

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**NANOCARREADORES BIOPOLIMÉRICOS DE  
ISOFLAVONAS DE SOJA E ÓLEOS ESSENCIAIS:  
POTENCIAL DERMOCOSMÉTICO, FOTOPROTETIVO E  
ANTIMICROBIANO**

**Eduarda Oliveira dos Santos**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

**Orientador: Dr. Prof. Moacir Rossi Forim**

**São Carlos – SP**  
**2023**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Eduarda Oliveira dos Santos, realizada em 08/12/2023.

**Comissão Julgadora:**

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim (UFSCar)

Profa. Dra. Janaina Brandão Seibert (ESALQ/USP)

Prof. Dr. João Batista Fernandes (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

## DEDICATÓRIAS

Dedico esta dissertação à minha família, cujo apoio incondicional e amor constante foram a força propulsora que me impulsionou durante esta jornada acadêmica. Agradeço por serem a minha fonte de inspiração, por compartilharem as alegrias e desafios deste percurso e o pelo incentivo constante.

À minha mãe, Margareth Lima Oliveira, que sempre foi meu exemplo de pessoa forte e dedicada, que nunca me deixou desistir e que sempre estava disponível para ficar horas e horas me ouvindo reclamar.

Ao meu pai, José Antônio Pinheiro dos Santos, homem que apesar das circunstâncias nunca deixou se abater e que nunca impôs limites para os objetivos que posso atingir.

Ao meu irmão, Anderson Felipe Oliveira dos Santos, que sempre pergunta quando eu vou pra casa.

Ao meu avô, Domingos Fernandes de Oliveira (*in memoriam*).

**Essa conquista é também de vocês.**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Margareth e José, que não pouparam esforços para que eu pudesse realizar meu sonho.

Ao Prof. Dr. Moacir Rossi Forim pelos ensinamentos, orientação e paciência.

A Dr<sup>a</sup>. Janaína Brandão Seibert, pelos finais de semana que se dispôs a me ensinar e aconselhar. Sem você esse trabalho não teria saído do papel.

A Karine, pelo auxílio e amizade ao longo desses dois anos.

Ao Prof. Dr Filipe Vieira. Por disponibilizar o espaço e insumos para os ensaios em células.

A Prof. Dr<sup>a</sup> Marisa Fernandes do departamento de fisiologia da UFSCAR por disponibilizar o seu laboratório para ensaios espectrofotométricos.

Ao Jesus David pelos conselhos e ensinamentos em análises de GC-MS.

Ao Carlos André que me ensinou e auxiliou nas análises de LC-MS

Ao Luiz Guillermo pelo auxílio e paciência durante as etapas de doseamento e formulação.

Ao Artur, pelos ensinamentos em cromatografia, doses concentradas de conselhos e sabedoria, e pelo enorme carinho e companheirismo nesses anos.

As minhas amigas, Lullie, sem ela eu não teria tido a coragem de sair do interior do Goiás para o interior de São Paulo, e Larissa por quem adquiri um carinho imenso.

E evitando o risco de esquecer algum nome, agradeço a todos os meus amigos e colegas do laboratório de produtos naturais da Universidade Federal de São Carlos, cujo momentos de aprendizado e diversão foram essenciais no meu crescimento profissional, acadêmico e pessoal.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização desse trabalho.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>CME</b>	Concentração mínima efetiva
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentração efetiva a 50%
<b>UHPLC</b>	<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>ESI</b>	<i>Electrospray ionization</i>
<b>QTOF-MS</b>	<i>Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
<b>HPLC-UV Detector</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet Detector</i>
<b>HPLC-DAD Detector</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector</i>
<b>GC-MS</b>	<i>Gas chromatography-Mass spectrometry</i>
<b>NPPT</b>	Nanoprecipitação do polímero pré-formado
<b>EDS</b>	Extrato Desengordurado de Soja
<b>OEGe</b>	Óleo essencial de gerânio ( <i>Pelargonium graveolens</i> )
<b>OETa</b>	Óleo essencial de tangerina ( <i>Citrus reticulata</i> )
<b>OECa</b>	Óleo essencial de cedro atlas ( <i>Cedrus atlântica</i> )
<b>FPS</b>	Fator de proteção solar
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
<b>ES1</b>	Extrato de soja preparado em EtOH:H <sub>2</sub> O 80%

<b>ES2</b>	Extrato de soja preparado em EtOH Cer.:H <sub>2</sub> O 80%
<b>ES3</b>	Extrato de soja preparado EtOH:DMSO 80%
<b>ES4</b>	Extrato de soja preparado EtOH Cer.:DMSO 80%
<b>ES5</b>	Extrato de soja preparado i-PrOH:H <sub>2</sub> O 80%
<b>ES6</b>	Extrato de soja preparado i-PrOH:DMSO 80%
<b>ES7</b>	Extrato de soja preparado EtOH:MEC 80%
<b>ES8</b>	Extrato de soja preparado AcOEt 100%
<b>EtOH</b>	Etanol absoluto
<b>EtOH Cer.</b>	Álcool de cereais
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>i-PrOH</b>	Isopropanol
<b>MEC</b>	Metil Etil Cetona
<b>AcOEt</b>	Acetato de etila
<b>SPE</b>	<i>Solid phase extraction</i> (Extração em Fase Sólida)
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória a 50%
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>CBM</b>	Concentração bactericida mínima
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colônia

<b>CC</b>	Controle de coloração;
<b>CM</b>	Controle do meio de cultura
<b>CN</b>	Controle negativo
<b>CP</b>	Controle positivo
<b>CN</b>	Controle negativo
<b>CS</b>	Controle de surfactante
<b>TTC</b>	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
<b>EE</b>	Espectro de resposta eritemal,
<b>I</b>	Espectro de intensidade solar
<b>Abs</b>	Absorbância
<b>CF</b>	Fator de correção



## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Classificação de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes segundo a ANVISA (2023).....	22
<b>TABELA 2:</b> Composição média dos grãos de <i>G. max</i> .....	31
<b>TABELA 3:</b> Principais óleos essenciais no mercado mundial .....	37
<b>TABELA 4:</b> Fontes principais de óleo essenciais em famílias botânicas .....	39
<b>TABELA 5:</b> Descrição óleos essenciais segundo fornecedor comercial.....	52
<b>TABELA 6:</b> Condições de extração de isoflavonas em sementes de soja .....	54
<b>TABELA 7:</b> Produto $EE \times I$ normalizado para o cálculo de FPS <i>in vitro</i> .....	60
<b>TABELA 8:</b> Preparo da curva de calibração de ácido gálico frente ao reagente Folin-Ciocalteu.....	62
<b>TABELA 9:</b> Preparo das amostras para determinação da concentração de inibição de 50% do radical DPPH.....	64
<b>TABELA 10:</b> Gradiente de eluição para análise em HPLC-DAD/UV das isoflavonas de <i>G. max</i> . .....	68
<b>TABELA 11:</b> Pontos das curvas analíticas preparadas.....	69
<b>TABELA 12:</b> Programação da rampa de temperatura para análise dos voláteis de óleos essenciais por GC-MS. ....	70

<b>TABELA 13:</b> Composição das fases para preparação de nanocápsulas pelo método de nanoprecipitação.....	71
<b>TABELA 14:</b> Massas obtidas das extrações de grãos de <i>G. max.</i> ....	77
<b>TABELA 15:</b> Atividade antimicrobiana de extratos de grãos de <i>G. max.</i> .....	82
<b>TABELA 16:</b> Atividade antimicrobiana de extratos de óleos essenciais comerciais. ....	84
<b>TABELA 17:</b> Atividade antimicrobiana quantitativa de óleos essenciais comerciais.....	88
<b>TABELA 18:</b> Valores de concentração mínima efetiva (CME) para atividade fotoprotetiva <i>in vitro</i> de padrões comerciais de isoflavonas de soja. Letras diferentes representam uma diferença estatística a 95% de certeza. Valores de efetividades calculados para um fator de proteção solar = 6, segundo a resolução RDC N° 629 de 2022. ....	92
<b>TABELA 19:</b> Valores de concentração mínima efetiva para atividade fotoprotetiva <i>in vitro</i> de extratos de soja. Letras diferentes representam uma diferença estatística a 95% ( $\alpha = 0,05$ ) de certeza. Valores de efetividades calculados para um fator de proteção solar = 6, segundo a resolução RDC N° 629 de 2022 .....	93
<b>TABELA 20:</b> Valores de concentração mínima efetiva para atividade fotoprotetiva <i>in vitro</i> de óleos essenciais comerciais. Letras diferentes representam uma diferença estatística a 95% de certeza. Valores de efetividades calculados para um fator de proteção solar = 6 , segundo a resolução RDC N° 629 de 2022 .....	96
<b>TABELA 21:</b> Teor de fenólicos totais para extratos de <i>G. max</i> e padrões de isoflavonas. ....	101
<b>TABELA 22:</b> Teor de fenólicos totais para extratos óleos essenciais. ....	103
<b>TABELA 23:</b> Atividade antioxidante pela redução do radical DDPH de extratos de <i>G. max.</i> .....	104
<b>TABELA 24:</b> Resultado dos testes de citotoxicidade de extratos de <i>G. max</i> e óleos essenciais frente a linhagem MRC-5. ....	106

<b>TABELA 25:</b> Íons diagnósticos de isoflavonas em extratos de <i>G. max</i> obtidos em UHPLC-ESI-QTOF-MS no modo positivo. ....	111
<b>TABELA 26:</b> Tempos de retenção no gradiente de eluição realizado em HPLC-UV de uma mistura das isoflavonas 1-6.....	109
<b>TABELA 27:</b> Doseamento de isoflavonas agliconas em extrato de <i>G. max</i> . ....	121
<b>TABELA 28:</b> Dados das curvas analíticas para doseamento de isoflavonas.....	121
<b>TABELA 29:</b> Componentes voláteis de óleo essencial de Gerânio ( <i>Pelargonium graviolens</i> ) obtidos por análise em GC-MS. ....	124
<b>TABELA 30:</b> Componentes voláteis de óleo essencial de Cedro Atlas ( <i>Cedrus Atlantica</i> ) obtidos por análise em GC-MS. ....	126
<b>TABELA 31:</b> Componentes voláteis de óleo essencial de Tangerina ( <i>Citrus reticulata</i> ) obtidos por análise em GC-MS. ....	127
<b>TABELA 32:</b> Medidas de diâmetro de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta para as preparações de nanopartículas em suspensão coloidal e do material sólido seco por aspersão atômica .....	132
<b>TABELA 33:</b> Cálculos da eficiência de encapsulamento em função das isoflavonas de <i>G. max</i> . ....	134

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Estrutura química de agentes nocivos à saúde humana e ambiental presentes em cosméticos. .... 24
- FIGURA 2:** Ranking dos valores de produção de diferentes tipos de agriculturas no Brasil ..... 30
- FIGURA 3:** Estrutura das isoflavonas encontrada na soja..... 33
- FIGURA 4:** Nódulos ativos na raiz de soja..... 34
- FIGURA 5:** Via geral de biossíntese de terpenos em plantas. .... 38
- FIGURA 6:** Ação antioxidante de substâncias encontradas em óleos essenciais. **A:** Redução do radical ROO pelo hidrogênio fenólico do timol.; **B:** Redução do radical ROO pela autooxidação do cumeno.; **C:** Redução do radical ROO pela formação de ROOH a partir do  $\gamma$ -terpineno..... 40
- FIGURA 7:** Nanopartículas poliméricas. **A:** estrutura representativa de uma nanocápsula com o ativo disperso no interior lipídico envolto por uma camada de polimérica; **B:** estrutura representativa de uma nanoesfera, com o ativo disperso em uma matriz contínua formada pelo polímero.. 42
- FIGURA 8:** Representação da técnica de nanoprecipitação do polímero pré formado para preparo de nanocápsulas ..... 43
- FIGURA 9:** Estrutura química da policaprolactona..... 45
- FIGURA 10:** Representação esquemática da cromatografia líquida de alta eficiência ..... 46
- FIGURA 11:** Representação esquemática da cromatografia gasosa acoplada a um analisador de massas ..... 48
- FIGURA 12:** Fluxograma de etapas adotado..... 51
- FIGURA 13:** Preparo de amostras por diluição seriada (1:2) para determinação quantitativa da atividade antimicrobiana..... 56

- FIGURA 14:** Preparo das placas de inoculação para teste quantitativo de atividade antimicrobiana. .... 57
- FIGURA 15:** (A): Reação de oxidorredução do reagente de viabilidade TCC que ocorre em tecidos vivos devido a ação de desidrogenases; (B) Placa de 96 poços inoculada com microrganismo, demonstrando a conversão do reagente de incolor (não há viabilidade celular visível) para rosa/vermelho (onde é possível visualizar células viáveis). .... 58
- FIGURA 16:** Valores de concentrações testadas para os extratos da semente de *G. max*, dos padrões de isoflavonas e óleos essenciais OEGe, OECa e OETa. .... 61
- FIGURA 17:** Reação de compostos fenólicos (exemplificado pelo ácido gálico) com o complexo de molibdato no reagente de Folin-Ciocalteu. A solução inicial de coloração amarela é convertida para azul com a redução de molibdato<sup>6+</sup> para molibdato<sup>5+</sup>. .. 62
- FIGURA 18:** Preparo das amostras de extrato de *G. max* e óleos essenciais em placa de 96 poços para determinação da atividade citotóxica. .... 65
- FIGURA 19:** Fluxograma de preparo de nanocápsulas segundo o método de nanoprecipitação..... 71
- FIGURA 20:** Resultados teste antimicrobiano qualitativo demonstrando os halos de inibição ao redor da aplicação de amostra. **A:** OEGe ativo contra *S. aureus*; **B:** OEGe ativo contra *S. epidermidis*; **C:** OEGe ativo contra *C. albicans*; **D:** ES2 inativo contra *S. epidermidis*..... 85
- FIGURA 21:** Curvas de viabilidade celular de microrganismos frente a óleos essenciais evidenciando os valores de CI<sub>50</sub>, onde a viabilidade celular é de 50%. OEGe: Óleo essencial de gerânio; OECa: Óleo essencial de cedro atlas; OETa: Óleo essencial de tangerina ..... 86
- FIGURA 22:** Teste antimicrobiano quantitativo demonstrando as concentrações de inibição mínima. A1 e A2: **OEGe** frente a *S. aureus* e *S. epidermidis*; B:OECa frente a *S. epidermidis*; C:OETa frente a *S. epidermidis*. A mudança de coloração nos poços... 87

<b>FIGURA 23:</b> Mecanismo de ação de filtros solares inorgânicos e orgânicos.....	89
<b>FIGURA 24:</b> Delocalização eletrônica que fornece estabilidade ao estado excitado dos filtros UVA/UVB ácido 4- aminobenzóico e benzofenona-3 .....	90
<b>FIGURA 25:</b> Estabilização da genisteína segundo delocalização de carga.....	92
<b>FIGURA 26:</b> Comparação entre os valores de FPS medidos <i>in vitro</i> para <b>A:</b> padrões de isoflavonas e <b>B:</b> extratos de <i>G. max</i> em diferentes solventes. ....	93
<b>FIGURA 27:</b> Comparação entre os valores de FPS medidos <i>in vitro</i> para os óleos essenciais <b>OEGe:</b> Gerânio; <b>OECa:</b> Cedro atlas; <b>OETa:</b> Tangerina .....	95
<b>FIGURA 28:</b> Reação do radical DPPH com uma molécula de isoflavona pela transferência de um elétron, formando uma hidrazina de coloração laranja.....	101
<b>FIGURA 29:</b> Estruturas de ressonância para uma molécula de isoflavona após a perda de um elétron do oxigênio fenólico.....	101
<b>FIGURA 30:</b> Reação de conversão do reagente MTT de coloração amarelada em seu homólogo violeta pela ação de oxido-redutases.....	103
<b>FIGURA 31:</b> Mecanismos de fragmentação comuns do núcleo de isoflavonas em análises por espectrometria de massas. <b>I:</b> fragmentação do tipo retro Diels-Alder, formando um dieno ( <b>A</b> ) e o dienófilo ( <b>B</b> ); <b>II:</b> perda consecutiva de duas moléculas de CO do anel central ( <b>C</b> ) por um rearranjo de hidrogênio. R1=R2=H para daidzeína; R1=OH para genisteína e gliciteína; R2=OHCH <sub>3</sub> para a gliciteína; R2= OH para genisteína .....	108
<b>FIGURA 32:</b> Padrões de fragmentos atribuídos a daidzeína por UHPLC-ESI-QTOF-MS em modo positivo. ....	110
<b>FIGURA 33:</b> Padrões de fragmentos atribuídos a gliciteína por UHPLC-ESI-TOF-MS em modo positivo .....	111

- FIGURA 34:** Padrões de fragmentos atribuídos a genisteína por UHPLC-ESI-TOF-MS em modo positivo. .... 112
- FIGURA 35:** Equilíbrio ácido-base entre as formas protonadas e desprotonadas das isoflavonas, exemplificada pela daidzeína. A presença das duas formas no meio pode gerar alargamento e assimetria de banda. .... 113
- FIGURA 36:** Espectro de varredura de 200 a 400 nm de soluções padrões de isoflavonas de soja obtidos em HPLC-DAD. **1:** Daidzeína; **2:** Daidzina; **3:** Gliciteína; **4:** Glicitina; **5:** Genisteína; **6:** Genistina. .... 114
- FIGURA 37:** Cromatograma obtido para os padrões de isoflavonas a 45 µg/mL em HPLC-UV a 256 nm..... 116
- FIGURA 38:** Cromatograma obtido para uma mistura de padrões de isoflavonas na concentração de 10 µL/mL cada em 256 nm..... 116
- FIGURA 39:** Cromatograma obtido para a amostra **ES3** a 3mg/mL a 256 nm. .... 117
- FIGURA 40:** Cromatograma obtido para a amostra **ES4** a 3mg/mL a 256 nm. .... 117
- FIGURA 41:** Cromatograma obtido para a amostra **ES8** a 3mg/mL a 256 nm. .... 117
- FIGURA 42:** Cromatogramas sobrepostos das amostras **ES3**, **ES4** e **ES8** evidenciando a banda referente a cada isoflavona. .... 117
- FIGURA 43:** Cromatograma de íons totais do óleo essencial de gerânio ..... 121
- FIGURA 44:** Cromatograma de íons totais de óleo essencial de cedro atlas..... 122
- FIGURA 45:** Cromatograma de íons totais de óleo essencial de tangerina. .... 124
- FIGURA 46:** Compostos majoritários indentificados por análise em GC-MS dos óleos essenciais de gerânio (OEGe), cedro atlas (OECa) e tangerina (OETa). .... 125

- FIGURA 47:** Análise da variação de pH ao longo do tempo de suspensões coloidais de nanopartículas preparadas. .... 127
- FIGURA 48:** Medidas de diâmetro de partícula e potencial zeta da suspensão coloidal de nanopartículas carregadas com extrato de *G. max.* .... 129
- FIGURA 49:** Medidas de diâmetro de partícula e potencial zeta da suspensão coloidal de nanopartículas carregadas com óleo essencial de gerânio. .... 130



## RESUMO

NANOCARREADORES BIOPOLIMÉRICOS DE ISOFLAVONAS DE SOJA E ÓLEOS ESSENCIAIS: POTENCIAL DERMOCOSMÉTICO, FOTOPROTETIVO E ANTIMICROBIANO. Com o surgimento de práticas de vida mais saudáveis e conscientes, o mercado de cosméticos sofreu uma grande mudança: reformulação química e planejamento tecnológico. Extratos vegetais e óleos essenciais se destacam, uma vez que seus componentes podem apresentar mais de uma dessas características simultaneamente e atuar de forma sinérgica. A estratégia em converter materiais regulares em formulações em escala nano para cosméticos está na formulação de produtos com alto poder de penetração nas camadas da pele. Dessa forma, esse trabalho tem por objetivo a avaliação do potencial de metabólitos secundários encontrados nas sementes de soja (*Glycine max*) e de óleos essenciais de origem comercial (*Geraniaceae*, *Pinaceae* e *Citreae*) como agentes de aplicação dermocosmética, segundo atividade antimicrobiana, antioxidante e fotoprotetiva, e a produção de nanocápsulas utilizando polímero biodegradável. Para isso, foi realizada a extração quantitativa dos compostos fenólicos de ocorrência restrita em leguminosas (*Fabaceae*), as isoflavonas agliconas daidzeína, gliciteína e genisteína. A identificação e doseamento dos compostos ativos foram obtidos por UHPLC-ESI-QTOF-MS, HPLC-UV/DAD e GC-MS. Por fim, as amostras foram nanoencapsuladas utilizando policaprolactona. A suspensão coloidal obtida foi caracterizada segundo o potencial zeta, pH, diâmetro de partícula e eficiência de encapsulamento e eficiência do processo de secagem por nebulização em *Spraying Dryer*. O extrato de soja preparado utilizando solução EtOH:DMSO 80% com assistência de sonda ultrasônica se mostrou mais eficiente em extrair daidzeína, gliciteína e genisteína ( $58,0 \pm 4,33$ ;  $7,37 \pm 0,575$ ;  $61,9 \pm 4,06$  mg/100 g respectivamente) com melhor

atividade fotoprotetiva (CME =  $0,482 \pm 0,018$  mg/mL) e antioxidante (9,2 mg EAG/100g;  $CI_{50} = 1,36$  mg/mL). Os padrões de daidzeína e genisteína apresentaram melhor atividade fotoprotetiva, quando comparados com o controle de benzofenona. O óleo essencial de gerânio (*Perlagonium graviolens*) se destacou como agente antimicrobiano ( $CI_{50} = 5,63$   $\mu$ L/mL; IS=1,68), o óleo essencial de cedro (*Cedrus atlântica*) como fotoprotetivo (CME = 6,6  $\mu$ g/mL) e o óleo de tangerina (*Citrus reticulata*) como antioxidante (30,9 mg EAG/g). Os componentes majoritários foram identificados como o citronelol para o óleo de gerânio, himacheleno para o óleo de cedro e limoneno para o óleo de tangerina. Os nanocarreadores preparados apresentaram um diâmetro de partícula médio de 300 nm, potencial zeta de -20 mV e IPD entre 0,3 e 0,5, mostrando estabilidade relativa quanto ao potencial hidrogeniônico avaliado. A eficiência de encapsulamento foi determinadas em função das isoflavonas daidzeína e genisteína, com valores acima de 90% e eficiência de secagem de 52%. Esse trabalho mostrou o potencial das isoflavonas de soja e de óleos essenciais como poderosos agentes fotoprotetores e antimicrobianos, assim como a viabilidade de sua incorporação na forma de nanocarreadores, como agentes dermocosméticos em potencial.

