007; MUNRO et al., 2008; RE et al., 2009).

1.2.2 Segurança de ingredientes botânicos

Outro tema importante e cada vez mais crescente no ramo cosmético, mas que traz sérias implicações para a avaliação de segurança, é o uso de ingredientes botânicos. O que vem impulsionando este mercado é a demanda da população por produtos declarados como “orgânicos” ou “naturais”, e, portanto, considerados seguros/saudáveis. No entanto, apesar destes ingredientes serem obtidos de plantas utilizadas historicamente como alimentos, chás e ainda na medicina natural, é fundamental levar em consideração que “ser natural” ou “ser usado

tradicionalmente”, não quer dizer “ser seguro” em novas condições de uso” (NOHYNEK et al. 2010).

Os ingredientes botânicos comumente utilizados em cosméticos são extratos aquosos e não aquosos de plantas, óleos fixos e óleos essenciais e ainda ingredientes purificados de plantas (NOHYNEK et al., 2010; ANTIGNAC, et al., 2011).

Neste contexto, a avaliação de segurança de ingredientes botânicos deve ser conduzida de forma bastante cuidadosa. Para isso, o primeiro passo é a caracterização da planta, que envolve a classificação taxonômica, a avaliação da composição fitoquímica por técnicas analíticas apropriadas, e a determinação de especificações que o ingrediente deverá atender para garantir uniformidade lote a lote (ANTIGNAC, et al., 2011). De posse desta caracterização, o avaliador de segurança pode iniciar buscas na literatura para avaliar o perigo intrínseco da planta e também dos metabólitos encontrados no ingrediente natural em questão. Na ausência de dados publicados para alguns dos metabólitos identificados no produto botânico, pode-se conduzir avaliações *in silico* para predizer possíveis alertas de toxicidade.

Como um segundo passo na avaliação de segurança de ingredientes naturais, o avaliador pode optar por solicitar a condução de ensaios *in vitro* e ainda levar em considerações os históricos de usos tradicionais destas plantas (ANTIGNAC, et al., 2011).

Por fim, para aqueles metabólitos não identificados pelas técnicas analíticas escolhidas, ou então que foram identificados porém poucos ou nenhum dado de segurança foi encontrado na literatura, o avaliador de segurança pode aplicar o conceito do TTC (RE et al., 2009; ANTIGNAC, et al., 2011).

Em suma, a avaliação de segurança de um ingrediente botânico deve ser bastante profunda e levar em consideração uma somatória de informações sobre a planta, o ingrediente propriamente dito, e a sua aplicação cosmética.

1.3 Daidzeína

A daidzeína é uma das isoflavonas presentes em vegetais, principalmente na soja. As isoflavonas de soja são de grande interesse não só para uso oral como também para uso tópico em formulações cosméticas. Além da daidzeína, objeto de

estudo deste projeto de pesquisa, a genisteína é outra importante isoflavona encontrada na soja. As estruturas moleculares destas duas principais isoflavona podem ser visualizadas na figura 7.

Figura 7: Estruturas moleculares das isoflavonas daidzeína e genisteína.

O atual interesse em extratos de soja é devido à presença de isoflavonas, especialmente a genisteína e a daidzeína, pelo fato de possuírem diversas propriedades benéficas. Dentre os seus benefícios já estudados estão, o efeito antioxidante (LIN et al., 2008; LIANG et al., 2010; ZHANG et al., 2012), a prevenção de tumores, a proteção contra raios ultravioleta e por agirem efetivamente na redução de sinais de envelhecimento (LIN et al., 2008). Alguns dos mecanismos para estes efeitos na redução dos sinais de envelhecimento já foram estudados e são relacionados ao estímulo da produção de colágeno e elastina (SCHIMID e ZÜLLI, 2002; MIYAZAKI et al., 2004; SUDEL et al., 2005) e à produção de ácido hialurônico (MIYAZAKI et al., 2003; SUDEL et al., 2005; CHEN et al., 2008).

LIIN e colaboradores (2008) estudaram o efeito protetor contra os danos causados pelos raios ultravioleta, de 5 isoflavonas (genisteína, equol, daidzeína, biochanina A, e formononetina) em comparação com uma combinação de antioxidantes (vitamina C, vitamina E e ácido ferúlico). O estudo contemplou a aplicação diária destas substâncias em peles de orelhas de porco durante 4 dias com irradiação das peles para avaliação da formação de eritemas. Observou-se que as isoflavonas genisteína, daidzeína e biochanina A tiveram melhores efeitos em relação às outras duas isoflavona estudadas, porém, seu efeito foi menor quando comparado com a solução de antioxidantes acima mencionada. Como conclusão teve-se que as isoflavonas oferecem efeito fotoprotetor e, portanto, são boas candidatas para a proteção contra os danos causados pela radiação ultravioleta.

Foi com base nestas informações e no fato da daidzeína não ser tão frequentemente descrita na literatura quanto a genisteína, que a daidzeína foi escolhida como objeto de estudo neste projeto de pesquisa.

2 Objetivos

Este projeto de pesquisa teve como objetivo principal, aprofundar os conhecimentos relacionados ao tema da permeação cutânea, com foco na avaliação de segurança de novos ingredientes para uso tópico (cosméticos). O objetivo central foi o de realizar a avaliação do perfil de retenção e permeação cutânea da daidzeína presente em um extrato de soja incorporado a uma nanoemulsão cosmética.

2.1 Objetivos específicos

- validar método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a identificação e quantificação da substância eleita para estudo (daidzeína);
- realizar doseamento em diferentes extratos botânicos contendo isoflavonas para a escolha do mais adequado para ser utilizado no estudo;
- desenvolver formulação cosmética em escala nanométrica que possibilite a incorporação de quantidade adequada do extrato botânico escolhido;
- realizar o levantamento de parâmetros físico-químicos e toxicológicos relacionados à daidzeína e a todos os outros ingredientes utilizados na nanoemulsão;
- proceder ao cálculo da margem de segurança e emitir parecer de segurança para os ingredientes da formulação;
- com base na avaliação de segurança teórica, propor um racional de testes clínicos para a avaliação da segurança da nanoemulsão caso esta venha no futuro ser disponibilizada no mercado cosmético;
- caracterizar a formulação através da avaliação de sua polidispersidade, seu tamanho de partícula e seu valor de potencial zeta;
- conduzir estudos de estabilidade acelerada conforme preconizado pela ANVISA;
- validar método para a avaliação da retenção e permeação cutânea através de célula de difusão vertical, utilizando-se peles de orelhas de suínos dermatomizadas;
- realizar a avaliação comparativa da retenção e permeação cutânea da daidzeína presente na nanoemulsão e em um controle (daidzeína pura padrão Sigma em solução aquosa contendo propilenoglicol);
- realizar, previamente aos estudos de retenção e permeação cutânea, ensaio de liberação em membrana sintética para se verificar a liberação da daidzeína da nanoemulsão.

3 Material e Métodos

3.1 Método analítico para detecção e quantificação da daidzeína

Para o doseamento da daidzeína nos extratos botânicos disponíveis e também para a quantificação desta isoflavona nos estudos de liberação, retenção e permeação cutânea, optou-se pela técnica de cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Cabe citar que além da daidzeína, utilizou-se também a isoflavona genisteína para os estudos dos extratos botânicos, conforme será explanado mais adiante no item 3.2. Para tanto, foi necessário o desenvolvimento e validação de um método analítico adequado que permitisse dosear ambas as isoflavonas nos extratos, e que também, futuramente pudesse ser utilizado na quantificação da daidzeína nos experimentos de liberação, retenção e permeação cutânea.

Padrões destas isoflavonas foram adquiridos da Sigma para a obtenção da curva de calibração. Tomou-se como base para início do desenvolvimento do método analítico por CLAE-DAD a publicação de Vargas et al. (2012). Verificou-se, após a realização de alguns testes, a necessidade de modificações na composição da fase móvel para uma melhor resolução dos picos de genisteína e daidzeína. A publicação de Vargas et al. (2012) utilizou metanol:água na proporção 70:30 (v/v) em pH 3,00. No presente projeto de pesquisa, optou-se por trabalhar com a mesma fase móvel, composta por metanol:água, porém na proporção de 60:40 (v/v) sem acidificação para acerto do pH.

Seguem listados abaixo os equipamentos e reagentes utilizados nesta etapa do projeto:

- cromatógrafo à líquido Waters e2695 acoplado a detector de arranjo de diodos Waters 2998 (equipamento que pode ser visualizado na figura 8)
- coluna cromatográfica da marca Merck, modelo RP-18 com sílica de 5 μ m, comprimento de 250 mm e diâmetro interno de 4 mm
- água milli-Q
- metanol grau HPLC
- padrão de genisteína e de daidzeína da marca Sigma

Condições do método analítico:

- fase móvel: metanol:água 60:40 v/v
- fluxo: isocrático de 1,2 mL/min.
- temperatura: ambiente
- Comprimento de onda: sistema operando em 260 nm

Figura 8: Cromatógrafo a líquido Waters utilizado ao longo do projeto de pesquisa para doseamento da daidzeína em diferentes extratos botânicos e para as quantificações desta isoflavona nos experimentos de liberação, retenção e permeação cutânea.

3.2 Escolha do Extrato Botânico

Uma vez que não se conhecia a composição dos extratos botânicos disponíveis para estudo, optou-se por realizar o doseamento tanto da daidzeína, molécula que se desejava estudar, quanto da genisteína, isoflavona mais frequentemente descrita na literatura em extratos de soja. Isso permitiu avaliar de forma mais ampla a composição dos extratos e também garantir boa seletividade do método analítico, evitando-se a co-eluição das duas isoflavonas.

Foram estudados diferentes extratos contendo isoflavonas para que o mais adequado fosse utilizado. Diversos fornecedores de matérias-primas foram acionados, além de uma farmácia de manipulação e uma empresa cosmética, para se ter uma maior quantidade de extratos avaliados. Muitos fabricantes de matérias-primas não comercializavam este tipo de extrato botânico, porém os que tinham este produto disponível concordaram em doar amostras para o projeto. A maioria dos extratos é obtido da soja (*Glycine Max*) e apenas um é obtido de Red Clover (*Trifolium Pratense Flower Extract*). Os nomes comerciais dos extratos, dos fabricantes de matérias-primas, da farmácia de manipulação e da empresa cosmética serão omitidos por questões de confidencialidade.

Ao todo seis diferentes extratos botânicos foram estudados e seguem abaixo codificados na tabela 2. Seus aspectos físicos podem ser visualizados na figura 9.

Tabela 2: Extratos botânicos estudados para doseamento de genisteína e daidzeína

Codificação	Planta	Fonte
1	Soja	doação de uma farmácia de manipulação da cidade de Itupeva
2	Soja	aquisição em uma farmácia de manipulação da cidade de Itupeva
3	Soja	doação de um fornecedor de matérias-primas cosméticas
4	Soja	doação de um fornecedor de matérias-primas cosméticas
5	Soja	doação de uma empresa cosmética da cidade de Cajamar
6	Red Clover	doação de um fornecedor de matérias-primas cosméticas

Figura 9: Foto dos seis extratos botânicos estudados para doseamento de genisteína e daidzeína

3.3 Desenvolvimento da nanoemulsão

O processo de fabricação da emulsão foi o de emulsificação a quente com posterior sonicação em sonicador de agulha para a obtenção da emulsão com partículas em escala nanométrica. A escolha por este tipo de processo se deu pela disponibilidade de equipamentos e facilidade no preparo, além do mesmo ter gerado bons resultados no que diz respeito a tamanho de partículas e estabilidade da

formulação. O emulsionante utilizado para a preparação da nanoemulsão foi o Crodafos CS20A, gentilmente cedido pela Croda do Brasil. O mesmo é composto por uma proporção otimizada de álcoois e alquil fosfatos (*Cetearyl Alcohol (and) Ceteth-20 Phosphate (and) Dicetyl Phosphate*), sendo similar aos fosfolipídios da pele. As demais matérias-primas foram todas gentilmente cedidas pela empresa Natura Inovação e Tecnologia de Produtos Ltda.

Para o preparo da nanoemulsão foram utilizadas as seguintes matérias-primas:

Fase oleosa:

- Crodafos CS20A (*Cetearyl Alcohol, Ceteth-20 Phosphate, Dicetyl Phosphate*) como emulsionante
- BHT como antioxidante

Fase aquosa:

- Água como veículo
- Propilenoglicol como emoliente e promotor de permeação
- Extrato de Soja enriquecido em isoflavonas, contendo aproximadamente 39% de daidzeína e 0,25% de genisteína (extrato codificado como “extrato 2”)
- Álcool etílico como solubilizante do extrato

Após a formação da emulsão a quente:

- Trietanolamina para neutralização e, ao final, se necessário, para acerto do valor de pH
- Optiphen (*Phenoxyetanol + Caprylyl Glycol*) para garantir a estabilidade microbiológica da formulação

Os equipamentos utilizados estavam todos devidamente aferidos e seguem listados abaixo:

- balança analítica
- placa aquecedora
- termômetro
- vidrarias e espátulas apropriadas
- ultra-turrax T-25 IKA

- sonicador de agulha Bandelin
- pHmetro

Para a obtenção à princípio de uma microemulsão, as fases aquosa e oleosa foram aquecidas em béqueres, separadamente, a 75°C sob leve homogeneização manual (bagueta de vidro). Ao atingirem a temperatura de 75°C, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa. Esta etapa deve ser realizada sob vigorosa agitação em ultra-turrax a 11.000 RPM durante 5 min. e logo em seguida a 16.000 RPM por mais 5 min. Quando a formulação atingiu 55°C, a trietanolamina e o conservante foram adicionados, ainda sob agitação no ultra-turrax. Neste momento tem-se uma microemulsão. Ao final desta etapa, a microemulsão foi então submetida a sonicador de agulha por 5 ciclos de 2 min. cada, em potência de 10% para redução dos tamanhos das partículas e obtenção da nanoemulsão. A cada ciclo, a formulação foi homogeneizada e sua temperatura foi observada para se evitar aquecimento excessivo da formulação. O pH da nanoemulsão foi corrigido para estar na faixa entre 5,50 e 6,50.

A figura 10 ilustra de maneira esquemática o processo aqui descrito para a obtenção da nanoemulsão cosmética:

Figura 10: Esquema ilustrativo demonstrando de forma resumida o processo de obtenção da nanoemulsão cosmética.

