

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**NANOEMULSÕES DE USO TÓPICO CONTENDO EXTRATO DE *GLYCINE*
MAX (SOJA): ESTUDOS DE PERMEAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Luísa Rodrigues Furtado

Porto Alegre, novembro de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**NANOEMULSÕES DE USO TÓPICO CONTENDO EXTRATO DE *GLYCINE
MAX* (SOJA): ESTUDOS DE PERMEAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Profº Drº Helder Ferreira Teixeira

Orientador

Mestre Marina Cardoso Nemitz

Coorientadora

Porto Alegre, novembro de 2016

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pela vida e pela oportunidade de estar realizando um sonho.

Aos meus pais, Luis Eduardo e Maria Heloísa, e irmão, Marcos, por todo o amor e por sempre acreditarem em mim e me apoiarem de todas as formas e em todos os momentos.

Ao meu noivo, Klaus, pelo incentivo e apoio nesta etapa.

Aos meus tios e tias, primos e primas por fazerem parte da minha vida.

Ao meu orientador, Profº Drº Helder Ferreira Teixeira, e a minha co-orientadora, Doutoranda Marina Cardoso Nemitz pelos ensinamentos, tempo, dedicação e contribuições durante a elaboração deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento Galênico que me acolheram e auxiliaram sempre que necessário com alegria e disposição.

Aos professores e colegas do curso de graduação pelo conhecimento compartilhado durante esses anos.

Aos meus amigos e todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

RESUMO

Isoflavonas são compostos fenólicos que apresentam propriedades antioxidantes. No presente estudo foi realizada a produção de nanoemulsão contendo extrato de soja padronizado em genistina (NE_{ES}). A formulação foi avaliada quanto ao seu potencial antioxidante e capacidade de penetração cutânea, sendo conjuntamente avaliada uma nanoemulsão contendo apenas genistina (NE_{GI}). Os ensaios de permeação/retenção cutânea foram realizados em modelo *in vitro* utilizando pele de orelha suína. Marcadores de dano oxidativo, tais como proteínas carboniladas, tióis totais e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foram avaliados após tratamento da pele suína com as formulações e exposição à radiação UVA/UVB. Ambas as nanoemulsões aumentaram a retenção cutânea de genistina quando comparadas com uma suspensão em propilenoglicol, evidenciando o efeito promotor de penetração dos nanocarreadores utilizados. No entanto, comparando-se as diferentes formulações, a genistina mostrou ser mais facilmente liberada e com maior capacidade de retenção cutânea a partir da NE_{ES}, demonstrando que os demais componentes do extrato influenciam positivamente o comportamento desta isoflavona frente a tais parâmetros. Por fim, destaca-se que a maior capacidade de fotoproteção cutânea ocorreu durante o tratamento com NE_{ES}. Sendo assim, o conjunto de resultados sinaliza que nanoemulsões contendo extrato de soja podem ser consideradas promissores produtos antioxidantes para aplicação dermatológica.

Palavras-chave: extrato de soja, genistina, nanoemulsão, atividade antioxidante, permeação/retenção cutânea.

SUMÁRIO

CAPA DO ARTIGO	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO	10
PARTE EXPERIMENTAL	12
Produtos Químicos e Reagentes	12
Preparo do extrato de soja	12
Método cromatográfico para análise da genistina	12
<i>Método de CLUE</i>	13
Validação do método para análise de genistina	13
<i>Especificidade</i>	13
<i>Linearidade</i>	14
<i>Precisão e exatidão</i>	14
Preparo das nanoemulsões	14
Caracterização das Formulações	15
<i>Determinação do pH</i>	15
<i>Determinação do tamanho e índice de polidispersão</i>	15
<i>Determinação do potencial zeta</i>	16
<i>Determinação do teor de genistina</i>	16
Estudos de liberação	16
Estudos de retenção/permeação cutânea	16
Atividade Antioxidante das formulações	17
Capacidade fotoprotetora das formulações	18
<i>Tratamentos e exposição da pele frente a radiações UVA/UVB</i>	18
<i>Quantificação de Proteínas Totais</i>	19

<i>Ensaio para determinação de proteínas carboniladas</i>	19
<i>Ensaio para determinação de tiois totais</i>	19
<i>Ensaio para determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico</i>	19
Estabilidade da genistina frente à radiação	20
Análise estatística	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
Obtenção do extrato de soja	20
Método cromatográfico para determinação de genistina	21
Nanoemulsões contendo extrato de soja	23
Estudos de liberação	24
Estudos de retenção/permeação cutânea	25
Atividade Antioxidante das formulações	27
CONCLUSÃO	33
AGRADECIMENTOS	33
REFERÊNCIAS	33

Este trabalho foi elaborado sob forma de artigo a ser submetido a Revista Química Nova. As normas e instruções aos autores encontram-se em anexo.

NANOEMULSÕES DE USO TÓPICO CONTENDO EXTRATO DE *GLYCINE* MAX: ESTUDOS DE PERMEACÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Luísa Rodrigues Furtado^a, Patricia Inês Back^a, Marina Cardoso Nemitz^a, Lucélia A. Balestrin^a, Flávia Nathiely Silveira Fachel^a, Henrique Mautone Gomes^b, José Cláudio Moreira^b, Gilsane Lino von Poser^c, Helder Ferreira Teixeira^{a,*}.

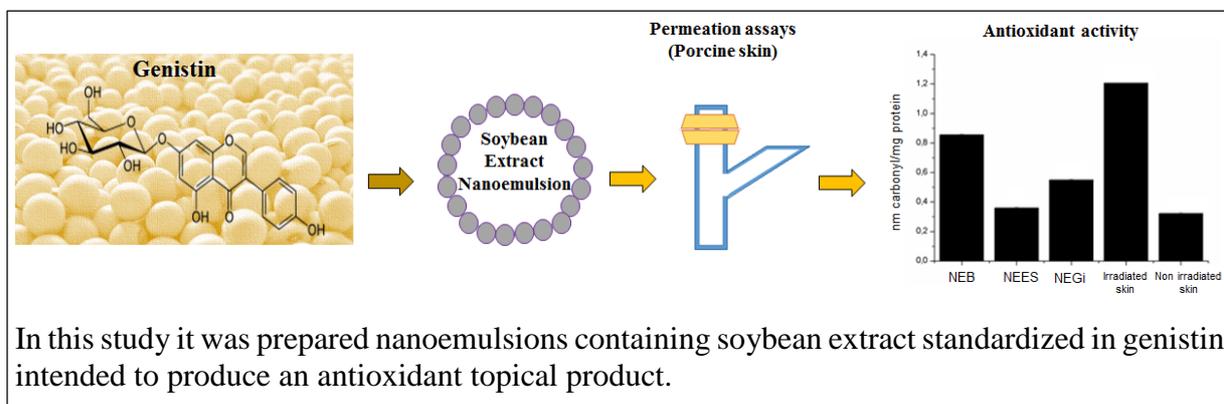
^a Departamento de Produção e Controle de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Departamento de Produção de Matéria-Prima, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

*email: helder.teixeira@ufrgs.br

Graphical abstract:



() Manuscrito com material suplementar

(x) Manuscrito sem material suplementar

TOPICAL NANOEMULSIONS CONTAINING *GLYCINE MAX* EXTRACT: PERMEATION STUDIES AND ANTIOXIDANT ACTIVITY

ABSTRACT

Isoflavones are phenolic compounds that have antioxidant activity. In the present study, it was accomplished the production of nanoemulsions containing soybean extract standardized in genistin (NE_{ES}). The antioxidant potential and skin penetration of formulation were evaluated, being also produced and analyzed nanoemulsions containing only genistin (NE_{Gi}). Permeation / retention assays were performed in an *in vitro* model using porcine ear skin. Oxidative damage markers such as carbonylated proteins, total thiols and thiobarbituric acid reactive substances were evaluated after treatment of porcine skin with the formulations and exposure to UVA / UVB radiations. Both nanoemulsions increased cutaneous retention of genistin when compared to a suspension in propylene glycol, evidencing the penetration-promoting effect of the nanocarriers. However, comparing the different formulations, genistin showed to be more easily released and with a greater skin retention capacity from NE_{ES}, demonstrating that other components present in the extract positively influence the behavior of this isoflavone against such parameters. Finally, it was found that the greater capacity of cutaneous photoprotection occurred during the treatment with NE_{ES}. Thus, the set of results indicates that nanoemulsions containing soybean extract may be considered promising antioxidant product for dermatological application.

Keywords: soybean extract, genistin, nanoemulsion, antioxidant activity, permeation/retention assays

INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e divide-se em três camadas distintas: epiderme, derme e hipoderme.¹ O envelhecimento cutâneo é um fenômeno fisiológico, progressivo e irreversível que acontece por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos. O envelhecimento intrínseco, ou cronológico, está ligado a fatores genéticos, podendo causar a diminuição da produção de elastina e de colágeno. O envelhecimento extrínseco, por sua vez, resulta de fatores ambientais como poluição, tabaco, radiações ultravioletas e produção de radicais livres, que provocam modificações deletérias em vários constituintes celulares.²

Para evitar as consequências nocivas do sol sobre a pele, compostos extraídos de matérias-primas vegetais vêm sendo estudados como potenciais fontes de antioxidantes naturais.^{3,4} Na clínica dermatológica, os extratos vegetais enriquecidos em polifenóis, principalmente flavonoides, ganham destaque devido à alta capacidade antioxidante que estes compostos apresentam.⁵⁻⁷ Os mecanismos antioxidantes que os flavonoides possuem estão basicamente fundamentados na capacidade de sequestrar radicais livres, ou ainda de atuar como quelante de metais, retardando a oxidação de lipídeos e outras biomoléculas.^{8,9} Porém, outros mecanismos podem estar presentes, a citar a indução de enzimas específicas antioxidantes, tais como superóxido dismutase catalase e glutatona peroxidase, ou ainda inibição do sistema enzimático responsável pela geração de radicais livres, tais como ciclooxygenase, lipoxigenase ou xantina oxidase.^{10,8,9}

Dentre diversos flavonoides estudados contra o envelhecimento cutâneo, as isoflavonas têm atraído atenção por sua considerável ação antioxidante,¹¹⁻¹³ e também devido a suas ações estrogênica e fotoprotetora.^{3,14-18} A estrutura química base das isoflavonas contém um núcleo flavona, composto por dois anéis aromáticos ligados a um anel heterocíclico, com alguns substituintes característicos. Essas substâncias são amplamente encontradas em leguminosas pertencentes à família Fabaceae, podendo estar presentes nas formas conjugadas a açúcares, ou ainda nas suas formas livres, também denominadas de agliconas.¹⁸

A soja, *Glycine max*, é relatada como sendo uma leguminosa com alto teor de isoflavonas. Devido a isso, ampla literatura é encontrada para avaliação das atividades antioxidantes de seus diferentes derivados, tais como extratos e produtos alimentares.¹⁹⁻

²⁶ Nos grãos de soja estão presentes doze isoflavonas, sendo elas as agliconas genisteína,

daidzeína, gliciteína e majoritariamente as suas respectivas formas acetil, malonil e glicosídeo.¹⁸ Com isso, destaca-se que devido à soja conter principalmente as formas conjugadas de isoflavonas, ao realizar a extração de seus grãos, o extrato conterá predominantemente genistina, a forma heterosídica da genisteína.²⁷

Ampla literatura é encontrada quanto ao potencial estrogênico, antioxidante e fotoprotetor de ambas as formas das isoflavonas, ou seja, conjugadas e não conjugadas.^{14,17,28-32} No entanto, para uso tópico, alguns pesquisadores relatam que o uso das formas agliconas pode potencializar a capacidade de penetração na pele, e conseqüentemente, aumentar os seus efeitos benéficos.^{18,33} Dessa forma, muitos estudos são encontrados relatando o desenvolvimento de produtos tópicos contendo as formas agliconas das isoflavonas, principalmente genisteína.¹⁸ No entanto, é importante destacar que apesar de existirem alguns relatos de que as isoflavonas conjugadas possuem baixa penetração cutânea, pouca exploração científica é encontrada para aprofundar, ou contornar tal situação.