Palavras-chave: Fotoproteção. Atividade antimicrobiana. Isoflavonas de soja. Gerânio. Cedro atlas. Tangerina. Óleos essenciais. Nanoencapsulação

## ABSTRACT

BIOPOLYMERIC NANOCARRIERS OF SOY ISOFLAVONES AND ESSENTIAL OILS: DERMOCOSMETIC, PHOTOPROTECTIVE AND ANTIMICROBIAL POTENTIAL. With the emergence of healthier and more conscious lifestyles, the cosmetics market has undergone a significant shift in chemical reformulation and technological planning. Plant extracts and essential oils stand out, as their components can exhibit more than one of these characteristics simultaneously and act synergistically. The strategy of converting regular materials into nano-scale formulations for cosmetics lies in formulating products with a high penetration power into the skin layers. Thus, this study aims to evaluate the potential of secondary metabolites found in soybean seeds (*Glycine max*) and commercially sourced essential oils (*Geraniaceae*, *Pinaceae*, and *Citreae*) as agents for dermocosmetic application, based on antimicrobial, antioxidant, and photoprotective activities, and the production of nanocapsules using biodegradable polymer. For this purpose, quantitative extraction of phenolic compounds restricted to legumes (*Fabaceae*), the aglycone isoflavones daidzein, glycitein, and genistein was performed. The identification and quantification of active compounds were obtained through UHPLC-ESI-QTOF-MS, HPLC-UV/DAD, and GC-MS. Finally, the samples were nanoencapsulated using polycaprolactone. The colloidal suspension obtained was characterized based on zeta potential, pH, particle diameter, and encapsulation efficiency, as well as the efficiency of the spray-drying process. The soy extract prepared using an EtOH:DMSO 80% solution with ultrasound assistance proved to be more efficient in extracting daidzein, glycitein, and genistein ( $58.0 \pm 4.33$ ;  $7.37 \pm 0.575$ ;  $61.9 \pm 4.06$  mg/100 g respectively) with better photoprotective activity (MEC =  $0.482 \pm 0.018$  mg/mL) and antioxidant activity (9.2 mg GAE/100g; IC<sub>50</sub>= 1.36 mg/mL).

Daidzein and genistein standards showed better photoprotective activity compared to the benzophenone control. Geranium essential oil (*Pelargonium graveolens*) stood out as an antimicrobial agent ( $IC_{50}$ = 5.63  $\mu$ L/mL; SI=1.68), cedar essential oil (*Cedrus atlantica*) as a photoprotective agent (MEC = 6.6  $\mu$ g/mL), and tangerine oil (*Citrus reticulata*) as an antioxidant (30.9 mg GAE/g). The major components were identified as citronellol for geranium oil, himachalene for cedar oil, and limonene for tangerine oil. The prepared nanocarriers had an average particle diameter of 300 nm, a zeta potential of -20 mV, and IPD between 0.3 and 0.5, demonstrating relative stability regarding the evaluated hydrogenic potential. The encapsulation efficiency was determined in terms of daidzein and genistein isoflavones, with values above 90%, and a drying efficiency of 52%. This work demonstrated the potential of soy isoflavones and essential oils as powerful photoprotective and antimicrobial agents, as well as the feasibility of their incorporation in the form of nanocarriers as potential dermocosmetic agents.

Keywords: Photoprotection. Antimicrobial activity. Soybean isoflavones. *Pelargonium graveolens*. *Cedrus Atlantica*. *Citrus Reticulata*. Nanoencapsulation.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
2.1. Gerais .....	29
2.2. Específicos .....	29
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>30</b>
3.1. A Soja.....	30
3.2. Óleos essenciais. ....	36
3.3. Nanopartículas poliméricas.....	40
3.4. Polímeros biodegradáveis. ....	44
3.5. <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC) .....	45
3.6. <i>Gas Chromatography</i> (GC). ....	48
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>50</b>
4.1. Material vegetal.....	51
4.2. Preparo do extrato de soja.....	52
4.3. Extração em fase sólida.....	53
4.4. Determinação da atividade antimicrobiana.....	54
4.4.1. Avaliação qualitativa .....	54
4.4.2. Avaliação quantitativa .....	55
4.4.2.1 Determinação do $CI_{50}$ .....	55
4.4.2.2 Determinação da CIM.....	57
4.4.2.3 Determinação da CBM .....	58
4.5. Avaliação do potencial fotoprotetivo <i>in vitro</i> .....	58
4.6. Determinação da atividade antioxidante .....	60
4.6.1. Teor redutor total .....	60
4.6.2. Redução do radical DPPH .....	62

4.7. Avaliação da citotoxicidade .....	63
4.8. Identificação dos ativos.....	65
4.8.1. Isoflavonas de <i>G. max</i> .....	65
4.8.2. Análise em CLAE-UV/DAD .....	66
4.9. Compostos voláteis de óleos essenciais.....	68
4.10. Nanocarreadores.....	69
4.10.1. Preparo dos carreadores biopoliméricos em suspensão coloidal. ....	69
4.10.2. Preparo dos carreadores biopoliméricos em pó.....	71
4.10.3. Caracterização dos carreadores biopoliméricos. ....	71
4.10.3.1. Caracterização da suspensão coloidal.....	71
4.10.3.1.1. pH.....	72
4.10.3.1.2. Diâmetro de partícula e mobilidade Eletroforética.....	72
4.10.3.1.3. Compostos bioativos totais na suspensão Coloidal.....	72
4.10.3.1.4. Compostos bioativos nanoencapsulados .....	73
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
5.1. Extração de isoflavonas de <i>Glycine max</i> .....	74
5.2. Atividade antimicrobiana de extratos de <i>Glycine max</i> e óleos essenciais .....	78
5.2.1. Triagem qualitativa. ....	79
5.2.1.1. Extratos de <i>G. max</i> .....	79
5.2.1.2. Óleos essenciais .....	82
5.2.2. Concentrações inibitórias e bactericidas. ....	84
5.3. Atividade fotoprotetiva de extratos de <i>Glycine max</i> e óleos essenciais. ....	87
5.3.1. Extratos de <i>G. max</i> .....	90

5.3.2. Óleos essenciais. ....	93
5.4. Atividade antioxidante de extratos de <i>Glycine max</i> e óleos essenciais. ....	96
5.4.1. Extratos de <i>G. max</i> . ....	97
5.4.2. óleos essenciais. ....	98
5.5. Capacidade redutora do radical DPPH. ....	99
5.6. Atividade citotóxica de extratos de <i>Glycine max</i> e óleos essenciais ....	101
5.7. Identificação dos analitos. ....	105
5.7.1. UHPLC-ESI-QTOF-MS ....	105
5.7.2. Doseamento de isoflavonas por HPLC-UV/DAD..	112
5.7.3. Compostos voláteis de óleos essenciais comerciais por GC-MS. ....	119
5.8. Caracterização dos carreadores poliméricos. ....	125
5.8.1. pH das suspensões. ....	125
5.8.2. Diâmetro de partícula. ....	126
5.8.3. Potencial zeta ....	127
5.8.4. Índice de polidispersão. ....	129
5.8.5 Eficiência de encapsulamento e secagem ....	130
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>132</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>133</b>
<b>APÊNDICES</b>	

## 1. INTRODUÇÃO

A indústria de cosméticos é responsável pela movimentação de 94 bilhões de dólares mundialmente. O Brasil é considerado o quarto maior consumidor de cosméticos e cuidados pessoais no mundo, atrás apenas de Estados Unidos, China e Japão, e o terceiro maior consumidor de protetor solar, representando uma região em ascensão rápida na área. (ABIHPEC, 2022).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), um cosmético é definido como preparações constituídas por substâncias naturais/sintéticas de uso externo com o objetivo de perfumar, alterar a aparência, proteger ou manter em bom estado uma parte do corpo (ANVISA, 2023a). Produtos dessa categoria são distinguidos segundo a sua proposta. Cosméticos de grau 1, não necessitam de informações detalhadas sobre uso e restrições para sua comercialização, e os de grau 2 propõem melhoria de alguma característica e por isso necessitam de comprovação de eficácia. Na categoria de cosmético grau 2 são inclusos produtos infantis, protetor solar e cremes para acne como descritos na TABELA 1.

TABELA 1: Classificação de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes segundo a ANVISA (2023).

<b>Cosmético e Produto de Cuidado Pessoal</b>	
<b>Grau 1</b>	<b>Grau 2</b>
Maquiagem sem ação fotoprotetora	<b>Produtos infantis</b>
Esmalte	Antitranspirante
Loções para barba	Protetor Solar
Perfume	Creme para acne
Cremes e loções hidratantes	Sabonete Antisséptico

O avanço do mercado de cuidados pessoais tem sofrido mudanças no perfil da demanda de produtos e a necessidade de remodelamento. FONSECA-



SANTOS e colaboradores (2015) apontam que entre as exigências recentes dos consumidores, cosméticos de formulação consideradas ‘naturais’ ou ‘orgânicas’ representam uma prioridade. Essa tendência do setor é pontuada como resultado de mudanças no estilo de vida, gerando a busca de produtos considerados mais saudáveis, seguros e ecologicamente conscientes. É importante citar que o conceito de natural e orgânico descrito remete ao senso comum relacionado à sustentabilidade e baixo impacto no ambiente.

O reposicionamento no mercado envolve a substituição de matérias-primas convencionais, como parabenos e derivados do formol (FIGURA 1), devido a preocupações com sua nocividade (BOM et al., 2019 e 2020). Parabenos, compostos orgânicos preservativos em cosméticos, são alvo de debates sobre segurança humana e ambiental, conforme discutido por RESENDE et al. (2021). A acumulação de parabenos no organismo humano devido à exposição prolongada é notável, mas a extensão dos danos permanece indefinida. Essas considerações impulsionam a formulação de produtos livres de parabenos, mantendo a eficácia sem comprometer a segurança do consumidor.

Os doadores de formaldeído, como o hidroximetilglicinato de sódio (FIGURA 1) constituem outra classe de conservantes em cosméticos. Essas substâncias em contato com fontes de calor e luz liberam formol no meio, reagindo com proteínas bacterianas e interrompendo suas funções vitais. Estudos experimentais entre 2013 e 2019 mostram os efeitos tóxicos da exposição prolongada a formaldeído em vários órgãos como pulmão e cérebro e baseados nas últimas pesquisas do efeito do formol em danos no DNA, é classificado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) como agente carcinogénico do grupo 1 (BALWIERZ et al., 2023).

Além dos insumos que representam riscos para a saúde humana, a utilização de princípios ativos potencialmente prejudiciais ao meio ambiente também está sendo reavaliada. Recentemente, discute-se o acúmulo de espécies fotoreativas em organismos marinhos, levantando preocupações sobre a segurança dos fotoprotetores orgânicos (IMMAMOVIC et al., 2022). O debate em torno da segurança e dos potenciais riscos carcinogênicos desses compostos, associados a fotoalergias e dermatites de contato, carece de consenso na comunidade científica (HEURUNG et al., 2014; BODE e ROH, 2020). Especificamente em ecossistemas marinhos, observa-se que filtros solares contendo benzofenonas e derivados do ácido para-aminobenzóico estão ligados ao branqueamento de corais em regiões costeiras.

Como resultado de discussões no campo científico, alguns órgãos de regulamentação têm limitado ou proibido o uso de formulações cosméticas contendo esses ingredientes. Atualmente a ANVISA não permite o uso de parabenos de cadeia longa e permite o uso de até 5% (m/v) de formaldeído como conservantes. No caso de protetores solares, até 10% de benzofenonas e aminobenzoatos em formulações de protetores solares (ANVISA, 2023b e 2023c).

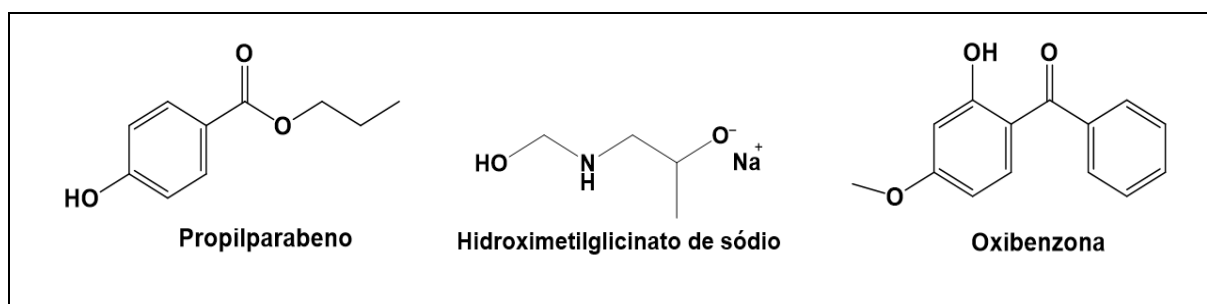


FIGURA 1: Estrutura química de agentes nocivos à saúde humana e ambiental presentes em cosméticos.

Segundo as regulamentações vigentes e o perfil de consumo atual, empresas e marcas têm adotado o uso de novas matérias-primas e tecnologias no desenvolvimento de formulações cosméticas. Neste contexto, produtos naturais têm sido fonte de agentes cosméticos ao longo de toda a história da humanidade. Diversas culturas exploram os benefícios de ingredientes de origem vegetal em práticas ancestrais, e pesquisas na área de química de produtos naturais evidenciam a eficácia de óleos e substâncias extraídas de fontes naturais na saúde humana e nos cuidados pessoais.

A eficácia dos produtos naturais como cosméticos está intrinsecamente ligada à diversidade de substâncias orgânicas. Substâncias bioativas como polifenóis, terpenos e flavonoides, encontrados em extratos de plantas, demonstram propriedades antioxidantes, combatendo os radicais livres e protegendo a pele contra o envelhecimento precoce (GAO et al., 2019). Além disso, a química dos óleos essenciais, oferece benefícios terapêuticos e aromáticos, contribuindo para a sensação de bem-estar associada aos produtos cosméticos naturais (BAKKALI et al., 2008). Estudos, como os de TUNDIS et al. (2015), destacam a presença de compostos antimicrobianos em óleos vegetais, evidenciando o potencial desses produtos na promoção da saúde da pele.

A soja (*Glycine max*) se destaca como uma fonte crucial de flavonoides e ácidos fenólicos, proporcionando uma série de benefícios para a pele. Com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, clareadoras, UV-protetoras e estimuladoras da produção de elastina e colágeno, a soja se tornou um ingrediente essencial em dermocosméticos disponíveis no mercado (WAQAS et al., 2015; ASAN et al., 2019; SEIBERG, 2011; PAZYAR et al., 2015). Essa rica gama de benefícios posiciona a soja como uma escolha notável para quem busca produtos de cuidados com a pele eficazes e abrangentes.

Os óleos essenciais desempenham um papel essencial na formulação de fragrâncias e aromas presentes em uma variedade de produtos, além de contribuírem para a preservação de cosméticos disponíveis no mercado (NARNOLIYA et al., 2019; BOUTOS et al., 2020; SAAB et al., 2018; HERMAN e HERMAN, 2015). Suas propriedades sensoriais e conservantes são amplamente reconhecidas. No entanto, apesar do seu uso difundido, é notável a escassez de estudos e produtos que explorem a aplicação da nanotecnologia em conjunto com esses bioativos. A integração de nanotecnologia aos óleos essenciais pode abrir novas perspectivas para a eficácia e a estabilidade desses compostos, oferecendo potencial para desenvolver produtos inovadores e mais eficientes no campo da cosmética.

Além da procura de novas matérias-primas novas tecnologias têm sido desenvolvidas para o melhoramento de produtos já existentes. A nanotecnologia surge como a vanguarda na área de desenvolvimento e pesquisa em cosméticos e produtos de cuidado pessoal como forma de aumentar a estabilidade, efetividade e controle na dosagem dos ativos envolvidos, gerando inúmeras aplicações no seguimento (CASANOVA e SANTOS, 2016; KATZ et al., 2015 e KAUL et. al, 2018).

A pele é composta por três camadas de espessuras variadas, a epiderme (50-100  $\mu\text{m}$ ), a derme (1-2 mm) e a hipoderme ( $\geq 3$  mm) compõem o maior órgão do corpo, responsável por fornecer proteção imunológica, física e contra radiação solar. Como regiões de permeabilidade variada, a penetração através da derme é um grande desafio para novas formulações tópicas (BAKI e ALEXANDER, 2015). E a administração de nanobiomaterias através da pele é altamente eficiente, devido à grande área superficial promovida, contribuindo para a adesão, oclusão e eficiência do ativo (ALVAREZ-ROMAN et al., 2004).

Com o intuito de aprimorar a biodisponibilidade, estabilidade e durabilidade de ativos em cosméticos, diversas abordagens em nanocarreadores vêm sendo desenvolvidas. BARROSO e colaboradores (2014) realizaram uma avaliação de compostos fenólicos como agentes antioxidantes microencapsulados em uma formulação de hidratante tópico. O extrato da planta foi encapsulado em biopolímero, resultando em partículas com diâmetro entre 40 e 170  $\mu\text{m}$ .

A tecnologia dos nanocarreadores possibilita a utilização de materiais não-tóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis, permitindo diferentes estruturas. O primeiro sistema nanométrico de liberação de ativo aplicado a dermatologia e cosmética foram os lipossomos, seguido do desenvolvimento de nanopartículas sólido líquidas. O interesse recente é voltado para os carreadores biopoliméricos, que fornecem vantagens sobre os carreadores lipídicos citados. Polímeros biodegradáveis podem ser armazenados por tempos prolongados e incorporar substâncias tanto hidrofílicas quanto hidrofóbicas além de compatibilidade com sistemas biológicos facilitando sua compatibilidade e uma alternativa mais sustentável do que polímeros convencionais (RANCAN et al., 2014; MORA-HUERTAS et al., 2010).

A estratégia em converter materiais regulares em formulações em escala nano e micro para cosméticos está na formulação de produtos com alto poder de penetração nas camadas da pele e ação com maior tempo de duração. O nanoencapsulamento tem o potencial de liberar compostos ativos em sistemas diversos, de forma efetiva, promovendo a proteção de fragrâncias e compostos voláteis e evitando a oxidação e degradação segundo o contato com o ar, luz e calor (SEVERINO et al, 2016).

Apesar do crescente interesse acadêmico e industrial na área de nanocarreadores dermocosméticos, matérias primas inorgânicas dominam uma

grande fatia do mercado. Isso gera uma grande oportunidade na área de química de produtos naturais e no desenvolvimento e pesquisa de substâncias e fontes de matérias-primas orgânicas eficientes (FYTIANOS et al., 2020).

Diante do apresentado, a proposta deste trabalho foi investigar o potencial como princípio ativo cosmético de sementes de soja (*G. max*) e óleo essenciais diversos para produção de nanopartículas poliméricas com polímero biodegradável como agente de encapsulamento como possível agente de aplicação dermocosmética.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Gerais:

Este projeto de mestrado tem por objetivo o desenvolvimento de nano partículas poliméricas como carreadores dos bioativos encontrados no extrato de soja e óleos essenciais de origem comercial como potenciais agentes dermocosméticos.

### 2.2. Específicos:

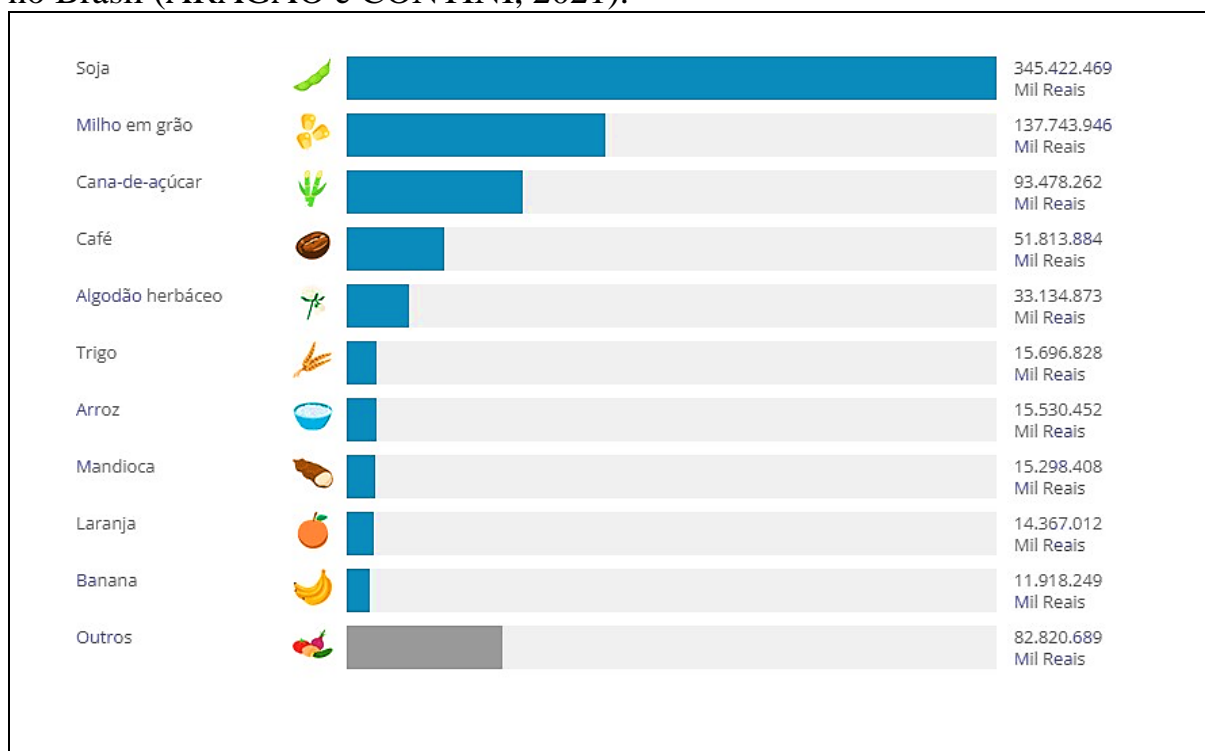
- Extrair quantitativamente isoflavonas de *G. max*;
- Avaliar o potencial antimicrobiano, fotoprotetivo, antioxidante e citotóxico das matrizes selecionadas;
- Identificar os ativos em soja e óleos essenciais comerciais por metodologia LC-UV/DAD, LC-MS e GC-MS;
- Produzir nanopartículas poliméricas em suspensão coloidal utilizando a metodologia de nanoprecipitação do polímero pré-formado;
- Produzir nanopartículas poliméricas sólidas por secagem por aspersão;
- Caracterizar as formulações poliméricas.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. A Soja

Soja é um dos legumes mais consumidos no mundo inteiro. É uma leguminosa (*Fabaceae*) com ciclo de vida anual. O grão chega no ocidente como cultura alimentar entre o século XV e XVI vinda do nordeste da China. No Brasil, a soja é introduzida no ano de 1882 como objeto de estudos botânicos, e em 1976 o país já respondia por 16% da produção mundial do grão (CISOJA, 2006). Atualmente o Brasil é responsável por 50% do mercado mundial de produção exportação de soja, e a cultura agrícola mais rentável do país (FIGURA 2).