A figura 11, por sua vez, traz as imagens da nanoemulsão desenvolvida:

Figura 11: Nanoemulsão cosmética desenvolvida. Os dois frascos representam (A) a nanoemulsão sem adição do extrato e (B) a nanoemulsão contendo 1% do extrato de soja eleito.

3.4 Caracterização da nanoemulsão e estudo de estabilidade

Para a caracterização e acompanhamento da estabilidade da nanoemulsão através das medições de tamanho de partícula, índice de polidispersidade e potencial zeta, utilizou-se:

- Centrífuga Eppendorf AG (Centrifuge 5430 R - Made in Germany)
- Zeta sizer, Nano-S, Malvern, United Kingdom
- Solução de KCL 1mM

A estabilidade da nanoemulsão foi verificada logo após o preparo mediante centrifugação a 1057 g (ou 3000 rpm), durante 30 min, conforme preconizado pelo Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (2004). Em seguida, as amostras foram submetidas a estabilidade acelerada por um período de 90 dias em diferentes temperaturas (4°C, 25°C e 45°C).

A caracterização quanto à distribuição de tamanho de partícula e índice de polidispersidade foi realizada por espalhamento dinâmico de luz em aparelho Zetasizer Nano-S. Para isso, foi realizada diluição da nanoemulsão na proporção de 1:100 (nanoemulsão:KCL 1mM). As amostras foram colocadas em cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico e as medições foram feitas em temperatura ambiente (25 °C). O equipamento possui um laser de He-Ne de 4 mW operando num comprimento de onda de 633 nm.

A carga de superfície da nanoemulsão foi medida como potencial zeta, através da mobilidade eletroforética das partículas/gotículas dispersas submetidas a um campo elétrico. A nanoemulsão foi diluída na proporção de 1:20 (nanoemulsão:KCL 1mM) e a determinação da carga superficial foi feita em aparelho Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Reino Unido).

3.5 Ensaio de liberação em membrana sintética

Previamente aos ensaios *in vitro* de retenção e permeação cutânea, procedeu-se a um ensaio de liberação em membrana sintética. Este ensaio teve como objetivo avaliar a afinidade da daidzeína pela formulação e sua capacidade de se liberar da mesma, alcançando o fluido receptor.

As células de difusão vertical (3,6 mL) foram preenchidas com solução tampão fosfato pH 7,4 com 2% de Polysorbate 80. O banho foi mantido a 32°C sob agitação de 400 rpm. As membranas sintéticas foram posicionadas na parte superior das células evitando-se a presença de bolhas de ar. Em seguida, 200µL da nanoemulsão contendo o extrato de soja foram adicionados sobre as áreas de permeação. O ensaio foi conduzido em três diferentes tempos para avaliação da cinética de liberação: 2, 6 e 12 h. Ao final de cada um dos períodos, as membranas foram removidas e descartadas, e foram realizadas coletas do fluido receptor, que imediatamente foram transferidas para vials de cromatografia. Posteriormente a daidzeína foi quantificada por CLAE utilizando o métodos analítico descrito no item 3.1.

Os materiais empregados neste ensaio foram:

- solução de tampão fosfato pH 7,4 30 mM com 2% de Polysorbate 80: Água Milli-Q, Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado (Synth, lote: 91107), Fosfato de Sódio Bibásico Heptahidratado (Synth, lote: 93438), Polysorbate 80 (Via Farma)
- Membranas sintéticas de acetato de celulose
- Células de difusão vertical. Cada célula tem 3,6 mL de volume para a solução receptora e permite uma área de permeação igual a 0,66 cm²

3.6 Ensaio *in vitro* de retenção e permeação cutânea

As membranas biológicas (orelhas de porco) foram recebidas do frigorífico “Olhos D’água Indústria e Comércio de Carnes Ltda.”, situado no município de Ipuã

no estado de São Paulo. Imediatamente após o seu recebimento, foram dissecadas e lavadas em água corrente. Em seguida, foram dermatomizadas em uma espessura de 500 µm e congeladas em papel alumínio em freezer a -20°C. O tempo máximo de congelamento para o uso foi de 30 dias (VICENTINI et.al, 2008), sendo que as orelhas foram retiradas do freezer alguns minutos antes de serem usadas para descongelamento.

Para o ensaio, as células de difusão verical (3,6 mL) foram preenchidas com solução tampão fosfato pH 7,4 com 2% de Polysorbate 80 para manter a *sink condition*. O banho foi aquecido a 32°C sob agitação de 400 rpm. As peles descongeladas foram posicionadas na parte superior das células evitando-se a presença de bolhas de ar. Em seguida, 200µL da nanoemulsão contendo o extrato de soja, e 200 µL da solução controle foram adicionados separadamente sobre as áreas de permeação. O ensaio foi conduzido em três diferentes tempos para avaliação da cinética de permeação: 2, 6 e 12 h. Ao final de cada um dos períodos, foram realizadas coletas do fluido receptor, sendo as mesmas imediatamente transferidas para vials de cromatografia. Posteriormente a daidzeína foi quantificada por CLAE utilizando o método analítico descrito no item 3.1.

Ao final de cada experimento e após a coleta do fluido receptor, as peles foram removidas e então lavadas com água corrente, secas com papel absorvente, e colocadas em uma superfície plana (placa de isopor coberta com folha de papel alumínio). Procedeu-se então à técnica de *tape stripping* utilizando-se 15 fitas adesivas para a retirada do estrato córneo das peles, sendo que a primeira fita utilizada em cada pele foi descartada para eliminação de possíveis quantidades de formulação remanescentes sobre as mesmas. As outras 14 fitas foram transferidas para tubos falcon contendo 3 mL de metanol para extração da daidzeína. Cada tubo foi agitado por 5 min. em agitador vertical (tipo vórtex) e em seguida colocado em banho de ultrassom por 15 min.. A solução foi transferida para vials de cromatografia e posteriormente a daidzeína foi quantificada por CLAE utilizando o método analítico descrito no item 3.1.

As peles, já sem o estrato córneo, foram cortadas visando delimitar a área de permeação, sendo então picadas e colocadas em tubos falcon contendo 3 mL de metanol para extração da daidzeína. O processo de extração da daidzeína presente no homogenato de epiderme + derme foi realizado da mesma forma como descrita no parágrafo anterior para o estrato córneo, ou seja, 5 min. em agitador vertical (tipo

vórtex) e 15 min. em banho de ultrassom. A solução final foi transferida para vials de cromatografia e posteriormente a daidzeína foi quantificada por CLAE utilizando o método analítico descrito no item 3.1.

Seguem abaixo listados os materiais utilizados nos ensaios de retenção e permeação cutânea:

- Solução de tampão fosfato pH 7,4 30 mM com 2% de Polysorbate 80: Água Milli-Q, Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado (Synth, lote: 91107), Fosfato de Sódio Bibásico Heptahidratado (Synth, lote: 93438), Polysorbate 80 (Via Farma)
- Orelhas de porco não escaldadas, limpas e dermatomizadas a uma espessura de 500 µm com dermatômetro (Nouvag GmbH)
- Células de difusão vertical. Cada célula tem 3,6 mL de volume para a solução receptora e permite uma área de permeação igual a 0,66 cm²
- Metanol grau HPLC

3.7 Avaliação toxicológica dos ingredientes da nanoemulsão

Uma vez que a escolha das matérias-primas foi baseada no seu amplo uso no mercado cosmético, sabia-se que as mesmas eram consideradas seguras para utilização na nanoemulsão proposta. Ainda assim, uma compilação de dados toxicológicos sobre as mesmas foi realizada para se avaliar a necessidade de condução de ensaios pré-clínicos de segurança.

Tal compilação se deu através de pesquisa bibliográfica nos seguintes sites técnicos:

- ✓ <http://online.personalcarecouncil.org/jsp/Home.jsp>
- ✓ <http://www.iarc.fr>
- ✓ <http://toxnet.nlm.nih.gov>
- ✓ <http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing>
- ✓ <http://www.echemportal.org/echemportal>
- ✓ <http://www.cir-safety.org/cir-findings>
- ✓ <http://www.fda.gov>

Estes sites, pertencentes a governos, organizações e também centros de pesquisas altamente renomados no ramo da toxicologia cosmética, são comumente utilizados para o levantamento de dados toxicológicos, que deve acontecer logo no

início da avaliação de segurança de um cosmético. Como a grande maioria dos ingredientes cosméticos já é utilizado há muitos anos, estes já foram submetidos a diversos testes toxicológicos e, portanto seus dados estão publicados e facilmente acessíveis para consulta. Isso minimiza a necessidade de realização de novos testes, poupando tempo e recursos investidos nas avaliações dos ingredientes isolados.

A busca se inicia a partir da nomenclatura INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients) e/ou do número CAS (Cosmetic Abstract Service) do ingrediente a ser avaliado. Alguns dos sites acima citados, além de trazerem informações regulatórias e/ou toxicológicas sobre cada um dos ingredientes, já traz também alguns links para outros sites relacionados que contêm informações adicionais ou ainda artigos publicados que são de extrema relevância para a avaliação de segurança como um todo. Exemplos disso são os sites TOXNET e EchemPortal que direcionam o avaliador para uma série de bancos de dados e outros sites toxicológicos.

Por fim, utilizou-se todas as informações obtidas para a realização do cálculo da margem de segurança de cada um dos ingredientes utilizados na formulação. Os conceitos deste cálculo bem como a fórmula para a realização do mesmo foram discutidos anteriormente no item 1.2.1.

4 Resultados e Discussão

4.1 Resultados

4.1.1 Método Analítico para detecção e quantificação da daidzeína

O método desenvolvido para as quantificações da daidzeína foi validado seguindo os critérios de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção e robustez preconizados na RE 899 da ANVISA.

A seletividade do método, com base na injeção de todos os possíveis interferentes, demonstrou ausência de picos no mesmo tempo de retenção da daidzeína, conforme ilustrado na figura 12.

Figura 12: Cromatograma demonstrando seletividade do método analítico. Fase móvel utilizada metanol:água (60:40 v/v), fluxo isocrático de 1,2 mL/min., temperatura ambiente, com o sistema operando em 260 nm.

A linearidade da curva analítica foi verificada a partir das seguintes concentrações, todas expressas em $\mu\text{g/mL}$: 0,098; 0,246; 0,614; 1,536; 3,84; 9,6 e 24,0. Para tal, uma massa de 600 μg do padrão Sigma foi pesado em balão de 25 mL e o volume completado com metanol grau HPLC. A solução concentrada (24 $\mu\text{g/mL}$) foi então diluída nas demais concentrações, a partir de alíquotas de 4 mL com a adição de 6 mL de tampão fosfato pH 7,4 30 mM, mantendo a mesma matriz que a solução receptora. Foram então realizadas injeções em triplicata de todas as

concentrações acima citadas. A linearidade da curva analítica foi comprovada para a faixa de concentração de 0,098 a 24 µg/mL (Figura 13). O coeficiente de correlação (r) obtido foi de 0,999567, estando de acordo com o valor mínimo de 0,99 preconizado pela RE 899 da ANVISA.

A figura 13 abaixo traz a curva analítica obtida nas condições do método desenvolvido:

Figura 13: Curva analítica demonstrando linearidade nas concentrações de 0,098 a 24,0 µg/mL.

A precisão e exatidão intra-corrida (repetibilidade) do método analítico foi verificada a partir da injeção em triplicata de três concentrações da curva analítica, a saber: 0,614 µg/mL (baixa), 3,84 µg/mL (média) e 24 µg/mL (alta). Enquanto que a precisão e exatidão inter-corrida (precisão intermediária) do método analítico foi verificada a partir da injeção em triplicata das mesmas três concentrações, em dois dias diferentes. Os cálculos usados para precisão e exatidão, foram, respectivamente: “desvio padrão/média x 100” e “concentração média experimental/concentração teórica x 100”.

As tabelas 3 e 4 demonstram os resultados de precisão e exatidão, intra-corrida (repetibilidade) e inter-corrida (reprodutibilidade) do método analítico. Tanto

para precisão intra-corrida quanto para a inter-corrida, foi verificado coeficiente de variação inferior a 5%, valores em acordo com a RE 899 da ANVISA.

Tabela 3: Cálculo da precisão (coeficiente de variação) para verificação da precisão intra-corrida, nas concentrações baixa (0,614 µg/mL), média (3,84 µg/mL) e alta (24,0 µg/mL).

Faixa de Concentração	Concentração (µg/ml)	Resposta (área)	Equação	Coeficiente de correlação (r)	R ²	Média	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação (CV%)	Exatidão
Baixa	0,614	25705,98011 25524,73227 25572,09158 120656,2972	$Y = 4,24e+007 X - 9,27e+003$	0,999171	0,998342	25600,935	94,003	0,367	133,88
Média	3,84	121092,5456 120838,6638 1015061,929				120862,502	219,099	0,181	79,97
Alta	24	1011316,244 1012085,204				1012821,126	1978,313	0,195	100,46

Tabela 4: Cálculo da precisão (coeficiente de variação) para verificação da precisão inter-corrida.

Concentrações	Baixa (0,614µg/ml)	Média (3,84µg/ml)	Alta (24,0µg/ml)
Respostas	25646,286	117824,381	937461,359
	25381,748	122528,438	955866,615
	25547,295	116970,776	987492,897
	25705,980	120656,297	1015061,929
	25524,732	121092,546	1011316,244
	25572,092	120838,664	1012085,204
Média	25563,022	119985,184	986547,375
Desvio padrão	111,379	2127,390	32955,720
Precisão (CV%)	0,436	1,773	3,341
Exatidão	129,15	79,92	100,43

O limite de detecção (sensibilidade) foi avaliado experimentalmente a partir da observação visual da menor concentração de daidzeína nos cromatogramas, considerando-se que o pico estivesse de 2 a 3 vezes o tamanho do ruído (COLLINS, et al., 2006).

O limite de quantificação foi definido a partir de análises consecutivas de diminuição da concentração de daidzeína do último ponto da curva, de forma que este fosse analisado com precisão e adequado coeficiente de correlação da curva analítica a partir de 10 injeções consecutivas.

O limite de detecção e quantificação foi de 0,098 µg/mL de daidzeína. A tabela 5 demonstra os valores obtidos com o limite de quantificação após 10 injeções em dois dias consecutivos, apresentando coeficiente de variação bem menores que 20% como preconizado pela RE 899 da ANVISA.

Tabela 5: Coeficiente de variação de 10 injeções do limite de quantificação do método analítico, realizadas em dois dias diferentes.