Durante o desenvolvimento de produtos, algumas estratégias tecnológicas podem ser utilizadas a fim de auxiliar a administração tópica de substâncias com baixa capacidade de penetração cutânea. Dentre essas estratégias encontra-se a utilização de nanoemulsões que vêm sendo recentemente propostas para aumentar a capacidade de retenção e/ou permeação cutânea de alguns flavonoides.³⁴⁻⁴⁰ Essas formulações são caracterizadas como dispersões nanométricas de gotículas oleosas em uma fase aquosa externa, estabilizada por um sistema tensoativo. Apresentam como vantagem o aumento da hidratação cutânea, bem como possibilidade de formação de um depósito mais uniforme dos compostos de interesse com a pele.⁴¹

Face ao exposto, o presente estudo apresenta como principal objetivo o desenvolvimento de novos produtos contendo genistina, principal isoflavona conjugada da soja, reconhecida por apresentar propriedades antioxidantes e baixa capacidade de penetração cutânea. Para tanto, foi avaliado o emprego de nanoemulsões como carreadores de extrato de soja padronizado em genistina, bem como para esta isoflavona isolada. As formulações foram avaliadas quanto à capacidade de aumentar a permeação/retenção cutânea da substância de interesse, e também de promover a fotoproteção de pele exposta a radiações ultravioletas.

PARTE EXPERIMENTAL

Produtos Químicos e Reagentes

As sementes de soja (cultivar EMBRAPA BRS262) utilizadas neste trabalho foram gentilmente doadas pela empresa SEMEL sementes (São Paulo, Brazil). As isoflavonas genistina e genisteína foram comercialmente adquiridas da Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). A lecitina de gema de ovo e triglicerídeos de cadeia média (TCM) utilizados para produção das nanoemulsões foram adquiridos da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). Os reagentes para cromatografia e ensaios antioxidantes foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Germany), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e Dinâmica (Diadema, SP, Brazil). As membranas de liberação foram adquiridas da Merck Millipore (Darmstadt, Germany). As orelhas suínas utilizadas no ensaio de permeação foram adquiridas do frigorífico Ouro do Sul (Harmonia, RS, Brasil).

Preparo do extrato de soja

As sementes de soja foram moídas e desengorduradas com *n*-hexano. O pó desengordurado (10 g) foi submetido a procedimento de extração em aparelho de Soxhlet com 200 mL de etanol 80% (v/v) durante 8 h. Ao final do processo o extrato foi filtrado e armazenado à 4 °C.

Método cromatográfico para análise da genistina

A genistina presente no extrato de soja foi avaliada quantitativamente por método de cromatografia líquida de ultraeficiência (CLUE). As condições cromatográficas utilizadas basearam-se no método de análise de isoflavonas previamente descrito por Nemitz e colaboradores (2015).⁴² Porém, foi necessário primeiramente averiguar a possibilidade de utilização do método para análise de genistina, e logo na sequência, o método foi então adequado para esta nova aplicação. Dessa forma, foi realizado o preparo de curvas analíticas de genistina na faixa de concentração de 0,1 a 10 µg.mL⁻¹ durante três dias consecutivos. Os parâmetros cromatográficos de adequabilidade do sistema, especificidade, linearidade, precisão e exatidão do método foram avaliados de acordo com o guia internacional de validação.⁴³

Para análise cromatográfica do extrato, este foi diluído na proporção 1:10 em acetonitrila 50 % (v/v) e filtrado em membrana 0,22 µm. Complementarmente, o método foi avaliado para quantificação de genistina nas demais etapas deste trabalho, ou seja, determinação desta isoflavona nas nanoemulsões e estudos de liberação e permeação. Destaca-se ainda que a genisteína, forma aglicona da genistina, também foi avaliada qualitativamente durante algumas etapas do presente estudo.

Método de CLUE

As análises foram realizadas em um cromatógrafo da Shimadzu com detector de arranjo de diodos (DAD) e injetor automático controlado por *software* LC-Solution Multi-PDA (Kioto, Japan). A fase estacionária foi constituída pela coluna Shim-pack XR ODS (Shimadzu, 100 x 2.0 mm i.d.; tamanho da partícula, 2.2 µm) com pré-coluna (Phenomenex, USA). A fase móvel consistiu de (A) ácido trifluoroacético (TFA) 0.1 % (v/v) em água e (B) acetonitrila. A eluição do gradiente foi 20–25 % B (0–2 min), 25–30 % B (2–3 min), 30–35 % B (3–4 min), e 35–20 % B (4–6 min). A coluna foi reequilibrada com 20 % B por 2 minutos antes da próxima análise. O fluxo do sistema consistiu de um gradiente de 0,35 mL.min⁻¹ (0–1,5 min), 0,35–0,5 mL.min⁻¹ (1,5–2 min), 0,5 mL.min⁻¹ (2–3 min), 0,5–0,35 mL.min⁻¹ (3–4 min), e 0,35 mL.min⁻¹ por 8 minutos. O comprimento de onda utilizado nas análises foi de 260 nm, o volume de injeção foi de 3 µL, e a análise foi realizada a uma temperatura de 55 °C.

Validação do método para análise de genistina

Especificidade

A especificidade do método foi avaliada por meio de injeções do padrão de genistina e das matrizes de interesse. Foram avaliadas três diferentes matrizes: extrato de soja, nanoemulsão branca e extrato metanólico de pele de orelha suína. A pureza de pico, o tempo de retenção e o espectro de UV do pico correspondente de genistina presente no extrato de soja foram comparados com estes mesmos parâmetros para o pico da solução padrão de genistina. Para as demais matrizes foi avaliado se ocorreu, ou não, co-eluições de picos no mesmo tempo de retenção que o pico da solução padrão de genistina.

Linearidade

Para realizar a confecção das curvas de calibração foi primeiramente preparada uma solução estoque pesando-se 1,5 mg de genistina e realizando-se a sua solubilização em 30 mL de metanol. As demais diluições foram realizadas com acetonitrila:água (50:50, v/v). Cada curva de calibração foi preparada nas concentrações de 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A linearidade do método foi expressa através da média de três curvas padrão, obtidas em três diferentes dias. Durante cada dia, foram analisadas três determinações de cada concentração. Para a construção das curvas, gráficos de área *versus* concentração foram construídos e analisados, e a partir disso foram calculados e avaliados a equação da reta e o coeficiente de correlação (r).

Precisão e exatidão

A precisão do método foi avaliada através das análises de repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi determinada pelo desvio padrão relativo (DPR) entre os resultados obtidos após análise de três amostras de genistina nas concentrações baixa, média e alta da curva (0,1, 4,0 e 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A precisão intermediária foi calculada pelo DPR apresentado em três dias diferentes destas análises.

A avaliação da exatidão foi realizada pela adição de quantidades conhecidas de genistina em uma solução em três diferentes níveis (0,1, 4,0 e 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Para cada nível foi avaliado três réplicas. A recuperação foi determinada pela equação: % recuperado = [(média da concentração analisada – valor adicionado) / valor adicionado].

Preparo das nanoemulsões

Nanoemulsões contendo genistina (NE_{Gi}) ou extrato de soja (NE_{ES}), bem como nanoemulsões brancas (NE_{B}) foram preparadas utilizando-se o método de emulsificação espontânea. Esse método consiste em misturar a fase orgânica em uma fase aquosa sob agitação magnética e deixar a mistura formar emulsão por 15 minutos, e após, o excesso de solvente é evaporado sob pressão reduzida à 40 °C em rotaevaporador até o volume final desejado. A composição final das formulações está apresentada na Tabela 1. O marcador das formulações NE_{Gi} ou NE_{ES} foi a genistina, sendo incorporada a uma concentração final de 0,03%.

Tabela 1. Composição final das formulações

Formulação	Componentes (%)				
	TCM	Lecitina de gema de ovo	Polissorbato 80	Marcador (genistina)	Água qsp
NE _{Gi}	8	2	1	0,03	100
NE _{ES}	8	2	1	0,03	100
NE _B	8	2	1	-	100

NE_{Gi}: nanoemulsão contendo genistina; NE_{ES}: nanoemulsão contendo extrato de soja; NE_B: nanoemulsão branca, TCM: triglicerídeos de cadeia média.

Para obtenção da NE_{Gi}, foi primeiramente preparado uma mistura de TCM, lecitina de gema de ovo, genistina (1,5 mg) e etanol. A mistura foi deixada sob agitação, e após dissolução de todos componentes, esta foi vertida em uma fase aquosa contendo polissorbato 80 e água. A mistura foi agitada constantemente durante 15 min, e evaporada até 5 mL. Processo similar foi realizado para obtenção da NE_{ES}. Para isso, primeiramente foi misturado 20 mL de extrato de soja (contendo o correspondente à 1,5 mg de genistina) com TCM, lecitina de gema de ovo e etanol. A mistura foi deixada sob agitação, e após dissolução de todos componentes, esta foi vertida em uma fase aquosa contendo polissorbato 80 e água. A mistura foi agitada constantemente durante 15 min, e evaporada até 5 mL.

Caracterização das Formulações

Determinação do pH

O pH das formulações foi determinado sem diluição prévia através da utilização de potenciômetro calibrado previamente (Modelo pH 21, Hanna Instruments, Brasil). Os resultados foram expressos como média de três determinações independentes.

Determinação do tamanho e índice de polidispersão

As formulações foram caracterizadas através do espalhamento de luz dinâmico pela difusão de raio laser monocromático que atravessa a dispersão coloidal utilizando o equipamento Zetasizer (3000HS Zetasizer; Malvern Instruments, Malvern, England). Essa determinação foi realizada observando-se o espalhamento a 90 ° após diluição das

amostras em água purificada (1:1000), previamente filtrada em membrana de 0,22 μm . Os resultados foram expressos como média de três determinações independentes.

Determinação do potencial zeta

O potencial zeta foi determinado através da mobilidade eletroforética das gotículas no equipamento Zetasizer (3000HS Zetasizer; Malvern Instruments, Malvern, England). Todas as análises foram realizadas após a diluição das amostras em NaCl 1 mM (1:1000), previamente filtrado em membrana de 0,22 μm . Os resultados foram expressos como média de três determinações independentes.

Determinação do teor de genistina

As formulações foram avaliadas quanto ao teor de genistina por meio do método de CLUE previamente descrito. Para isso, as nanoemulsões foram diluídas na proporção 1:100 em acetonitrila 50 % (v/v) e as amostras foram filtradas em membrana 0,22 μm .

Estudos de liberação

Para realizar os ensaios de liberação foram utilizadas Células de Difusão de Franz. Membranas de éster de celulose com porosidade de 50 nm foram acondicionadas entre o compartimento doador e receptor e quantidade conhecida de fluido receptor (tampão fosfato pH 7,4: etanol, 70:30 v/v) foi adicionado às células. A temperatura foi mantida a 32 °C, e o ensaio permaneceu a uma velocidade de 450 rpm com agitação constante. Alíquotas de 1,0 mL foram retiradas a cada uma hora de experimento, e quantidade equivalente de fluido fresco foi adicionado novamente à célula. A duração total do ensaio foi de 10 horas. As alíquotas foram filtradas para vials para posterior análise pelo método de CLUE.