FIGURA 2: Ranking dos valores de produção de diferentes tipos de agriculturas no Brasil (ARAGÃO e CONTINI, 2021).





O gênero *Glycine* dispõe de 10 espécies com poucas variedades. O Brasil disponibiliza três grupos de cultivares de soja, a soja convencional, a soja intacta e a soja RR, sendo as duas últimas variações transgênicas. As variações se diferenciam por ciclos de crescimento, resistência a pragas e adaptação ambiental diferentes. A soja convencional não apresenta alterações genéticas para melhoramento, a soja intacta é produzida com tecnologia que a torna resistente a herbicidas e a ataque de pragas. A soja RR corresponde ao cultivar mais utilizados no país, que permite a semeadura precoce (BAVARESCO e MORAES, 2023).

Proteína é o macronutriente principal presente no grão ou semente de soja, seguido dos carboidratos e lipídeos. A composição média dos grãos variam conforme o genótipo e as condições de cultivo da soja, como a temperatura, umidade do solo e incidência solar. A distribuição média de macronutrientes na soja são apresentados na TABELA 2. Os carboidratos correspondem a polissacarídeos insolúveis como as pectinas e oligossacarídeos solúveis como a sacarose.

TABELA 2: Composição média dos grãos de *G. max.* (BUCAR F, 2013),

<b>Composição</b>	<b>mg/ 100 g</b>
Proteína	33,8
Carboidrato	25,5
Humidade	11,5
Fibras	5,5
Cinzas	4,8
Fosforo	440
Potássio	397
Cálcio	198
Ferro	6
Vitamina C	7,50
Tiamina (B1)	0,87

Riboflavina (B2)	0,34
Niacina (B3)	1
Carotenos	0,109

Micronutrientes como vitaminas e minerais estão presentes em quantidades variáveis. As cinzas são ricas em ferro e zinco e os lipídeos incluem substâncias não saponificáveis como esteróides, tocoferóis e vitamina A. O óleo de soja contém cerca de 15% de ácidos graxos saturados e 85% de insaturados (MORAIS, 1996; TAN et al., 2023).

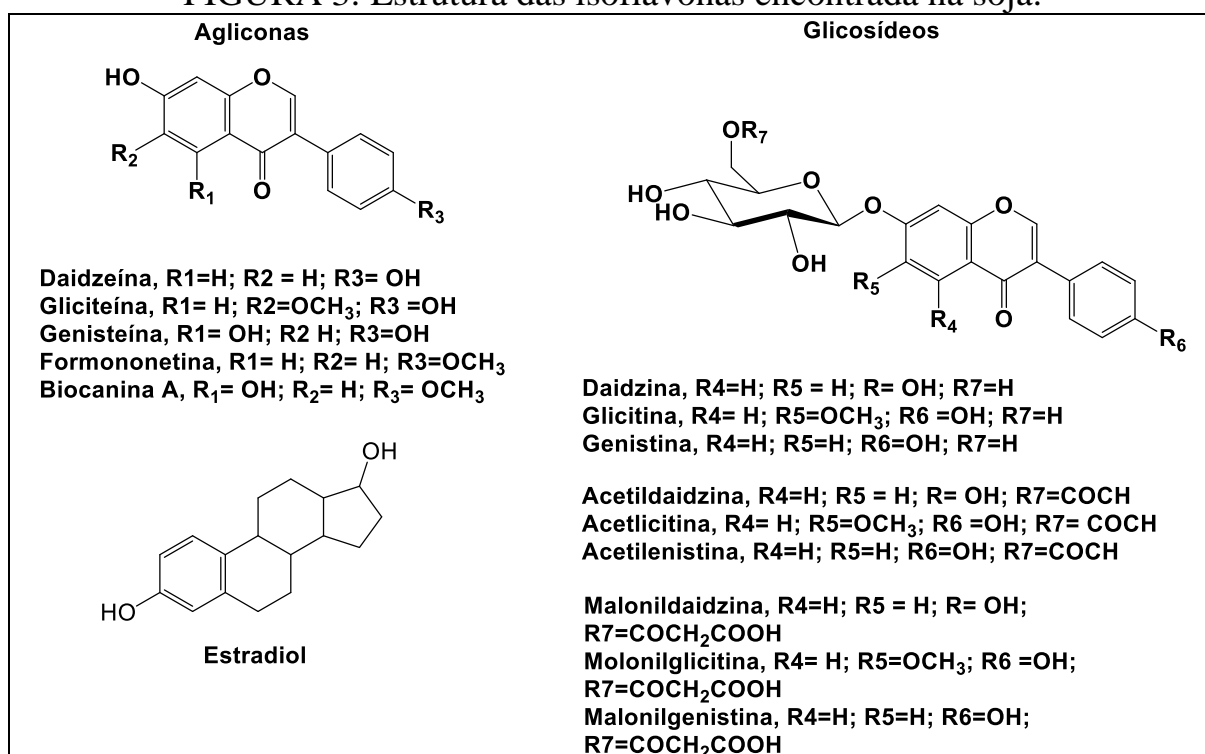
Em menor proporção, a soja apresenta fitatos, saponinas e os a principal fonte de fitoestrógenos, os flavonóides. Fitoestrógenos são substâncias difenólicas, estruturalmente semelhantes ao estrogênio, hormônio produzido em seres vertebrados (FIGURA 3).

Nas plantas, essas substâncias atuam como fitoalexinas, produtos do metabolismo secundário responsáveis por respostas ao estímulo ambiental, durante estresse ou infecções microbianas, por exemplo. Os fitoestrógenos são agrupados em duas categorias principais: flavonoides e não-flavonoides. Os flavonoides incluem as isoflavonas, coumestanos e fenilflavonoides e não-flavonoides incluem as lignanas. O mais comum entre esses são as isoflavonas e lignanas, que são encontrados em frutas, vegetais e grãos (KRIZOVA et al., 2019).

Genisteína, daidzeína, gliciteína, biocanina A e formononetina são os fitoestrógenos do tipo isoflavonoides. Essas substâncias têm ocorrência natural na forma de glicosídeos e agliconas, e ésteres derivados do ácido malonílico e acético, os *O*-malonilglicosídeos ou *O*-acetilglicosídeos. Isoflavonas são derivados do caminho biossintético dos fenilpropanóides, onde ocorre a conversão de flavanonas na respectiva isoflavanona e então na isoflavona, por

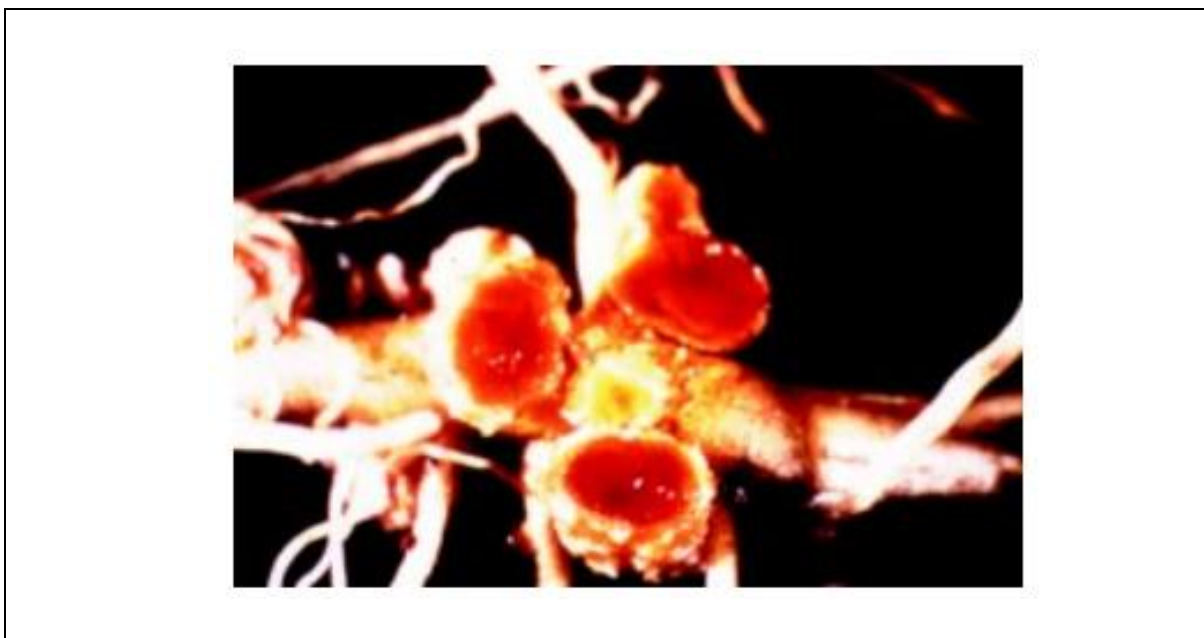
uma sequência de reações biocatalisadas. A flavanona liquiritigenina é o precursor da daidzeína, formononetina e gliciteína. O precursor da genistéina e biocanina A é a naringenina (KO et al., 2014; BUCAR., 2013).

FIGURA 3: Estrutura das isoflavonas encontrada na soja.



As isoflavonas desempenham seu papel principal na soja pela interação simbiótica planta-microbiota, no processo de nodulação. A nodulação é o processo de formação de estruturas na raiz da soja em resposta à necessidade de nitrogênio para o desenvolvimento vegetal. A liberação de flavonóides no solo favorece uma infecção benigna da planta com bactérias fixadoras de nitrogênio (*Rhizobium spp.*). Esse mecanismo desencadeia a formação de gânglios de tecido provocada pelos fatores virulentos da bactéria (FIGURA 4). As isoflavonas atuam como fator importante na ativação dos genes de nodulação dos rizóbios (SOHN et al., 2021; SUBRAMANIAN et al., 2006).

FIGURA 4: Nódulos ativos na raiz de soja (HUNGRIA et al., 2001).



As isoflavonas ocorrem de forma limitada na natureza, se restringindo as leguminosas da família *Fabaceae*. A soja, o trevo (*Trifolium sp.*) e alfafa (*Medicago sativa*) são importante fontes de isoflavonas. Como fonte nutricional em humanos a soja é a principal. O conteúdo médio de isoflavonas nos grãos de soja variam entre 1,2- 4,2 mg/g dependendo das condições de cultivo. Biocanina A e formononetina ocorrem em menores proporções na soja). Raiz e sementes são os tecidos responsáveis pelo acúmulo de isoflavonas na soja (SILVA et al., 2021).

Em seres humanos, após consumo, as isoflavonas são absorvidos no intestino. Os glicosídeos são primeiramente hidrolisados e convertidos em sua forma mais biologicamente ativa, as agliconas. No organismo, podem atuar como agentes estrógenos, quimioprotetores ou antioxidantes. Os benefícios à saúde humana associada ao consumo de isoflavonas é extensamente descrito. A estrutura similar ao estradiol permite a interação com os receptores de estrogênio,

nas células é capaz de interagir com os receptores, como agonistas ou antagonistas (BABER et al., 2013).

No caso de deficiência na produção de estrogênio, as isoflavonas atuam como agonistas dos receptores de estrogênio, diminuindo os efeitos da menopausa, por exemplo, como os riscos de doenças cardiovasculares e osteoporose (KREBS et al., 2004). Como antagonistas, é conhecida a atividade profilática e retardante do desenvolvimento de cânceres estrogênio-dependentes, como câncer de mama, uterino, de próstata e tireóide. Segundo a afinidade pelos receptores de estrogênio, isoflavonas como a daidzeína e genisteína se ligam ao receptor, suprimindo a via de formação de tumores dependentes da interação estrogênio-receptor (NAGATA et al., 2021).

Além da atividade estrogénica, a ação antioxidante das isoflavonas é associada a prevenção e diminuição dos sintomas de várias doenças . A atividade antioxidante das isoflavonas é relacionada a diferentes mecanismos de ação. A presença de grupos hidroxilo fenólicos permite a neutralização de espécies radiculares reativas relacionadas a oxidação lipídica e envelhecimento precoce (YOON et al., 2014).

Como agente cosmético, WAQAS e colaboradores (2015) apresentam a revisão dos benefícios associados aos componentes ativos da soja, entre elas as isoflavonas. A aplicação tópica em modelos murinos antes da exposição a radiação solar diminui a expressão da proteína COX-2 responsável pela inflamação e carcinogénese estimulada por UV. Diversos trabalhos descrevem a atividade anti-inflamatória das isoflavonas, reduzindo o efeito inflamatório ativo ou impedindo a cascata de citocinas inflamatórias. Além disso, são descritos os efeitos inibidores da degradação de elastina e carcinogénese dermal (YU et al., 2016; ACCORSI-NETO et al., 2009).

### 3.2. Óleos essenciais

A definição de óleo essencial foi primeiramente cunhada por Paracelsus (1493-1541) quando se referia a ‘*Quinta essentia*’ (Quinto elemento) em seus estudos sobre extrato de plantas e remédios herbais. Ele descrevia o processo de hidrodestilação, como a extração da ‘alma da planta’, sua parte essencial (GUENTHER,1950; DHIFI et al., 2016). A farmacopeia brasileira define os óleos essenciais, ou óleos voláteis, como “óleos obtidos a partir de plantas por processos físicos, que evaporam a temperatura ambiente sem deixar resíduos” (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2019).

Óleos essenciais correspondem a uma das mais importantes comodites, segundo sua aplicação extensa dentro da indústria. A demanda mundial é dividida entre a indústria de comida e bebidas (35%), fragrâncias, cosméticos e aromaterapia (29%) utilidades domésticas (16%) e farmacêutica com 15% do mercado. O mercado internacional de óleo essencial tem previsão de atingir o valor de US\$16 bilhões anualmente, correspondendo a 345 mil toneladas de produto no ano de 2026. O Brasil ocupa quinta posição no ranking de maiores produtores, atrás de China, França, EUA e Índia como o maior exportador (BIZZO e RESENDE, 2022).

Devido a grande produção e exportação de suco de laranja, o Brasil ocupa o primeiro lugar de país exportador de óleo essencial de laranja, um dos principais óleos do mercado mundial, juntamente com óleo de menta japonesa (*Mentha arvensis*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*), como apresentado na TABELA 3.

TABELA 3: Principais óleos essenciais no mercado mundial (BIZZO e RESENDE, 2022).

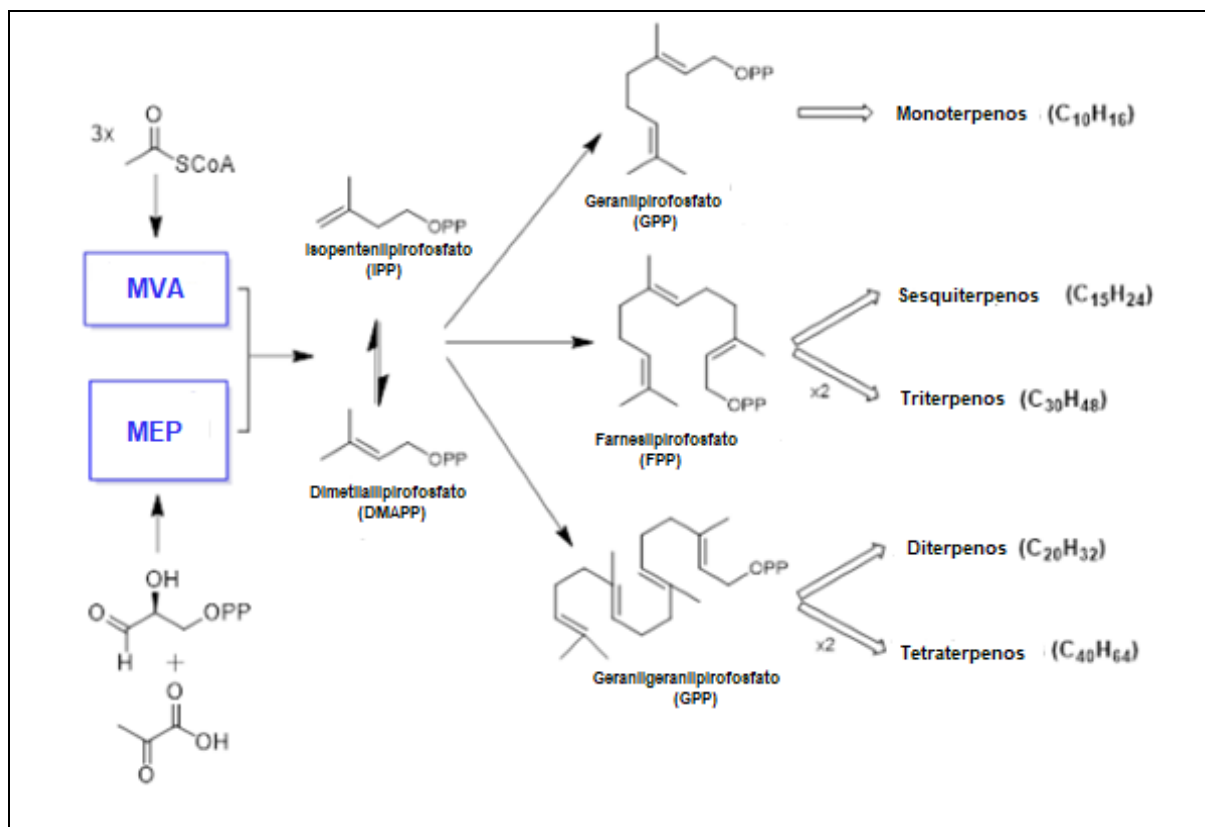
Óleo essencial	Quantidade (ton)	Usos
Laranja ( <i>Citrus spp.</i> )	50,000-55,000	Bebidas, aromatizante
Menta japonesa ( <i>Mentha arvenses</i> )	25,000-40,000	Aromatizante, mentol
Eucalipto ( <i>Eucalyptus globulus</i> )	5,000-11,000	Aromatizante, medicamentos
Limão Siciliano ( <i>Citrus limon</i> )	7,000-7,500	Bebidas, aromatizante
Hortelã-Pimenta ( <i>Mentha x piperita</i> )	4,000-4,500	Aromatizante, higiene oral
Cravo ( <i>Syxygium aromaticum</i> )	2,500-4,000	Fragrâncias, aromatizantes
Menta ( <i>Mentha spicata</i> )	2,000-3,700	Aromatizante, higiene oral
Cedro da Virgínia ( <i>Juniperus virginiana</i> )	2,000-3,500	Fragrâncias
Citronela ( <i>Cymbopogon witerianus</i> )	1,500-3,000	Fragrâncias

Óleos essenciais são mistura complexas de compostos químicos voláteis, e seus componentes são geralmente classificados em dois grupos principais: terpenoides e não-terpenoides. Todos ocorrem como hidrocarbonetos e seus derivados oxigenados, funcionalizados como aldeídos, cetonas, álcoois e etc. (SADGROVE et al., 2022).

Os terpenos e terpenoides são o grupo majoritário dos componentes em óleos essenciais. A biossíntese de terpenos segue a condensação de unidades de isoprenos, e seus precursores, isopentenila difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP) são produzidos por dois caminhos biossintéticos, o caminho do ácido mevalônico (MVA) e do metileritrol fosfato (MEP). (DEWICK, 2002).

Os terpenos são classificados conforme a quantidade de unidades de isopreno condensadas, sendo os hemiterpenos ( $C_5H_8$ ) com uma, monoterpenos ( $C_{10}H_{16}$ ) com duas, diterpenos ( $C_{20}H_{32}$ ) com quatro e assim por diante (FIGURA 5). Os componentes não-terpenoides principais correspondem aos fenilpropanoides, biossintetizados a partir do aminoácido L-fenilalanina (JAEGER et al., 2016).

FIGURA 5: Via geral de biossíntese de terpenos em plantas (SOUSA et al., 2023).



Cerca de 60 famílias botânicas compreendem mais de 2000 espécies de plantas aromáticas e medicinais. A TABELA 4 apresenta alguns exemplos de famílias e óleos essenciais extraídos das espécies. A fração aromática corresponde a uma pequena parte da composição de uma planta, menos que 5% de massa seca. O principal método industrial de extração é a hidrodestilação das partes aéreas (folhas, flores e frutas), cascas, madeira e rizomas.