Dia 1							
Concentração (ug/ml)	Tempo de retenção	Resposta (Área)	Coeficiente de correlação (r)	R²	Média	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação (CV%)
0,098	3,892	3951	0,998871	0,997744	3843,40	231,08	6,01
	3,892	3861					
	3,896	3828					
	3,897	3916					
	3,912	4161					
	3,913	3848					
	3,906	3278					
	3,919	3927					
	3,914	3965					
	3,916	3699					
Dia 2							
Concentração (ug/ml)	Tempo de retenção	Resposta (Área)	Coeficiente de correlação (r)	R²	Média	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação (CV%)
0,098	3,892	3846	0,999171	0,998342	3720,10	174,29	4,69
	3,896	3783					
	3,907	4108					
	3,899	3666					
	3,894	3642					
	3,903	3496					
	3,907	3694					
	3,912	3744					
	3,916	3514					
	3,911	3708					

A robustez do método analítico foi avaliada variando-se a proporção dos solventes da fase móvel. As proporções utilizadas foram 50:50 v/v (metanol:água) e 70:30 v/v (metanol:água). Visando a comparação entre os coeficientes de correlação, para ambas as proporções de fase móvel, realizou-se a injeção em triplicata, utilizando-se as seguintes concentrações: 0,614; 1,536; e 9,6 µg/mL. O coeficiente de correlação linear (r) observado para variações na proporção da fase móvel 50:50 v/v (metanol:água) e 70:30 v/v (metanol:água) com valores de 0,999959 e 0,999817, respectivamente, demonstrando eficiente robustez do método analítico (Tabela 6).

Tabela 6: Coeficiente de variação das concentrações de daidzeína (n=3), realizadas com diferentes proporções de fase móvel para avaliação da robustez.

injeção	MeOH:H ₂ O 50:50 Concentração (ug/ml)	Resposta (Área)	Equação	Coeficiente de Correlação (r)	R ²	Média	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação (CV%)
1	0,614	22094,5984	Y = 3,88e+007 X - 6,42e+002	0,999959	0,999919	21943,3745	1052,6098	4,7969
2		20823,3315						
3		22912,1934						
4	1,536	60338,5570				60371,3663	800,8338	1,3265
5		59587,4413						
6		61188,1005						
7	9,600	370727,1701				371856,1173	1403,2582	0,3774
8		373427,1902						
9		371413,9915						
injeção	MeOH:H ₂ O 70:30 Concentração (ug/ml)	Resposta (Área)	Equação	Coeficiente de Correlação (r)	R ²	Média	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação (CV%)
1	0,614	26731,0514	Y = 4,20e+007 X - 1,01e+003	0,999817	0,999634	26860,4547	193,1228	0,7190
2		27082,4380						
3		26767,8748						
4	1,536	66927,1339				66621,1327	408,3499	0,6129
5		66778,8122						
6		66157,4521						
7	9,600	400646,4757				401558,4853	1292,8403	0,3220
8		400990,9595						
9		403038,0207						

4.1.2 Escolha do extrato botânico

A escolha baseou-se na concentração de daidzeína presente nos extratos e também na facilidade de incorporação do mesmo na nanoemulsão. Os seis extratos botânicos estudados apresentaram quantidades bastante diferentes de daidzeína, e os valores encontram-se na tabela 7:

Tabela 7: Concentrações de daidzeína encontrada em cada um dos seis extratos.

Codificação do Extrato	Origem	Concentração de Daidzeína (%)
1	Soja	38,3000
2	Soja	39,5800
3	Soja	0,0005
4	Soja	0,0005
5	Soja	0,6545
6	Red Clover	0,0013

Adicionalmente ao doseamento da daidzeína, doseou-se também a genisteína, para se conhecer melhor a composição dos extratos. As quantidades de genisteína eram muito baixas e seguem abaixo na tabela 8:

Tabela 8: Concentrações de genisteína encontrada em cada um dos seis extratos.

Codificação do Extrato	Origem	Concentração de Genisteína (%)
1	Soja	0,1844
2	Soja	0,2533
3	Soja	ND
4	Soja	ND
5	Soja	0,4389
6	Red Clover	0,0013

Essa diferença na composição dos seis extratos, já era esperada, pois os extratos são provenientes de fabricantes diferentes, que por sua vez utilizam processos de extração distintos e diluem seus extratos em veículos específicos e em diferentes concentrações. Além disso, alguns estão na forma de pó enquanto outros estão na forma líquida, conforme se pode visualizar na figura 9. O extrato escolhido foi o codificado com o número 2, por conter a maior quantidade de daidzeína. O método empregado para a quantificação de daidzeína nos extratos foi o mesmo empregado para a quantificação desta isoflavona nos estudos de permeação. Detalhes do método cromatográfico e sua validação estão descritos nos itens 3.1. e 4.1.1., respectivamente.

4.1.3 Desenvolvimento da Nanoemulsão

Para a avaliação do perfil de retenção e permeação cutânea *in vitro* da daidzeína presente no extrato 2, foi desenvolvida uma formulação cosmética baseada em nanotecnologia. Partiu-se do princípio de que a formulação deveria conter o mínimo de ingredientes possível, possuir composição apropriada, bem como textura e pH adequados para a aplicação tópica, além de permitir a incorporação do extrato botânico escolhido. Procurou-se, ao longo do desenvolvimento, considerar aspectos relevantes para a disponibilização desta nanoemulsão no mercado, como por exemplo, facilidade de acesso às matérias-primas, segurança das matérias-primas, simplicidade do processo, possibilidade de aumento da escala produtiva, aspectos sensoriais e etc. O procedimento para a obtenção da nanoemulsão está descrito no item 3.3., e abaixo, no 4.1.4. encontram-se os resultados obtidos na caracterização e no estudo de estabilidade realizado para a nanoemulsão desenvolvida.

4.1.4 Caracterização da nanoemulsão e estudo de estabilidade

Comparou-se a polidispersidade e o tamanho de partícula médio por intensidade da formulação antes e após o processo de sonicação para evidenciar a eficiência do processo na obtenção de partículas em escala nanométrica. Para isso, foi realizada diluição da nanoemulsão na proporção de 1:100 (nanoemulsão:KCL 1mM) para medida de tamanho de partícula e polidispersidade, e na proporção 1:20 (nanoemulsão:KCL 1mM) para medida de potencial zeta. Os valores comparativos estão expressos na tabela 9.

Tabela 9: Dados de polidispersidade e de tamanho de partícula (média por intensidade), da formulação contendo 1% de extrato, antes e após sonicação.

Formulação	Polidispersidade (Pdl)	Tamanho de Partícula (Média por intensidade)
antes da sonicação	0,441	161,40
após a sonicação	0,188	112,40

A figura 14 ilustra os perfis de distribuição de partícula, antes e após a sonicação:

Figura 14: Gráficos de distribuição de tamanho de partículas da nanoemulsão contendo 1% do extrato, antes (a) e após (b) o processo de sonicação.

Observando-se os gráficos da figura 14 assim como os valores de tamanho de partícula médio e de polidispersidade expressos na tabela 9, pode-se concluir que o processo de sonicação foi fundamental para a obtenção de uma nanoemulsão pouco polidispersa.

Verificou-se a estabilidade da nanoemulsão após centrifugação a 1057 *g* (ou 3000 rpm), durante 30 min, conforme preconizado pelo Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (2004). Após este procedimento verificou-se visualmente que a nanoemulsão permaneceu estável. Iniciou-se então, o acompanhamento periódico da polidispersidade e do tamanho de partícula durante 90 dias.

Quatro lotes da nanoemulsão foram produzidos, em dias diferentes, para avaliação da reprodutibilidade do processo. Verificou-se, conforme tabela 10, que o processo é reprodutível e eficaz na obtenção da nanoemulsão.

Tabela 10: Codificação dos lotes produzidos e resultados de polidispersidade e tamanhos de partícula médios por intensidade.

Codificação do lote	Índice de Polidispersidade	Tamanho de partícula no tempo zero (T0)
		Média por intensidade (nm)
F1	0,132	193,60
F2	0,151	132,30
F3	0,188	112,40
F4	0,192	163,70

O acompanhamento periódico das formulações evidenciou que a nanoemulsão contendo 1% do extrato, permanece estável por um período mínimo de 90 dias, apresentando baixo índice de polidispersidade e tamanho de partícula mantido entre os diferentes dias. Os lotes F1, F2 e F3 foram escolhidos para o acompanhamento de 90 dias de estabilidade, sendo que amostras do lote F2, também foram submetidas às temperaturas de 4°C e 45°C para acompanhamento da estabilidade acelerada.

A tabela 11 apresenta os resultados encontrados para os lotes F1, F2 e F3, evidenciando a estabilidade da nanoemulsão por um período de 90 dias, a temperatura ambiente, enquanto que a tabela 12 apresenta os resultados encontrados no acompanhamento do lote F2 nas temperaturas ambiente (25°C), estufa (45°C) e geladeira (4°C).

Tabela 11: Resultados de polidispersidade e tamanhos de partícula médios por intensidade dos 3 lotes acompanhados por 90 dias.

Tempo (em dias)	Lote F1		Lote F2		Lote F3	
	Polidispersidade (Pdl)	Tamanho de Partícula Média por intensidade (nm)	Polidispersidade (Pdl)	Tamanho de Partícula Média por intensidade (nm)	Polidispersidade (Pdl)	Tamanho de Partícula Média por intensidade (nm)
0	0,132	193,60	0,151	132,30	0,188	112,40
15	0,222	209,70	0,202	158,30	0,176	130,80
30	0,254	232,40	0,255	212,20	0,169	146,20
45	0,357	266,30	0,186	227,10	0,170	132,70
60	0,219	254,20	0,215	236,60	0,189	144,50
75	0,222	253,90	0,186	265,00	0,176	148,50
90	0,254	291,00	0,215	236,60	0,167	157,30

Tabela 12: Resultados de polidispersidade e tamanhos de partícula médios por intensidade do lote F2 acompanhado por 90 dias, em diferentes temperaturas.

Lote F2						
Tempo (em dias)	AMBIENTE (25°C)		ESTUFA (45°C)		GELADEIRA (4°C)	
	Polidispersidade (Pdl)	Tamanho de Partícula Média por intensidade (nm)	Polidispersidade (Pdl)	Tamanho de Partícula Média por intensidade (nm)	Polidispersidade (Pdl)	Tamanho de Partícula Média por intensidade (nm)
0	0,151	132,30	0,168	302,30	0,208	141,40
15	0,202	158,30	0,147	352,10	0,157	137,30
30	0,255	212,20	0,214	491,80	0,177	143,40
45	0,186	227,10	0,160	602,60	0,259	172,20
60	0,215	236,60	0,264	645,30	0,288	205,20
75	0,186	265,00	0,162	875,10	0,193	162,70
90	0,215	236,60	0,243	729,30	0,212	164,60

Adicionalmente, um acompanhamento também do potencial zeta foi realizado para os três lotes estudados. Os resultados encontram-se na tabela 13:

Tabela 13: Resultados de potencial zeta (*zeta average*) dos 3 lotes acompanhados por 90 dias.

Tempo (em dias)	Lote F1	Lote F2	Lote F3
	Potencial Zeta (Zeta Average)	Potencial Zeta (Zeta Average)	Potencial Zeta (Zeta Average)
0	-58,90	-40,10	-40,60
15	-43,70	-40,90	-61,50
30	-56,70	*	-41,60
45	*	-41,90	-33,10
60	-43,00	-37,30	-41,90
75	-43,70	-44,40	-61,50
90	-61,70	-50,00	-42,90

* dado perdido

Para a condução dos ensaios de retenção e permeação cutânea *in vitro*, foi produzido um novo lote, codificado como F12. Este foi produzido sem o agente quelante EDTA, o qual foi identificado como um interferente para a quantificação analítica da daidzeína, na época da validação do método analítico. Optou-se também por não centrifugar este lote, visando evitar a diluição do teor de daidzeína na nanoemulsão, uma vez que o extrato seco não se encontrava totalmente solúvel. Os valores de tamanho de partícula, polidispersidade e potencial zeta deste lote, estão apresentados na tabela 14. Foi ainda realizado um doseamento da concentração de daidzeína neste lote da nanoemulsão, logo após o seu preparo e depois de 90 dias para se avaliar a estabilidade da isoflavona na nanoemulsão. Foi possível verificar que mesmo após os 90 dias, período no qual se acompanhou a estabilidade da nanoemulsão e também no qual foram realizados os experimentos de retenção e permeação cutânea, a concentração de daidzeína se manteve estável, na faixa de 0,39%.

Tabela 14: Acompanhamento da estabilidade, por 90 dias, da nanoemulsão lote F12, utilizado nos experimentos de liberação, retenção e permeação cutânea.

Lote F12			
Tempo (em dias)	Polidispersidade (Pdl)	Tamanho de Partícula Média por intensidade (nm)	Potencial Zeta (Zeta Average)
0	0,373	198,00	-34,00
30	0,465	268,30	-33,70
60	0,438	264,00	-29,40
90	0,344	291,40	-39,00

4.1.5 Ensaio de liberação em membrana sintética

Antes da realização dos ensaios de retenção e permeação cutânea *in vitro*, foi realizado um ensaio para a avaliação da liberação da daidzeína da nanoemulsão. O procedimento deste ensaio está descrito no item 3.4. e o mesmo foi realizado em triplicata.

Foi possível verificar, conforme gráfico da figura 13, que a daidzeína pode ser liberada da nanoemulsão de maneira crescente nos períodos de 2, 6 e 12 h. No primeiro tempo avaliado, 2 h, teve-se uma liberação de 9,48 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Com 6 h de

experimento, a quantidade liberada foi de $14,50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e por fim, com 12 h, houve uma liberação de $39,22 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Os valores das três replicatas deste experimento bem como os valores de desvio padrão estão descritos na tabela 15.