Estudos de retenção/permeação cutânea

Para realizar os ensaios de retenção/permeação cutânea também foram utilizadas Células de Difusão de Franz. Primeiramente, foram preparados os cortes circulares de peles de orelhas suínas a serem utilizadas durante o experimento. Para isso, os pelos e a cartilagem foram removidos, e então as peles foram cortadas no diâmetro de interesse,

aconditionadas com papel alumínio e armazenadas a -20 °C até sua utilização (por um período máximo de 30 dias). Nos dias de experimento as peles foram descongeladas e mantidas em um recipiente contendo tampão fosfato pH 7,4 durante 15 minutos. Após, elas foram alocadas entre o compartimento doador e o receptor deixando-se a parte da derme em contato com o fluido receptor (tampão fosfato pH 7,4: etanol, 70:30 v/v). Foram separadamente adicionados 400 µL das formulações na parte do compartimento doador de cada célula. A temperatura foi mantida a 32 °C e o ensaio permaneceu a uma velocidade de 450 rpm com agitação constante durante 8 horas. No final do experimento, uma alíquota de cada fluido foi retirada, e as amostras foram filtradas para posterior análise pelo método de CLUE. As peles foram retiradas das células de Franz, limpas com água e gaze. Foram efetuados cortes circulares de cada pele (referente ao espaço que ficou marcado pela célula) e os seus diâmetros foram medidos. Foi realizado um procedimento de *tape stripping* com auxílio de uma fita adesiva para se retirar o excesso de formulações das peles, e então foram realizados os procedimentos de cortes destas em pequenos pedaços. Em seguida, o material representativo da pele de cada célula de Franz foi transferido para tubo de ensaio e extraído com 2 mL de metanol em ultrassom durante 30 minutos. Após, o conteúdo foi filtrado em membrana de 0,22 µm para vials e estes foram posteriormente analisados pelo método de CLUE.

Atividade Antioxidante das formulações

O potencial antioxidante total das nanoemulsões contendo genistina ou extrato de soja foi avaliado utilizando os ensaios de Potencial Antioxidante Reativo Total (TRAP). Este método é normalmente utilizado para estimar a capacidade antioxidante de amostras *in vitro*, e avaliar a capacidade de reação da substância quando há um aumento de radicais livres.

O ensaio de TRAP foi realizado conforme descrito por Dresch e colaboradores (2009).⁴⁴ Uma solução de 2,2'-Azobis (Amidinopropano) dihidroclorato (ABAP) e luminol foi preparada e mantida em repouso para a estabilização durante 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, em placa de 96 poços foram adicionados 180 µL desta solução e 20 µL das formulações. A intensidade da quimiluminescência induzida por ABAP foi avaliada em um contador de cintilação líquido (Wallac 1450 Micobeta® TriLux, Perkin-Elmer, Boston, MA, EUA). O TRAP foi determinado pelo cálculo da área

sob a curva (AUC) da intensidade da quimiluminescência de luminol ao longo do tempo. O Trolox em concentração de 40 μM foi utilizado como controle positivo.

Capacidade fotoprotetora das formulações

A capacidade fotoprotetora das nanoemulsões foi avaliada através da determinação de proteínas carboniladas, tióis totais e determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em pele de orelha suína tratadas com as formulações e expostas à radiação ultravioleta conforme descrito a seguir.

Tratamentos e exposição da pele frente a radiações UVA/UVB

O protocolo experimental para tratamento da pele e exposição frente a radiações UVA/UVB foi realizado conforme Balestrin e colaboradores (2016).⁴⁵ Assim, as peles de orelhas suínas foram previamente cortadas em pedaços e congeladas. No dia do ensaio, estas foram descongeladas e hidratadas com tampão fosfato pH 7,4 por 15 minutos. Em uma placa foi adicionado papel filtro e algodão umedecido com água e as peles foram mantidas sob o algodão durante todo o experimento a fim de manter a hidratação das mesmas. Nesta placa foram adicionadas peles com área de 2,54 cm^2 divididas em quatro grupos: pele sem nenhum tratamento ou ainda peles que foram tratadas com 500 μL de nanoemulsões (NE_B , NE_{Gi} , NE_{ES}). A placa foi levada a uma câmara para realizar a exposição das peles as radiações UV por uma lâmpada UVA Exo Terra Sun. GloNeodímio 100 W ($41 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$; comprimento de onda de 365 nm) e por uma lâmpada UVB Exo Terra ReptiGlo 15 W (dose de $1,8 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$; comprimento de onda 290 nm). A cada 2 h foram feitos intervalos de exposição para fazer a reposição das nanoemulsões para que as peles não ficassem secas. O tempo total de exposição foi de 6 horas. A pele sem nenhum tratamento foi denominada como controle positivo (pele irradiada). Complementarmente, pedaços de pele foram mantidos sob um algodão embebido de água fora da câmara para servir como controle negativo do processo (pele não irradiada).

Após o tempo de exposição, as peles foram lavadas e homogeneizadas com tampão fosfato pH 7,4 em Ultra-Turrax® e posteriormente centrifugadas. Os sobrenadantes foram reservados, denominados por “amostras”, as quais foram analisadas nos diferentes ensaios, conforme descrito a seguir.

Quantificação de Proteínas Totais

O teor de proteínas totais nas amostras foi determinado utilizando albumina bovina como padrão,⁴⁶ e este valor serviu para normalizar os resultados obtidos nos ensaios de avaliação dos danos oxidativos.

Ensaio para determinação de proteínas carboniladas

O ensaio para determinação de proteínas carboniladas foi realizado de acordo com Levine (1990).⁴⁷ Neste ensaio a dinitrofenilhidrazina (DNPH) reage com as proteínas carboniladas, formando hidrazonas que podem ser quantificadas por espectrofotômetro. Para tanto, em tubos de eppendorf foram adicionados 200 µL de amostra e 200 µL de ácido tricloroacético 20 %, a fim de precipitar as proteínas. O conteúdo foi centrifugado, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso com 200 µL de NaOH 2 M e homogeneizado em vórtex. Foram adicionados 100 µl de DNPH 10 mM e a mistura foi centrifugada novamente. O precipitado foi lavado três vezes com etanol/acetato de etila (1:1 v/v) e ressuspenso com uma solução de ureia 8 M (pH 2,3). Por fim, a solução foi analisada por um espectrofotômetro a 370 nm.

Ensaio para determinação de tiois totais

O ensaio para determinação de tiois totais foi realizado de acordo com Ellman (1959).⁴⁸ Neste ensaio o ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTDB) reage com os grupamentos SH, proteico e não proteicos, formando um composto amarelo que pode ser quantificado por espectrofotômetro. Para tanto, uma alíquota de volume conhecido de cada amostra foi diluída com tampão fosfato pH 7,4. Posteriormente, 10 µl de DTDB 10 mM foi diluído em etanol e adicionado às amostras. Após 60 minutos de reação, a intensidade da cor amarela formada foi lida por um espectrofotômetro a 412 nm.

Ensaio para determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O ensaio para determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi realizado de acordo com a metodologia de Draper e Hadley (1990).⁴⁹ Neste ensaio o ácido tiobarbitúrico reage com lipídeos oxidados, especialmente malondialdeído (MDA), causando a produção de um composto de coloração rosa que pode ser quantificado por

espectrofotômetro. Para tanto, em tubos de eppendorf foram adicionados 200 µL de amostra e 200 µL de ácido tricloroacético 10 %. O conteúdo foi centrifugado, e 100 µl do sobrenadante foram homogeneizados com 100 µl de ácido tiobarbitúrico a 0,67 %. A mistura foi incubada com banho seco durante 20 minutos. Por fim, a cor desenvolvida pela presença TBARS foi lida por um espectrofotômetro a 532 nm.

Estabilidade da genistina frente à radiação

Na câmara de exposição foram concomitantemente expostos frascos contendo solução metanólica de genistina e nanoemulsões contendo genistina, para servirem de controles da estabilidade desta isoflavona frente às radiações UVA e UVB. Após 6 h de exposição, o conteúdo destes frascos foi diluído, filtrado para vial e analisado por CLUE.

Análise estatística

A análise estatística dos ensaios foi realizada pelo *software* GraphPad Prism® versão 6.1. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico ANOVA *one-way* e complementação com teste Tukey para as comparações múltiplas. O nível de significância adotado foi $\alpha=0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtenção do extrato de soja

Um dos objetivos do presente estudo foi realizar a incorporação de um extrato de soja padronizado em teor de genistina em nanoemulsões de uso tópico. Para poder obter o extrato de interesse, primeiramente foi realizada uma pesquisa bibliográfica à procura de genótipos de soja do Brasil que poderiam ter um diferencial para a obtenção de alto teor de isoflavonas. Dessa forma, optou-se por realizar os estudos com sementes da cultivar EMBRAPA BRS262, uma vez que segundo Ávila e colaboradores (2011)⁵⁰ o teor de isoflavonas é considerado elevado nesta amostra.

As sementes de soja foram moídas e desengorduradas e o extrato foi obtido após processo extrativo em meio hidroetanólico. Para determinar o teor de genistina presente no extrato optou-se por avaliar se método de Nemitz e colaboradores (2015)⁴² poderia ser

utilizado para esta finalidade. Este método havia sido previamente validado apenas para a quantificação de genisteína, daidzeína e gliciteína em amostras de soja, formulações e ensaios bioanalíticos. Com isso, para verificação da nova aplicação, o método foi avaliado quanto a sua adequabilidade em determinar o teor de genistina com reprodutibilidade e exatidão durante as análises aqui propostas.

Método cromatográfico para determinação de genistina

O método mostrou-se adequado para análise de genistina no extrato de soja, uma vez que o pico cromatográfico referente a esta isoflavona apresentou os parâmetros de adequabilidade dentro dos limites preconizados, conforme apresentado na Tabela 2. Os parâmetros avaliados ficaram conforme a especificação de Shabir (2003)⁵¹ e Snyder e colaboradores (2010).⁵² O comprimento de onda escolhido foi 260 nm, uma vez que o espectro de absorção da genistina apresenta sua máxima absorção nesta condição.

Tabela 2. Parâmetros de adequabilidade do método de CLUE para a determinação de genistina em solução padrão e extrato de soja

Parâmetros cromatográficos	Pico Genistina Sol. Padrão	Pico Genistina Extrato	Especificação
Tempo de retenção (min)	1,91	1,92	-
Pratos teóricos	2924	3872	> 2000 (Shabir, 2003)
Fator de cauda	1,79	1,84	≤ 2,0 (Shabir, 2003)
Resolução pico anterior	-	4,96	> 2,0 (Shabir, 2003)
Resolução pico posterior	-	5,84	> 2,0 (Shabir, 2003)
Repetibilidade de injeção	0,06	0,07	≤ 1,0 (Shabir, 2003)
Fator de capacidade (k')	1,72	1,82	1 – 10 (Snyder et al., 2010)

A especificidade do método foi confirmada pela análise de pureza de pico referente à genistina tanto na solução padrão como no extrato de soja. Além disso, devido à necessidade de determinação desta isoflavona nas demais etapas do presente trabalho,

foi realizada também a avaliação das matrizes: formulação branca (NE_B) e extrato metanólico de pele de orelha suína (Figura 1). Como pode ser observado, não houve co-eluições de picos das matrizes no mesmo tempo de retenção do pico referente à genistina, demonstrando a especificidade do método para essas aplicações.