TABELA 4: Fontes principais de óleo essenciais em famílias botânicas (FRANZ et al., 2010).

Família botânica	Exemplo de óleo essencial
<i>Cupressaceae</i>	Folha de cedro, madeira de cedro.
<i>Pinaceae</i>	Pinho
<i>Zingiberaceae</i>	Gengibre, cardamomo
<i>Asteraceae</i>	Camomila



<i>Geraniaceae</i>	Gerânio
<i>Illiciaceae</i>	Anil estrelado
<i>Lauraceae</i>	Cânfora
<i>Oleaceae</i>	Jasmim
<i>Rosaceae</i>	Rosas

---

Como agentes farmacológicos, os óleos essenciais são agentes antimicrobianos, antioxidantes e anti-inflamatórios e suas propriedades terapêuticas são extensamente descritas (SOUSA et al., 2023). O crescente interesse na utilização de óleos essenciais como insumos cosméticos segue a tendência descrita anteriormente sobre a procura de materiais de origem natural. No entanto, essas substâncias são particularmente utilizadas no seguimento de produto de cuidados pessoais devido a sua propriedade aromática e apelo comercial (SHARMEEN et al., 2021; ABELAN et al., 2021). Além disso, como produtos cosméticos, apresentam potencial antimicrobiano, como agentes conservantes de grande interesse (HALLA, et al., 2018). Como agentes de conservação, a atividade contra microrganismos é observada tanto de forma isolada quanto associado a conservantes comerciais.

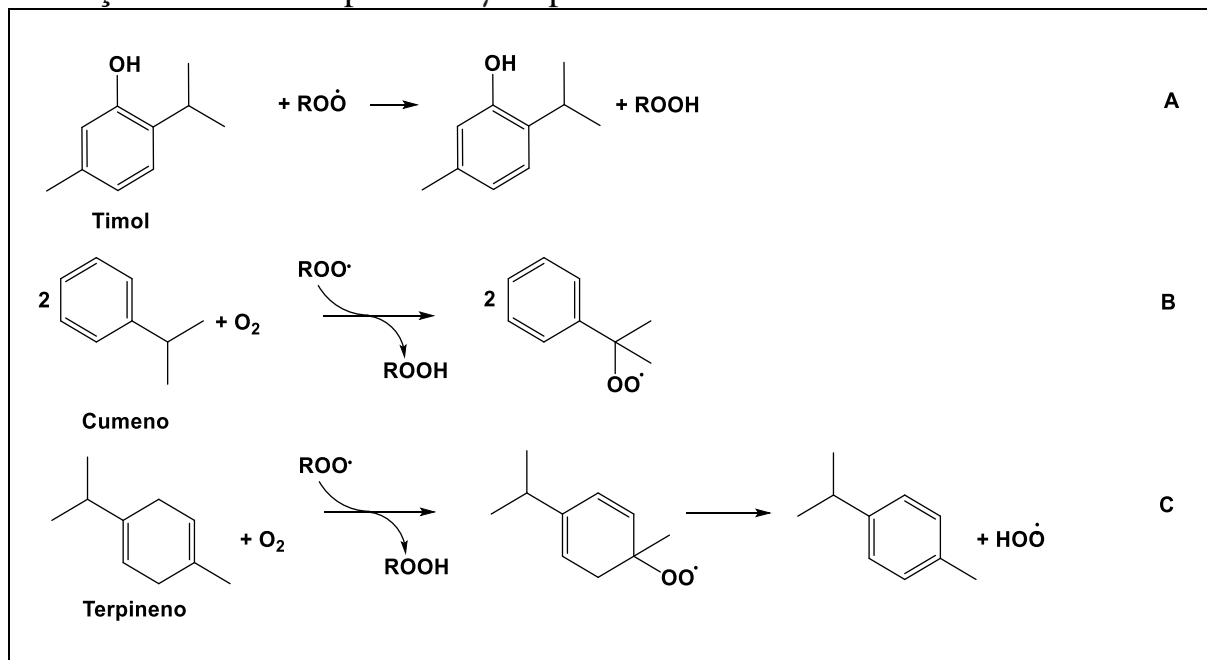
No contexto de dermocosméticos óleos essenciais também apresentam atividade antioxidante, importante na diminuição do estresse oxidativo e envelhecimento precoce do tecido dermal. SOUSA e colaboradores (2023) descrevem três mecanismos pela qual os óleos essenciais atuam como inibidores de oxidação: armadilha de radicais por grupos fenólicos, co-oxidação por compostos altamente oxidáveis e geração de radical HO $\cdot$  por 1,4-ciclohexadienos (FIGURA 6).

**Armadilha de radicais:** Compostos fenólicos voláteis agem como doadores de hidrogênio fenólico.

**Co-oxidação:** Pequenas quantidades de substâncias altamente oxidáveis diminuem o processo de autooxidação de outro substrato. Por exemplo, o cumeno, que diminui a formação de radicais peróxidos (ROO $\cdot$ ).

**Geração de radical HO $\cdot$ :** O  $\gamma$ -terpineno é o principal exemplo desse mecanismo. Após abstração de um hidrogênio radicalar, é formado um radical peroxil instável que se degrada formando *p*-cimeno e o radical HO $\cdot$  que facilmente doa um hidrogênio para ROO $\cdot$ . GUO e colaboradores (2021) atribuem o aumento da atividade antioxidante de malvinas à formação de HO $\cdot$  via  $\gamma$ -terpineno.

FIGURA 6: Ação antioxidante de substâncias encontradas em óleos essenciais. **A:** Redução do radical ROO pelo hidrogênio fenólico do timol. **B:** Redução do radical ROO pela autooxidação do cumeno.; **C:** Redução do radical ROO pela formação de ROOH a partir do  $\gamma$ -terpineno.



### 3.3. Nanopartículas poliméricas.

Nanocarreadores são sistemas de liberação de ativos em escala nanométrica (<1  $\mu$ m). A nanotecnologia é uma emergente que lida com o

desenvolvimento, investigação e aplicação de materiais em escala atômica, molecular e supramolecular (YAN et al., 2014). Sobretudo no âmbito de agentes terapêuticos, nanocarreadores oferecem uma abordagem eficiente que superam materiais tradicionais, fornecendo uma liberação controlada e direcionada do ativo incorporado e sua melhor biodistribuição e estabilidade.

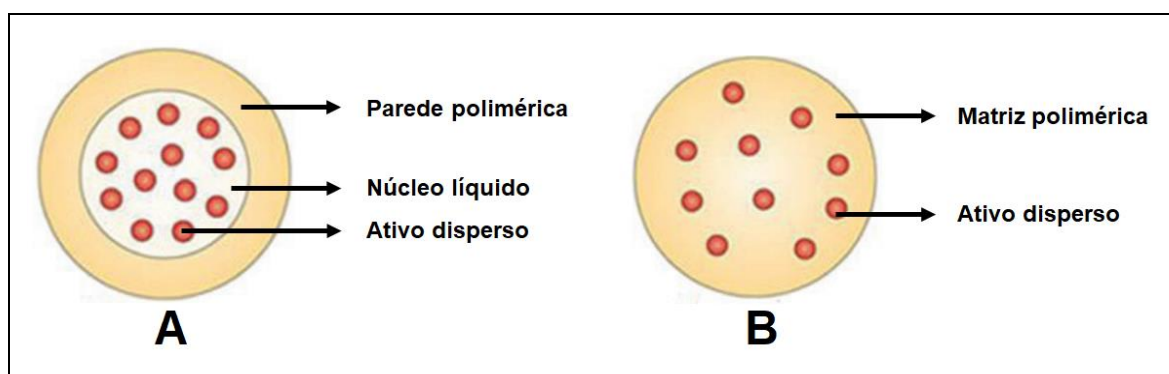
No contexto de formulações cosméticas a nanotecnologia oferece diferentes vantagens, como a liberação prolongada e gradual do ativo de forma que seja possível uma fragrância durar por mais tempo, aumentar a eficiência de um protetor solar pelo aumento da proteção UV e oferecer um transporte ativo dos ingredientes através da pele, possibilitado pelo tamanho das partículas (KAUL et al., 2018).

Além de promover eficiência, a nanotecnologia surge como uma maneira de aumentar a estabilidade das substâncias administradas, garantindo que suas propriedades sejam mantidas por mais tempo. Isso se torna necessário para substâncias sensíveis a luz, como flavonoides e essências voláteis que apresentam baixa estabilidade a longo prazo e hidrofobicidade que pode dificultar a absorção e transporte através das camadas da pele (AYALA-FUENTES et al., 2021; SEVERINO et al., 2016).

Entre as diferentes nanoestruturas possíveis, as nanopartículas poliméricas têm se destacado devido às propriedades adquiridas devido ao tamanho e alteração de características físico-químicas do material inicial (ABDEL-MOTTALEB et al., 2012; ESTEVINHO et al., 2013; ZIELINSKA et al., 2020). O termo nanopartícula define partículas sólidas coloidais, que incluem nanoesferas e nanocápsulas. Nanocápsulas são estruturas vesiculares onde uma

substância de interesse é revestida por uma parede interna líquida e sobreposta por uma membrana polimérica. Nanoesferas são constituídas em uma rede polimérica contínua onde a substância permanece retida no interior ou adsorvida sobre a superfície, como descrito na FIGURA 6.

FIGURA 7: Nanopartículas poliméricas. **A**: estrutura representativa de uma nanocápsula com o ativo disperso no interior lipídico envolto por uma camada de polimérica; **B**: estrutura representativa de uma nanoesfera, com o ativo disperso em uma matriz contínua formada pelo polímero (ORIVE et al., 2009).



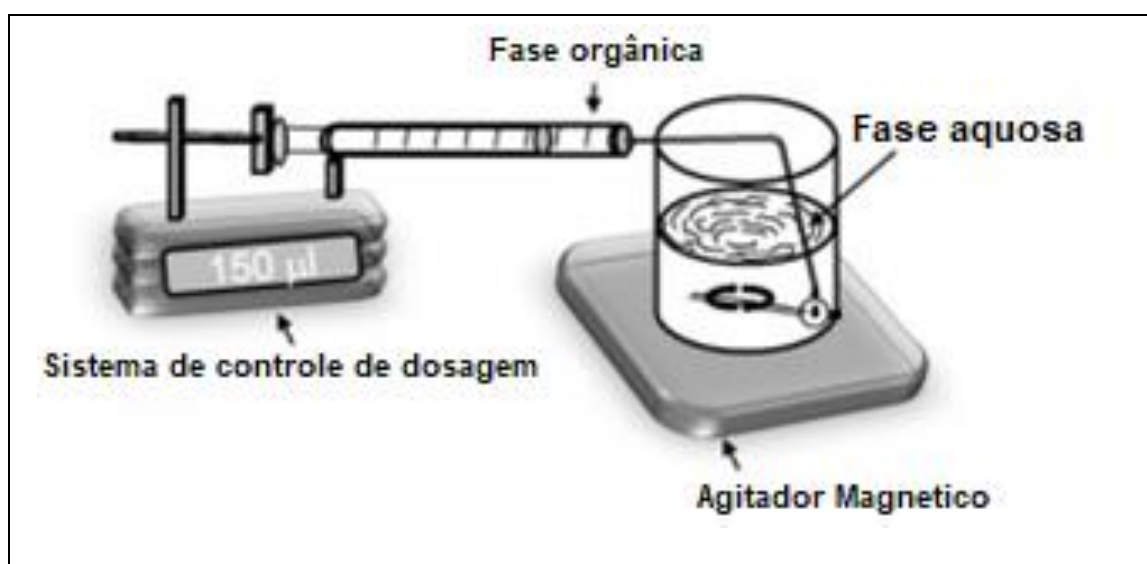
Nanopartículas podem ser produzidas por diferentes métodos, segundo o tipo de substância encapsulada e a via de administração desejada. Os métodos de preparação são classificados de duas maneiras: dispersão de polímeros pré-formados ou polimerização de monômeros. Na polimerização de monômeros, o processo promove a formação do polímero *in situ*, entre dois líquidos imiscíveis. A maioria das técnicas de preparo de nanopartículas requer a presença de um polímero pré-formado, cujo processo é mais facilmente controlável e de maior rendimento quando comparado com o anterior (SOUTO et al., 2012).

O método de nanoprecipitação (NPPT) é designado também como método do deslocamento de solvente ou deposição interfacial. FESSI et al., (1988) descreve o método pelo uso de suas fases, uma fase solvente e outra não-solvente,

geralmente um solvente orgânico miscível em água. A fase solvente ou orgânica é constituída de uma solução orgânica (em etanol, acetona, etc.) de um polímero juntamente com a substância ativa, óleo e um tensoativo lipofílico. Já na fase não-solvente, geralmente aquosa, é composta de uma solução aquosa de surfactante (MORA-HUERTAS et al., 2009).

As nanocápsulas são obtidas como uma suspensão coloidal formada pela adição lenta da fase orgânica sob a fase aquosa (FIGURA 8). O mecanismo de formação das nanocápsulas é descrita por LINCE e colaboradores (2008) em três fases, nucleação, crescimento e agregação regidos pela saturação do polímero na solução resultante orgânica-aquosa. No entanto, o processo é descrito por McMANAMEY et al. (1973) e DAVIES (1975) como a formação rápida das nanopartículas devido diferenças de tensão superficial. Na interface solvente-

FIGURA 8: Representação da técnica de nanoprecipitação do polímero pré formado para preparo de nanocápsulas (MORA-HUERTAS et al., 2009).



-água o solvente tende a ser deslocado pelo líquido com maior tensão superficial (água) e o polímero solúvel na fase orgânica tende a se agregar na superfície oleosa, formando as nanocápsulas com a substância ativa dispersa no óleo.

A solubilidade do princípio ativo na fase oleosa é um fator essencial na obtenção de nanocápsulas com alta eficiência. Quando melhor a solubilidade, menos a substância terá de deixar a fase oleosa. Princípios ativos hidrossolúveis deixam a fase oleosa para a dispersão aquosa, e as nanocápsulas são usadas principalmente para compostos orgânicos pouco hidrofílicos. A natureza da fase oleosa influencia diretamente no tamanho final da partícula. Óleos com alta tensão superficial dificultam o deslocamento da fase orgânica e geralmente formam partículas maiores, assim como óleos muito viscosos são resistentes à emulsificação e formam grandes gotículas e o tamanho das partículas será maior (SOUTO et al., 2012).

### **3.4. Polímeros biodegradáveis**

A biodegradabilidade é a propriedade que um material tem de ser degradado pela ação de agentes naturais. Polímeros biodegradáveis têm vantagens sobre os não biodegradáveis devido a sua compatibilidade com sistemas biológicos, diminuindo efeitos de toxicidade e sendo uma alternativa considerada sustentável (CAKMAK et al., 2023). Um polímero biodegradável pode ser tanto de fonte sintética quanto natural, categorizados segundo os processos de produção e matéria prima.

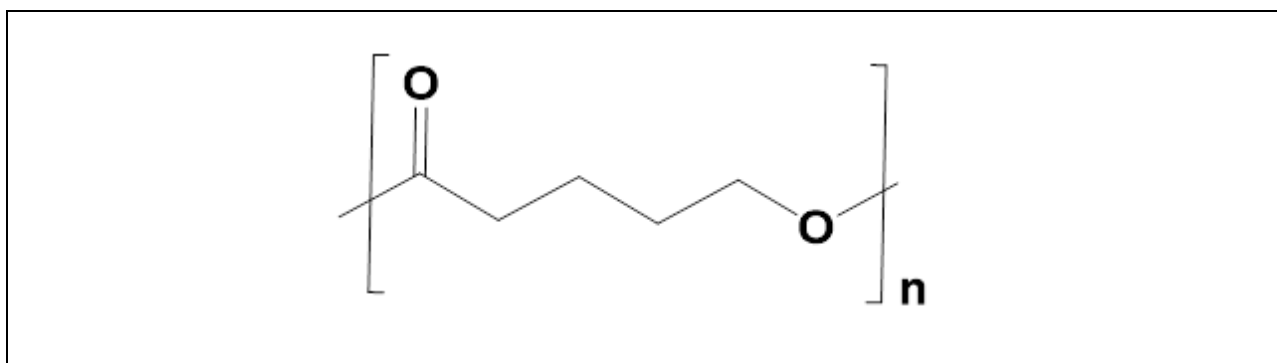
**Biopolímeros naturais:** São extraídos diretamente da natureza, de fontes vegetais ou animais. Exemplos: amido, celulose, agar, alginato, colágeno, gelatina.

**Biopolímeros sintéticos biodegradáveis:** Os monômeros são produzidos através da fermentação de carboidratos, mas a polimerização é conduzida por síntese química. Exemplos: ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA) policaprolactona (PCL), polibutilenosuccinato.

**Biopolímeros produzidos por processos de fermentação:** Os monômeros e a polimerização são conduzidas por processos de fermentação através de microorganismos. Exemplos: polihidroxicanoato, polihidroxibutirato.

A policaprolactona é um poliéster alifático obtido a partir da polimerização da caprolactona através de catálise com metais. O polímero é utilizado industrialmente como aditivo de resinas e plásticos como forma de aumentar resistência, na produção de membranas e aplicações biomédicas (CAKMAK et al., 2023).

FIGURA 9: Estrutura química da policaprolactona.



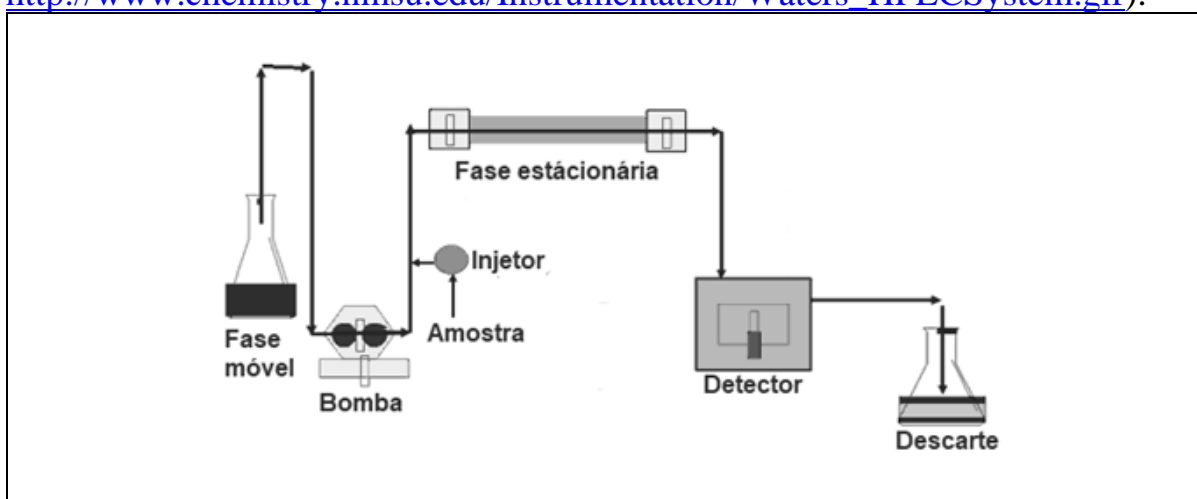
Recentemente, nanopartículas de policaprolactona têm sido investigados para aplicação cosmética, como estimulante de regeneração de colágeno. O ácido rosmarínico, conhecido por diversas propriedades biológicas como antioxidante, antimicrobiana e antiinflamatória, e alta instabilidade, é nanoencapsulado utilizando PCL para aplicação dermocosmética (KIM, 2010).

### **3.5. *High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)***

O termo cromatografia a líquido de alta eficiência, remete a uma técnica analítica utilizada tanto para fins qualitativos como quantitativos. É

definida como um método de separação físico-químico dos componentes de uma mistura baseada na interação entre duas fases. Uma fase é formada por um agente adsorvente que permanece estacionário enquanto a outra, líquida, se move através dela. Os componentes presentes na mistura são separados segundo a afinidade por cada uma das fases (McMASTER, 1994; CIOLA et al., 2003).

FIGURA 10: Representação esquemática da cromatografia líquida de alta eficiência (Disponível em: [http://www.chemistry.nmsu.edu/Instrumentation/Waters\\_HPLCSystem.gif](http://www.chemistry.nmsu.edu/Instrumentation/Waters_HPLCSystem.gif)).



A instrumentação de HPLC é composta por uma coluna metálica empacotada com partículas finas (3-10  $\mu\text{m}$ ) de adsorvente (sílica, sílica modificada), uma bomba de alta performance que empurra a fase móvel (solvente orgânico ou aquoso) dentro da coluna, um sistema de injeção que introduz a solução da mistura a ser separada e um detector que registra a saída de cada componente da mistura do sistema (eluição) na forma de sinal que é convertido em um registro gráfico, o cromatograma (FIGURA 10).

Os detectores mais comuns em HPLC são os espectrofotométricos que registram a absorção de energia, geralmente na região do ultravioleta/visível, devido a presença de cromóforos nos componentes em processo de separação. A HPLC pode ser aplicada em diferentes situações, sendo uma técnica



extremamente versátil, provendo informações no âmbito de separação, purificação, identificação e doseamento (BANSAL et al., 2010).

Quando associado a um analisador de massas, a separação a líquido pode ser denominada LC-MS, HPLC-MS ou UHPLC-MS, dependendo do sistema de separação utilizado. A amostra eluída do sistema cromatográfico pode ser analisada e identificada segundo sua massa, especificamente na razão entre a massa e a carga ( $m/z$ ) gerada pelo sistema de ionização do analisador. O espectrômetro de massas é um dos métodos de maior sensibilidade e seletividade. Um espectrômetro de massas consiste de uma fonte íons, onde há a formação de íons em fase gasosa, um analisador de massas que separa os íons em função da  $m/z$ , e de um detector que converte a corrente iônica em sinal elétrico. Os dados são registrados em função da abundância de uma determinada  $m/z$  na amostra (PATEL et al., 2010; PITT, 2009).