Tabela 15: Valores de liberação da daidzeína da nanoemulsão em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, nos tempos de 2, 6 e 12 h. Média de três replicatas com seus respectivos valores de desvio padrão entre parênteses. (n=3)

Ensaio de Liberação em membrana sintética	
Tempo	Valor permeado - $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
2 h	9,48 (0,68)
6 h	14,50 (5,47)
12 h	39,22 (8,73)

As quantidades de daidzeína liberadas da nanoemulsão nos três diferentes tempos estudados estão visualmente expressas abaixo no gráfico da figura 15:

Figura 15: Gráfico demonstrando a liberação da daidzeína da nanoemulsão, em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, nos tempos de 2, 6 e 12 h. (n=3)

Considerando-se que foram aplicados 200 μL da nanoemulsão, o que corresponde a aproximadamente 0,195 g, e que a nanoemulsão contém 0,39% de daidzeína, assume-se que a quantidade em massa total de daidzeína aplicada sobre as membranas foi de 760,5 μg . Com isso, tem-se que aproximadamente 3,40% da daidzeína total foi liberada da nanoemulsão ao final do período de 12 h de

experimento. Isso por que foram detectados 25,89 μg na solução receptora (ou seja, 39,22 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

4.1.6 Ensaio *in vitro* de retenção e permeação cutânea

4.1.6.1 Sink Condition

Para garantir o estado de *sink condition* durante o experimento de retenção e permeação cutânea, foi determinado o coeficiente de solubilidade da daidzeína na solução de tampão fosfato pH 7,4 (PBS 7,4), na presença e ausência de 2% de Polysorbate 80. Adicionou-se quantidade do extrato de soja em excesso em um béquer contendo 3 mL de PBS 7,4 e em outro contendo a mesma quantidade de PBS 7,4 + 2% de Polysorbate 80. Deixou-se agitando por 12 h (período total do ensaio de permeação), sendo a solução filtrada e a quantidade de daidzeína determinada por CLAE conforme método descrito no item 3.1. O coeficiente de solubilidade determinado foi 3,28 vezes maior quando utilizado o Polysorbate 80 na concentração de 2%, sendo os valores de 46 e 151 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de daidzeína em solução PBS 7,4 e PBS 7,4 + 2% de Polysorbate 80, respectivamente.

4.1.6.2 Eficiência de recuperação

Para verificar a eficiência da recuperação da daidzeína nas amostras de pele (estrato córneo e epiderme + derme), foi preparada uma solução de concentração igual a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de padrão de daidzeína em metanol. Da mesma forma preparou-se uma solução do extrato de soja também em metanol, de forma que a concentração de daidzeína fosse a mesma (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As massas pesadas em 1 mL de metanol foram de 0,9 mg do padrão de daidzeína e 2,1 mg do extrato de soja contendo 39,58% desta isoflavona. Foram utilizados dois pedaços de pele de orelha de porco dermatomizadas para este ensaio. Cada pele foi submetida à técnica de tape stripping utilizando-se 15 fitas adesivas para remoção do estrato córneo. As 15 fitas contendo o estrato córneo de cada pele foram colocadas em tubos falcon devidamente identificados. As duas peles, já sem o estrato córneo (fração epiderme + derme) foram picadas e também cuidadosamente colocadas em tubos falcon identificados. Uma alíquota de 25 μL da solução de daidzeína padrão foi adicionada

sobre as fitas adesivas contendo o estrato córneo, e outros 25 µL da solução foram adicionados exatamente sobre a fração epiderme + derme, evitando contato da solução com a parede do tubo. O mesmo procedimento foi realizado utilizando-se a solução do extrato de soja. Os tubos foram colocados em fluxo de ar para total evaporação do metanol das soluções adicionadas. Em seguida, foi realizado o procedimento de extração da daidzeína, tendo sido cada tubo agitado por 5 min. em agitador vertical (tipo vórtex) e depois colocado em banho de ultrassom por 15 min.. A solução foi transferida para vials de cromatografia e posteriormente a daidzeína foi quantificada por CLAE utilizando o método analítico descrito no item 3.1. Os resultados de recuperação obtidos com este ensaio foram de 95,1% de recuperação no estrato córneo e de 80,7% na fração epiderme + derme.

4.1.6.3 Ensaios de retenção e permeação cutânea

O ensaio para a avaliação do perfil de retenção e permeação cutânea da daidzeína foi realizado em 3 diferentes peles, utilizando a nanoemulsão e a solução controle escolhida como referência.

Para a condução deste ensaio, seguiu-se o procedimento descrito no item 3.5. O lote da nanoemulsão que foi utilizado para este ensaio, foi o lote F12, cujos valores de acompanhamento da estabilidade estão descritos no item 4.1.4. Conforme já mencionado anteriormente, foram conduzidos experimentos nos tempos de 2, 6 e 12 h.

A solução controle utilizada foi uma solução aquosa do padrão de daidzeína e propilenoglicol a 0,39% e 10%, respectivamente. Estas concentrações são iguais às encontradas na nanoemulsão para estes componentes.

Foi verificado um aumento crescente de retenção e permeação cutânea da daidzeína nos três diferentes tempos, tanto para a solução controle quanto para a nanoemulsão. A tabela 16 e a figura 16 trazem expressos os valores de retenção e permeação cutânea da daidzeína na nanoemulsão e no controle.

Tabela 16: Valores de daidzeína retida e permeada nos tempos de 2, 6 e 12 h com seus respectivos valores de desvio padrão entre parênteses. (n=3)

	Quantidades retidas e permeadas nos tempos de 2, 6 e 12h					
	2 h (ug/cm ²)		6 h (ug/cm ²)		12 h (ug/cm ²)	
	nanoemulsão	controle	nanoemulsão	controle	nanoemulsão	controle
Retenção no Estrato Córneo	2,16 (0,03)	0,96 (0,16)	4,01 (0,70)	3,33 (0,30)	5,53 (0,10)	4,81 (0,07)
Retenção na Epiderme + Derme	1,88 (0,16)	0,61 (0,11)	4,18 (0,05)	1,72 (0,16)	4,71 (0,42)	4,66 (0,61)
Permeação	0,78 (0,14)	0,89 (0,27)	1,65 (0,40)	1,32 (0,60)	4,61 (0,61)	1,97 (0,06)

Figura 16: Gráfico ilustrando a retenção e a permeação cutânea da daidzeína nos tempos de 2, 6 e 12 h, para a nanoemulsão e para o controle. (n=3)

Observa-se que a nanoemulsão proporcionou um aumento na retenção da daidzeína nos três tempos testados no estrato córneo e na fração epiderme + derme, sendo que em 12 h, a retenção na fração epiderme + derme foi semelhante para nanoemulsão e para a solução controle. Com relação à permeação, com exceção ao tempo de 2 h, a nanoemulsão aumentou a permeação do ativo, sendo que no tempo de 12 h este aumento duplicou. Considerando-se que a daidzeína é utilizada em produtos cosméticos e estes necessitam ter uma ação tópica com mínima ou ausente absorção sistêmica, o tempo de aplicação de 6 h parece ser mais adequado para aplicação do produto, uma vez que liberou maior quantidade do ativo nas camadas da pele sem ter aumento da permeação cutânea.

Considerando-se que foram aplicados 200 µL da nanoemulsão sobre a pele, o que corresponde a aproximadamente 0,195 g, e que a nanoemulsão contém 0,39% de daidzeína, assume-se que a quantidade em massa total de daidzeína aplicada sobre as membranas biológicas foi de 760,5 µg.

Com isso, tem-se que aproximadamente 0,15% (correspondente a 1,11 µg) da daidzeína total presente na nanoemulsão permeou através das camadas da pele atingindo a solução receptora ao final do período de 6 h de experimento. No que se refere às quantidades retidas na pele, temos que 0,72% ficou retido na pele total (fração estrato córneo + epiderme + derme), correspondentes a 5,49 µg.

Aplicando-se o mesmo racional de cálculo para os valores obtidos com o controle, tivemos uma permeação da daidzeína para a solução receptora de 0,12% (correspondente a 0,88 µg) e uma retenção na pele total de 0,44% (correspondente a 3,38 µg).

Em suma, após 6 h de aplicação sobre a pele, a permeação da daidzeína para a solução receptora foi de 0,15% quando veiculada na nanoemulsão, enquanto que a daidzeína veiculada na solução controle apresentou uma permeação de 0,12% para a solução receptora. No que se refere às quantidades retidas na pele total (estrato córneo + epiderme + derme), a daidzeína presente na nanoemulsão teve uma retenção de 0,72%, enquanto que quando aplicada na solução controle, a retenção foi de 0,44%.

Os valores permeados são baixos em relação à quantidade total aplicada sobre a pele devido a dois principais fatores. Um deles é que por estarmos trabalhando com extrato seco, nem toda a daidzeína está solúvel para ser liberada. Outro fator é o uso de dose infinita, ou seja, a quantidade aplicada sobre a pele está em excesso, e portanto parte dela não está em contato direto com a pele para ser liberada e penetrada.

Uma vez que não foi estudada a eficácia desta nanoemulsão e que o foco deste trabalho foi a segurança, não consideramos isso um problema.

4.1.6.4 Avaliação estatística dos resultados dos ensaios *in vitro* de retenção e permeação cutânea

Para a avaliação estatística dos resultados obtidos nos ensaios aqui descritos, foi utilizada a ferramenta Action, disponível em www.portalaction.com.br.

A metodologia escolhida foi o ANOVA, teste de múltiplas comparações de Tukey.

A tabela 17 a seguir apresenta o p-valor encontrado para cada uma das comparações realizadas considerando-se um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 17: p-valor para as comparações realizadas num intervalo de confiança de 95%.

	Tempo de experimento	p-valor comparando nanoemulsão x solução controle
Retenção no extrato córneo	2 h	1,68E-02 (<0,05)
	6 h	6,27E-01 (>0,05)
	12	5,23E-01 (>0,05)
Retenção na fração epiderme + derme	2 h	7,99E-03 (<0,05)
	6 h	4,34E-08 (<0,05)
	12	1,00E+00 (>0,05)
Permeação para a solução receptora	2 h	1,00E+00 (>0,05)
	6 h	9,99E-01 (>0,05)
	12	7,41E-09 (<0,05)

Considerando-se um intervalo de confiança de 95% (p-valor <0,05), podemos afirmar que houve retenção significativamente maior para a nanoemulsão quando comparada com o controle, nas seguintes situações:

- ✓ Retenção no extrato córneo no tempo de 2 h
- ✓ Retenção na fração epiderme + derme no tempo de 2 h
- ✓ Retenção na fração epiderme + derme no tempo de 6 h
- ✓ Permeação para a solução receptora no tempo de 12 h

No entanto, para as situações abaixo, não observou-se diferenças significativas considerando-se p-valor <0,05, ou seja, num intervalo de confiança de 95%:

- ✓ Retenção no extrato córneo no tempo de 6 h
- ✓ Retenção no extrato córneo no tempo de 12 h
- ✓ Retenção na fração epiderme + derme no tempo de 12 h
- ✓ Permeação para a solução receptora no tempo de 2 h
- ✓ Permeação para a solução receptora no tempo de 6 h

4.1.7 Avaliação toxicológica dos ingredientes da nanoemulsão

Com base nas pesquisas bibliográficas realizadas, foi possível encontrar dados toxicológicos que garantem a segurança de todos os ingredientes que compõem as matérias-primas escolhidas para o preparo da nanoemulsão. Os dados levantados podem ser visualizados no apêndice 1, “Avaliação regulatória e toxicológica dos ingredientes da nanoemulsão”.

De maneira geral, os ingredientes não apresentam riscos de irritação dérmica ou ocular, fototoxicidade, sensibilização ou danos sistêmicos, se utilizados nas concentrações permitidas pelas legislações e, no caso dos não regulados, utilizados nas concentrações atualmente praticadas pelo mercado cosmético.

Adicionalmente, calculou-se a margem de segurança conforme descrito no item 1.2.1. para a verificação do atingimento da margem de segurança mínima de 100 para todos os ingredientes. A tabela 18 traz os resultados obtidos neste cálculo:

Tabela 18: Cálculo da margem de segurança (MoS) dos ingredientes da nanoemulsão.

nomenclatura INCI	NO(A)EL (mg/kg bw/d)	A (mg/kg bw/d)	C (%)	DAP (%)	SED (mg/kg bw/d)	MoS
Caprylyl Glycol	300	24,14	0,22	100	0,05	5585,40
Phenoxyethanol	500	24,14	0,28	100	0,07	7463,97
BHT	25	24,14	0,05	100	0,01	2071,25
Alcohol	2000	24,14	10,00	100	2,41	828,50
Propylene Glycol	2000	24,14	10,00	100	2,41	828,50
Triethanolamine	349	24,14	0,65	100	0,16	2224,20
Soy isoflavones	50	24,14	0,40	100	0,10	517,81
Cetearyl Alcohol	1000	24,14	2,10	100	0,51	1972,62
Ceteth-20 Phosphate	200	24,14	1,40	100	0,34	591,79
Dicetyl Phosphate	-	24,14	3,50	100	0,84	-

Onde:

NOAEL: Dose em que não se observam efeitos adversos

A: Exposição diária estimada (SCCS/1501/12)

C: Concentração do ingrediente no produto

DAP: Absorção dérmica

SED: Dose de exposição sistêmica

MoS: Margem de Segurança

Onde: INCI: Nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos, do inglês *International nomenclature of cosmetic ingredient*; NOAEL: Dose em que não se observam efeitos adversos, do inglês *no observed adverse effect level*; A: Exposição diária estimada; C: concentração do ingrediente no produto cosmético; DAP: absorção dérmica, do inglês *dermal absorption*; SED: Dose de exposição sistêmica, do inglês *systemic exposure dose*; MoS: Margem de segurança, do inglês *Margin of Safety*.

Como se pode verificar na tabela 18 acima, foram realizados os cálculos de margem de segurança para todos os ingredientes da formulação, com exceção de um deles para o qual não foi encontrado um valor de NOAEL, o que impossibilita a realização do cálculo. Evidenciou-se que todos os ingredientes, nas concentrações em que foram aplicados, estão com valores de margem de segurança bem acima de 100, que é o valor mínimo para se garantir um uso seguro.

Estes resultados aliados aos estudos de retenção e permeação cutânea *in vitro* indicam que a nanoemulsão desenvolvida pode proporcionar uma liberação aumentada do ativo daidzeína nas camadas da pele e ainda apresentar um desempenho de segurança exigido pela legislação pertinente.

Com base em todo o contexto exposto acima, os ensaios pré-clínicos para avaliação de segurança da nanoemulsão não se fazem necessários. Porém, cabe ressaltar que, do ponto de vista clínico, estudos que comprovem uma boa compatibilidade cutânea da formulação com a pele humana (SCCS/1501/12) ainda devem ser realizados. De acordo com o que é preconizado pelo SCCS, podemos afirmar que não se espera a ocorrência de eventos adversos relacionados ao produto, uma vez que o mesmo seja utilizado nas condições previsíveis de uso, o que permite que tal formulação seja utilizada de forma ética na condução de ensaios clínicos com voluntários humanos.