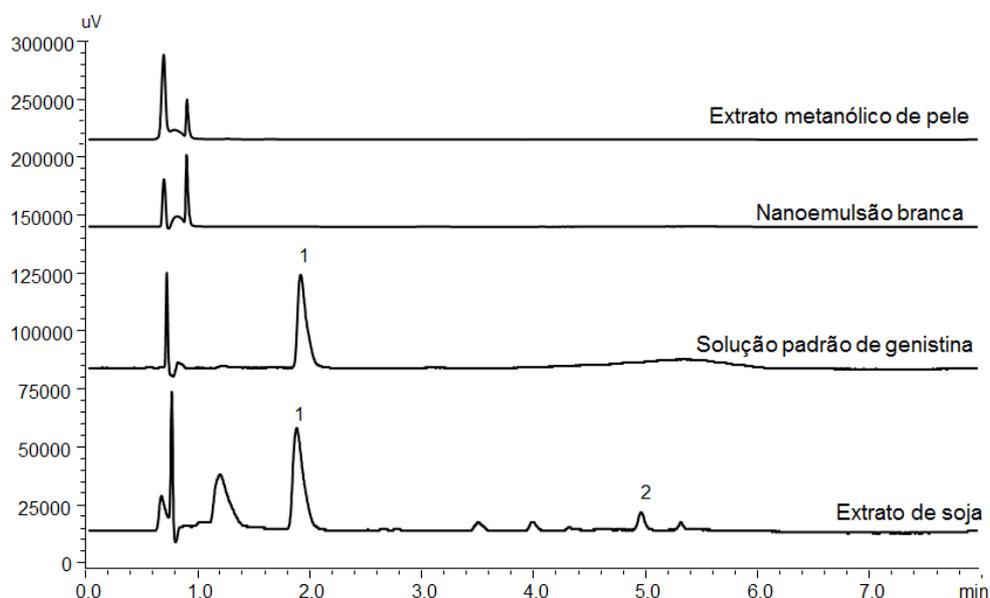


Figura 1. Cromatogramas obtidos na análise por CLUE do extrato de soja hidroetanólico não hidrolisado diluído a uma concentração correspondente a aproximadamente $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de genistina, da solução de genistina padrão à $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, da nanoemulsão branca e do extrato metanólico de pele de orelha de porco. Ambos com leitura em 260 nm. Onde: 1= genistina; 2=genisteína.

O método mostrou-se linear na faixa de $0,1$ a $10,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ através da análise de regressão linear ($y = 19204x - 1188$, $r = 0,998$). O limite de detecção calculado a partir da curva foi de $0,103 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e o de quantificação foi de $0,311 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A precisão intradia e interdia foi avaliada durante análise de três réplicas em pontos baixo ($0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), médio ($4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e alto ($10,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e apresentou desvio padrão relativo (DPR) inferior a 5,0 % em todas as situações. Durante a análise de exatidão, o método apresentou recuperação média de 105,05 %, 98,57 % e 99,35 % para os pontos baixo, médio e alto da curva, respectivamente.

Após a adequação do método, o teor de genistina presente no extrato hidroetanólico de soja foi determinado, sendo correspondente a $75,1 \pm 0,19 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Além disso, como pode ser observado na Figura 1, mesmo sem realização de hidrólise, é encontrada uma pequena quantidade de genisteína na amostra. Isto ocorre devido à

presença da porção livre desta isoflavona na planta *in natura*, corroborando com o já descrito na literatura.^{27,53}

Nanoemulsões contendo extrato de soja

Nanoemulsões vêm sendo descritas como promissores sistemas para aumentar a penetração cutânea de flavonoides.³⁸ Neste sentido, o presente estudo avaliou o preparo de nanoemulsões contendo extrato de soja, e o impacto causado na permeação/retenção cutânea da genistina, principal isoflavona presente na formulação. Paralelamente, foram preparadas nanoemulsões contendo apenas a isoflavona isolada, para fins de comparação da penetração a partir das formulações.

Destaca-se que ao realizar a avaliação dos estudos da literatura, não foram encontrados relatos a respeito do uso de nanoemulsões como promotores de penetração cutânea de genistina. Por outro lado, produtos tópicos envolvendo nanotecnologia já foram descritos para incorporação da sua respectiva forma aglicona, ou seja, genisteína, relatando, inclusive, o aumento da capacidade da sua permeação/retenção cutânea.¹⁸

A produção das nanoemulsões foi realizada por meio de emulsificação espontânea. Os resultados referentes às análises de características físico-químicas das formulações contendo extrato de soja (NE_{ES}), apenas genistina (NE_{Gi}) ou nenhum composto ativo (NE_B) estão apresentados na Tabela 3.

Pode-se observar que todas as formulações possuem tamanho de gotícula inferior a 200 nm e são consideradas monodispersas, uma vez que apresentaram valores baixos de índice de polidispersão (IPD<0,2). O pH de todas as formulações encontrou-se na faixa de 4,0 a 5,0. Estes resultados estão de acordo com a faixa aceitável de pH para produtos tópicos, que estima que o “natural” do pH da superfície da pele seja, em média, 4,7.⁵⁴ O potencial zeta apresentou-se negativo muito provavelmente devido a presença de lecitina de gema de ovo na formulação, que contém fosfolípídeos ácidos como fosfatidilserina e o ácido fosfatídico conferindo carga negativa ao sistema nesta faixa de pH.^{55,56} O teor de genistina nas NE_{ES} e NE_{Gi} foi estatisticamente semelhante e próximo à 0,3 µg.mL⁻¹, demonstrando que praticamente 100% do teor inicialmente adicionado está contido nas formulações. Não houve diferença significativa de tamanho e potencial zeta entre as formulações de NE_B e NE_{Gi}. Entretanto, na formulação de NE_{ES} há uma diminuição no tamanho e um aumento (em módulo) do potencial zeta, indicando que provavelmente os componentes do extrato podem estar adsorvidos na superfície externa das nanogotículas.

Situação semelhante foi relatada por Zorzi e colaboradores (2016),⁴⁰ onde nanoemulsões contendo extrato de *Achyrocline satureioides* apresentaram um potencial zeta maior quando comparado com formulações brancas ou formulações contendo apenas um flavonoide.

Tabela 3. Caracterização físico-química das formulações

	Tamanho (nm)	IPD	Potencial zeta (mV)	Teor de genistina (mg.mL ⁻¹)	pH
NE _B	168,70 ± 6,10	0,124 ± 0,01	-15,2 ± 1,35	NA	4,0 – 5,0
NE _{Gi}	160,51 ± 7,02	0,137 ± 0,02	-16,6 ± 3,00	0,31 ± 0,001	4,0 – 5,0
NE _{ES}	144,38 ± 7,14*	0,160 ± 0,03	-39,3 ± 1,00*	0,34 ± 0,016	4,0 – 5,0

IPD: Índice de Polidispersão; NE_B: Nanoemulsão branca; NE_{Gi}: Nanoemulsão contendo genistina; NE_{ES}: Nanoemulsão contendo extrato de soja. Onde * representa diferença estatística dos demais resultados em uma mesma coluna (p<0,05).

Estudos de liberação

Estudos de liberação servem como uma importante ferramenta para avaliar inicialmente o potencial de aplicação de novas formulações, pois a substância de interesse deve se liberar do veículo e estar disponível para atingir seu sítio específico de ação. No caso de formulações a serem administradas na pele, a liberação das substâncias deve ocorrer para que essas possam penetrar no estrato córneo, principal barreira que a pele possui.⁵⁷ Estes estudos são realizados normalmente com membranas sintéticas, que funcionam como barreiras de difusão passiva onde a taxa é determinada pela concentração do soluto.⁵⁸ Destaca-se que a liberação de um fármaco a partir de determinado produto depende diretamente da substância de interesse e das características físico-químicas dos demais componentes da formulação.⁵⁹

Neste sentido, foi realizado um estudo de liberação da genistina a partir das nanoemulsões (NE_{ES} e NE_{Gi}). Foi utilizado como controle do ensaio uma suspensão de genistina em propilenoglicol (PG), uma vez que neste solvente a isoflavona está totalmente disponível para ser liberada.⁶⁰ Os perfis de liberação da genistina a partir do controle em PG, e das formulações estão apresentados na Figura 2. Após 10 h foi observado um percentual liberado de genistina de 96,87 ± 1,04 % a partir do controle em PG, 69,96 ± 4,18 % a partir da NE_{Gi} e 86,37 ± 4,95% a partir da NE_{ES}.

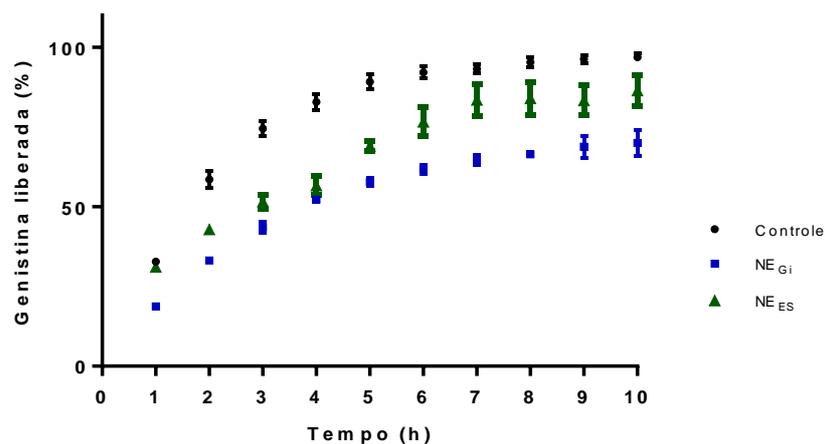


Figura 2. Perfil de liberação de genistina durante 10 horas de ensaio, em células de difusão do tipo Franz e com membrana de celulose, a partir das amostras: suspensão controle de propilenoglicol e nanoemulsões (NE_{Gi} e NE_{ES}). Onde NE_{Gi}: Nanoemulsão contendo genistina; NE_{ES}: Nanoemulsão contendo extrato de soja.

Além do perfil de liberação, foi também determinado o fluxo de liberação de genistina a partir do controle em PG e formulações. Assim, o fluxo de liberação da genistina a partir do controle foi de $6,79 \pm 0,073 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, a partir da NE_{Gi} foi de $4,91 \pm 0,293 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ e a partir da NE_{ES} foi de $6,06 \pm 0,347 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. Comparando-se os resultados, foi observado que o fluxo a partir das formulações foi estatisticamente inferior ao controle ($p < 0,05$), o que demonstra uma liberação da genistina retardada a partir dos nanocarreadores. Além disso, comparando-se as nanoemulsões, foi observado que o fluxo de liberação da genistina a partir NE_{ES} foi estatisticamente superior à NE_{Gi} ($p < 0,05$). Muito provavelmente essa situação pode ter ocorrido devido a um efeito positivo dos demais componentes presentes no extrato de soja durante a liberação da genistina.

Estudos de retenção/permeação cutânea

Os ensaios de permeação/retenção cutânea foram realizados utilizando um modelo experimental *in vitro* com pele de orelha suína, uma vez que esta é comparável com a pele humana em termos morfológicos e bioquímicos.⁶¹ Conforme pode ser observado na Figura 3, a retenção cutânea de genistina a partir das formulações de NE_{Gi} e NE_{ES} aumentou cerca de 1,5 e 6 vezes em relação ao seu controle em PG, respectivamente. A promoção da penetração de moléculas através da fluidez dos componentes da pele é relacionada provavelmente à presença de TCM e dos tensoativos das nanoemulsões.⁶²

Além disso, de uma forma geral, nanoemulsões formam filmes oclusivos devido à presença de lipídeos em suas gotículas, diminuindo com isso a perda de água, e aumentando a hidratação da pele. Essa situação faz com que ocorra uma desorganização do estrato córneo, causando uma diminuição da resistência da pele à difusão das substâncias ativas presentes na formulação.^{41,63}

A ocorrência de uma maior retenção de genistina a partir da NE_{ES} pode estar relacionada com um efeito positivo que os demais componentes do extrato exercem na penetração dessa substância. Situação semelhante foi relatada por Zorzi e colaboradores (2016),⁴⁰ uma vez que a retenção de quercetina a partir de nanoemulsões contendo extrato de *Achyrocline satureioides* foi superior à retenção a partir de uma nanoemulsão contendo apenas a substância isolada.