A ionização por eletrospray (IE) é extensivamente utilizada para análise de compostos orgânicos. As amostras são bombeadas através de um capilar metálico mantido sob um potencial elétrico, e nebulizadas, formando um spray fino, de gotas ionizadas. O gás de secagem ( $N_2$ ) rapidamente evapora as gotículas e a carga é transferida para as moléculas em estado gasoso. Os íons seguem até o analisador através de uma série de aparatos mantidos também sob voltagem (EDMOND et al., 2007). O sistema de IE permite a análise de moléculas de baixa a média polaridade que podem ser facilmente ionizadas por reações de perda ou ganho de prótons, sendo detectados na forma de cátions (no modo de aquisição positivo,  $[M+H]^+$ ) ou ânions (no modo de aquisição negativo  $[M-H]^-$ ).

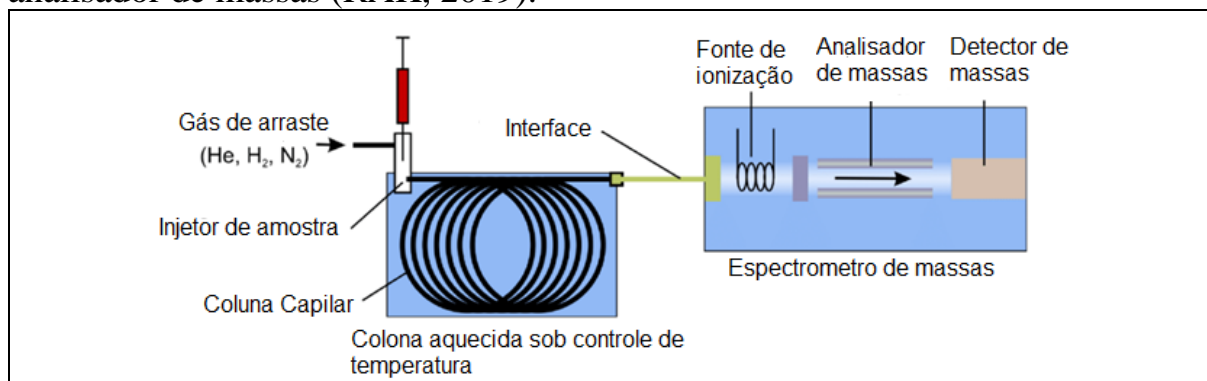
Diferentes analisadores de massa podem ser empregados. O analisador por tempo de voo (*Time of Flight*, TOF) permite a aquisição rápida de dados com alta sensibilidade e alta precisão de massa (BRISTOW et al., 2006). A espectrometria de massas é uma ferramenta poderosa sobretudo na área de produtos naturais, onde analitos obtidos em escala de partes por bilhão é extremamente comum. A técnica surge como meio de explorar, caracterizar e confirmar a identidade de moléculas diversas com alta precisão sem que haja uma demanda de grandes quantidades de amostra.

### **3.6. *Gas Chromatography (GC)***

A cromatografia a gás é o principal meio para análise de substâncias voláteis. Similarmente ao sistema descrito para a HPLC, a cromatografia utiliza uma fase móvel composta por um gás inerte para arrastar as substâncias através da coluna (FIGURA 11), que diferentemente da cromatografia a líquido pode atingir 10 metros de comprimento, com espessuras variadas entre 0,05 e 0,1 mm (SEQUINEL et al., 2010). A separação na coluna é realizada com auxílio de aquecimento, de forma constante, ou variada, segundo a volatilidade e capacidade da substância em mistura de ser retida ou deslocada pelo gás de arraste.

Diferentes analisadores podem ser acoplados ao sistema de cromatografia gasosa, para análise de óleos essenciais analisadores de massas são frequentemente utilizados. A identificação dos componentes é feita com base no padrão de fragmentação obtido para cada composto, segundo a quebra da molécula pela aplicação de energia (mV) por ionização por impacto de elétrons. O padrão pode ser comparado com os dados fornecido por bibliotecas espectrais internas, ou ainda determinada segundo a comparação com o índice de retenção do composto na coluna em questão (SADGROVE et al., 2022).

FIGURA 11: Representação esquemática da cromatografia gasosa acoplada a um analisador de massas (RAK, 2019).



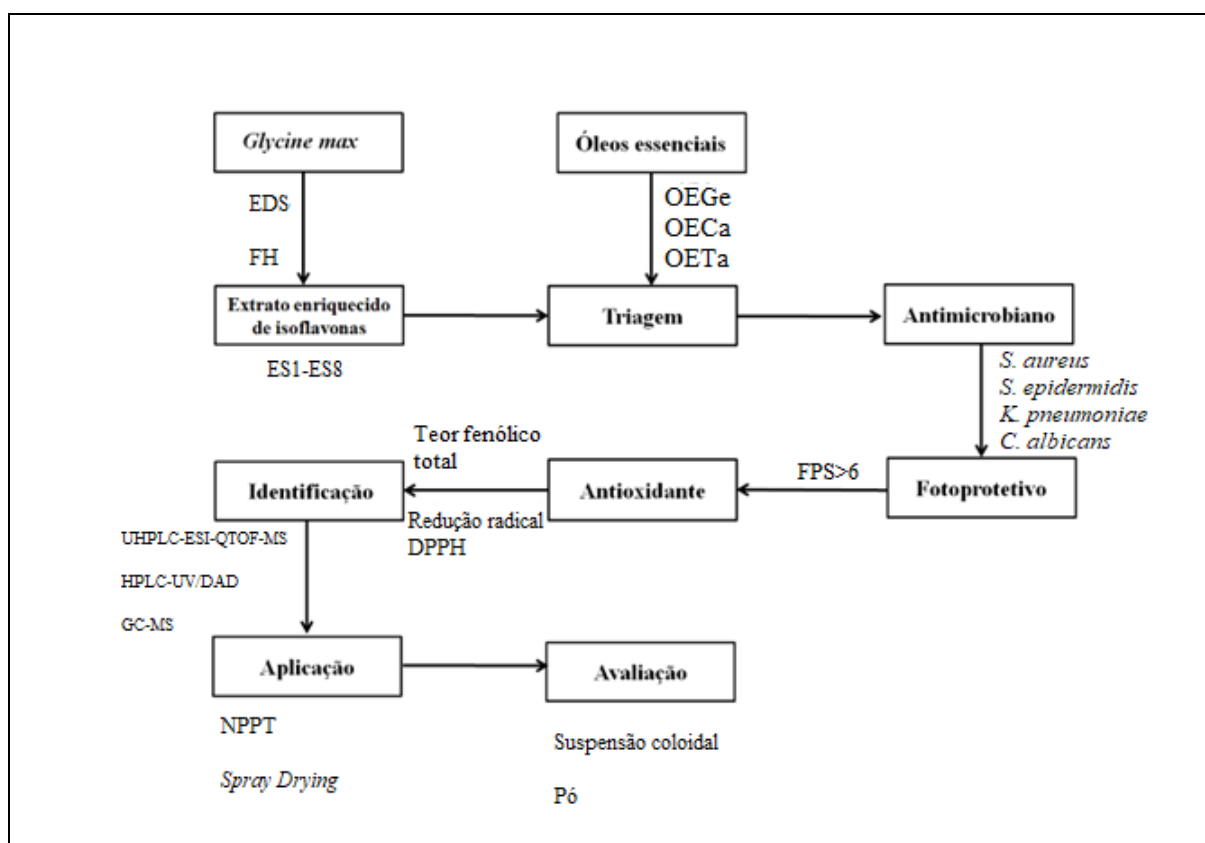
Dentro do contexto apresentado, serão utilizadas as técnicas de separação cromatográfica em fase líquida e gasosa, acopladas a detectores DAD/UV e de espectrometria de massas para determinação dos marcadores selecionados como potenciais agentes dermocosméticos, as isoflavonas de soja e os compostos voláteis de óleos essenciais para incorporação em nanocápsulas de policaprolactona.

Esse trabalho consistiu em uma avaliação bioguiada do potencial do extrato de soja enriquecido de isoflavonas e de óleos essenciais de origem comercial como matérias primas de atividade fotoprotetiva e antimicrobiana para incorporação em carreadores poliméricos de aplicação dermocosmética. Para isso diferentes extratos de soja foram preparados e distintos óleos essenciais foram utilizados. Atividades fotoprotetivas, antioxidantes, antimicrobiana e citotóxica foram empregadas para o objetivo proposto. Os materiais com maior relevância foram então identificados em função dos marcadores selecionados, as isoflavonas de soja e os constituintes voláteis majoritários encontrados nos óleos essenciais. Finalmente, o material de interesse foi estruturado em carreadores polimérico.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Segundo o objetivo de aplicar o material vegetal selecionado para interesse dermocosmético, foi definido a importância da avaliação do material em função de desempenho nessa função. Para isso, as amostras foram verificadas segundo a atividade antimicrobiana, fotoprotetiva e antioxidante. Apesar de matéria-prima natural, ainda foi feita a avaliação a segurança do material segundo a possibilidade de gerar dano a tecidos saudáveis, através da determinação de citotoxicidade frente a linhagens de células humanas não tumorais.

FIGURA 12: Fluxograma de etapas adotados. **EDS**: Extrato desengordurado de soja.; **FH**: fração hexano.; **ES1-ES8**: Extratos de soja 1-8.; **OEGe**: Óleo essencial de gerânio.; **OECa**: Óleo essencial de cedro atlas.; **OETa**: Óleo essencial de tangerina. **NPPT**: Nanoprecipitação do polímero pré-formado.



#### 4.1. Material vegetal

Sementes da espécie *Glycine max* (SC), foram adquiridas em casa de produtos naturais localizada em São Carlos-SP no período de abril de 2022. Os grãos foram higienizados em solução NaClO 10% (v/v), secos por liofilização por 36 horas e processados em moinho analítico. Três óleos essenciais de origem comercial (OEGe, OECa e OETA) foram obtidos em loja de essências na mesma região e período descrito. A TABELA 5 sumariza as informações fornecidas pelo fornecedor sobre os óleos adquiridos. Os materiais foram acondicionados sob refrigeração (4 °C) e abrigo de luz até utilização.

TABELA 5: Descrição óleos essenciais segundo fornecedor comercial.

---

##### **Óleo Essencial de Gerânio Bourbon (*Pelargonium graveolens*)**

Marca: BioEssência

Lote: 220423

Origem: França

Método de Extração: Destilação á vapor das folhas

Odor: Característico floral

Cor: Amarelo pálido a amarelo esverdeado

---

##### **Óleo Essencial de Cedro atlas (*Cedrus Atlantica*)**

Marca: BioEssência

Lote: 220102

Origem: Marrocos

Método de extração: Destilação á vapor da madeira

Odor: Característico amadeirado

Cor: Amarelo

---

##### **Óleo Essencial de Tangerina (*Citrus reticulata*)**

Marca: BioEssência

Lote: 210905

Origem: Brasil

Método de extração: Prensagem a frio da casca

Odor: Característico cítrico

Cor: Amarelo a castanho

---

## 4.2. Preparo do extrato de soja

A farinha de soja (1211 g) foi desengordurada com n-hexano na proporção de 1:10 (m/v) com auxílio de homogeneizador de hélices (1200 rpm, 24 h) para remoção de ácidos graxos e pigmentos que poderiam interferir nas análises posteriores. O material sólido recolhido em Funil de Büchner denominado extrato desengordurado de soja (**EDS**) foi armazenado sob refrigeração e abrigo da luz.

Diferentes soluções extratoras foram empregadas com o objetivo de extrair quantitativamente o conteúdo de isoflavonas, buscando alternativas aos solventes utilizados comumente na extração dessa classe de compostos. Dois tipos de energia foram empregadas nas extrações, homogeneização mecânica e ultrassônica. As soluções utilizadas são descritas na TABELA 6 assim como a denominação adotada para os diferentes extratos no decorrer deste trabalho. Para os extratos ES1 e ES2 utilizou-se o homogeneizador de hélices programado para operar por 24 h a 1600 rpm e para os extratos **ES3-ES8** utilizou-se o homogeneizador ultrassônico programado a 30% de amplitude e pulsos a cada 5 s por 15 s totalizando 15 min de extração.

TABELA 6: Condições de extração de isoflavonas em sementes de soja. **EtOH**: etanol absoluto; **EtOH Cer.**: álcool de cereais; **DMSO**: dimetil sulfóxido; **i-PrOH**: isopropanol; **MEC**: metil etil cetona; **AcOEt**: Acetato de etila.

\* IKA RW 20; 1600 rpm, 24 horas;

\*\* SONICS, Vibra-Cell VCX 750; 26 mm; 30% amplitude; pulso a cada 5 s por 15s, 15 min.

Extrato	Solução extratora (v/v)	Condições de extração
<b>ES1</b>	EtOH:H <sub>2</sub> O 80%	Homogeizador de hélices*
<b>ES2</b>	EtOH Cer.:H <sub>2</sub> O 80%	
<b>ES3</b>	EtOH:DMSO 80%	Sonda ultrassônica**

<b>ES4</b>	EtOH Cer.:DMSO 80%
<b>ES5</b>	i-PrOH:H <sub>2</sub> O 80%
<b>ES6</b>	i-PrOH:DMSO 80%
<b>ES7</b>	EtOH:MEC 80%
<b>ES8</b>	AcOEt 100%

---

Uma massa aproximada de 25 g de **EDS** foi transferida para erlenmeyer e tratada com 150 mL de solução extratora sob homogeneização. O extrato foi coletado após filtragem sob pressão do sobrenadante e remoção do solvente. As extrações foram conduzidas em triplicata.

### **4.3. Extração em fase sólida**

Entre os solventes selecionados, DMSO (P.E = 189 °C) não é facilmente removido da solução através de evaporação sob pressão reduzida, procedimento comum no preparo de extratos, necessitando altas temperatura para sua volatilização. Para obtenção do extrato seco, evitando degradação dos analitos, formação de artefatos indesejados e proliferação de microrganismos, foi realizada uma etapa para remoção do solvente, um *Clean up*, utilizando os princípios da extração em fase sólida.

O procedimento foi realizado com auxílio de pressão negativa constante com cartucho octodecila ativado com 10 mL de etanol e condicionado com 15 mL de água ultrapura. Um volume aproximado de 15 mL de amostra foi aplicado e o cartucho foi lavado com 25 mL de água e eluído com 10 mL de etanol. O eluato foi recuperado em evaporador rotativo a 40 °C.

### **4.4. Determinação da atividade antimicrobiana**

Foram realizados ensaios de atividade contra microorganismos em duas bactérias gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228), uma bactéria gram negativa (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13833) e um fungo (*Candida albicans* ATCC 14408). As bactérias foram cultivadas em ágar de crescimento Mueller-Hinton durante 24 horas a 37 °C e o fungo em meio de cultura sólido Sabouraud por 48 horas a 37 °C.

#### **4.4.1. Avaliação qualitativa**

Extratos e óleos essenciais foram testados segundo o método de KIRBY-BAUER (1996) com inóculos preparados pela suspensão direta de colônias em solução salina a 0,9% NaCl, ajustada para o equivalente a um padrão de 0,5 da escala McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Placas de Petri estéreis (90 x 15) foram preparadas com cerca de 25 mL de ágar Mueller-Hinton ou Sabouraud e três perfurações de 6 mm de diâmetro foram feitas, correspondendo a aplicação do controle positivo, controle negativo e do tratamento. No caso dos óleos, três discos brancos estéreis (6 mm) foram posicionados sobre a placa. A suspensão do inóculo foi aplicado na placa de maneira uniforme com o auxílio de swabs esterilizados.

Os extratos foram testados na concentração de 100 mg/ mL preparado em DMSO 100% e aplicados no volume de 50 µL e 10 µL de óleo puro nos testes com óleo essencial. Ciprofloxacina (50 µg/mL) foi utilizada como controle positivo para as bactérias, anfotericina B (50 µg/mL) para o fungo, e DMSO 100% como controle negativo. Após período apropriado de incubação a 37 °C (24h para as bactérias e 48h para o fungo), mediu-se com auxílio de paquímetro a formação de halos de inibição ao redor dos discos ou das perfurações na placa. Os resultados foram expressos como a média do halo de inibição de três



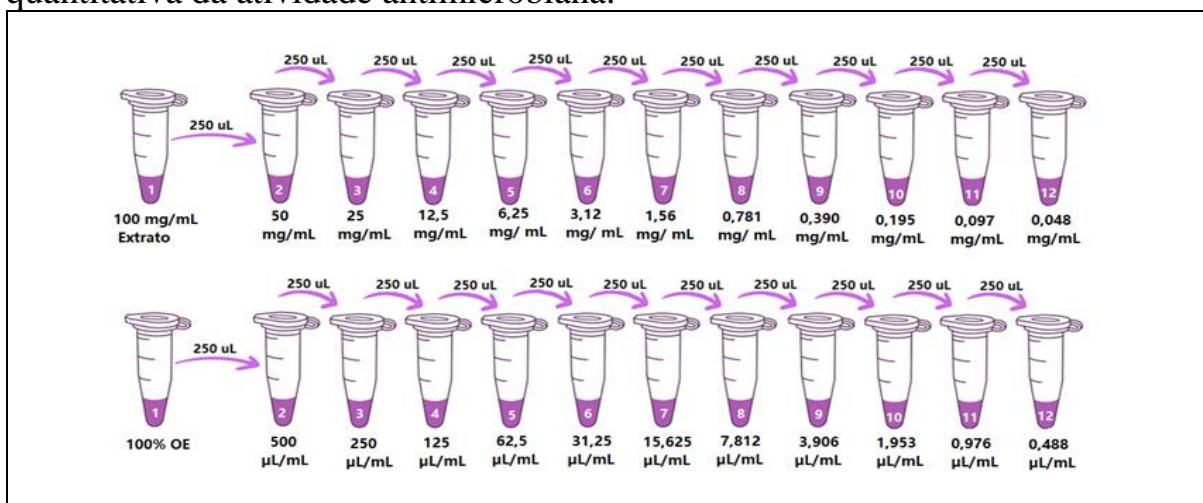
réplicas e o desvio padrão da medida, sendo considerado como ativo contra o microrganismo amostras com halos de inibição maiores que 10 mm.

## 4.4.2. Avaliação quantitativa

### 4.4.2.1. Determinação do $CI_{50}$

As amostras consideradas ativas foram submetidos a avaliação quantitativa da extensão da atividade antimicrobiana utilizando a metodologia de microdiluição (ELOFF, 1998), em triplicata. Para os extratos, foram preparadas diluições a partir de uma solução 100 mg/mL em meio de cultura líquido (Mueller-Hinton para bactérias, Sabouraud para fungo) com 1% (v/v) de DMSO, e para os óleos, suspensões em caldo de meio de cultura a partir do material puro. Diluiu-se de forma seriada (1:2) em eppendorf a solução inicial, como é representado na FIGURA 13.

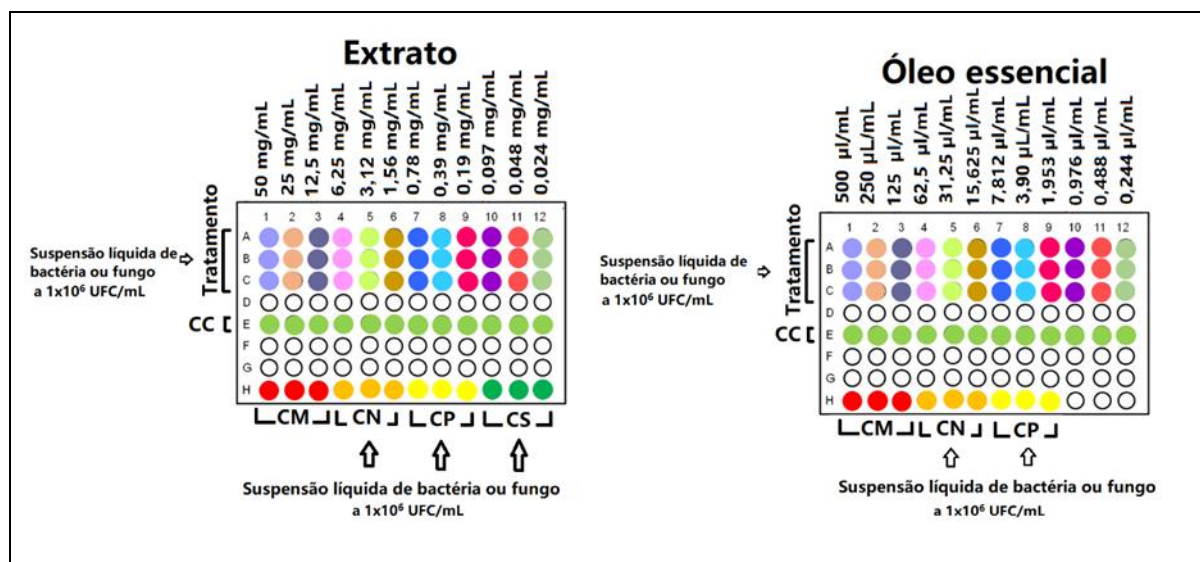
FIGURA 13: Preparo de amostras por diluição seriada (1:2) para determinação quantitativa da atividade antimicrobiana.



Em placa de 96 poços, 50 µL das soluções 1-12 foram incubadas a 37 °C com 50 µL de inóculo preparado em solução salina 0,9% a  $1 \times 10^8$  UFC/mL

e diluído até  $1 \times 10^6$  UFC/mL com meio de cultura líquido, obtendo-se uma concentração final no poço de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Após incubação por 24 ou 48 horas, 50  $\mu$ L de solução de reagente de viabilidade celular cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) 0,5 mg/ mL foi adicionado nos poços e incubados por mais 3h a 37 °C. Os dados de absorvância foram adquiridos em espectrofotômetro com suporte para placa (625 nm). Apenas meio de cultura foi utilizado como controle negativo e ciprofloxacina (bactérias) a 50  $\mu$ g/mL como controle positivo. Um branco de amostra, composto por 50  $\mu$ L de amostra e 50  $\mu$ L de meio de cultura foi feito para descontar a coloração intrínseca do extrato ou óleo. A faixa de concentração testada para os extratos correspondeu de 50 a 0,024 mg/mL e de 500 a 0,244  $\mu$ L /mL para os óleos essenciais como descrito na FIGURA 14.