4.2 Discussão

Literaturas recentes referem os benefícios positivos de veículos nanoestruturados para uso em cosméticos, bem como ferramentas para a compreensão da biologia da pele e cura de doenças de pele, superando potenciais preocupações quanto a sua toxicidade.

Uma série de sistemas micro e nanoestruturados vêm sendo estudados e aplicados com êxito para otimizar a liberação e a retenção/permeação cutânea de ativos destinados ao tratamento de doenças e terapias cutâneas diversas, incluindo tratamentos estéticos (DELOUISE, 2012). Como exemplos destes sistemas, podemos citar as microemulsões (LOPES et al., 2010) e os lipossomas contendo antioxidantes (LANDI-LIBRANDI et al., 2011), os sistemas nanodispersos de cristais líquidos para a liberação de siRNA (*small interfering RNA*) na pele (VICENTINI et al., 2013) e para terapias fotodinâmicas (PRAÇA. et al., 2012; PETRELLI et al.,

2013) e ainda as micropartículas para tratamentos com ácido retinóico (LIRA et al., 2009).

Dentre os vários sistemas de liberação nanoestruturados, as nanoemulsões merecem destaque. Elas são dispersões coloidais compostas de dois líquidos imiscíveis, sendo um disperso no outro, com tamanhos de gotículas entre 20 e 200 nm. Estes produtos, por possuírem reduzido tamanho de gotículas, fluem facilmente, podem ser transparentes e possuem textura e propriedades reológicas únicas. Do ponto de vista de estabilidade as nanoemulsões são altamente atrativas tanto para produtos alimentícios quanto para cosméticos, devido ao reduzido tamanho das gotículas (LEONG, T. S. H. et al., 2009).

Com base na literatura consultada, a opção por se trabalhar com emulsões em escalas nanométricas pode ser considerada uma boa escolha para formulações cosméticas destinadas a entrega de princípios ativos nas diferentes camadas da pele. Da mesma forma, o processo de redução do tamanho de partícula das emulsões através do uso de ultrassom, também se apresenta como uma escolha bastante viável (LEONG, T. S. H. et al., 2009; CEVC, G. e VIERL, U., 2010).

O processo escolhido para a redução do tamanho de partículas da emulsão foi a sonicação. Quando as ondas ultrassônicas atravessam um meio líquido, ocorre a cavitação. Este termo define um processo físico através do qual, bolhas de ar são geradas. Essas bolhas crescem, oscilam e finalmente implodem, de forma que são consideradas como micro-reatores, elevando a pressão e a temperatura do material. A cavitação causa uma série de fenômenos físicos, dentre eles, a ruptura de partículas, levando a uma redução em seu tamanho. Existem dois tipos diferentes de equipamentos para a geração de ondas ultrassônicas: o banho e a sonda de ultrassom. As principais vantagens da sonda de ultrassom sobre o banho de ultrassom são o fato de que a sonda pode ser imersa diretamente na solução e a potência gerada por ela é até 100x maior do que a que é gerada no banho (SANTOS e CAPELO, 2007).

Conforme abordado por SANTOS e CAPELO (2007), a estratégia utilizada de sonicação por ciclos é adequada. Conforme as ondas de ultrassom são direcionadas para dentro da solução, atingem-se elevadas temperaturas e pode acontecer de não se obter mais a cavitação de maneira adequada. A recomendação dos autores neste caso é interromper o procedimento e resfriar a amostra. Quando longos períodos de sonicação forem necessários, pode-se também utilizar a sonicação por pulsos.

Em se tratando da carga das partículas, verificou-se que a nanoemulsão obtida apresentou carga negativa. Este parâmetro foi avaliado através de leitura do potencial zeta no equipamento Zeta Sizer, da Malvern, e está descrito no item 3.3.

Comparando-se a retenção e permeação cutânea da daidzeína presente na nanoemulsão com a presente na solução controle, observou-se, de maneira geral, maiores valores para a nanoemulsão, apesar do fato de não terem sido em todos os casos que se observou diferença significativa. Cabe citar que estes valores não oferecem riscos para o consumidor diante dos dados toxicológicos que foram levantados para as isoflavonas (vide Apêndice 1). Com relação à retenção e permeação dos demais ingredientes da nanoemulsão, estes não foram estudados por não serem o foco deste projeto de pesquisa, mas com base nos dados toxicológicos pesquisados (Apêndice 1) e no cálculo de exposição e margem de segurança (Tabela 18) para cada um deles, não existem evidências de risco no uso cosmético. Do ponto de vista de eficácia, estudos específicos precisariam ser conduzidos para se avaliar os benefícios da nanoemulsão desenvolvida.

Uma vez que os estudos clínicos de segurança não foram conduzidos por não fazerem parte dos objetivos deste projeto de pesquisa, caso no futuro a nanoemulsão desenvolvida venha a ser introduzida no mercado cosmético, recomenda-se a condução dos seguintes ensaios clínicos de segurança:

- *Patch Test* completo com fototeste para avaliação de (foto)irritação primária, (foto)irritação acumulada e potencial (foto)alergênico;
- Teste em uso para avaliação da aceitabilidade cutânea diante do modo de uso indicado para o produto.

Além disso, certamente, estudos de eficácia *in vitro* e/ou clínicos também precisam ser conduzidos para a avaliação da performance da nanoemulsão como um fluido facial antirrugas.

Vale citar que, caso isso venha a ocorrer, ainda seria necessária a adição de fragrância e corantes para aumentar a atratividade da nanoemulsão, e ainda os testes de segurança e eficácia devem ser conduzidos somente após a definição da fórmula final a ser comercializada.

5 Conclusões

- ✓ O método analítico desenvolvido e validado permitiu a detecção e a quantificação da daidzeína de forma específica, sensível e reprodutível na formulação, bem como nos estudos de liberação, retenção e permeação cutânea *in vitro*;
- ✓ O método de emulsificação a quente seguido de sonicação demonstrou-se adequado para a obtenção da nanoemulsão cosmética. A nanoemulsão apresentou tamanho de partícula médio abaixo de 200 nm e índice de polidispersidade abaixo de 0,38, tendo seu potencial zeta demonstrado carga negativa em torno de -40,0;
- ✓ A nanoemulsão obtida demonstrou-se estável e passível de incorporação de 1% de extrato de soja rico em daidzeína. A estabilidade da nanoemulsão foi verificada ao longo do período de 90 dias através da medição do tamanho de partícula, polidispersidade e potencial zeta, além do doseamento do teor de daidzeína;
- ✓ Em comparação com a solução controle, a daidzeína presente na nanoemulsão apresentou maior retenção e permeação cutânea;
- ✓ O tempo de contato com a pele durante os experimentos influenciou nas quantidades de daidzeína retidas e permeadas, sendo que o tempo de 6 h foi considerado o mais adequado para aplicação cosmética sobre a pele;
- ✓ A avaliação toxicológica demonstrou segurança no uso de todos os ingredientes utilizados, de forma que não se fizeram necessários testes pré-clínicos, e testes clínicos foram sugeridos para projetos futuros;
- ✓ Veículos nanoestruturados do tipo nanoemulsões proporcionam liberação cutânea adequada de princípios ativos presentes em extratos vegetais. A maior retenção nas camadas da pele frente à baixa permeação cutânea observados por métodos *in vitro* são pré-requisitos fundamentais para se garantir a eficácia e a segurança de produtos cosméticos.

6 Referências

ALVAREZ-ROMAN, R; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; et. al. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. *Pharmaceutical Research*. v. 21, Issue 10, p. 1818-1825, 2004.

ANTIGNAC, E.; NOHYNEK, G. J. ; RE, T.; CLOUZEAU, J. ; TOUTAINET, H. Safety of Botanical Ingredients in personal care products/cosmetics. *Food and Chemical Toxicology*. v. 49, p. 324-341, 2011.

BARRY, B. W. *Dermatological Formulations: Percutaneous Absorption*. Marcel Dekker, New York, 1983.

BARRY, B. W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *Journal of Controlled Release*. v. 6, Issue 1, p. 85-97, Elsevier, 1987.

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

CAETANO, J. P. S. Aspectos Reguladores dos Cosmecêuticos in *Tratado Internacional de Cosmecêuticos*, COSTA, A. 1ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 13-19, 2012.

CAROLLO, A. R. H. Influência do ácido oleico como promotor de absorção cutânea para o ácido 5-aminolevulínico na terapia fotodinâmica do câncer de pele: estudos *in vitro* e *in vivo* em modelo animal. Dissertação de mestrado. Ribeirão Preto, 2007.

CEVC, G.; Vierl, U. Nanotechnology and the transdermal route A state of the art review and critical appraisal. *Journal of Controlled release*. v. 141, p. 277-299, 2010.

CHADHA, G.; SATHIGARI, S.; PARSONS, D.I.; BABU, R.J. In vitro percutaneous absorption of genistein from topical gels through human skin. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 37, p.498-505, 2011.

CHEN, N.; SCARPA, R.; ZHANG, L.; SEIBERG, M.; LIN, C.B. Non-denatured soy extracts reduce UVB-induced skin damage via multiple mechanisms. *Photochemistry and Photobiology*, v. 84, p. 1551–1559, 2008.

<http://www.cir-safety.org/cir-findings>

CRAMER, G. M. et al.. Estimation of toxic hazard – decision tree approach. *Food and Cosmetic Toxicology*. v. 16, p. 255-276, 1978.

DELOUISE, L. A. Applications of Nanotechnology in Dermatology. *Journal of Investigative Dermatology*. v. 132, p. 964-975, 2012.

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

<http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing>

<http://www.echemportal.org/echemportal>

EL MAGHRABY, G. M.; BARRY, B. W., WILLIAMS, A. C. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* v. 34, p. 203-222, 2008.

<http://www.fda.gov>

FRAWLEY, J. P. Scientific evidence and common sense as a basis for food-packaging regulations. *Food and Cosmetic Toxicology*. v. 5, p. 293-308, 1967.

Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos, 2ª Edição, ANVISA, 2012.

Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, ANVISA, 2004.

Handbook of Pharmaceutical Excipients. Rowe, R, Sheskey, PJ, Weller, PJ. Eds. Pharmaceutical Press. 4th edition, 2003.

HARRIS, M. I. N. C., *Pele: Estrutura, propriedades e envelhecimento*. 3ª ed., Senac, São Paulo, 2009.

<http://www.iarc.fr>

KONG, M.; CHEN, X. G.; KWEON, D. K.; PARK, H. J. Investigations on skin permeation of hyaluronic acid based nanoemulsion as transdermal carrier. *Carbohydrate Polymers*, v. 86, p. 837-843, 2011.

KROES, R. et al.. Application of the Threshold of Toxicological Concern (TTC) to the safety evaluation of cosmetic ingredients. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, p. 2533-2562, 2007.

LANDI-LIBRANDI, A. P.; OLIVEIRA, C. A.; AZZOLINI, A. E. C. S.; KABEYA, L. M. K.; DEL CIAMPO, J. O.; BENTLEY, M. V. L. B.; LUCISANO-VALIM, Y. M. In vitro evaluation of the antioxidant activity of liposomal flavonols by the HRP–H₂O₂–luminol system. *Journal of Microencapsulation*, v. 28, p. 258–267, 2011.

LIANG, X.L.; WANG, X.L.; LI, Z.; HAO, Q.H.; WANG, S.Y. Improved in vitro assays of superoxide anion and 1,1-diphenyl- 2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity of isoflavones and isoflavone metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 11548–1552, 2010.

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

LIRA, A. A. M., et al., Preparation and characterization of chitosan-treated alginate microparticles incorporating all-trans retinoic acid. *Journal of microencapsulation*. V. 26, p. 243-250, 2009.

LIU, C. H.; CHANG, F. Y.; HUNG, D. K. Terpene microemulsions for transdermal curcumin delivery: Effects of terpenes and cosurfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 82, p. 63-70, Elsevier, 2011.

LOPES, L.B.; SPERETTA, F.F.F.; BENTLEY, M.V.L.B. Enhancement of skin penetration of vitamin K using monoolein-based liquid crystalline systems. *European journal of Pharmaceutical Sciences*, v.3 2, p. 209-215, 2007.

LOPES, L.B. et al. Topical Delivery of Lycopene Using Microemulsions: Enhanced Skin Penetration and Tissue Antioxidant Activity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 99, 2010.

LUCCA, L. C. P.; LACERDA, D., Diferenças entre as peles masculina e feminina in *Tratado Internacional de Cosmecêuticos*, Costa, A. 1ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 27-37, 2012.

LUPO, M. P.; COLE, A. L. Cosmeceutical peptides. *Dermatologic Therapy*., v. 20, Issue 5, p. 343-349, 2007.

Merck KGaA. ChemDat – The Merck Chemical database. CDRom, 2007

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

MIYAZAKI, K.; HANAMIZU, T.; SONE, T.; CHIBA, K.; KINOSHITA, T.; YOSHIKAWA, S. Topical application of bifidobacterium-fermented soy milk extract containing genistein and daidzein improves rheological and physiological properties of skin. *Journal of Cosmetic Science*, v. 55, p. 473–479, 2004.

MUNRO, I. C. et al. Correlation of structural class with no-observed-effect-levels: a proposal for establishing a threshold of concern. *Food Chemistry Toxicology*. v. 34, p. 829-867, 1996.

MUNRO, I. C. et al. The threshold of toxicological concern (TTC) in risk assessment. *Toxicology Letters*. v. 180, p. 151-156, 2008.

NGO, M. A.; MAIBACH, H. I. Dermatotoxicology: Historical perspective and advances. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v. 243, p. 225–238, 2010.

NOHYNEK, G. J.; ANTIGNAC, E.; TOUTAIN, H. Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 243, p. 239–259, 2010.

<http://online.personalcarecouncil.org/jsp/Home.jsp>

PARK, E.; LEE, S. M.; JUNG, I. K.; LIM, Y.; KIM, J. H. Effects of genistein on early-stage cutaneous wound healing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 410, p. 514-519, 2011.

PETRILLI, R. et al., Nanoparticles of Lyotropic Liquid Crystals: A Novel Strategy for the Topical Delivery of a Chlorin Derivative for Photodynamic Therapy of Skin Cancer. *Current Nanoscience*, v. 9, p. 434-441, 2013.