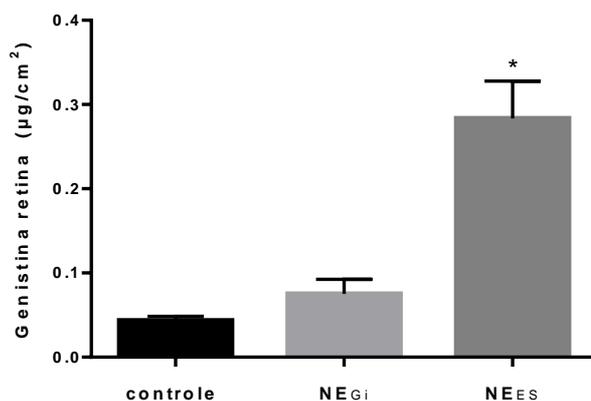


Figura 3. Quantidade de genistina retida em pele de orelha suína após 8 h de ensaio, em células de Franz, a partir de: suspensão controle de propilenoglicol e nanoemulsões. Onde NE_{Gi}: Nanoemulsão contendo genistina; NE_{ES}: Nanoemulsão contendo extrato de soja e * significa estatisticamente superior aos demais grupos ($p < 0,05$).

É importante destacar ainda, que foram detectados picos cromatográficos de genisteína na pele após realização do ensaio de permeação de genistina a partir de NE_{Gi} (Figura 4). Embora a quantidade detectada encontrou-se inferior ao do limite de quantificação, foi verificado que ocorreu transformação de genistina até a forma aglicona de genisteína durante o ensaio de permeação.

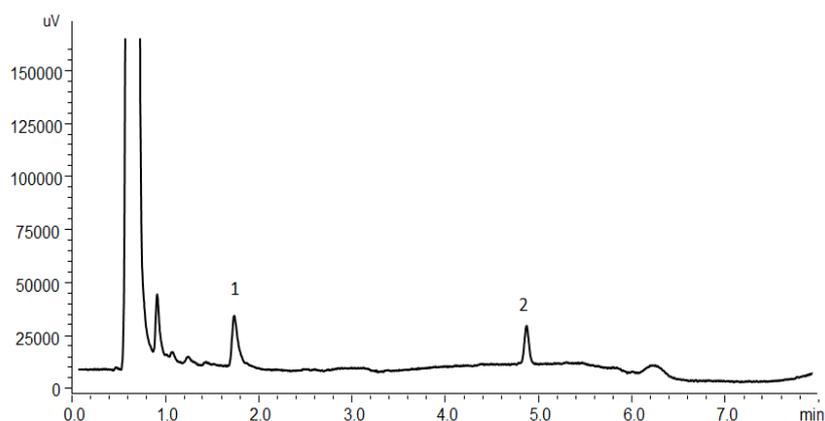


Figura 4. Cromatograma ampliado obtido na análise por CLUE após ensaio de permeação/retenção aplicando-se na pele a nanoemulsão de genistina. Onde: 1= genistina; 2=genisteína.

A presença do pico de genisteína durante a permeação de NE_{Gi} pode estar relacionado com diversos fatores, sendo uma das possíveis explicações uma provável atividade enzimática (β -glicosídica) que a pele possui, podendo apresentar certa capacidade de hidrolisar a forma conjugada até sua forma livre durante a penetração nas camadas da pele. Esse resultado opõe-se ao relatado por Schmid e Zulli (2002),⁶⁴ em que propõem que a pele não tem enzimas que hidrolisam as moléculas glicosiladas em agliconas.

Atividade Antioxidante das formulações

Em uma última etapa deste trabalho, foi verificada a atividade antioxidante das formulações obtidas. Desta forma, o potencial antioxidante total das nanoemulsões foi avaliado pela análise de TRAP. Este ensaio sugere o potencial antioxidante de amostras baseados na quimioluminescência formada quando o luminol é incubado na presença de uma fonte de radicais livres (ABAP). Assim, quando adicionado uma substância sequestrante de radicais livres a intensidade da quimioluminescência se reduz e o tempo de recuperar a luminescência é relacionado à quantidade total de antioxidantes presentes na amostra. Ao final do ensaio, o tempo calculado é então comparado com o tempo de indução do padrão trolox, um potente composto antioxidante, onde quanto menor a AUC maior a atividade antioxidante da amostra.⁶⁵

Na Figura 5 é apresentado o resultado da atividade antioxidante total das formulações por ensaio de TRAP. Como pode ser observado, a NE_{ES} apresentou uma área sob a curva (AUC) mais próxima ao Trolox em comparação com as demais formulações testadas, é possível verificar que a NE_B e a NE_{Gi} apresentaram AUC estatisticamente semelhante, o que indica uma menor capacidade antioxidante total para essas formulações quando comparadas a nanoemulsão contendo o extrato de soja.

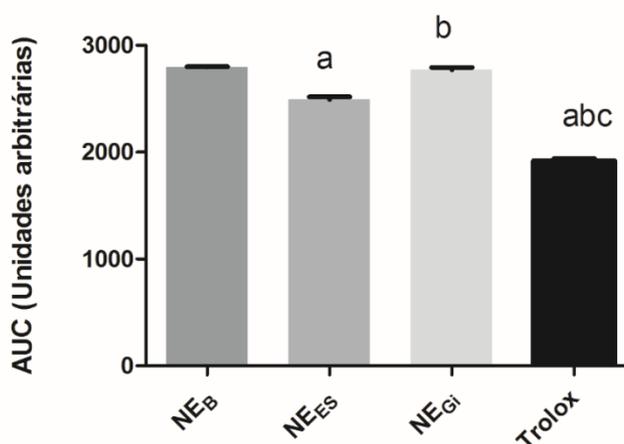


Figura 5. Avaliação do potencial antioxidante de NE_{Gi} , NE_{ES} por determinação de TRAP – Potencial Antioxidante Reativo Total. Onde, NE_{Gi} : Nanoemulsão contendo genistina; NE_{ES} : Nanoemulsão contendo extrato de soja, AUC: área sob a curva, (a) refere-se a diferença em relação a NE_B ; (b) refere-se a diferença em relação a NE_{ES} e (c) refere-se a diferença em relação a NE_{Gi} .

Por fim, a capacidade fotoprotetora das formulações foi avaliada contra os danos induzidos por radiações UV, utilizando um protocolo experimental com pele de orelha suína. Diferentes danos cutâneos podem ser causados pelas radiações UVA (320 – 400 nm) e UVB (290 – 320 nm), pois elas têm diferentes energias e distintas capacidades de penetração na pele.⁶⁶ Dessa forma, ambos os tipos de radiações podem levar a sérios riscos cutâneos. Exemplos de danos causados pela radiação UVA são o envelhecimento precoce da pele, redução na quantidade de células de Langerhans e aumento na quantidade de células inflamatórias presentes na derme. Por outro lado, a radiação UVB causa danos mais profundos, atingindo o DNA, podendo causar mutações nos dímeros de pirimidina que estão associadas ao câncer de pele não-melanoma, geração de processos inflamatórios e carcinogênese.⁶⁷ Devido a isso, a busca por substâncias que apresentem capacidade de proteção por meio de mecanismos de ação antioxidantes pode ser uma

estratégia na busca de produtos tópicos destinados à prevenção dos efeitos danosos causados pelas radiações UV.

A Figura 6 apresenta os resultados dos níveis de diferentes marcadores do dano oxidativo antes e após exposição da pele frente às radiações UVA e UVB, bem como a capacidade protetora das diferentes formulações (NE_{Gi}, NE_{ES} e NE_B). Ensaio com a NE_B foram realizados a fim de avaliar uma possível atividade protetora exercida pelos excipientes e pela própria nanoemulsão. Destaca-se que em paralelo foi avaliada a estabilidade da genistina frente à exposição da radiação UVA e UVB. Assim, após expor na câmara de radiação uma solução metanólica contendo genistina, ou ainda NE_{Gi}, esta isoflavona manteve-se estável durante as seis horas do ensaio, não apresentando hidrólise até sua respectiva forma aglicona.

Para determinar o nível de proteção oferecida pelas formulações frente às proteínas, foi realizado o ensaio de determinação de proteínas carboniladas. A carbonilação é um dano que ocorre nas células quando em presença de espécies reativas de oxigênio (ERO) e é caracterizada por ser um evento oxidativo de início rápido, estável e altamente doloso aos tecidos.⁶⁸

Conforme demonstrado na Figura 6A, a pele irradiada sem tratamento (CP) apresentou alta taxa de proteínas carboniladas, o que indica alto dano oxidativo a essas estruturas, enquanto que a pele não irradiada (CN) demonstrou baixa carbonilação proteica, indicando assim um dano oxidativo bem menos pronunciado para estas amostras. As peles tratadas com as nanoemulsões e posteriormente irradiadas, apresentaram uma significativa proteção a partir de todos os tratamentos, visto que a produção de proteínas carboniladas foi menor do que no CP em todos os casos ($p < 0.05$). No entanto, comparando-se os resultados da proteção das formulações com a pele não irradiada, a formulação capaz de oferecer um efeito protetor mais pronunciado frente a carbonilação proteica foi a NE_{ES}, uma vez que foram estes os resultados mais próximos ao valor basal da pele não irradiada (CN).

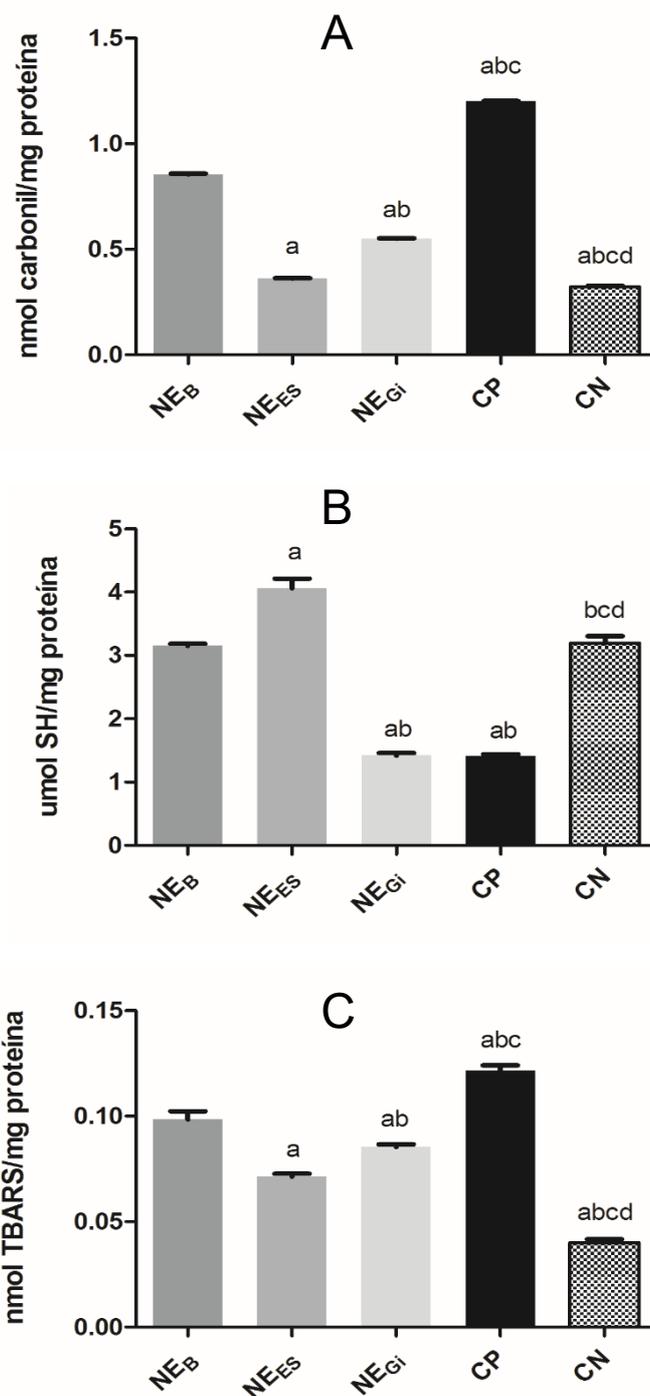


Figura 6. Avaliação do estresse oxidativo em pele de orelha suína após radiações UVA/UVB e diferentes tratamentos, determinado por (A) proteínas carboniladas, (B) tióis totais (proteico e não proteicos) e (C) substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), onde os tratamentos significam CP: controle positivo (pele irradiada sem tratamento), CN: controle negativo (pele sem irradiação e sem tratamento); NE_B: nanoemulsão branca; NE_{ES}: nanoemulsão contendo extrato de soja; NE_{Gi}: nanoemulsão contendo genistina; As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA seguido de Tukey ($p < 0,05$), onde (a) refere-se a diferença em relação a NE_B; (b) refere-se a diferença em relação a NE_{ES}; (c) refere-se a diferença em relação a NE_{Gi} e (d) refere-se a diferença em relação ao CP.