FIGURA 14: Preparo das placas de inoculação para teste quantitativo de atividade antimicrobiana. **CC**: controle de coloração; **CM**: controle do meio de cultura; **CN**: controle negativo; **CP**: controle positivo; **CN**: controle negativo; **CS**: controle de surfactante (DMSO).



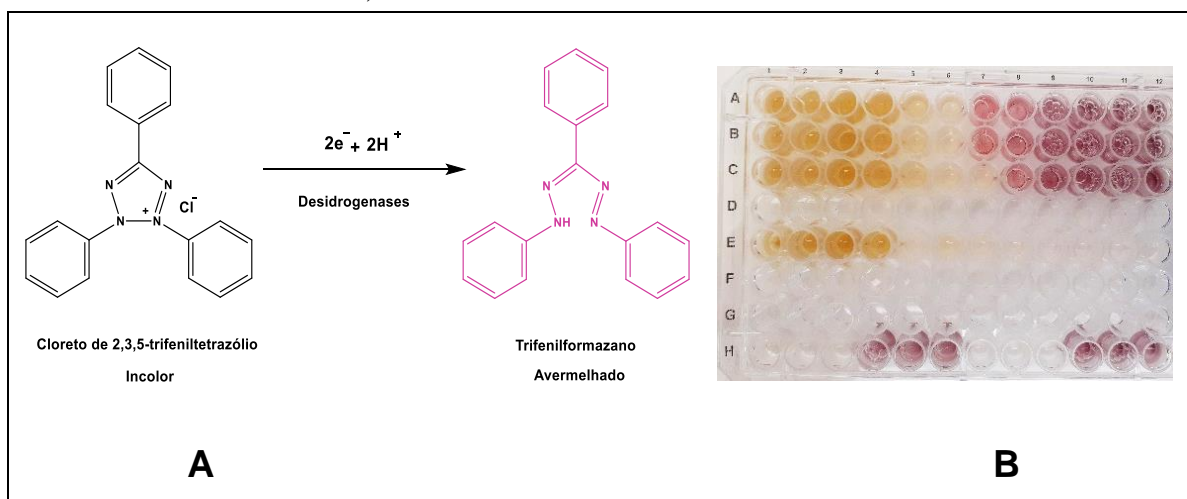
O valor de concentração onde há inibição de 50% da viabilidade dos microorganismos ( $CI_{50}$ ) foi determinado pelo ajuste segundo uma equação polinomial de grau 2 da concentração de amostra pela viabilidade celular (%)

adquirida segundo dados espectrofotométricos e representado como a média de três leituras.

#### 4.4.2.2. Determinação da CIM

O valor da CIM, concentração mínima necessária para que não haja crescimento visível do microrganismo, foi determinado segundo inspeção visual da placa inoculada segundo descrito no item anterior. A conversão do reagente TTC (incolor) para sua forma reduzida, 1,3,5 – trifenilformazan (avermelhado) pela ação de desidrogenases presentes no metabolismo celular microbiano ativo é o indicativo da viabilidade celular do microrganismo avaliado (ELSHIKH et al., 2016).

FIGURA 15: **A**: Reação de oxidorredução do reagente de viabilidade TTC que ocorre em tecidos vivos devido a ação de desidrogenases; **B**: Placa de 96 poços inoculada com microrganismo, demonstrando a conversão do reagente de incolor (não há viabilidade celular visível) para rosa/vermelho (onde é possível visualizar células viáveis).



#### 4.4.2.3. Determinação da CBM

Nesta etapa, 10  $\mu$ L das soluções inoculadas segundo já descrito foram semeadas em placa de Petri estéreis preparadas com ágar apropriado e

incubadas a 37 °C por 24 h ou 48 h. O valor de CBM ou CFM, valor de concentração mínimo onde nenhum crescimento da bactéria ou fungo é observável, foi definido por inspeção visual das placas (PFALLER et al., 1995).

#### 4.5. Avaliação do potencial fotoprotetivo *in vitro*.

O fator de proteção solar (FPS) foi calculado segundo o método descrito primeiramente por MANSUR e colaboradores (1986) usando a espectrofotometria na região do ultravioleta. O cálculo desse valor acompanha a seguinte relação:

**Equação 1:** Equação de Mansur para determinação de fator de proteção solar *in vitro*.

$$FPS_{\text{espectrofotométrico}} = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

Sendo o termo  $EE(I)$  denominado como espectro de resposta eritemal, que expressa a sensibilidade da pele a radiação ultravioleta,  $I(I)$  como espectro de intensidade solar,  $Abs(I)$  a absorbância da amostra e  $CF$  o fator de correção convencionalmente de valor 10. Os valores  $EE \times I$  são constantes, atribuídos matematicamente por SAYRE e colaboradores (1979) e dados na TABELA 7.

TABELA 7: Produto  $EE \times I$  normalizado para o cálculo de FPS *in vitro*.

	Comprimento de onda (nm)	EE × I (normalizado)	
	290	0,0150	
	295	0,0817	
	300	0,2874	
Para	305	0,3278	os ensaios, 20 mg pesados e solubilizados em
	310	0,1864	
dos extratos foram	315	0,0839	
	320	0,0180	
quantitativamente	<b>Total</b>	1	

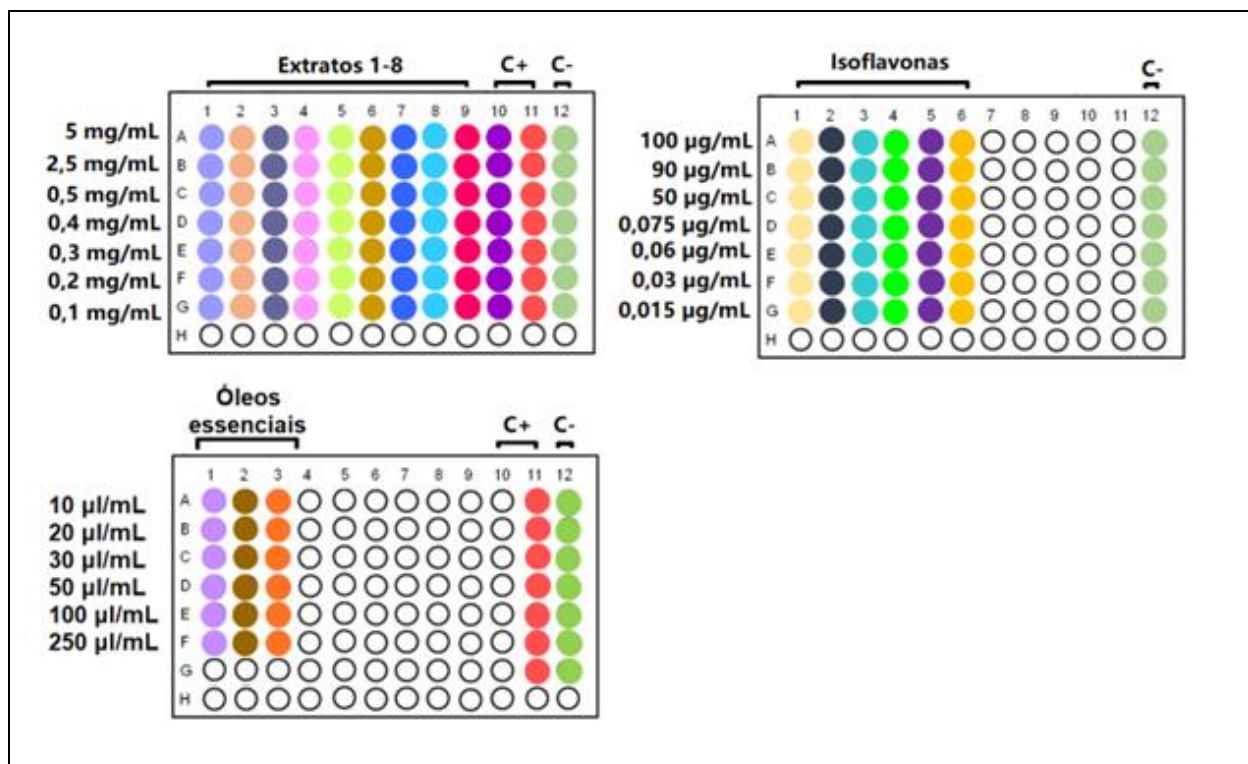
2 mL de solução etanol P.A a 80% obtendo-se uma solução 10 mg/mL. Para

determinar a concentração mínima efetiva (CME) uma série de diluições foi realizada, assim os extratos foram testados na faixa de concentração entre 5 e 0,1 mg/mL. Os valores de absorção das amostras foram obtidos no intervalo entre 290 e 320 nm com intervalos de 5 nm entre as leituras, com etanol 80% como branco. Soluções em metanol P.A das isoflavonas foram testadas separadamente na faixa de concentração entre 100 µg/mL e 0,015 µg/mL. Os óleos essenciais foram testados na faixa de entre 10 µg/ mL e 250 µg/mL preparados em etanol. Benzofenona foi utilizada como controle positivo.

Os dados foram adquiridos em espectrofotômetro com suporte para placas de 96 poços. As diluições foram preparadas diretamente nas placas, segundo representado na FIGURA 16 , ajustadas para um volume final de 100 µL no poço. Para manter os valores de absorbância abaixo de 1, algumas soluções foram diluídas e o valor final foi apresentado como o produto do fator de diluição pelo FPS calculado.

Os resultados foram expressos como concentração mínima efetiva (CME), para um valor de FPS = 6 e o desvio padrão da medida. Os dados foram processados utilizando a análise de variância (ANOVA) e teste de significância de Tukey a nível de confiança de 95% ( $\alpha=0.05$ ).

FIGURA 16: Valores de concentrações dos extratos da semente de *G. max* , dos padrões de isoflavonas e óleos essenciais **OEGe**, **OECa** e **OETA** para avaliação do potencial do potencial fotoprotetivo.



#### 4.6. Determinação da atividade antioxidante.

##### 4.6.1. Teor redutor total

O ensaio foi realizado segundo o método adaptado de PIRES et. al., (2017a), que utiliza a reação de redução do reagente de Folin-Ciocalteu para determinação do conteúdo fenólico de uma amostra e relaciona com sua capacidade antioxidante (FIGURA 17).

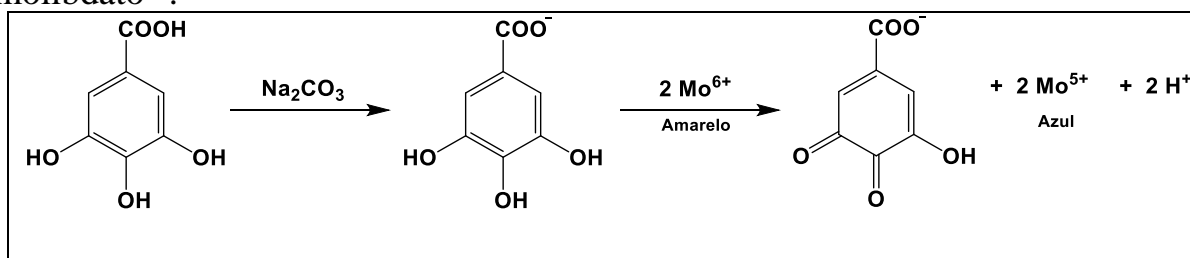
Uma curva de calibração foi construída a partir de uma solução padrão de ácido gálico a 200 µg/mL em placa de 96 poços segundo descrito na TABELA 8. Após 20 min de incubação em temperatura ambiente e local protegido de luz direta, as absorbâncias foram registradas em espectrofotômetro com suporte para placas em comprimento de onda de 760 nm. Um ajuste linear foi plotado relacionando a concentração do padrão com os valores de absorbância obtidos em triplicata.

TABELA 8: Preparo da curva de calibração de ácido gálico frente ao reagente Folin-Ciocalteu.

Ácido gálico (µL)	Folin-Ciocalteu 3%	Etanol (µL)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 10% (µL)	V. final (µL)	Concentração no poço (µg/mL)
3	20	17	60	100	6
6	20	14	60	100	12
9	20	11	60	100	18
12	20	8	60	100	
15	20	5	60	100	
18	20	2	60	100	

Um volume de 20 µL de soluções de extratos, óleos (3 mg/ mL) e isoflavonas (0,3 mg/mL) em Etanol 80% foram testadas. A concentração final das amostras foi ajustada com a adição de 20 µL de reagente e 60 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10% obtendo-se 0,6 mg/mL para extratos e óleos, e 0,06 mg/ mL para os padrões. Após período de incubação, os dados de absorbância foram obtidas como descrito. Um branco de amostra, composto apenas por extrato/óleo e ajustado para o volume final de 100 µl com etanol P.A, foi feito de forma a descontar quaisquer interferências nos resultados devido a presença de pigmentos nas amostras. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por massa de amostra, como a média de três leituras e o desvio padrão da medida.

FIGURA 17: Reação de compostos fenólicos (exemplificado pelo ácido gálico) com o complexo de molibdato no reagente de Folin-Ciocalteu. A solução inicial de coloração amarela é convertida para azul com a redução de molibdato<sup>6+</sup> para molibdato<sup>5+</sup>.



#### 4.7.2. Redução do radical DPPH

A extensão da capacidade antioxidante das amostras com maior conteúdo fenólico total foi avaliado segundo a redução do radical 2,2-diphenyl-1-picrilhidrazil (DPPH) de acordo com método adaptado de PIRES e colaboradores (2017b). O método se baseia na conversão do radical de coloração roxa para sua forma reduzida amarela. Em uma microplaca de 96 poços, foram preparadas diversas diluições a partir de soluções de 3 mg/mL. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente, protegidas da luz direta, com uma solução aquosa contendo 32 µg/mL de DPPH, conforme detalhado na TABELA 9. Após vinte minutos, a absorbância foi adquirida em espectrofotômetro com suporte de microplacas no comprimento de onda de 517 nm. Um branco de amostra preparado em etanol na sua respectiva concentração foi preparado de forma que fossem descontados os valores de absorbância referentes a amostras ricas em pigmentos.

A atividade antioxidante foi expressa como a média de três réplicas do ensaio, onde o valor em porcentagem de atividade antioxidante (%AAO) é obtido com a relação expressa na EQUAÇÃO 2.

O cálculo da concentração efetiva de amostra necessária para reduzir 50% do radical do meio (CE<sub>50</sub>) foi feito pelo ajuste logarítmico da concentração pela porcentagem de atividade antioxidante.

Equação 2: Cálculo da atividade antioxidante em função da redução do radical DPPH.

$$\%AAO = \frac{Abs_{Controle\ DPPH} - Abs\ amostra}{Abs\ Controle\ DPPH} \times 100$$



TABELA 9: Preparo das amostras para determinação da concentração de inibição de 50% do radical DPPH.

DPPH ( $\mu\text{L}$ )	Amostra ( $\mu\text{L}$ )	EtOH ( $\mu\text{L}$ )	V. final ( $\mu\text{L}$ )	Concentração de amostra no poço (mg/mL)
20	0	180	200	0,0
20	20	160	200	0,3
20	40	140	200	0,6
20	60	120	200	0,9
20	80	100	200	1,2
20	100	80	200	1,5
20	120	60	200	1,8

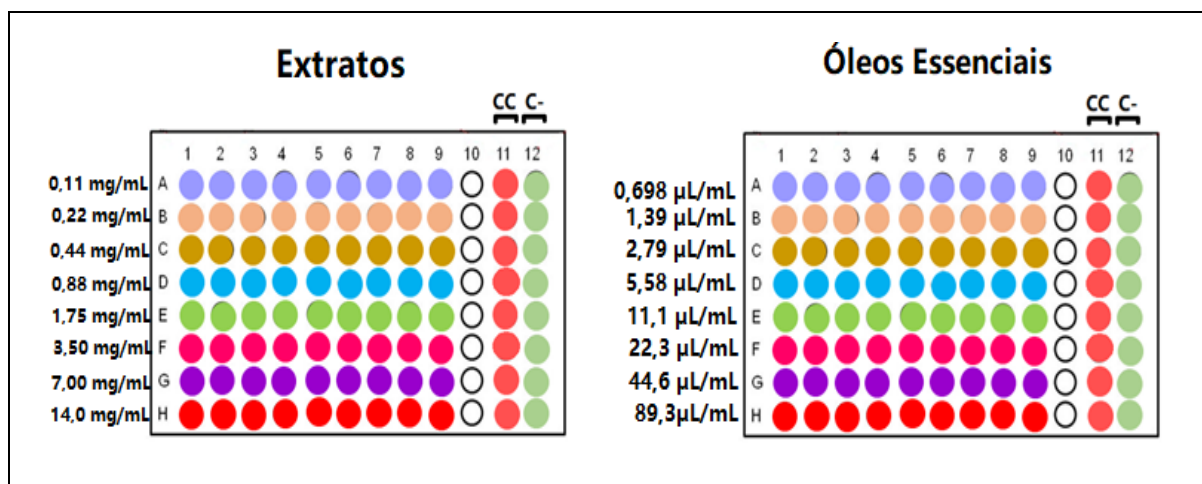
#### 4.8. Avaliação da citotoxicidade

A determinação da atividade citotóxica foi feita em colaboração com o Prof. Dr. Filipe Vieira e da aluna de doutorado Karine Zanotti no Departamento de Química da UFSCar.

As amostras foram avaliadas frente a linhagem celular MRC-5 (fibroblasto não-tumoral de pulmão) por meio do método colorimétrico utilizando o reagente de viabilidade celular brometo de 3-(4,5- dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este método consiste na redução do MTT, de coloração amarela, em cristais roxos de formazan através da ação de desidrogenases em células viáveis. (MOSMANN, 1983).

As células foram semeadas em placa de 96 poços, a uma densidade celular de  $1,5 \times 10^4$  células/poço, em 150  $\mu\text{L}$  de meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* suplementado com 10% de soro bovino fetal. Após 24 h de incubação sob condições de 5% de  $\text{CO}_2$  à 37 °C, as células foram tratadas com 0,75  $\mu\text{L}$  das soluções das amostras preparadas em EtOH 80% em concentrações diferentes (FIGURA 18). As placas foram incubadas por 48 h.

FIGURA 18: Preparo das amostras de extrato de *G. max* e óleos essenciais em placa de 96 poços para determinação da atividade citotóxica.



Posteriormente, foram adicionados 50 µL de solução MTT (1 mg/mL) em cada poço, e mantidos em incubação por 4 h. Após este período, a solução de cada poço foi cuidadosamente descartada e adicionados 100 µL de isopropanol para solubilizar os cristais de formazan gerados. A leitura da absorbância nos poços foi obtida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm e a viabilidade celular calculada segundo a Equação 3.

Equação 3: Cálculo de viabilidade celular segundo a absorbância.

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{\text{Média da absorbância do composto}}{\text{Média da absorbância do controle}} \times 100$$

O cálculo da concentração efetiva de amostra necessária para reduzir 50% do radical do meio (CE<sub>50</sub>) foi feito pelo ajuste linear da concentração pela porcentagem de viabilidade celular utilizando o software GraphPad Prism.

A razão entre o CI<sub>50</sub> e CE<sub>50</sub>, denominado índice de seletividade (IS) foi utilizado como parâmetro de citotoxicidade para comparação entre os resultados obtidos frente a microrganismo, segundo descrito em item anterior.

## **4.9. Identificação dos ativos.**

### **4.9.1. Isoflavonas de *G. max*.**

A identificação das isoflavonas nos extratos preparados foi realizada em duas etapas: Identificação através de espectrometria de massas por determinação da massa exata e padrão de fragmentação em UHPLC-ESI-QTOF-MS e determinação do conteúdo dos marcadores selecionados por HPLC-DAD/UV.

### **4.9.2. Análise em HPLC-ESI-QTOF-MS.**

As análises foram executadas em cromatógrafo a líquido de ultra eficiência equipado com espectrômetro de massas *Time-of-Flight*. Uma coluna de fase reversa (ACQuity UPLC CSH Fenil-Hexil; 2,1x100 mm, 1,7 µm) foi utilizada para as análises. A fase móvel consistiu em um gradiente preparado com 0,1% ácido fórmico em água (A) e em metanol (B). O programa de gradiente adotado consistiu em 0-1 min a 30% de B, 1-10 min 100% de B, 10-13 min 100% de B; 13- 15 min 100-30% de B, 15-17 min 30% de B a uma vazão de 0,3 mL/min. O volume de injeção foi de 3 µL e temperatura de coluna a 40 °C. O espectro de massas na faixa de 50-1500  $m/z$  foi obtido por ionização em *electrospray* no modo positivo para determinação das massas exatas dos analitos. As condições do espectrômetro foram otimizadas e as seguintes condições foram adotadas para as análises: temperatura do gás 220 °C, pressão gás nebulizador 1,5 bar, e potencial do capilar e fragmentor a 100 V. As análises em UHPLC-QTO/MS foram realizadas no mesmo instrumento descrito. As energias de colisão foram otimizadas para 30 eV para obtenção dos íons-produtos característicos.

### 4.9.3. Análise em HPLC-UV/DAD

As análises foram conduzidas em duas etapas: otimização dos parâmetros de análise e identificação e quantificação dos analitos.

A primeira etapa foi realizada em cromatógrafo a líquido de alta eficiência (*SHIMADZU LC-20 Series*) equipado com detector de arranjo de díodos. Foi realizada uma varredura espectral de 200-400 nm das amostras e de padrões de isoflavonas para auxiliar na identificação dos analitos e determinar o comprimento de onda ideal para as análises.