PRAÇA, F. S. G.; MEDINA, W. S. G.; PETRILLI, R.; BENTLEY, M. V. L. B. Liquid Crystal Nanodispersions Enable the Cutaneous Delivery of Photosensitizer for Topical PDT: Fluorescence Microscopy Study of Skin Penetration. *Current Nanoscience*, v. 8, p. 535-540, 2012.

RE, T. A. et al. Application of the Threshold of Toxicological Concern approach for the safety evaluation of calendula flower (*Calendula Officinalis*) petals and extracts used in cosmetic and personal care products. *Food and Chemical Toxicology*. v. 47, p. 1246 -1254, 2009.

Regulamento Europeu, EEC 1223/2009

RENEWICK, A. G. Toxicokinetics in infants and children in relation to the ADI and TDI. *Food Additives and Contaminants Suppl.* v. 15, p. 17-35, 1998.

Resolução - RDC nº 04, de janeiro de 2014, ANVISA

Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, ANVISA

SAHOO, S. K.; MA, W.; LABHASETWAR, V. Efficacy of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer. *International Journal of Cancer*. v. 112, Issue 2, p. 335-340, 2004.

SANTOS, H. M.; Capelo, J. L. Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. *Talanta*, v. 73, p. 795-802. 2007.

SCCS/1501/12. The SCCS's Notes of Guidance for the testing of cosmetic substances and their safety evaluation. 8th revision, 2012.

SCHMID, D.; ZÜLLI, F. Topically applied soy isoflavones increase skin thickness. *Cosmetic and Tolletries* v. 117, p. 45–50, 2002.

SHAI, A.; MAIBACH, H. I.; BARAN, R. *Handbook of Cosmetic Skin Care*. Informa UK Ltd., Second Edition, p. 34-40, 2009.

SILVA, M. R.; JACQUES, C. M. C. Epidermal Barrier Function and Systemic Diseases. *Clinics in Dermatology*. v. 30, p. 277-279, Elsevier, 2012.

SUDEL, K.M.; VENZKE, K.; MIELKE, H.; et al. Novel aspects of intrinsic and extrinsic aging of human skin: beneficial effects of soy extract. *Photochemistry & Photobiology*. v. 81, p. 581-587, 2005.

The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 14th ed. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2006. Reg. 8925.

<http://toxnet.nlm.nih.gov>

VARGAS, B. A. et al. Validation of an LC Method to Determine Skin Retention Profile of Genistein from Nanoemulsions Incorporated in Hydrogels. *Journal of Chromatographic Science*. v. 50, p. 114-118, 2012.

VICENTINI, F.T.M.C.; SIMI, T.R.M.; DEL CIAMPO, J.O.; WOLGA, N.O.; PITOL, D.L.; IYOMASA, M.M.; BENTLEY, M.V.L.B.; FONSECA, M.J.V. Quercetin in w/o microemulsion: In vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.69, p.948-957, 2008.

VICENTINI, F.T.M.C.; DEPIERI, L. V.; POLIZELLO, A. C. M.; DEL CIAMPO, J.O.; SPADARO, A. C. C.; FANTINI, M. C. A.; BENTLEY, M.V.L.B. Liquid crystalline phase nanodispersions enable skin delivery of siRNA. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 83, p. 16–24, 2013.

WILLIAMS, A. C ; BARRY, B. W. Penetration Enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 603– 618, Elsevier, 2004.

www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

ZHANG, Su.-J.; SUN, D.; HAO, J.B.; WEI, Y.F.; YIN, L.F.; LIU, X. The effect of dietary soyabean isoflavones on photodynamic therapy in K562 leukemia cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v. 110, p. 28–33, 2012.

Apêndice

Apêndice 1: Avaliação regulatória e toxicológica dos ingredientes da nanoemulsão.

IDENTIFICAÇÃO			
Matéri-prima	nomenclatura INCI	número CAS	Função cosmética
Optiphen	Caprylyl Glycol	1117-86-8	emoliente, humectante, agente condicionante para pele e cabelos
	Phenoxyethanol	122-99-6	conservante
BHT	BHT	128-37-0	antioxidante
Álcool Etilico	Alcohol	64-17-5	solvente
Propilenogicol	Propylene Glycol	57-55-6	humectante, solvente, agente condicionante para a pele, controlador de viscosidade
Trietanolamina	Triethanolamine	102-71-6	surfactante, ajustador de pH
Extrato de soja rico em isoflavonas	Soy isoflavones	446-72-0 (genistein) 486-66 8 (daidzein)	agente condicionante para pele
Crodafos CS20A	Cetearyl Alcohol	67762-27-0; 8005-44-5	emulsificante
	Ceteth-20 Phosphate	-	agente de limpeza, surfactante
	Dicetyl Phosphate	2197-63-9	surfactante, emulsificante

DADOS FÍSICO-QUÍMICOS					
nomenclatura INCI	Fórmula molecular	Peso Molecular	Propriedades Organolépticas	log P	Solubilidade
Triethanolamine	C ₆ H ₁₅ O ₃ N	149.19 g/mol [The Merck Index, 2006].	Líquido viscoso muito higroscópico, com suave odor amoníaco, incolor a amarelo claro. Torna-se marrom se exposto ao ar e à luz. [CIR].	- 1.59 (20°C) [CIR].	Miscível em água, metanol e acetona. Solubilidade a 25°C em benzeno, 4.2%; em éter, 1.6%; em n-heptano, <0.1% [The Merck Index, 2006].
Soy isoflavones	C ₁₅ H ₁₀ O ₅ (genisteína) / C ₁₅ H ₁₀ O ₄ (daidzeína)	270.2 g/mol (Genisteína) e 254.2 g/mol (Daidzeína) [International Journal of Pharmaceutics 364: 36-44, 2008].	Pó bege de odor fraco [Literatura do fabricante].	-	Solúvel em solventes orgânicos e pouco solúvel em água, de acordo com experimentos realizados.
Cetearyl Alcohol	C ₁₈ H ₃₈ O (stearyl alcohol: 50-70%) e C ₁₆ H ₃₄ O (cetyl alcohol: 20-35%)	-	Sólido branco ceroso, geralmente em forma de flocos [CIR].	-	Solúvel em etanol (95%), éter e óleo, praticamente insolúvel em água [Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2003].
Ceteth-20 Phosphate	-	-	-	-	-
Dicetyl Phosphate	C ₃₂ H ₆₇ O ₄ P	546.8 g/mol	Flocos sólidos de cor branca. [CIR]	14.95± 0.58 (calculado) [CIR]	-

DADOS REGULATÓRIOS				
nomenclatura INCI	ANVISA (Brasil)	GRAS (EUA)	CIR (EUA)	CE
Caprylyl Glycol	Sem restrições.	Não listado.	Seguro se usado até 5%.	Não listado.
Phenoxyethanol	Está presente na lista positiva de conservantes, sendo permitido até 1% no produto acabado.	Não listado.	Seguro se usado até 1%.	Listado no anexo V do regulamento europeu sendo permitido até 1% no produto acabado.
BHT	Sem restrições.	Relatório SCOGS número 2 (Conclusão: 3).	Seguro se usado até 0.5%.	Não listado.
Alcohol	Sem restrições.	Não listado.	Não avaliado.	Não listado.
Propylene Glycol	Sem restrições.	Relatório SCOGS número 27 (Conclusão: 1 - sem riscos à população se usado nas concentrações praticadas).	Seguro se usado até 50%.	Não listado.
Triethanolamine	Restrito até 2,5% em produtos não enxaguáveis.	Não listado.	Seguro com ressalvas - seguro para ser usado em produtos enxaguáveis; seguro até 5% em produtos não enxaguáveis; não deve ser utilizado em produtos contendo agentes nitrosantes devido à probabilidade de formação de nitrosaminas.	Listado no anexo III do regulamento europeu sendo permitido até 2,5% em produtos cosméticos não enxaguáveis.
Soy isoflavones	Sem restrições.	21 CFR 182.1 Geralmente reconhecido como seguro (GRAS), para uso como ingrediente utilizado na alimentação e bebidas de adultos em níveis até 50 mg/dia.	Não avaliado.	Não listado.
Cetearyl Alcohol	Sem restrições.	Não listado.	Seguro se usado até 25%.	Não listado.
Ceteth-20 Phosphate	Sem restrições.	Não listado.	Não avaliado.	Não listado.
Dicetyl Phosphate	Sem restrições.	Não listado.	Seguro se usado até 4%.	Não listado.

DADOS TOXICOLÓGICOS				
nomenclatura INCI	Carcinogenicidade	Genotoxicidade/ Mutagenicidade	Reprotoxicidade	Irritação Ocular
Caprylyl Glycol	A aplicação dérmica de caprilil glicol puro em camundongos (estudo do tipo "lifetime") classificou este ingrediente como não carcinogênico. O propilenoglicol foi também considerado não carcinogênico em ratos (50.000 ppm na alimentação durante dois anos). [CIR].	Negativo no teste de AMES [Literatura do fabricante]; Não induziu mutações gênicas em células V79 de hamsters chineses. [CIR].	Dado de molécula similar: Um valor de NOAEL de 1000 mg/Kg para toxicidade reprodutiva foi reportado para o 1,2-butanediol em ratos por administração oral [CIR].	Não irritante a 1% e 3% em óleo neutro no teste de HET-CAM [CIR]; Minimamente irritante para os olhos quando 0,1 ml foram aplicados nos olhos de coelhos. [Literatura do fabricante]
Phenoxyethanol	Não disponível.	Sem evidências de mutagenicidade [US National Library of Medicine – CCRIS - Chemical Carcinogenesis Research Information System].	Não reprotóxico [US National Library of Medicine – Developmental and Reproductive Toxicology Database (DART)].	Severamente irritante para os olhos [US National Library of Medicine – HSDB database].
BHT	Não apresenta evidências de atividades carcinogênicas, porém pode aumentar ou inibir a atividade de outras substâncias carcinogênicas. [Environ Mutagen 5: 353-362, 1983.]; Efeitos carcinogênicos foram observados em um estudo prolongado com ratos provavelmente causados devido a condições específicas do estudo. No entanto, não se pode descartar totalmente o fato de que efeitos hepatotóxicos causados por doses crônicas e elevadas de BHT possam resultar em proliferação celular persistente. Pode-se considerar uma dose máxima de 100 mg/kg bw/day. Nesta dose, não se observa aumento na incidência de carcinoma no fígado, mas sim um pequeno aumento em adenoma de fígado foi observado após exposição crônica iniciando no útero [OECD – Screening information Data Sets (SIDS)].	Mutagênico [Environ Mutagen 5: 353-362, 1983.]; Mutagênico em células somáticas de mamíferos, em bactérias e em leveduras [Literatura do fabricante]; BHT não apresentou potencial para causar mutações em testes <i>in vivo</i> . De maneira geral, os dados disponíveis demonstram que o BHT não apresenta clastogenicidade <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . [OECD – Screening information Data Sets (SIDS)].	BHT não é considerado tóxico à reprodução ou ao desenvolvimento em animais [CIR]; Durante a gestação, o BHT teve efeitos em camundongos em doses orais acima de 240 mg/kg bw/day. O valor de NOEL para toxicidade ao desenvolvimento foi de 800 mg/kg bw day [OECD – Screening information Data Sets (SIDS)].	Moderadamente irritante em coelhos [MSDS do fabricante]; Pode ser irritante para os olhos mediante superexposição [The Merck Index, 2006].

DADOS TOXICOLÓGICOS				
nomenclatura INCI	Carcinogenicidade	Genotoxicidade/ Mutagenicidade	Reprotoxicidade	Irritação Ocular
Alcohol	Overall Carcinogenic Evaluation: Group 1; TWA (1000 ppm); Not classifiable as a human carcinogen; TWA 1000 ppm (1900 mg/m3) [US National Library of Medicine - ChemID database].	As evidências apontam o etanol como não genotóxico. Diversos resultados negativos em testes de mutação em bactérias são bastante relevantes. Foi verificado leve efeito mutagênico em ensaio de mutação em células de mamíferos, apenas em concentrações muito elevadas de etanol. Ensaios <i>in vivo</i> de aberração cromossômica em ratos e em hamsters chineses apresentaram resultados negativos. Existem apenas poucas evidências que sugerem que o etanol seja genotóxico em células somáticas e este parece ter uma capacidade muito limitada de induzir alterações genéticas <i>in vivo</i> , e apenas sob condições muito específicas e em doses muito elevadas, possíveis em humanos somente mediante ingestão oral. [OECD – Screening information Data Sets (SIDS)].	Sintomas possíveis mediante super exposição: efeitos reprodutivos e teratogênicos [The Merck Index, 2006]; O menor valor de NOAEL reportado para fertilidade por via oral foi de 2000 mg/kg bw em ratos. Valor equivalente a uma concentração de 1320 mg/L de álcool no sangue [OECD – Screening information Data Sets (SIDS)].	Superexposição pode causar irritação ocular. [The Merck Index, 2006].

DADOS TOXICOLÓGICOS				
nomenclatura INCI	Carcinogenicidade	Genotoxicidade/ Mutagenicidade	Reprotoxicidade	Irritação Ocular
Propylene Glycol	Não foram encontrados aumentos nos tumores em todos os tecidos avaliados quando propilenoglicol foi administrado na dieta de ratos durante dois anos (2,5 g/kg bw/day), ou aplicado sobre a pele de ratos fêmeas por um período de 14 meses (100% PG; dose total não reportada) ou camundongos (dose estimada em aproximadamente 2 g/kg bw/week; estudo do tipo "lifetime") [US National Library of Medicine – HSDB database]; O propilenoglicol não foi carcinogênico em um estudo crônico de 2 anos, no qual ratos foram alimentados com 50.000 ppm na dieta. Aplicação dérmica de propilenoglicol puro em camundongos em um estudo do tipo "lifetime" não produziu efeitos carcinogênicos significativos. Propilenoglicol não foi carcinogênico em outros estudos orais, dérmicos e sub-cutâneos. [CIR].	Em estudos com animais não existem evidências de que o propilenoglicol seja teratogênico ou mutagênico [Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2003]; Negativo em teste de AMES [CIR; US National Library of Medicine – CCRIS - Chemical Carcinogenesis Research Information System]; Não foram observados aumentos nas aberrações cromossômicas quando linfócitos humanos foram expostos a concentrações variando entre 6,25 e 50 mM, com ou sem sistema de ativação metabólica. [US National Library of Medicine – HSDB database].	Propilenoglicol não causou toxicidade fetal ou ao desenvolvimento em ratos, camundongos, coelhos ou hamsters (NOAELs variando de 1200 a 1600 mg/kg bw/day em quatro espécies), e efeitos reprotóxicos não foram encontrados quando este ingrediente foi administrado na água a até 5% para camundongos [US National Library of Medicine – HSDB database].	Propilenoglicol não causou danos oculares em seres humanos, e isso não seria esperado, porém pode causar coceira e lacrimação transitórias. Irritação suave com hiperemia foi observada após exposição ocular [US National Library of Medicine – HSDB database]; Leve irritante ocular (propilenoglicol puro) [CIR].