Além disso, foi avaliado outro marcador de dano de proteínas por meio do ensaio de determinação de grupamentos tióis totais expressos pelos grupamentos SH, proteicos ou não proteicos. Diferentemente das proteínas carboniladas, a presença de grupamentos -SH em altas taxas demonstra a proteção dos tecidos frente a presença de ERO.⁶⁹ Assim, conforme apresentado na Figura 6B, a pele irradiada sem tratamento (CP) apresentou alta taxa de depleção dos grupamentos tióis (SH), enquanto que a pele não irradiada (CN) apresentou baixa depleção dos mesmos, o que indica baixo dano oxidativo a estes grupamentos. Para as peles que foram tratadas com as nanoemulsões e posteriormente irradiadas, foi possível observar uma significativa proteção aos grupamentos de -SH a partir dos tratamentos de NE_{ES} e NE_B quando comparado ao CP ($p < 0.05$), demonstrando que nessas situações houve uma preservação dos grupamentos tióis das proteínas. Comparando-se os resultados da proteção das formulações com a pele não irradiada, apenas a formulação NE_{ES} apresentou um resultado de alta proteção, uma vez que os resultados foram ainda superiores que os valores basais apresentados no CN. No entanto, destaca-se que a NE_{Gi} não promoveu nenhum tipo de proteção, uma vez que a quantidade de grupamentos -SH foi semelhante ao encontrado no CP ($p > 0.05$).

Para determinar o nível de proteção oferecida pelas formulações contra a lipoperoxidação, realizou-se o ensaio de substâncias reativas ao ácido barbitúrico (TBARS). Esse ensaio consiste em avaliar a presença de subprodutos da degradação dos lipídeos causados por reações oxidativas quando em presença de ERO.⁷⁰ Conforme demonstrado na Figura 6C, a pele irradiada sem tratamento (CP) apresentou alta taxa de TBARS, o que indica alto dano lipídico nesta amostra, enquanto que a pele não irradiada (CN) apresentou baixa taxa desses compostos. Quando as peles foram tratadas com as nanoemulsões e posteriormente irradiadas, foi possível observar uma significativa proteção a partir de todos os tratamentos, visto que a produção de TBARS foi menor do que no CP em todos os casos ($p < 0.05$). No entanto, comparando-se os resultados da proteção das formulações com a pele não irradiada, a formulação que melhor protegeu contra os danos de lipoperoxidação foi a NE_{ES}, uma vez que foram estes os resultados mais próximos aos valores basais do CN.

De uma forma geral, o conjunto dos resultados aqui apresentados demonstra que nanoemulsões contendo extrato de soja apresentam um efeito protetor às proteínas e lipídeos presentes na pele frente o estresse oxidativo induzido pelas radiações UV. A proteção de danos oxidativos, tais como os aqui avaliados, pode ocorrer por mecanismos

de ação enzimáticos ou não-enzimáticos. Destaca-se que existem na literatura relatos de que derivados de soja possuem capacidade antioxidante por meio de diferentes mecanismos de defesa. Segundo um estudo realizado por Rao e Chaitanya (2015),²⁶ extratos de soja apresentam atividades *in vitro* indutora de importantes enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e glutatona redutase, reduzindo os danos oxidativos mediados por ERO. Além disso, diversos estudos relatam as atividades antioxidantes dos extratos de soja através da capacidade sequestradora de radicais livres, avaliado durante ensaios de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).^{71, 23, 24.21}

Extratos de sementes de soja são relatados por possuírem majoritariamente genistina, porém apresentam também quantidades significativas das demais isoflavonas, tais como as suas formas agliconas.²⁷ Tanto as formas conjugadas, quanto as livres são estudadas individualmente e relatadas por serem substâncias com potencial antioxidante.^{14,17,28-32} No entanto, alguns pesquisadores descrevem que as formas agliconas possuem maiores capacidades de sequestrar radicais livres do que as conjugadas. Sendo assim, a presença das demais isoflavonas no extrato de soja pode explicar a maior fotoproteção que a NE_{ES} causou na pele após radiações UV quando comparado à NE_{Gi}. Além disso, extratos de soja também possuem saponinas, que são consideradas substâncias com certa capacidade antioxidante,⁷² podendo complementar a explicação da maior fotoproteção apresentada pela NE_{ES}.

Destaca-se, por fim, que formulações tópicas convencionais do tipo óleo em água (o/a) foram desenvolvidas por Georgetti e colaboradores (2006)²⁰ contendo extrato de soja. Tais autores descrevem o potencial antioxidante do extrato antes e após incorporação em formulações através de ensaios *in vitro* de DPPH e TBARS em homogeneizado de fígado previamente extraído de ratos Wistars e expostos a danos de íons ferrosos (Fe²⁺). Posteriormente, Georgetti e colaboradores (2008)⁷³ demonstraram a atividade antioxidante *in vivo* dessas formulações através da inibição do conteúdo de H₂O₂ e TBARS em pele de camundongos tratados e expostos a dano oxidativo induzido por tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). No entanto, convém ressaltar que o extrato utilizado nestes trabalhos prévios é um extrato comercial (Isoflavin®) e, além disso, os produtos não foram desenvolvidos utilizando nanotecnologia, diferindo, portanto, do produto aqui desenvolvido.

CONCLUSÕES

O presente estudo realizou a obtenção de um extrato de soja padronizado em genistina e a sua incorporação em nanoemulsões. Um método cromatográfico para determinação de genistina durante os estudos deste trabalho mostrou-se específico, linear, preciso e exato. O procedimento de emulsificação espontânea permitiu a obtenção de nanoemulsões contendo genistina isolada (NE_{Gi}) ou extrato de soja (NE_{ES}) com características adequadas para aplicação tópica. Ambas as formulações apresentaram potencialidade de uso para promover a penetração de genistina na pele. No entanto, destaca-se que tanto a taxa de liberação como a retenção cutânea da genistina foram maiores a partir da NE_{ES} do que a partir da NE_{Gi}. Dessa forma, sugere-se que os demais componentes do extrato de soja podem exercer efeitos positivos sobre a liberação e penetração cutânea da genistina. Além disso, foi evidenciado que a pele provavelmente possui atividade β -glicosídica baixa, porém presente, a qual é capaz de hidrolisar a forma conjugada (genistina) até sua forma livre (genisteína) durante a penetração desta isoflavona nas camadas da pele. Por fim, destaca-se que a NE_{ES} foi capaz de proteger a pele de danos oxidativos proteicos e lipídicos após exposição à luz UV, demonstrando a potencialidade desta formulação para ser utilizada como um produto antioxidante para administração dermatológica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (convenção de subvenção nº 459619 / 2014-4).

REFERÊNCIAS

1. Forster, M.; Bolzinger, M. A.; Fessi, H.; Briançon, S.; *Eur J Dermatol.* **2009**, 19, 309–323.
2. Kohen, R.; *Biomedical and Pharmacotherapy.* **1999**, v. 53, p. 181-182.
3. Pinnel, S.; *Journal of American Academy of Dermatology.* **2003**, v. 48, p.1-19.
4. Mukherjee, P. K.; Maity, N.; Nema, N. K.; Sarkar, B. K.; *Phytomedicine.* **2001**, V. 19, p. 64-73.
5. Epstein, H.; *Clinics in Dermatology.* **2009**, v. 27, p. 575-478.

6. Zillich, O. V.; Schweiggert-Weisz, U.; Eisner, P.; Kerscher, M.; *International Journal of Cosmetic Science*. **2015**, v.37, p.455-464.
7. Treml, J.; Šmejkal, K.; *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2016**, 15, 720–738.
8. Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D.J.; *The Journal of nutritional biochemistry*. **2002**, 13.10, 572-584.
9. Nijveldt, R. J.; Van Nood, E. L. S.; Van Hoorn, D. E.; Boelens, P. G.; Van Norren, K.; Van Leeuwen, P. A.; *The American journal of clinical nutrition*. **2001**, 74(4), 418-425.
10. Horáková, L.; *Interdisciplinary toxicology*. **2011**, 4.3, 114-124.
11. Mitchell, J. H.; Gardner, P. T.; McPhail, D. B.; Morrice, P. C.; Collins, A. R; Duthie, G. G.; *Archives of biochemistry and biophysics*. **1998**, 360.1, 142-148.
12. Rüfer; C. E.; Kulling, S. E.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.**2006**, 54.8, 2926-2931.
13. Mazumder, M. A. R.; Hongsprabhas, P.; *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **2016**, 82, 379-392.
14. Wei, H.; Saladi, R.; Lu, Y.; Wang, Y.; Palep, S. R; Moore, J.; Phelps, R.; Shyong, E.; Lebwohl, M. G.; *The Journal of nutrition*. **2003**, 133.11, 3811S-3819S.
15. Huang, Z. R.; Hung, C. F.; Lin, Y. K.; Fang, J. Y.; *International journal of pharmaceutics*. **2008**, 364.1, 36-44.
16. Chiu, T. M.; Hung, C. C.; Lin, T. J.; Fang, J. Y.; Wu, N. L.; Hung, C. F.; *Journal of ethnopharmacology*. **2009**,126.1, 108-113.
17. Iovine, B.; Iannella, M. L.; Gasparri, F.; Giannini, V.; Monfrecola, G.; Bevilacqua, M. A.; *International journal of molecular sciences*. **2012**, 13.12, 16444-16456.
18. Nemitz, M. C.; Moraes, R. C.; Koester, L. S.; Bassani, V.L.; Poser, G. L.; Teixeira, H. F.; *Phytochemistry Reviews*. **2015**, 14.5, 849-869.
19. Fritz, K. L.; Seppanen, C. M.; Kurzer, M. S.; Csallany, A. S.; *Nutrition Research*. **2003**, 23(4), 479-487.
20. Georgetti, S. R.; Casagrande, R.; Vicentini, F. T. M. C.; Verri, Jr. W. A.; Fonseca, M. J. V.; *Eur J Pharm Biopharm*. **2006**, 64, 99–106.
21. Georgetti, S. R.; Casagrande, R.; Souza, C. R. F.; Oliveira, W. P.; Fonseca, M. J. V.; *LWT-Food Science and Technology*. **2008**, 41(8), 1521-1527.
22. Malenčić, D.; Maksimović, Z.; Popović, M.; Miladinović, J.; *Bioresource technology*. **2008**, 99(14), 6688-6691.