As análises seguiram em cromatógrafo a líquido de alta eficiência (*Agilent 1200 Infinity Series*) equipado com lâmpada de deutério e gerenciado pelo *software Agilent OpenLab*. O gradiente de eluição otimizado, como descrito na TABELA 10, foi utilizado para as subseqüentes análises, onde os dados foram adquiridos no comprimento de onda de 256 nm, fluxo de fase móvel a 0,8 mL/min, temperatura de coluna a 40 °C e volume de injeção de 20 µL. A aquisição de dados foi otimizada em coluna de fase reversa octodecila (*PHENOMENEX Luna Phenyl Hexyl 250 x 4.60 mm, 5µ*) e fase orgânica de metanol acidificado a 0,1% com ácido acético, por injeções consecutivas das amostras e soluções padrão dos analitos. Soluções padrões em metanol de seis isoflavonas (daidzeína, daidzina, gliciteína, glicitina, genisteína e genistina) foram preparadas e analisadas na forma de uma mistura a 10 µg/mL cada, e separadamente a 45 µg/mL de forma a otimizar o gradiente de eluição e identificar os analitos na matriz de soja.

As amostras foram analisados pela pesagem quantitativa dos extratos e solubilização em metanol 80% até uma concentração de 3 mg/mL em banho ultrassônico por 5 min e filtradas em membrana de Nylon com poro de 0,22 µm.

TABELA 10: Gradiente de eluição para análise em CLUE-DAD/UV das isoflavonas de *G. max*.

<b>Tempo (min)</b>	<b>MeOH (%)</b>
0,01	40
3	40
7	55
10	60
15,5	67
16	80
20	100
26	100
26,50	40
34	40

O teor de isoflavonas foi determinado segundo o preparo de curvas analíticas em HPLC-UV a 256 nm. Para isso, uma sequência de soluções padrões de daidzeína, gliciteína e genisteína, em diferentes concentrações foram analisadas em triplicata. A curva analítica foi preparada pela diluição de soluções-estoque a 200 µg/mL das isoflavonas em metanol. O teor das isoflavonas nas amostras foi calculado segundo ajuste linear da curva analítica, utilizando a equação da reta que relaciona área do pico com a concentração.

TABELA 11: Pontos das curvas analíticas preparadas.

<b>Ponto</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>		
	<b>Daidzeína</b>	<b>Gliciteína</b>	<b>Genisteína</b>
<b>1</b>	5	2	1
<b>2</b>	10	5	2
<b>3</b>	15	9	3
<b>4</b>	20	10	5
<b>5</b>	25	15	10
<b>6</b>	30	20	20
<b>7</b>	40	50	50
<b>8</b>	50	80	80
<b>9</b>	80	100	100

Os resultados foram expressos como a média de três leituras e o desvio padrão da medida. Os limites de detecção e quantificação foram calculados segundo a equação 4 e 5, respectivamente. Os dados foram processados utilizando a análise de variância (ANOVA) e teste de significância de Tukey a nível de confiança de 95% ( $\alpha=0.05$ ).

Equação 4: Cálculo do limite de detecção, onde DP= desvio padrão do coeficiente linear e ca= coeficiente angular.

$$LD = DP \times \frac{3}{ca}$$

Equação 5: Cálculo do limite de detecção, onde DP= desvio padrão do coeficiente linear e ca= coeficiente angular.

$$LD = DP \times \frac{10}{ca}$$

#### 4.9.4. Compostos voláteis de óleos essenciais

O perfil químico dos óleos essenciais foram obtidos em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas em coluna DB-5MS (30x0,250 mm; 0,25  $\mu$ m). A temperatura de forno foi mantida inicialmente a 40°C, com temperatura de injeção de 250 °C, fluxo total de 34 mL/min, fluxo de coluna a 1mL/min e velocidade linear de 36, 1 m/s. A temperatura da fonte e interface foi ajustada para 290 °C com tempo de corte de solvente de 3 minutos. A programação de aquecimento foi realizada segundo apresentado na TABELA 12, totalizando um tempo de análise de 45 min. O injetor automático foi programado no modo de injeção líquido em *split* 1:30. As amostras foram preparadas pela diluição de 10  $\mu$ L de óleo bruto em 1000  $\mu$ L de acetona grau HPLC.

TABELA 12: Programação de temperatura para análise dos voláteis de óleos essenciais por GC-MS.

Taxa (°C/min)	Tempertatura (°C)	Tempo (min)
---------------	-------------------	-------------

-	40	3
4	150	-
7	250	10

Os compostos foram anotados segundo perfil de similaridade > 92 com a biblioteca espectral interna NIST. A identidade dos compostos foi confirmada segundo cálculo do índice de retenção, de acordo com a Equação 6, usando uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos homólogos (C7-C40) preparados e analisados sob as mesmas condições descritas.

Equação 6: Cálculo do índice de retenção, onde  $tR^x$ : tempo de retenção do composto x;  $tR^n$ : tempo de retenção do n-alcano que eluiu antes do composto x;  $tR^{n+1}$ : tempo de retenção do n-alcano que eluiu depois do composto x; n: número de carbono do n-alcano que eluiu antes de x; n+1: número de átomos de carbono do n-alcano que eluiu depois de x.

$$IR(x) = 100 n + 100 \frac{(tR^x - tR^n)}{(tR^{n+1} - tR^n)}$$

## 4.10. Nanocarreadores

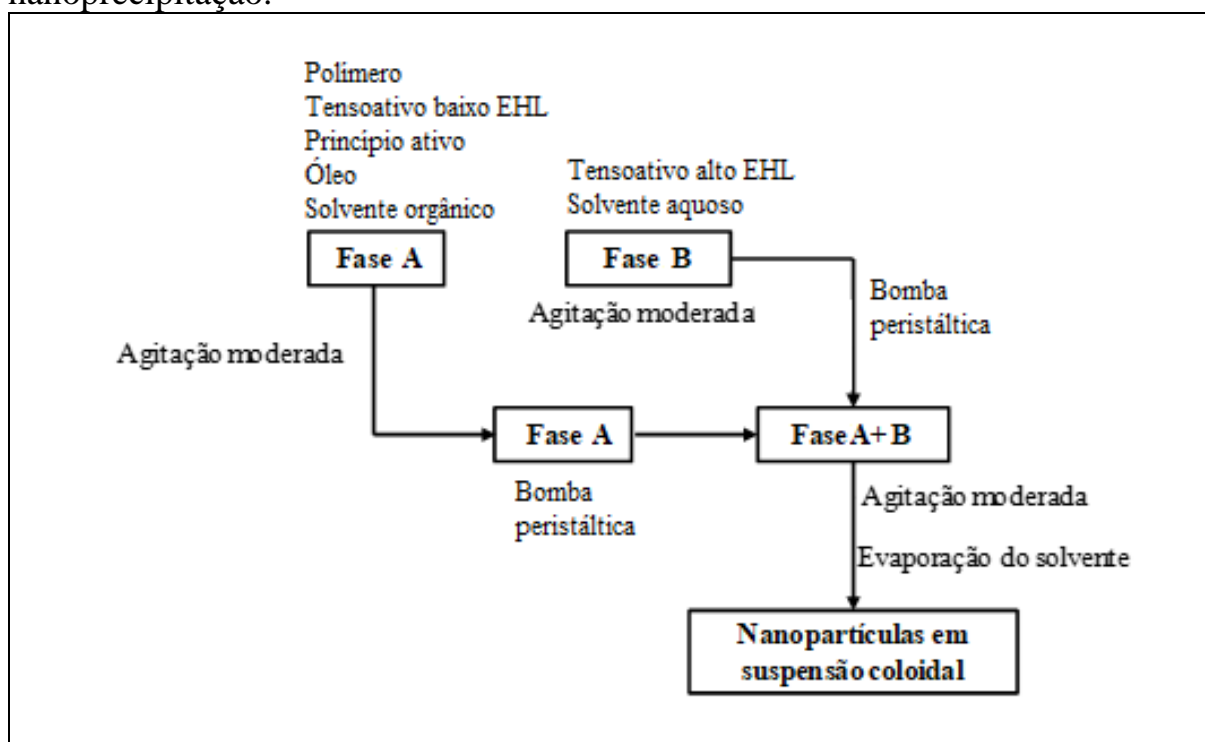
### 4.10.1. Preparo das nanocápsulas em suspensão coloidal

Para obtenção de cápsulas em suspensão coloidal fez-se o uso da técnica de nanoprecipitação do polímero pré-formado (NPPT) para a preparação como descrito por FESSI et al. (1998). Para isso, duas soluções de polaridade diferentes foram preparadas. A fase orgânica **A**, constituída pelo polímero de revestimento, um tensoativo de baixo equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL), o componente ativo (extrato ou óleo essencial) e um óleo, foi vertida sobre a fase aquosa **“B”**, contendo um tensoativo de alto EHL nas proporções indicadas na TABELA 13. O processo foi conduzido lentamente, com aquecimento inicial até 40 °C até solubilização total do polímero, sob agitação branda, segundo demonstrado na FIGURA 19.

TABELA 13: Composição das fases para preparação de nanocápsulas pelo método de nanoprecipitação.

Fase	Composição
<b>A (orgânica)</b>	
Polímero	Policaprolactona 45000 (250 mg)
Tensoativo baixo EHL	Span 80 (195 mg)
Princípio ativo	Extrato ou Óleo essencial (60 mg)
Óleo	Oleodato de isodecila (775 mg)
Solvente	Acetona (65 mL)
<b>B (aquosa)</b>	
Tensoativo alto EHL	Tween 80 (195 mg)
Solvente	Água (135 mL)

FIGURA 19: Fluxograma de preparo de nanocápsulas segundo o método de nanoprecipitação.



A solução resultante foi mantida sob agitação por 10 min em temperatura ambiente. O solvente orgânico utilizado foi removido por evaporação sob pressão e o volume final da emulsão foi ajustado até 50 mL. Duas formulações



foram preparadas, uma contendo o extrato de soja enriquecido com isoflavonas e o outro contendo um óleo essencial.

#### **4.10.2. Preparo das nanocápsulas em pó**

Para obtenção de material contendo dois tipos de princípios ativos selecionados, advindos do extrato de soja e dos óleos essenciais, as amostras foram preparadas pela mistura de 50 mL de suspensão coloidal contendo as nanopartículas de extrato e 50 mL de suspensão coloidal contendo óleo essencial. As soluções coloidais preparadas foram secas por método de secagem por aspersão utilizando como suporte de secagem, dióxido de sílica coloidal (Aerosil-2000®) a 3% (m/v). Um Mini *Spray-Dryer* (BÜCHI B-290) foi empregado no modo contra-corrente equipado com agulha de fluídos. Uma agulha com orifício 0,7 mm será utilizada com ar comprimido como gás atomizador. Outros parâmetros operacionais incluíram um fluxo de alimentação de 7,5 mL/min, fluxo de ar 530 L/h, pressão de ar comprimido de 0,55 bar, temperatura de entrada do ar de secagem de  $125^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ , temperatura de saída do ar de secagem de  $50^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ , diâmetro do atomizador de 0,7 mm e sistema de aspiração de 95 % ( $38\text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$ ).

#### **4.10.3. Caracterização das nanocápsulas**

A avaliação dos carreados biopoliméricos foram conduzidos de duas formas, pela determinação da estabilidade da suspensão coloidal, e dos princípios ativos dispersos, e avaliação da eficiência de encapsulamento e secagem por *Spray Dryer*

##### **4.10.3.1. Caracterização da suspensão coloidal**

O estudo da estabilidade da suspensão coloidal consideraram os parâmetros de pH, diâmetro de partículas e mobilidade eletroforética. As análises

físico-químicas foram realizadas imediatamente após a preparação das suspensões coloidais e, em períodos pré-definidos. As suspensões foram analisadas separadamente, ou seja, suspensão contendo extrato de soja (NPPE3) e suspensão contendo óleo essencial (NPPOEGe)

#### **4.10.3.1.1. pH**

Aferido usando um potenciômetro medido diretamente na suspensão coloidal em triplicatas ao longo de 15 dias após o preparo das suspensões coloidais.

#### **4.10.3.1.2. Diâmetro de partícula e mobilidade eletroforética**

A análise foi feita por espalhamento dinâmico de luz em Zetasizer Nano Series-ZS. As medidas foram obtidas em triplicata a 25 °C num ângulo fixo de 90° após diluição 0,1 mL de cada suspensão coloidal em 10 mL de água ultrapura.

#### **4.10.3.1.3. Compostos bioativos totais na suspensão coloidal.**

A quantificação dos compostos bioativos nas suspensões coloidais de extrato de soja, foram realizadas por HPLC-UV segundo método descrito anteriormente no item 4.9.3.

As suspensões coloidais (100 µL) foram tratadas com acetona (900 µL) para dissolução das nanopartículas. Após homogeneização em agitador de tubos e repouso por 60 min, uma alíquota de 500 µL foi retirada, transferida para tubo eppendorf de 1,5 mL e centrifugada por 30 mins a 14.000 rpm. Uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi retirada e seca. O material seco foi ressuspendido em 200 µL de solvente (MeOH 80%) e analisado por HPLC-UV.

#### 4.10.3.1.4. Compostos bioativos nanoencapsulados

Para avaliar o teor dos compostos bioativos encapsulados, foi necessário quantificar o teor dos compostos bioativos livres, no meio de dispersão aquoso. Por centrifugação, foi feita a separação do material disperso (nanopartículas) e do meio de dispersão em duas fases heterogêneas. Assim, após a homogeneização da suspensão coloidal, transferiu-se uma alíquota de 500 µL para tubo de centrífuga *Spin* (Costar®*Spin-X*®, 2,0 mL) com filtro acetato de celulose 0,22 µm, centrifugando por 40 min a 8.000 rpm. Após a separação das fases, uma alíquota de 200 µL da fase aquosa foi seca e ressuspendida em 200 µL de solvente (MeOH 80%) e analisado por HPLC-UV (XAVIER-JUNIOR et al., 2021). A eficiência do processo de encapsulamento foi determinado segundo a Equação 7.

**Equação 7** : Determinação da eficiência de encapsulamento incorporado em nanocarreador polimérico.

$$EE (\%) = \frac{\text{Concentração de ativo incorporado}}{\text{Concentração total do ativo}} \times 100$$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Extração de isoflavonas de *Glycine max*.

Juntamente com as isoflavonas, as sementes de soja dispõem de misturas complexas de fitoquímicos e uma extração efetiva de interferentes se mostra indispensável. Para garantir isso, diferentes soluções de extração foram empregadas e a determinação de um método de extração eficiente, com tempos de extração de 24 horas (homogeneização por hélices) e 15 minutos (sonda ultrassônica) foram avaliados.

A escolha das soluções de extração foi guiada segundo descrito por BYRNE e colaboradores (2016), sobre a importância que solventes tem no desenvolvimento de processos químicos mais ‘verdes’. Dois fatores principais têm sido considerados para a classificação de solventes verdes, a segurança e a demanda energética. O primeiro fator se refere diretamente ao impacto gerado no ambiente e na saúde humana, e o segundo à demanda energética necessária para produção, manejo e descarte devido do material. Os impactos ambientais são relacionados com o manejo correto sem que haja impactos relevantes em ambientes aquáticos ou aéreo. Outro fator associado é os perigos a saúde de quem maneja o solvente e de organismos expostos indiretamente.

Na literatura é frequentemente descrito a utilização de misturas de solventes orgânicos com água como sistemas de extração sólido-líquido de isoflavonas em grãos de soja, favorecendo a extração dos componentes glicosilados e do núcleo aglicona (ROSTAGNO et al., 2003). Metanol, acetona e etanol são as fases orgânicas mais comuns utilizadas para esse fim. Do ponto de vista ‘verde’, todas as opções descritas são viáveis, apenas com ressalvas em casos de intoxicação aguda pela exposição por tempo prolongado (CHEN et al., 2021).

Apesar da viabilidade, se faz necessário a busca por alternativas mais eficientes tanto do ponto de vista químico clássico, obtendo-se quantidades relevantes das substâncias almeçadas, quanto considerando-se uma visão de sustentabilidade. Na seguinte TABELA 14 é descrito o rendimento bruto das extrações realizadas.

TABELA 14: Massas obtidas das extrações de grãos de *Glicine max*.

<b>Extrato</b>	<b>Massa inicial (g)</b>	<b>Massa final (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>ES1</b>	25,05	4,45	17,8
<b>ES2</b>	25,01	4,72	18,9
<b>ES3</b>	25,05	0,586	2,3
<b>ES4</b>	25,03	1,06	4,25
<b>ES5</b>	25,28	0,968	3,83
<b>ES6</b>	25,04	1,02	4,07
<b>ES7</b>	25,05	1,27	5,07
<b>ES8</b>	25,01	0,565	2,26

É conhecida a influência dos fatores de extração no conteúdo de substâncias extraídas. Além das condições de extração, como o tipo de solução extratora, o método de extração é extremamente relevante (TRAN et al., 2019). A extração assistida por ultrassom destaca-se como um método eficiente ao passo que promove um período de extração curto, pouco volume de solvente necessário e baixo consumo de energia, quando comparado á técnicas mais clássicas como a maceração e a extração em soxhlet. O procedimento se baseia no fenômeno de cavitação, a formação de microbolhas dentro de um líquido submetido a ondas mecânicas com frequência maior que 20 kHz. As bolhas formadas tendem a expandir e implodirem continuamente, aumentando a pressão e temperatura do sistema. Esse processo facilita o rompimento do tecido vegetal e a transferência de massa, aumentando a eficiência da extração (GOULA, 2013).

Entre os solventes escolhidos, o álcool de cereais, produzido pela fermentação de grãos como milho e trigo, têm sido empregado como extrator de

isoflavonas em matrizes de soja. BATISTA e colaboradores (2020) definem como melhor solvente de extração de isoflavonas em resíduo industrial de soja uma solução 1:1 de álcool de cereais e água, apresentando uma maior atividade antioxidante ( $244.89 \pm 11.20$  mg EAG/g) quando comparado a uma amostra preparada em etanol. De fato, o constituinte principal do álcool de cereais é o etanol, diferenciando-se apenas pelo conteúdo de água incorporado no processo de produção.

O álcool isopropílico é utilizado industrialmente como fluido de refrigeração em aeronaves, e de forma doméstica como produto de limpeza de componentes eletrônicos e superfícies. Como solvente, poucos trabalhos descrevem a utilização de isopropanol. BANVOLGYI e colaboradores (2020) utilizam uma mistura binária i-PrOH:H<sub>2</sub>O para extrair o conteúdo fenólico de resíduo de uva. UZEL e colaboradores (2018) utiliza uma mistura ternária de isopropanol:etanol: água para extrair fenólicos de variedades de azeitonas.

Além dos álcoois, as cetonas têm sido investigadas quanto soluções extratoras de componentes fenólicos diversos. Os grupos funcionais carbonílicos presentes permitem a interação com as hidroxilas dos flavonóides. AL-FARSI e LEE (2008) e PAKDAMAN (2021) reportaram a eficiência da propanona e butanona como solventes de extração e purificação de fenólicos de *Phoenix dactylifera*, e *Pistacia vera*.

Como meio de aumentar o rendimento da extração de polifenóis, a utilização de surfactantes no meio de extração têm ganhado destaque, sobretudo surfactantes de natureza anfifílica (SHARMA et al., 2015). Dimetil sulfóxido (DMSO) possui caráter polar aprótico que permite a interação com espécies hidrofílicas e hidrofóbicas. Devido a essas propriedades é particularmente usado como veículo de liberação transdermal na área médica.

Como solvente extrator, trabalhos recentes reportam a utilização de DMSO co-solvente para a extração de metabólitos antioxidantes. KOKKALI et al. (2020) observa a influência do solvente utilizado na extração de compostos polifenólicos em *Phaeodactylum tricornutum*. Utilizando uma solução 50% de DMSO em água, o autor relata maior conteúdo total de compostos fenólicos quando comparado a metanol 100% como solvente (8 mg EAG/g / 3,16 mg EAG/g) .

As amostras **ES1** e **ES2**, preparadas sob agitação em hélices, levaram a um maior rendimento em massa do extrato de soja, de aproximadamente 18% enquanto as amostras produzidas sob homogeneização em ultrassom tiveram rendimentos menores que 5%. Essa observação é relacionada principalmente ao tempo de extração utilizado nos dois métodos, no entanto, tempos prolongados de extração podem levar a degradação gradativa dos compostos, mudando o perfil químico e as informações obtidas (BLICHARSKI e ONISZCZUK, 2017; TRAN et al. 2019). Neste sentido, os critérios para seleção da amostra de interesse foi determinada segundo os testes de atividade, de forma a relacionar com o conteúdo de isoflavonas presente nessas amostras.

## 5.2. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Glycine max* e Óleos essenciais.

Como constituintes comuns à microbiota humana, bactérias e fungos contribuem para o equilíbrio fisiológico humano através de defesa contra patógenos, auxílio na digestão e na degradação de toxinas. Em certas condições essa microbiota pode ser patogênica para o hospedeiro, desencadeando doenças diversas (BROOKS et al., 2014). Para os ensaios antimicrobianos, bactérias e fungos que compõem a microbiota normal da pele, foram selecionados de forma a avaliar a atividade dos analitos frente a manifestação patogênica desses.

As bactérias selecionadas, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *K. pneumoniae* desempenham papel importante na manifestação de doenças em humanos, desde uma infecção simples, como espinhas e furúnculos, até as mais graves, como pneumonia, endocardite e septicemia (SANTOS et al., 2007). A bactéria *S. aureus* está associado a uma ampla variedade de infecções invasivas e toxicogênicas e *S. epidermidis* é frequentemente associado a infecções oportunistas. As toxinas excretadas por bactérias do gênero *Staphylococcus* são responsáveis pela necrose epidérmica tóxica. A bactéria gram negativa *K. pneumoniae* possui alta resistência a antibióticos e causa doenças no trato digestivo e respiratório. Sua morfologia encapsulada é o principal fator de virulência e é particularmente resistente aos mecanismos de defesa do organismo humano, o que a torna letal.