DADOS TOXICOLÓGICOS				
nomenclatura INCI	Carcinogenicidade	Genotoxicidade/ Mutagenicidade	Reprotoxicidade	Irritação Ocular
Triethanolamine	Em estudos de carcinogenicidade dérmica com duração de 2 anos (doses de 100-1000 e de 200-2000 mg/kg/day de trietanolamina para camundongos machos e fêmeas, respectivamente, e doses de 32-125 e de 63-250 mg/kg/day de trietanolamina para ratos machos e fêmeas, respectivamente), conclui-se que a trietanolamina produziu evidências equivocadas de atividade carcinogênica em camundongos machos com base na ocorrência de hemangiosarcoma de fígado, produziu alguma evidência de atividade carcinogênica em camundongos fêmeas com base no aumento da incidência de adenoma hepatocelular, produziu evidência equivocada de atividade carcinogênica em ratos machos com base em um leve aumento na incidência de adenoma renal, e não produziu evidência de atividade carcinogênica em ratos fêmeas. Em estudos de carcinogenicidade oral em camundongos e ratos (1 ou 2% em água, 82 semanas ou 2 anos), a trietanolamina foi considerada não carcinogênica em ambos [CIR].	Não mutagênico; negativo em teste de Ames com ou sem ativação metabólica e negativo em teste de aberração cromossômica, dentre outros testes. A Trietanolamina com nitrato de sódio, mas não pura, foi mutagênica em <i>Bacillus subtilis</i> sem ativação metabólica [CIR].	Não reprotóxico em estudos dérmicos com ratos e camundongos que foram expostos a 0,5 e 2,0 g/kg de trietanolamina, respectivamente, em acetona, antes do acasalamento até o período de lactação ou em um estudo de teratogenicidade oral em camundongos com 1125 mg/kg/day de trietanolamina nos dias 6-15 da gestação [CIR].	Irritante severo (20mg, coelhos) [RTECS]; Pode ser irritante para os olhos e membranas mucosas [Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2003]; Altas concentrações durante exposição prolongada, trietanolamina pode ser irritante para os olhos de coelhos. Essencialmente não irritante quando aplicada em solução aquosa a 10%, em olhos de coelhos com e sem enxágue [CIR].

DADOS TOXICOLÓGICOS				
nomenclatura INCI	Carcinogenicidade	Genotoxicidade/ Mutagenicidade	Reprotoxicidade	Irritação Ocular
Soy isoflavones	Tratamento crônico com genisteína indicou que esta isoflavona não é carcinogênica.[International Journal of Pharmaceutics 364: 36-44, 2008]. Não listada pelo IARC.	Não mutagênica em teste de Ames e em teste de mutação reversa em E. coli [Safety Assessment for Human Health of Laboratoires Sérobiologiques S.A. - code: CRT - RA 0101177-0 Vegeseryl HGP8572B]. Resultado positivo em teste de Ames. [National Toxicology Program-NTP-CERHE-Genistein, 2006].	Este extrato possui isoflavonas que apresentam fraca ação estrogênica devido a sua ligação com receptores estrógenos. Existem resultados contraditórios sobre a reprotoxicidade deste extrato. De maneira geral, há alguns indicativos de que fitoestrógenos podem alterar hormônios reprodutivos, espermatogênese e fertilidade. No entanto, há uma escassez de estudos em humanos e inúmeros relatos não revelaram quaisquer efeitos sobre a fisiologia reprodutiva masculina. Existem diversos estudos nos quais animais foram alimentados com proteína de soja para avaliação de efeitos reprotóxicos, sendo resultados negativos e positivos encontrados. [US National Library of Medicine – Developmental and Reproductive Toxicology Database (DART)].	Não irritante quando uma solução a 25% foi instilada diretamente nos olhos de coelhos. [Safety Assessment for Human Health of Laboratoires Sérobiologiques S.A. - code: CRT - RA 0101177-0 Vegeseryl HGP8572B].

DADOS TOXICOLÓGICOS				
nomenclatura INCI	Carcinogenicidade	Genotoxicidade/ Mutagenicidade	Reprotoxicidade	Irritação Ocular
Cetearyl Alcohol	Álcool cetílico e estearílico não possuem potencial de induzir tumores locais de pele mediante aplicação dérmica repetida (substância controle em estudos de pinturas corporais ou em experimentos em camundongos que foram iniciados ou co-expostos com carcinogênicos) [Ecotox Environ Safe 72: 1016–1030, 2009].	Álcool cetílico foi classificado como não mutagênico em teste de Ames [CIR]; Álcool estearílico foi classificado como não mutagênico em teste de micronucleus <i>in vivo</i> . [Ecotox Environ Safe 72: 1016–1030, 2009.].	A fertilidade e o desenvolvimento do feto não foram afetados pelo Álcool Estearílico (ratos, machos e fêmeas, administração oral, concentrações até 2000 mg/kg day). Ausência de potencial reprotóxico para a categoria dos álcoois de cadeia longa [Ecotox Environ Safe 72: 1016–1030, 2009.].	Não irritante em coelhos (0.1 mL de um creme contendo 3.0% da substância) [CIR].

DADOS TOXICOLÓGICOS				
nomenclatura INCI	Carcinogenicidade	Genotoxicidade/ Mutagenicidade	Reprotoxicidade	Irritação Ocular
Ceteth-20 Phosphate	Não disponível.	A agência de proteção ao meio ambiente dos Estados Unidos (EPA, <i>Environmental Protection Agency</i>), utilizou uma base de dados de relação estrutura-atividade (QSAR) chamada DEREK11, para determinar se existem alertas estruturais que sugerissem carcinogenicidade para alquil álcoois alcoxilados inertes. Não foram encontrados quaisquer alertas para carcinogenicidade e portanto para este grupo de compostos não existem preocupações relacionadas a este tipo de perigo. [USA. 75 FR 51382 2010-20708. Alkyl Alcohol Alkoxyate Phosphate Derivatives; Exemption from the Requirement of a Tolerance, 2010]; Não listado pelo IARC.	Dois estudos de reprotoxicidade em animais realizados com fosfatos de alquil álcoois alcoxilados foram realizados e não apontaram para efeitos tóxicos relacionados à reprodução. [USA. 75 FR 51382 2010-20708. Alkyl Alcohol Alkoxyate Phosphate Derivatives; Exemption from the Requirement of a Tolerance, 2010].	Os materiais concentrados são geralmente moderados a severos irritantes oculares [USA. 75 FR 51382 2010-20708. Alkyl Alcohol Alkoxyate Phosphate Derivatives; Exemption from the Requirement of a Tolerance, 2010].

DADOS TOXICOLÓGICOS				
nomenclatura INCI	Carcinogenicidade	Genotoxicidade/ Mutagenicidade	Reprotoxicidade	Irritação Ocular
Dicetyl Phosphate	Não disponível.	Testes in vitro de genotoxicidade foram conduzidos em diversos alquil fosfatos e os resultados foram todos negativos. Fosfato de cetila foi classificado como não genotóxico em teste de mutação gênica em células de mamíferos, alquil fosfato C20-22 foi considerado como não mutagênico em teste de Ames, teste de mutação gênica em células de mamíferos e em teste de aberração cromossômica. (Substância Análoga) [CIR].	Não foram encontrados dados específicos para este ingrediente, no entanto alquil fosfatos similares não são considerados tóxicos ao desenvolvimento ou à reprodução. [CIR].	Levemente irritante aos olhos de coelhos. [CIR]

DADOS TOXICOLÓGICOS						
nomenclatura INCI	Irritação dérmica	Sensibilização	Fototoxicidade	Toxicidade aguda	NO(A)EL	Metabolismo e absorção
Caprylyl Glycol	Não irritante para a pele de coelhos (0,5 mL aplicados sobre a pele de coelhos com oclusão por 24h) [Literatura do fabricante]; Não irritante em diversos patch tests em seres humanos em concentrações até 10% em 1,2-hexanediol [CIR].	Visando avaliar o potencial de causar reações tardias de hipersensibilidade, 200 voluntários humanos foram submetidos a 15% de uma mistura 1:1 (v/v) de 1,2-hexanediol e caprylyl glycol em sistema oclusivo (patch test). Esta mistura foi aplicada em um gel de carbômero e em uma formulação cosmética. Não foram observadas reações tardias de hipersensibilidade [US National Library of Medicine - Toxline database]; Não sensibilizante a concentrações de até 50% em teste maximizado utilizando porquinhos da índia (protocolo 406 da OECD) [CIR].	Não produziu resposta fotoalérgica em um foto patch teste [CIR].	LD50 (oral, ratos fêmeas): 2200 mg/Kg; LD50 (oral, ratos machos): 2240 mg/Kg;	300 mg/Kg bw/d	A aplicação de 5% de caprilil glicol (etanol/propilenoglicol 70:30 (v/v)) sobre a pele de porcos <i>in vitro</i> , demonstrou que aproximadamente 97% foi absorvido pela derme em 24 h após a aplicação. Dados de outros glicóis e de propilenoglicol podem ser extrapolados para este ingrediente [CIR].

DADOS TOXICOLÓGICOS						
nomenclatura INCI	Irritação dérmica	Sensibilização	Fototoxicidade	Toxicidade aguda	NO(A)EL	Metabolismo e absorção
Phenoxyethanol	Causa leve irritação a pele de coelhos. Pode ser absorvido pela pele. [Merck KGaA. ChemDat – The Merck Chemical database. CDROM. 2007]; Um estudo crônico indica que exposição dérmica por 90 dias até 500 mg/kg bw/day não produz nenhum efeito, apenas eritemas. [OECD – Screening information Data Sets (SIDS)].	Não sensibilizante [US National Library of Medicine – Developmental and Reproductive Toxicology Database (DART)] e [Merck KGaA. ChemDat – The Merck Chemical database. CDROM. 2007].	Não fototóxico [US National Library of Medicine – Developmental and Reproductive Toxicology Database (DART)].	LD50 (dérmico, coelhos): > 2218 mg/kg; LD50: 1260 mg/kg (Oral) [US National Library of Medicine – HSDB database];	500 mg/kg bw/ day	Uma vez hidrolizado, o 2-fenoxietanol é rapidamente absorvido e oxidado a ácido fenoxiacético. [US National Library of Medicine – HSDB database].

DADOS TOXICOLÓGICOS						
nomencatura INCI	Irritação dérmica	Sensibilização	Fototoxicidade	Toxicidade aguda	NO(A)EL	Metabolismo e absorção
BHT	Irritante moderado para a pele de coelhos e humanos [MSDS do fabricante]; Superexposição pode irritar a pele [The Merck Index, 2006].	Não apresenta potencial sensibilizante [MSDS do fabricante]; Trata-se de um ingrediente que vem sendo utilizado há muitos anos em diversos produtos com pouquíssimos casos de reações alérgicas em humanos mediante exposição dérmica ou ingestão [OECD – Screening information Data Sets (SIDS)].	Não disponível.	LD50 (oral, camundongos): 1040 mg/kg [The Merck Index, 2006]; LD50 (oral, ratos): 650 mg/kg. [MSDS do fabricante];	25 mg/kg bw/day	A aplicação dérmica de BHT resulta em alguma absorção através da pele, mas este ingrediente parece ficar sobre a pele ou permar lentamente, e aplicação tópica ao BHT e seus metabólitos não produz efeitos tóxicos ou sistêmicos similares aos que foram observados em estudos orais. Estudo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> mostraram que menos de 4% de NHT permeia a pele. [CIR].
Alcohol	Formulações contendo mais de 50% v/v pode causar irritação cutânea [Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2003]; Superexposição pode causar irritação cutânea [The Merck Index, 2006].	Não disponível.	Não disponível.	LD50 (oral, ratos): 10.6 g/kg. LD50 (oral, ratos): 7.06 g/kg. [The Merck Index, 2006];	2000 mg/kg bw/day	O etanol não se acumula no organismo e a sua permeação sobre a pele é muito baixa. [OECD – Screening information Data Sets (SIDS)].

DADOS TOXICOLÓGICOS						
nomenclatura INCI	Irritação dérmica	Sensibilização	Fototoxicidade	Toxicidade aguda	NO(A)EL	Metabolismo e absorção
Propylene Glycol	Em produtos para uso tópico, propilenoglicol é considerado como minimamente irritante, apesar deste ser mais irritante do que a glicerina. Irritação local ocorre mediante aplicação em membranas mucosas ou quando o propilenoglicol é usado sob condições de oclusão. [Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2003]; Em patch test de 48 hs foi considerado não irritante para a pele de humanos (15 uL; puro) [US National Library of Medicine – HSDB database]; Em um estudo utilizando camundongos, 50% de propilenoglicol pode ter causado irritação dérmica, enquanto em um outro estudo, este ingrediente puro foi classificado como minimamente irritante em camundongos. Propilenoglicol puro foi	Não sensibilizante após aplicação cutânea oclusiva e semi oclusiva. Um creme contendo 12% de propilenoglicol foi considerado como não sensibilizante quando testado em 204 voluntários humanos. Em um estudo com animais não foram observadas reações em porquinhos da índia expostos a soluções de até 70% de propilenoglicol [US National Library of Medicine – HSDB database]; Propilenoglicol foi negativo em diversos testes de alergenidade utilizando porquinhos da índia. Testes em uso com desodorantes contendo de 35 a 73% de propilenoglicol não apontaram potencial de causar irritação ou sensibilização. [CIR].	Propilenoglicol não produziu resposta fotoalérgica em um foto patch teste [CIR].	O propilenoglicol é usado em uma grande variedade de formulações farmacêuticas e é geralmente considerado como um material não tóxico. LD50 (oral, ratos): 22.0 g/Kg. [Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2003]; LD50 (dérmico, coelhos): 20800 mg/kg. LD50 (oral, ratos): 20 g/kg. [US National Library of Medicine - ChemID database]; Não foram observadas evidências de toxicidade sistêmica em estudos sobre a pele intacta de animais com polietilenoglicóis (PEG's) e seus derivados. Diversos estudos de exposição crônica a diferentes PEG's	2000 mg/kg bw/day	Provavelmente devido a seu metabolismo e excreção, o propilenoglicol é menos tóxico do que outros glicóis. Ele é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e existem evidências de que é rapidamente absorvido se aplicado sobre a pele danificada [Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2003].