23. Devi, M. A.; Gondi, M.; Sakthivelu, G.; Giridhar, P.; Rajasekaran, T.; Ravishankar, G. A.; *Food Chemistry*. **2009**, 114(3), 771-776.
24. Mujić, I.; Šertović, E.; Jokić, S.; Sarić, Z.; Alibabić, V.; Vidović, S.; Živković, J.; *Croatian Journal of Food Science and Technology*. **2011**, 3(1), 16-20.
25. Yon, P.; Gun, P.; Sunmin P.; *Nutrition research and practice*. **2014**, 8.6, 618-624.
26. Rao, D.E.; Chaitanya K.V.; *Journal of Food Biochemistry*. **2015**, 39.4, 398-408.
27. Rostagno, M.A.; Villares, A.; Guillamón, E.; García-Lafuente, A.; Martínéz, J.A.; *Journal of Chromatography A*. **2009**, v. 1216, p. 2 - 29.
28. Wei, H.; Qiuyin C.; Ronald O. R.; *Carcinogenesis*. **1996**, 17.1, 73-77.
29. Ruiz-Larrea, M. B.; Mohan, A. R.; Paganga, G.; Miller, N. J.; Bolwell, G. P.; Rice-Evans, C. A.; *Free radical research*. **1997**, 26(1), 63-70.
30. Arora, A.; Muraleedharan G. N.; Gale M. S.; *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **1998**, 356.2, 133-141.
31. Lee, C. H.; Yang, L.; Xu, J. Z.; Yeung, S. Y. V.; Huang, Y.; Chen, Z. Y.; *Food Chemistry*. **2005**, 90(4), 735-741.
32. Russo, A.; Cardile, V.; Lombardo, L.; Vanella, L.; Acquaviva, R.; *The Journal of nutritional biochemistry*. **2006**, 17(2), 103-108.
33. Schmid, D.; Zulli, F.; Nissen, H. P.; Prieur, H.; *Cosmet Toiletries*. **2003**, 118,71-74.
34. Fasolo, D.; Bassani, V. L.; Teixeira, H. F.; *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2009**, 64(11), 726-730.
35. Bidone, J.; Zorzi, G. K.; Carvalho, E. L.; Simões, C. M.; Koester, L. S.; Bassani, V. L.; Teixeira, H. F.; *Industrial Crops and Products*. **2014**, 62, 421-429.
36. Leelapornpisid, P. I. M. P. O. R. N.; Kiattisin, K. A. N. O. K. W. A. N.; Jantrawut, P. E. N. S. A. K.; Phrutivorapongkul, A. M. P. A. I.; *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **2014**, 6, 231-236.
37. Macedo, A. S.; Quelhas, S.; Silva, A. M.; Souto, E. B.; *Pharmaceutical development and technology*. **2014**, 19(6), 677-680.
38. Zorzi, G. K.; Carvalho, E. L. S.; Von Poser, G. L.; Teixeira, H. F.; *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **2015**, 25(4), 426-436.
39. Ganesan, P.; Dong-Kug C.; *International journal of nanomedicine*. **2016**, 11, 1987.
40. Zorzi, G. K.; Caregnato, F.; Moreira, J. C. F.; Teixeira, H. F.; Carvalho, E. L. S.; *AAPS PharmSciTech*. **2016**, v. 17, p. 844 - 850.
41. Gupta, S.; Bansal, R.; Gupta, S.; Jindal, N.; Jindal, A.; *Indian dermatology online journal*. **2013**, 4(4), 267.

42. Nemitz, M.C.; Yatsu, F. K. J.; Bidone, J.; Koester, L.S.; Bassani, V.L.; Garcia, C.V.; Mendez, A. S. L.; von Poser, G.L.; Teixeira, H.F.; *Talanta*. **2015**, *134*, 183 - 193.
43. International Conference on Harmonization (ICH); *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, Q2(R1), 2005.
44. Dresch, M. T. Z.; Rossato, S. B.; Kappel, V. D.; Biegelmeier, R.; Hoff, M. L. M.; Mayorga, P.; Zuanazzi, J. A. S.; Henriques, A. T.; Moreira, J. C. F.; *Anal. Biochem.* **2009**, *385*, 107–114.
45. Balestrin, L. A.; Bidone, J.; Bortolin, R. C., Moresco, K.; Moreira, J. C.; Teixeira, H. F.; *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. **2016**, *163*, 269-276.
46. Lowry, H. O.; Rosebrough, N. J.; Farr, L. A.; Randall, R.; *The Journal of Biological Chemistry*. **2009**, *193*, 265-275.
47. Levine, R.L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 464–478.
48. Ellman, G. L.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70–77.
49. Draper, H. H.; Hadley, M.; *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 421–431.
50. Ávila, M. R.; Braccini, A. L; Albrecht, L. P.; Scapim, C. A.; Mandarino, J. C. G.; BAZO, G. L.; Cabral, Y. C. F.; *Revista Brasileira de Sementes*. **2011**, v. 33, p. 149 - 161.
51. Shabir, G.A.; *Journal of Chromatography A*. **2003**, v. 987, p. 57 – 66.
52. Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; Dolan, J.W.; *John Wiley & Sons, Inc.*, **2010**, pp. 957.
53. Heimler, D.; Vignolini, P.; Galardi, C.; Pinelli, P.; Romani, A.; *Chromatographia*. **2004**, v. 59, p. 361 - 365.
54. Lambers, H.; Piessens, S.; Bloem, A.; Pronk H.; Finkel, P.; *International Journal of Cosmetic Science*. **2006**, v. 28, p. 359 - 370.
55. Li, L. C.; Tian, Y.; *Em Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*; 2nd ed.; James, S.; James, C. B., eds.; Marcel Dekker Inc.: New York, **2002**.
56. Schuh, R.S.; Bruxel, F.; Teixeira, H.F.; *Quimica Nova*. **2014**, v. 37, n. 7, p.1193 - 1198.
57. Getie, M.; Gebre-Mariam, T.; Rietz, R.; Neubert, R. H. H.; *Pharmazie*. **2002**, v. 57, p. 320-322.
58. Pagliara, A.; Reist, M.; Geinoz, S.; Carrupt, P.A.; Teste, B.; *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **1999**, V. 51, p.1339-1357.
59. Santoyo, S.; Arellano, A.; Ygartua, P.; Martín, C.; *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. **1996**, V. 71, p. 141-146.
60. Bemvindo, C. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2006.

61. Godin, B.; Touitou, E.; *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2007**, v. 59, p. 1152 – 1161.
62. Sonnevile-Auburn, O.; Simonnet, J.-T.; L'Alloret, F.; *Advances in Colloid and Interface Science*. **2004**, v. 108, p. 145-149.
63. Martins, M. R. F. M.; Veiga, F.; *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. **2002**, v. 38, n. 1, p. 33-54.
64. Schmid, D.; Zulli, F.; *Cosmet Toiletries*. **2002**, 117,45–50.
65. De Perez, D.; Leighton, F.; Aspee, A.; Aliaga, C.; Lissi, E.; *Biological Research*. **2000**, v. 33, n.2: p.71-77.
66. 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.A.; Fonseca, M.J.V.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, 69, 948-957.
67. Palm, M. D.; O`donoghue, M. N.; *Dermatol Ther.* **2007**, 20, 360-76.
68. Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Giustarini, D.; Milzani, A.; Colombo, R.; *Clinica Chimica Acta*. **2003**, 329, 23–38.
69. Deneke, S. M.; *Current Topics in Cellular Regulation*. **2000**, 36, 151-180.
70. Antolovich, M.; Prenzler, P.D.; Patsalides, E.; McDonald, S.; Robards, K.; *The Analyst*. **2002**, 127, 183–198.
71. Kao, T. H.; Chen, B. H.; *J Agric Food Chem*. **2006**, 54(20), 7544-55.
72. Chaturvedi, S.; Hemamalini, R.; Khare, S., K.; *Annals of Phytomedicine*. **2012**, 1(1), 62-68.
73. Georgetti, S. R.; Casagrande, R.; Verri, Jr. W. A.; Lopez, R. F. V.; Fonseca, M. J. V.; *International Journal of Pharmaceutics*. **2008**, 352, 189–196.

ANEXO 1

NORMAS E INSTRUÇÕES AOS AUTORES (QUÍMICA NOVA)

1. GERAL

Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos em Português, Inglês e Espanhol, que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico (clique [aqui](#) para acessar as normas de restrição). Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

Artigos Originais: refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo as seções *Introdução*, *Parte Experimental*, *Resultados e Discussão*, *Conclusão e Referências*, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros elementos.

Artigos sobre Educação: trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de graduação em Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, e outros elementos.

Notas Técnicas: trabalhos de comunicação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito, desde que apresentem acentuado conteúdo químico. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo as seções *Introdução*, *Parte Experimental*, *Resultados e Discussão*, *Conclusão e Referências*, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc.

Assuntos Gerais: abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química, etc. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros elementos.

Artigos de Revisão: destinados à apresentação do progresso em uma área específica de Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros elementos.

Para submeter um artigo de Revisão, é imprescindível que o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação na referida área. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, para quimicanova@sbq.org.br, um resumo da revisão pretendida, acompanhado de uma carta explicativa da pertinência do trabalho e lista de publicações do autor na área em que pretende publicar. O material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o envio do manuscrito completo, dentro das normas de QN, e só então será dado início ao processo de avaliação pelos assessores. O aceite da submissão não garante a publicação do manuscrito, que passará pelo processo formal de avaliação equivalente ao das outras modalidades.

2. ANTES DA SUBMISSÃO

2.1 Direitos autorais

Ao submeter um manuscrito à revista Química Nova, assume-se que ele não foi publicado previamente, que não está sob processo de avaliação por outra entidade e que não será

publicado simultaneamente em outro veículo de divulgação, no mesmo formato, sem a permissão por escrito dos Editores. Além disso, subentende-se que o autor responsável pela submissão tem o consentimento de todos os outros autores. Os autores também concordam que os direitos autorais do manuscrito serão transferidos para a Sociedade Brasileira de Química (SBQ), caso o manuscrito seja aceito para publicação. Manuscritos aceitos e ilustrações se tornarão propriedades da SBQ.

2.2 Organização do manuscrito

Os manuscritos deverão apresentar clareza e concisão. A seção *Introdução* deverá identificar de forma clara e breve, utilizando-se de referências relevantes, a natureza do problema sob investigação e o conhecimento prévio a respeito dele. Revisões extensas da literatura não serão aceitas.

A seção *Parte Experimental* pode preceder ou vir após a seção *Resultados e Discussão*, mas devem ser necessariamente separadas. A seção *Conclusões*, que resumirá brevemente as principais conclusões do trabalho, deverá ser disposta logo após a seção *Resultados e Discussão*.

A parte experimental do manuscrito deve descrever os experimentos de maneira suficientemente detalhada para que outros pesquisadores possam reproduzi-los. O grau de pureza dos materiais utilizados deve ser fornecido, bem como todas as quantidades utilizadas. A descrição de procedimentos já estabelecidos não é necessária. A instrumentação utilizada só deve ser descrita caso não seja padrão. Deve-se referir a instrumentos disponíveis comercialmente a partir de suas marcas e modelos.

Todos os compostos novos devem ser completamente caracterizados, incluindo dados espectroscópicos e análises elementares. Espectros de massas de alta resolução poderão substituir análises elementares caso sejam acompanhados de provas inquestionáveis da pureza da amostra (pontos de fusão, cópias dos espectros RMN, etc.). Para compostos sintetizados em formas enantiomericamente puras ou enantiomericamente enriquecidas, sua rotação específica deverá ser fornecida. Nos casos em que o excesso enantiomérico for determinado por técnicas cromatográficas e/ou espectroscópicas, as cópias dos cromatogramas e/ou espectros devem ser inclusas no Material Suplementar (ver seção *Material Suplementar*).

Muitas publicações de Química Teórica e/ou Computacional utilizam rotinas baseadas em métodos bem documentados, sejam semi-empíricos ou *ab initio*. Neste caso é suficiente citar a variante utilizada, referindo-se a publicações importantes nas quais os métodos foram desenvolvidos, e o programa de computador utilizado, indicando brevemente as modificações realizadas pelo autor.

É de responsabilidade dos autores a obtenção de permissões para reprodução de gráficos e imagens retiradas de outros periódicos. Essas permissões para reprodução devem ser enviadas no momento da submissão, juntamente com os outros arquivos do manuscrito. A reprodução deve também ser informada nas respectivas legendas.

Os Editores poderão solicitar a revisão do idioma do manuscrito em qualquer etapa do processo de avaliação do manuscrito. Neste caso, os autores deverão apresentar um certificado de revisão por empresa/profissional especializado, que deve ser submetido pela plataforma ScholarOne no momento da submissão da versão revisada do manuscrito.

2.3 Preparo dos manuscritos

Geral

Deve-se utilizar a fonte Times New Roman, tamanho de 12 pt e cor preta. O espaçamento entre linhas deve ser de 1,5×. As páginas devem ser numeradas consecutivamente, no canto inferior direito. As linhas e os títulos e subtítulos das seções não devem ser

enumerados. Os títulos das seções devem ser escritos em negrito e caixa alta, os subtítulos apenas em negrito e os subsubtítulos apenas em itálico.

O Material Suplementar deve ser o último elemento do manuscrito, e deve conter informações relevantes e complementares àquelas já apresentadas no manuscrito (ver seção Material Suplementar).

Detalhes

A primeira página deverá conter o *graphical abstract* (ver seção *Graphical Abstract*), título do trabalho, em negrito e caixa alta, nome dos autores em negrito e endereço. Se o endereço onde o trabalho foi conduzido é diferente do endereço atual de qualquer um dos autores, uma nota de rodapé indicando a posição atual pode ser incluída. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão ser listados em sequência e indicados utilizando-se letras sequenciais.

Um exemplo:

José A. Benício^a, Maria C. Cavalcante^b e João D. de Almeida^{a,*}

^aDepartamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá - PR, Brasil

^bDepartamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-000 São Paulo - SP, Brasil

*e-mail: jalmeida@dq.uem.br

Como mostra o exemplo, o autor para correspondência deverá ser indicado com asterisco (*) e seu e-mail colocado logo abaixo dos endereços. A menor unidade do endereço deve ser o departamento. Em seguida devem ser indicados a faculdade/instituto, a universidade, o CEP, a cidade, o estado e o país. Laboratórios, programas de pós-graduação e cursos não devem ser inclusos no endereço. A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho, ambos em inglês, com no máximo 200 (duzentas) palavras, e a indicação de 3 a 5 palavras-chave (keywords), também em inglês. O texto deve se iniciar a partir da terceira página do manuscrito. Ao longo do texto, o autor deve se atentar às seguintes regras:

Palavras em língua estrangeira (inglês, francês, latim, etc.) deverão ser escritas em itálico.

Nomes científicos de espécies devem ser escritos em itálico, com a primeira letra do nome em caixa alta.

Alguns exemplos:

... os experimentos foram realizados *in situ*;
A bactéria *Escherichia coli*...

O tratamento dos dados foi realizado a partir do *software* Origin;

Todas as unidades devem ser separadas dos valores por um espaço simples (inclusive o grau Celsius). A mesma regra é válida para o caso de unidades em sequência.

Alguns exemplos:

10 °C;

15 mg L⁻¹ (evitar mg/L);

10 m s⁻² (evitar m/s²);

Atenção: Toda a nomenclatura utilizada deverá ser consistente, clara e de acordo com as regras estabelecidas por entidades apropriadas, como IUPAC, *International Union of Biochemistry, Abstracts Service, Nomenclature Committee of the American Chemical Society*, entre outras. Símbolos e unidades deverão seguir as recomendações da IUPAC. Os autores devem evitar o uso de unidades que não fazem parte do SI.

Normas para elementos gráficos e tabelas

Gráficos e Figuras: textos, nomes dos eixos e quaisquer outros elementos textuais que acompanham os elementos gráficos devem ser consistentes ao longo de todo o trabalho

em relação à fonte, ao tamanho da fonte, ao espaçamento e à cor. Para elementos gerados por computador, deve-se evitar planos de fundo ou sombreado.

Fórmulas estruturais e equações químicas: todas as estruturas químicas ou equações devem ser escritas utilizando a mesma fonte ao longo do manuscrito.

Equações: as equações devem ser escritas utilizando-se um editor de equações (MathType, Equation, entre outros) e devem ser numeradas sequencialmente ao longo do manuscrito.

Fotografias: As fotografias devem apresentar contraste e não devem ser montagens. Caso haja necessidade de uma escala, ela deve ser desenhada sobre a figura e não abaixo. Não serão aceitas fotografias de equipamentos comerciais.

Tabelas: as tabelas devem ser formatadas de modo a fornecer informações diretas ao leitor. Sombreamentos e negritos devem ser evitados. Qualquer informação extra deve vir abaixo da tabela, na forma de nota de rodapé, utilizando-se as letras a, b, c e assim por diante.

Graphical abstract (em inglês): O *graphical abstract* deve resumir o conteúdo do trabalho de forma concisa e dedicada a capturar a atenção de um público amplo. O autor deve apresentar uma figura nova, usando como parâmetro uma estrutura chave, uma reação, uma equação, um conceito, um gráfico, um teorema, entre outras possibilidades. Recomenda-se que seja de caráter artístico e possua cores diversas. Não serão aceitas fotos de equipamentos comerciais.

Atenção: a imagem deve possuir alta resolução (em formato .tiff, .jpg ou qualquer outro de ampla utilização que possa ser editado) e tamanho de 4 cm de altura por 8 cm de largura [os elementos textuais devem ser legíveis nessas dimensões]. Junto com o *graphical abstract*, o autor deverá enviar um texto explicativo em inglês (em arquivo .txt, .rtf ou .doc) de, no máximo, 3 linhas.

Normas para citações e lista de referências

Os elementos gráficos e as tabelas devem ser numeradas e citadas no texto, utilizando-se a primeira letra em caixa alta. Não se deve abreviar as citações.

Alguns exemplos:

... como pode ser verificado na Tabela 1.
A Figura 3 mostra o sistema utilizado...

(*Tab. 1, Fig. 1 e quaisquer outras abreviações dos títulos dos elementos não devem ser utilizadas*)

As citações de referências devem ser feitas de forma consecutiva, na forma numérica sobrescrita (sem parênteses ou colchetes), sempre após a pontuação, quando houver. Citações de duas ou mais referências devem ser separadas por vírgulas. Citações de três ou mais referências consecutivas devem ser agrupadas, utilizando-se o hífen (-). Não utilizar espaços entre as citações ou entre a citação e o caractere sobre o qual está posicionada.

A Química Nova não publica notas de rodapé. Quaisquer notas do autor devem ser incluídas na lista de referências e, no texto, devem seguir o mesmo padrão das citações, mantendo inclusive a sequência numérica.

Alguns exemplos:

Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura.^{3,7,8}
Existe extensa literatura a respeito do sistema utilizado,⁹⁻¹² bem como das propriedades dos materiais empregados.¹³
salicilato de sódio,¹⁻³

Nishide *et al.*⁴
... pela redução do ácido crômico,^{4-8,12}

(*Três ou mais referências consecutivas devem ser citadas utilizando-se o hífen*)

Na seção Referências, as abreviações dos títulos de periódicos devem estar de acordo com as definidas no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://cassi.cas.org>). Caso o periódico não esteja listado no CASSI, o título deve ser escrito por extenso.

As normas para o ano, o volume e as páginas seguem abaixo para diversos tipos de literaturas. A pontuação, os espaçamentos, os negritos e os itálicos devem ser verificados com atenção. Manuscritos com referências fora das normas da revista serão reenviados ao autor até que os erros sejam verificados e corrigidos.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 518.
2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue: Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zadev.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, *19*, 708. (CA 85:78051s).
3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar DOI da seguinte maneira:

Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

4. É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte: Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, *147*, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 473.

Patentes:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 79 73,771 **1979**. (CA 91:P193174v)
6. Kadin, S.B.; *US pat.* 4,730,004 **1988**. (CA 110:P23729y)
7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T.; *Br PI* 9.604.468-3, **1999**.

Livros:

com _____ *editor(es):*

8. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

sem _____ *editor(es):*

9. Cotton, F. A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Programas de computação (Softwares):

10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

Teses:

11. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

Material apresentado em Congressos:

12. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas Internet:

<http://www.sbq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo.
Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem.*

Soc., submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Manuscritos contendo RMN, IV, espectros de massas, etc.

Sempre que um composto é sintetizado ou identificado (novo ou conhecido previamente), é obrigatório o envio de todos os dados espectrais (dados e espectros) como Material Suplementar (ver seção Material Suplementar) no momento da submissão do manuscrito.

Material Suplementar

Esta modalidade foi criada para que o texto principal seja objetivo e contenha o número estritamente necessário de Figuras e Tabelas.

O conteúdo do Material Suplementar (MS) deverá ser colocado no final do trabalho, após a seção REFERÊNCIAS. Quando houver MS, deve ser criada uma seção MATERIAL SUPLEMENTAR, logo após a seção CONCLUSÃO, com a descrição de seu conteúdo. O texto deve também indicar o acesso livre ao MS a partir do website da revista Química Nova (<http://quimicanova.sbq.org.br/>).

Elementos gráficos e Tabelas do Material Suplementar devem ser numeradas sequencialmente, com a letra S após a numeração. Ex: Figura 1S, Tabela 4S, etc.

Apesar de complementar a informação do manuscrito, o MS deve ser um documento completo. Caso sejam usadas referências, elas devem ser listadas ao final do próprio MS e numeradas na forma 1S, 2S, ...

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.

3. DURANTE A SUBMISSÃO

A QN oferece aos autores apenas submissão on line.

Todos os autores devem ter seus nomes introduzidos na plataforma, portanto, durante a submissão, preencha os campos necessários informando o endereço de e-mails dos coautores.

Na plataforma ScholarOne-QN é necessário fazer o *upload*, SEPARADAMENTE, dos seguintes materiais:

1. *Main document* (full.doc), incluindo todas as figuras, tabelas e respectivas legendas, as quais devem ser inseridas após a primeira citação. Esse arquivo deve ser feito utilizando, necessariamente, o modelodisponível para *download*. No caso do manuscrito conter Material Suplementar, esse deve ser adicionado no final do *main document*.
2. Todos os arquivos originais de figuras, incluindo o *graphical abstract*, em jpg, tiff, opj, xls, cdx, etc. Por exemplo, se o manuscrito contiver 6 figuras, é necessário fazer o upload dos 6 arquivos originais (opj, xls, tiff, etc.) e também o *main document* com as figuras inclusas.

Observação:

- No caso da figura ser um arquivo de imagem, esse precisa ter alta resolução (mínimo de 300 dpi);
- Por favor, não envie as figuras inseridas num arquivo .doc, envie todos os arquivos originais (opj, xls, tiff, etc.). Isso irá acelerar a avaliação de seu manuscrito e o processo de publicação, no caso de o manuscrito ser aceito.

Atenção: apesar de a versão online da revista ser colorida, as impressões são feitas em preto e branco (exceto pelos *graphical abstracts*). Ao produzir as figuras, os autores devem ter em mente que estas serão convertidas no momento da impressão, evitando assim possível perda de informações baseadas unicamente nas cores.

3. Um único arquivo .doc ou .docx contendo todas as tabelas;
4. Arquivos originais das figuras do Material Suplementar.

A Editoria de QN reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou tornar seu estilo mais claro, respeitando, naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que seja a natureza do manuscrito submetido, ele deve ser original em nível de metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho poderá ser atestada por consultor(es) ad hoc, indicados pela Editoria.