DADOS TOXICOLÓGICOS						
nomenclatura INCI	Irritação dérmica	Sensibilização	Fototoxicidade	Toxicidade aguda	NO(A)EL	Metabolismo e absorção
Triethanolamine	Doses de 0,14 g/Kg aplicadas sobre a pele de camundongos (5 dias por semana durante 13 semanas) causou leve hiperplasia epidermal (evidência de irritação leve). Considerado como suave à moderadamente irritante quando aplicado puro sobre a pele de coelhos (intactas ou escarificadas) e irritante para a pele humana (irritante a 100% na pele intacta e fortemente irritante para a pele escarificada a 10% em etanol). Irritante para 106 voluntários humanos em um patch test envolvendo 737 pessoas [CIR].	Não sensibilizante quando aplicado puro semanalmente em porquinhos da índia, durante 3 semanas, com reaplicações após 14 ou 21 dias com patches oclusivos contendo 90% de trietanolamina. Em humanos, os dados são contraditórios: em patch testes cumulativos conduzidos ao longo de vários anos, a trietanolamina a 2% (solução aquosa), 5% (veículo não especificado), ou 5% em petrolatum, apresentou reações positivas para dermatite de contato em 23/500, 9/479, e 2/100 voluntários, sendo classificada como sensibilizante. A maioria das formulações contendo de 0,83 a 4,2%, de trietanolamina, foram consideradas não sensibilizantes, e ainda uma formulação contendo 20% deste ingrediente, quando testada em 26 voluntários, foi também considerada não sensibilizante [CIR]; Pode causar hipersensibilidade [Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2003].	Não fototóxico em estudos clínicos com algumas formulações contendo de 0,45% a 4,2% de trietanolamina e com uma formulação contendo 20% deste ingrediente. No entanto, em um dos estudos envolvendo uma formulação com 4,2% de trietanolamina, a mesma foi levemente fototóxica ou houve aumento da resposta irritante por ação da radiação UV. [CIR].	LD50 (oral, porquinhos da índia): 5.3 g/kg. LD50 (oral, ratos): 8.0 g/kg. [Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2003]; LD50 (oral, coelhos) > 2200 mg/Kg. LD50 (dérmico, coelhos) > 16 mL/Kg. [RTECS]; Não foi observada toxicidade quando 1 mg/kg de uma formulação de tintura capilar contendo trietanolamina a 1,5% foi aplicada no dorso de coelhos por uma hora, 2 vezes por semana, durante 13 semanas [CIR]; Quando aplicado sobre a pele intacta, diluído em acetona, é rapidamente absorvido, sem efeitos sistêmicos.	349 mg/Kg bw/d	<i>In vitro</i> , a absorção da trietanolamina através da pele humana foi baixa, em condições que simulam o uso cosmético (em uma formulação contendo de 1 a 5%, pH 7,0, aproximadamente 5,5 a 9,5% foi recuperado na pele após 24 ou 72 h, porém, apenas 0,5% foi recuperado no fluido receptor. Em camundongos, trietanolamina em acetona é rapidamente absorvida e esta absorção aumenta com o aumento da dose. [CIR].

DADOS TOXICOLÓGICOS						
nomenclatura INCI	Irritação dérmica	Sensibilização	Fototoxicidade	Toxicidade aguda	NO(A)EL	Metabolismo e absorção
Soy isoflavones	<p>Não irritante para a pele de coelhos intacta e escarificada (25% do ingrediente, ocluído durante 24h). Praticamente não foram observadas irritações dérmicas em uma pesquisa dermatológica envolvendo 50 voluntários humanos (aplicação em sistema oclusivo, diluído a 25%, com duração de 24h) [Safety Assessment for Human Health of Laboratoires Sérobiologiques S.A. - code: CRT - RA 0101177-0 Vegeseryl HGP8572B.]; As isoflavonas demonstraram irritação dérmica negligenciável após aplicação tópica de 0,6 ml em ratos, indicando segurança para uso dérmico [International Journal of Pharmaceutics 364: 36-44, 2008].</p>	<p>Classificada como não sensibilizante em patch teste envolvendo voluntários humanos (sistema oclusivo, 50 voluntários, 25% em água) e a matéria-prima também não foi sensibilizante em porquinhos da Índia após aplicação subcutânea a 25% em solução aquosa [18]; Porquinhos da Índia foram sensibilizados a proteína de soja após serem alimentados com grãos de soja [US National Library of Medicine - Toxline database].</p>	<p>A genisteína previne os danos causados pelo psoraleno sob efeito da radiação UV (fotodanos e fotocarcinogenicidade) quando aplicada topicamente (0,5-2 nmol/cm²) na pele de camundongos sem a ocorrência de efeitos adversos [Carcinogenesis 23 (2): 317-321, 2002]; Estudo crônico da exposição à UVB em ratos com genisteína durante 20 semanas demonstrou que esta isoflavona bloqueia danos cutâneos, sugerindo efeito protetor contra cânceres de pele induzidos por UV e contra o fotoenvelhecimento. [Cosmetic Dermatology 14 (2): 13-19, 2001]; Estudo clínico confirmou que a genisteína (0,05-5 umol, 40 mJ/cm²) inibiu eritemas</p>	<p>LD50 (oral, ratos): > 2000 mg/Kg. As isoflavonas são consumidas como parte da alimentação diária em quantidades muito maiores do que as que são esperadas no uso cosmético. [Safety Assessment for Human Health of Laboratoires Sérobiologiques S.A. - code: CRT - RA 0101177-0 Vegeseryl HGP8572B]; LD50 (oral, ratos): > 3g/Kg [MSDS do fabricante].</p>	<p>200 mg/kg bw/day</p>	<p>Estudos <i>in vitro</i> mostraram que as isoflavonas (daidzeína e genisteína em óleo de oliva) penetram a pele e alcançam a circulação sistêmica após aplicação transdérmica. [Die Pharmazie 56 (9): 711-717, 2001]; A genisteína (55%) apresentou maior absorção dérmica do que a daidzeína (43%) [International Journal of Pharmaceutics 364: 36-44, 2008].</p>

DADOS TOXICOLÓGICOS						
nomenclatura INCI	Irritação dérmica	Sensibilização	Fototoxicidade	Toxicidade aguda	NO(A)EL	Metabolismo e absorção
Cetearyl Alcohol	Um creme contendo 3.0% de álcool cetearílico testado em coelhos em sistema oclusivo, foi classificado como suavemente irritante para a pele [CIR].	Um creme contendo 3.0% de álcool cetearílico não produziu reações de sensibilização (25 voluntários, 0,3 g aplicados no antebraço com patch oclusivo) [CIR]; Reações de sensibilização foram reportadas [Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2003]; Patch testes com pacientes com dermatite de contato demonstraram que diversos álcoois alifáticos de cadeia longa foram causadores de alergias de contato, mas existe evidências que sugerem que alguns dos voluntários reativos eram atópicos [Ecotox Environ Safe 72: 1016–1030, 2009].	Não disponível.	LD50 (dérmico, ratos): > 2000 mg/kg (álcoois alifáticos de cadeia longa). NOAEL (álcool estearílico): > 2000 mg/kg bw/day e NOAEL (álcool cetílico): 1000 mg/kg bw/day. Poucos ou nenhum sinal de toxicidade foram reportados após administração oral de álcoois alifáticos entre C6 e C22. Animais que sobreviveram a altas doses de administração oral não apresentaram quaisquer sinais de efeitos tardios ou irreversíveis. [CIR]	1000 mg/kg bw/day.	Vários estudos indicam que álcoois alifáticos de cadeia longa são oxidados aos seus correspondentes ácidos graxos em tecidos de mamíferos [CIR].

DADOS TOXICOLÓGICOS						
nomenclatura INCI	Irritação dérmica	Sensibilização	Fototoxicidade	Toxicidade aguda	NO(A)EL	Metabolismo e absorção
Ceteth-20 Phosphate	Os fosfatos de alquil álcoois alcoxilados não são tóxicos agudos pela via dérmica nas condições normais de uso, no entanto, os materiais concentrados são geralmente irritantes moderados a severos para a pele. [USA. 75 FR 51382 2010-20708. Alkyl Alcohol Alkoxylate Phosphate Derivatives; Exemption from the Requirement of a Tolerance, 2010].	Os materiais concentrados podem causar sensibilização cutânea [USA. 75 FR 51382 2010-20708. Alkyl Alcohol Alkoxylate Phosphate Derivatives; Exemption from the Requirement of a Tolerance, 2010].	Não disponível.	Os fosfatos de alquil álcoois alcoxilados não são tóxicos pelas vias oral e dérmica nas condições normais de uso. Em exposições sub-crônicas em ratos, irritação gastrointestinal foi observada, mas não foram encontradas toxicidades ou neurotoxicidades em órgãos específicos. Não foram observados efeitos neurotóxicos em uma bateria observacional [USA. 75 FR 51382 2010-20708. Alkyl Alcohol Alkoxylate Phosphate Derivatives; Exemption from the Requirement of a Tolerance, 2010].	200 mg/kg bw/day	Não disponível.

DADOS TOXICOLÓGICOS						
nomenclatura INCI	Irritação dérmica	Sensibilização	Fototoxicidade	Toxicidade aguda	NO(A)EL	Metabolismo e absorção
Dicetyl Phosphate	Não irritante para a pele de ratos a 80%; não irritante para coelhos a 46,5% em óleo de oliva (p/p). [CIR]	Não sensibilizante em teste em animal (Teste de maximização em porquinhos da Índia) e em estudo com humanos (patch teste) [CIR].	Não disponível.	O LD50 dérmico em ratos é >2000 mg/kg para 45% e 80% de dicetyl fosfato. Em ratos a LD 50 oral de uma suspensão de 25% foi > 5000 mg/kg. [CIR] Os alquil fosfatos são relativamente não tóxicos em estudos de dose única. [CIR]	Não disponível.	Não disponível.

CONCLUSÃO	
nomenclatura INCI	Parecer de Segurança
Caprylyl Glycol	Não existem evidências na literatura sobre esta substância que sugiram a possibilidade de riscos ao ser humano, uma vez que a mesma seja utilizada nas concentrações atualmente praticadas.
Phenoxyethanol	Não existem evidências na literatura sobre esta substância que sugiram a possibilidade de riscos ao ser humano, uma vez que a mesma seja utilizada nas concentrações atualmente praticadas. O valor de NOAEL para administração oral é de 80 mg/kg bw/day. Mediante aplicação dérmica, até 500 mg/kg bw/day durante 90 dias, apenas leves eritemas são observados, e este valor é assumido como o NOAEL para este ingrediente. Está listado no anexo V do regulamento europeu (EC 1223/2009), sendo permitido até 1% em produtos cosméticos.
BHT	Este ingrediente é considerado mutagênico, porém não classificável como carcinogênico para humanos (Grupo 3 - IARC). Não existem evidências na literatura sobre esta substância que sugiram a possibilidade de riscos ao ser humano, uma vez que a mesma seja utilizada até SED: 0,25 mg/kg bw/day, baseado no valor de NOAEL para exposição oral crônica (25 mg/kg bw/day).
Alcohol	Não existem evidências na literatura sobre esta substância que sugiram a possibilidade de riscos ao ser humano, uma vez que a mesma seja utilizada nas concentrações atualmente praticadas.
Propylene Glycol	Não existem evidências na literatura sobre esta substância que sugiram a possibilidade de riscos ao ser humano, uma vez que a mesma seja utilizada nas concentrações atualmente praticadas. É considerado seguro se usado até 50% pelo CIR.
Triethanolamine	A trietanolamina tem baixa toxicidade, mas pode irritar a pele, e em alguns casos, causar sensibilização. A exposição crônica dérmica apresenta um valor de NOAEL de 349 mg/Kg bw/day. É considerada segura pelo CIR até 5% e pelo regulamento europeu até 2,5%, ambos em produtos não enxaguáveis. Este ingrediente não deve ser utilizado em produtos contendo sistemas nitrosantes, devido à possibilidade de formação de nitrosaminas, de acordo com CIR e regulamento europeu.
Soy isoflavones	Os principais compenetes deste extrato são a genisteína e a daidzeína, isoflavonas comumente encontradas nos grãos de soja e alguns outros vegetais, e amplamente consumidas mundialmente na alimentação. Apesar de serem citadas como fitoestrógenos atuarem como disruptores endócrinos, possuem uma série de ações benéficas, tanto por via oral quando por via dérmica. Até o momento não existem dados que evidenciem claras preocupações no uso de extratos de soja em geral no mercado cosmético.
Cetearyl Alcohol	Não existem evidências na literatura sobre esta substância que sugiram a possibilidade de riscos ao ser humano, uma vez que a mesma seja utilizada nas concentrações atualmente praticadas.

CONCLUSÃO	
nomenclatura INCI	Parecer de Segurança
Ceteth-20 Phosphate	Este ingrediente não é considerado carcinogênico e nem tóxico por exposição aguda ou crônica. Os fosfatos de alquil álcoois alcoxilados diluídos não são irritantes ou sensibilizantes, mas puros podem ter tais efeitos. Este tipo de ingrediente pode conter dioxana e óxido de etileno, e portanto estes contaminantes devem ser controlados na matéria-prima para garantir sua segurança no uso. De maneira geral, não existem evidências na literatura sobre esta substância que sugiram a possibilidade de riscos ao ser humano, uma vez que a mesma seja utilizada nas concentrações atualmente praticadas.
Dicetyl Phosphate	O dicetil fosfato é uma mistura complexa de diésteres de álcool cetílico e ácido fosfórico. Este ingrediente não é irritante ou sensibilizante para a pele, e para os olhos foi considerado como levemente irritante. Não é esperado que seja carcinogênico com base nos estudos de mutagenicidade e genotoxicidade realizados com alquil fosfatos similares. Não existem evidências na literatura sobre esta substância que sugiram a possibilidade de riscos ao ser humano, uma vez que a mesma seja utilizada nas concentrações atualmente praticadas.