A levedura *C. albicans*, é responsável por manifestações clínicas apenas quando há desequilíbrio nos mecanismos de defesa do hospedeiro humano ou da microbiota, se manifestando em regiões da pele por todo o corpo. Infecções de pele e tecidos moles são comuns devido a esse patógeno, podendo atingir desde regiões superficiais até tecidos mais profundos (PEIXOTO et al, 2014).

Além das manifestações cutâneas, os microrganismos patogênicos citados estão intrinsecamente relacionados a contaminação de materiais



cosméticos. Para a conservação adequada de formulações é necessário a utilização de sistemas conservantes, garantido a segurança e qualidade do produto.

## **5.2.1. Triagem qualitativa.**

### **5.2.1.1. Extratos de *G. max***

Os resultados da atividade antimicrobiana dos extratos de semente de soja são mostrados na TABELA 15. Foi observado que entre os extratos testados não houve inibição significativa (halo < 10 mm) dos microrganismos avaliados. Somente as amostras de extratos de soja **ES2**, **ES3** e **ES8** foram testados, esperando-se que o maior conteúdo de isoflavonas estivesse presente nessas amostras. Assim, como não foi observado atividade relevante, os outros extratos não foram submetidos aos ensaios. Foi possível verificar que entre os extratos testados não há a influência direta do processo de extração, nessa atividade observada.

A ausência da atividade pode ainda ser relacionada as condições adotadas para o ensaio. HONG e colaboradores (2006) identificaram a atividade frente a *S. aureus* de genisteína em concentrações menores que  $2 \times 10^6$  unidades Formadoras de Colônia, valor muito inferior ao usado nos testes qualitativos ( $2 \times 10^8$  UFC).

Apesar da ausência de atividade observada, na literatura alguns trabalhos descrevem a atividade inibidora microbiana da soja. CHALESHTORI e colaboradores (2017) descreve a atividade de duas variedades de soja, contra cepas de bactérias. O extrato metanólicos apresentaram atividade ideal a 100 mg/mL contra cepas como *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus* (ATCC 6538) e *K. pneumonia* (43816) no ensaio de difusão em ágar. O alto conteúdo de isoflavonas é atribuído por LALOUCKOVA et al. (2021) como responsável a

atividade antimicrobiana do extrato de soja fermentado contra cepas suscetíveis e resistentes de *S. aureus*. A genisteína encontrada na soja é um inibidor enzimático da topoisomerase IV, responsável pela replicação de DNA nos microrganismos. Foi observado também a atividade da daidzeína contra *E. coli* via interação com a membrana celular da bactéria (WU et al., 2013). Além disso, a genisteína e a daidzeína são descritos como ativos potencializadores da ação de antibióticos contra *S. aureus* (MOREL et al,2003).

TABELA 15: Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *G. max*.

Microrganismo	Amostra	Halo de inibição (mm)		
		CN	CP ± DP	Tratamento ± DP
<i>S. aureus</i>	ES2	6,00	24,0 ± 0,870	6,00 ±± 0,00
	ES3	6,00	21,7 ± 0,290	6,00 ± 0,00
	ES8	6,00	24,1 ± 0,290	6,00 ± 0,00
<i>S. epidermidis</i>	ES2	6,00	29,0 ± 2,65	6,00 ± 0,00
	ES3	6,00	28,6 ± 1,61	6,00 ± 0,00
	ES8	6,00	28,2 ± 1,89	6,00 ± 0,00
<i>K. pneumoniae</i>	ES2	6,00	27,2 ± 2,47	6,00 ± 0,00
	ES3	6,00	26,2 ± 0,760	6,00 ± 0,00
	ES8	6,00	25,2 ± 0,760	6,00 ± 0,00
<i>C. albicans</i>	ES2	6,00	21,16 ± 2,75	6,00 ± 0,00
	ES3	6,00	18,66 ± 1,44	6,00 ± 0,00
	ES8	6,00	18,5 ± 0,50	6,00 ± 0,00

Diferentes trabalhos relatam a estereoespecificidade estrutural das isoflavonas relacionadas com sua atividade antimicrobiana. O efeito biológico dessas substâncias é atribuído a presença dos grupos hidroxil fenólicos livres que possuem afinidade com proteínas e agem como inibidores de enzimas microbianas. HATANO e colaboradores (2000) descreveram que a ausência de grupos hidroxil afetam diretamente a atividade de isoflavonas em leguminosas (*Fabaceae*) contra cepas de *S. aureus*. A redução desses grupos, formando um aldeído, extingue a atividade. A presença desses grupos são relacionados ao dano

gerado nos tecidos celulares por efeitos de oxidação. Modificações estruturais no anel isoflavona que aumente sua lipofilicidade, como a presença de grupos prenil e geranil, aumenta a interação com a membrana celular dos microrganismos (KALLI-ANGEL, 2021).

A presença de um glicosídeo também parece ditar a extensão da atividade antimicrobiana em isoflavonas. Quando comparado a genistina, um glicosídeo, a daidzeína é mais ativa frente a *E. coli*. Isso é observado através de efeito de interação com a membrana da bactéria. Novamente, a lipofilicidade da molécula é determinante para a atividade, já que o glicosídeo tenderá a ser mais hidrofílico em comparação a aglicona. Isso vai de acordo com o observado ao longo de extensos estudos sobre as isoflavonas majoritárias da soja. As agliconas tendem a ser mais biologicamente ativas do que os glicosídeos neste caso (SHAMSUDIN et al., 2022).

Não são descritas atividades relevantes contra o fungo *C. albicans*. É reportado que isoflavonas preniladas, encontradas em outras espécies das leguminosas apresentam capacidade de inibição do crescimento de cepas clínicas de *C. albicans* a concentrações relevantes entre 6 e 26  $\mu\text{M}$ , mostrando que a modificação estrutural do esqueleto favorece sua atividade também no fungo filamentosos. Aqui, os extratos não mostraram atividade contra o fungo, corroborando com CUI e colaboradores (2016) que descrevem a ausência de efeito de inibição do fungo tratadas com genisteína. Nesse caso, não há inibição do microrganismo, mas é apontada uma regulação dos fatores de virulência do fungo, gerando uma maior resposta imune do hospedeiro. Ou seja, sendo um potencial de uso terapêutico e preventivo de infecções devido a esse patógeno.

Assim, segundo os resultados obtidos para esse ensaio, nessas condições os componentes dos extratos de soja testados não apresentaram atividade antimicrobiana frente as cepas utilizadas.

### 5.2.1.2. Óleos Essenciais.

O resultado do teste de triagem antimicrobiana realizada para os três óleos essenciais são apresentados na TABELA 16. Foi observado halos de inibição não relevantes do óleo de cedro atlas frente a *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *C. albicans*. O óleo de tangerina apenas não foi ativo frente a *S. aureus* com um halo de 6 mm. Foi observado que o óleo de gerânio foi ativo contra todos os microrganismos testados, destacando-se contra o fungo, onde apresentou halo maior do que aquele formado pelo controle positivo de anfotericina b (FIGURA 20, C).

TABELA 16: Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de óleos essenciais comerciais. **OEGe**: Óleo essencial de gerânio; **OECa**: Óleo essencial de cedro atlas; **OETa**: Óleo essencial de tangerina.

Microrganismo	Amostra	Halo de inibição (mm)		
		C <sup>-</sup>	C <sup>+</sup> ± DP	T ± DP
<i>S. aureus</i>	<b>OEGe</b>	6,00	12,67 ± 1,26	11,7 ± 1,15
	<b>OECa</b>	6,00	12,5 ± 0,50	7,33 ± 2,31
	<b>OETa</b>	6,00	12,64 ± 1,26	6,00 ± 0
<i>S. epidermidis</i>	<b>OEGe</b>	6,00	20,67 ± 3,89	11,7 ± 5,01
	<b>OECa</b>	6,00	21,75 ± 3,89	10,5 ± 0,00
	<b>OETa</b>	6,00	19 ± 3,12	11,3 ± 1,53
<i>K. pneumoniae</i>	<b>OEGe</b>	6,00	25,7 ± 3,06	10,7 ± 1,04
	<b>OECa</b>	6,00	24,0 ± 1,73	9,67 ± 3,75
	<b>OETa</b>	6,00	22,3 ± 0,76	10,7 ± 0,29
<i>C. albicans</i>	<b>OEGe</b>	6,00	8,5 ± 2,57	30,8 ± 2,57
	<b>OECa</b>	6,00	9,5 ± 1,50	9,50 ± 0,87
	<b>OETa</b>	6,00	10,3 ± 0,58	13,0 ± 0,50

As bactérias são agrupadas segundo os constituintes do invólucro celular. Bactérias gram positivas, possuem uma parede grossa composta por camadas de 30-100 nm de peptidoglicanos entrelaçados, formando um polímero

aniônico, o ácido teicóico. As bactérias gram negativas também apresentam essa camada de peptidoglicanos, no entanto em proporção muito menor que os análogos positivos, com apenas poucos nanômetros de espessura. Além disso, bactérias gram negativas dispõem de mais uma barreira de proteção, uma camada externa composta principalmente de lipopolissacarídeos (SILHAVY et al., 2010). Essas características tornam as bactérias gram negativas menos suscetíveis a ação de agentes antimicrobianos.

Os óleos essenciais exibem grande potencial antimicrobiano contra uma grande variedade de microrganismos. Essa atividade é geralmente atribuída a capacidade dos componentes dos óleos de romper a parede celular e membrana citoplasmática das bactérias, levando a sua eventual morte (LOPEZ-ROMERO et al., 2015).

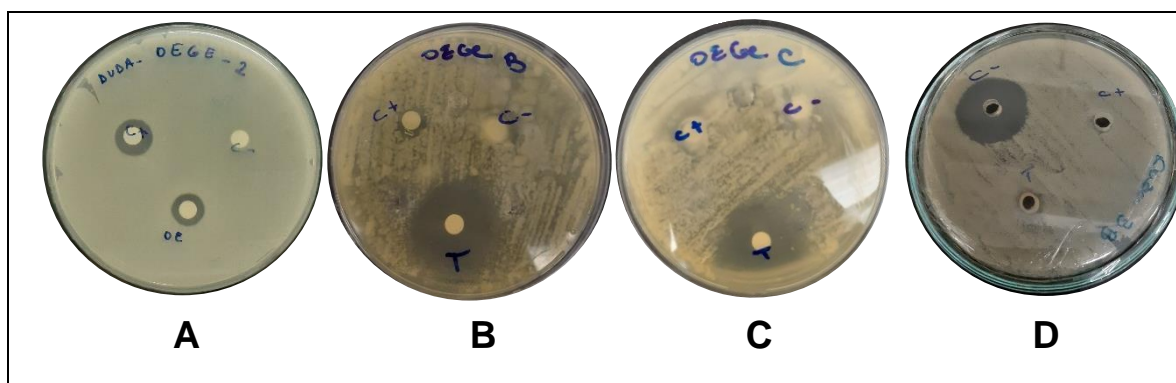
Desordens na pele é uma das mais comuns formas de infecção, sendo considerada uma das principais razões pelo qual pacientes procuram por atendimento médico. Condições dermatológicas podem particularmente serem agravadas por infecções de microrganismos como *S. aureus* e *S. epidermidis*. Nesse sentido, o uso de óleos essenciais têm sido prevalente na área de dermatologia, como principais fontes naturais para tratamento de infecções diversas (CRUZ et al., 2019).

Em recente trabalho, SANTOS et al. (2024), descreve a atividade contra *S. aureus* (ATCC 25923) do óleo de gerânio extraído das folhas de *P. graveolens*, com halo de inibição de 17 mm e MIC = 2,95 mg/mL. Para o óleo de cedro atlas, KACANIOVA et al. (2022) determina um halo de 15,2 mm e MIC = 12 µL/mL para a bactéria *S. aureus* (CCM 8223), sendo considerada uma atividade moderada e uma atividade fraca contra *C. albicans*. O óleo extraído de *C. reticulata* reportado por DENKOVA-KOSTOVA (2021) relataram atividades

inibitórias frente a *S. aureus* com halo de inibição de 20 mm e MIC = 0,006 mg/mL e *C. albicans* com halo de 13 mm e MIC = 60.

No que concerne a literatura disponível, componentes majoritários em óleos essenciais diversos são extensamente estudados como os agentes responsáveis pela ação antimicrobiana observada. o modo de ação antibacteriano do citronelol, carveol e seus isômeros, citronelal e carvona. Foi visto que o citronelol sobretudo foi o componente mais ativo frente a *S. aureus*, atuando na superfície celular da bactéria e causando a quebra da membrana celular.

FIGURA 20: Resultados da avaliação de atividade antimicrobiana qualitativa demonstrando os halos de inibição ao redor da aplicação de amostra. **A:** Óleo essencial de gerânio ativo contra *S. aureus*; **B:** Óleo essencial de gerânio ativo contra *S. epidermidis*; **C:** Óleo essencial de gerânio ativo contra *C. albicans*; **D:** Extrato 2 (ES2) inativo contra *S. epidermidis*.

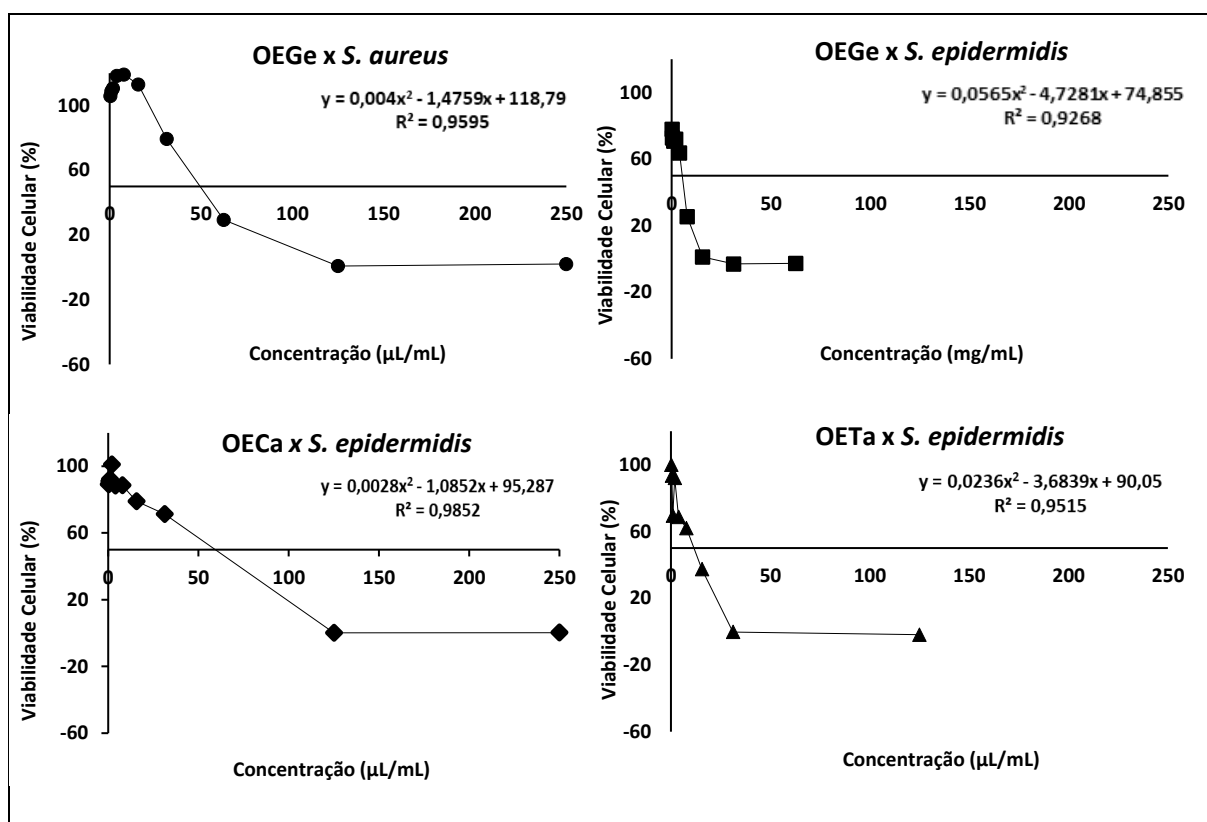


### 5.3. Concentrações inibitórias e bactericidas.

Para as amostras consideradas ativas foram calculados os valores de concentração inibitórias e bactericidas frente aos patógenos *S. aureus* e *S. epidermidis*. O cálculo foi realizado a partir de viabilidade celular em cada poço da placa, quando comparado ao controle positivo de ciprofloxacina e negativo. Os valores de viabilidade nos poços contendo surfactante foram calculados obtendo-se valores que não pudessem atrapalhar a análise dos resultados.

A FIGURA 21 representa as curvas utilizadas para o cálculo de inibição a 50% de cada amostra de óleo. As curvas representam uma função exponencial decrescente onde a partir de uma determinada concentração de amostra observa-se uma viabilidade nula do microrganismo naquele meio. A partir desse ponto não há valores de viabilidade consideráveis. A FIGURA 22 indica onde não há inibição efetiva do crescimento do microrganismo que está ativo para reduzir o reagente TTC levando ao produto de cor rosa.

FIGURA 21: Curvas de viabilidade celular de microrganismos frente a óleos essenciais evidenciando os valores de  $CI_{50}$ , onde a viabilidade celular é de 50%. **OEGe**: Óleo essencial de gerânio; **OECa**: Óleo essencial de cedro atlas; **OETA**: Óleo essencial de tangerina.



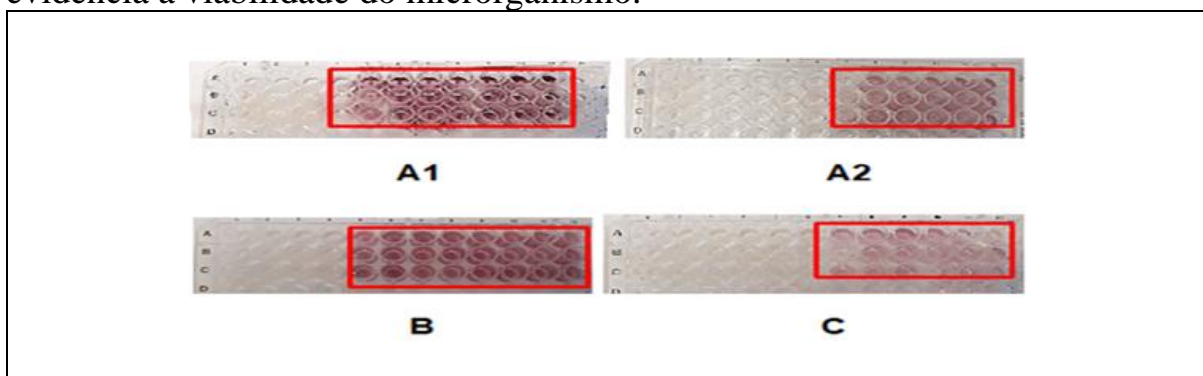
Para os óleos testados, valores de CIM menores que 2 mg/mL são considerados relevantes. Todas as amostras testadas apresentaram valores equivalentes entre 13,2 e 111 mg/mL de CIM, segundo exposto na TABELA 17.

TABELA 17: Avaliação da atividade antimicrobiana quantitativa de óleos essenciais comerciais. **OEGe**: Óleo essencial de gerânio; **OECa**: Óleo essencial de cedro atlas; **OETa**: Óleo essencial de tangerina.

Amostra	Microrganismo	CI <sub>50</sub> (µL/mL)	CBM (µL/mL)	CIM (µL/mL)	CIM (mg/mL)
<b>OEGe</b>	<i>S.aureus</i>	54,7	125	125	111
<b>OEGe</b>	<i>S. epidermidis</i>	5,63	62,5	15,6	13,9
<b>OECa</b>	<i>S. epidermidis</i>	47,5	62,5	62,5	58,2
<b>OETa</b>	<i>S. epidermidis</i>	11,7	62,5	15,6	13,2

Em trabalho anterior, ORCHARD et al. (2016) relata a atividade antimicrobiana de 59 óleos essenciais frente a patógenos de relevância dermatológica. É relatado valores de CIM 2, 2 e 1 mg/mL contra *S. epidermidis*, *S. aureus* e *C. albicans* respectivamente para o óleo essencial comercial de cedro atlas. Valores de 4, 2 e 2 mg/mL (equivalentes a unidade µL/mL) são descritos para amostras de óleo de tangerina e 1,25 , 1 e 1 mg/mL para o óleo de gerânio, frente esses patógenos.

FIGURA 22: Teste antimicrobiano quantitativo demonstrando as concentrações de inibição mínima. **A1** e **A2**: óleo essencial de gerânio frente a *S. aureus* e *S. epidermidis*; **B**: óleo essencial de cedro atlas frente a *S. epidermidis*; **C**: óleo essencial de tangerina frente a *S. epidermidis*. A mudança de coloração nos poços evidencia a viabilidade do microrganismo.





#### **5.4. Avaliação da atividade fotoprotetiva de extratos de *Glycine max* e óleos essenciais**

A radiação solar desempenha um importante papel no desenvolvimento de vida na Terra. Na saúde humana contribui para a produção de vitamina D, redução da pressão sanguínea e bem estar mental. No entanto, é crescente a preocupação relacionada aos danos na pele em função da exposição prolongada aos raios solares (JUZENIENE et al., 2011). O espectro que compreende a radiação solar que atinge a terra é composto majoritariamente por ondas de infravermelho (> 800 nm), visível (400- 800 nm) e ultravioleta (100-400 nm), que por sua vez é composta por 95% de radiação UVA (320-400 nm) e UVB (280-320 nm) (DIFFEY, 2002).

A radiação UVB é a principal responsável por causar danos à saúde humana, penetrando nas camadas mais profundas da pele e desencadeando efeitos biológicos diretos e indiretos (GRUIJL, 2000). Os efeitos da exposição por longos períodos se dão imediatamente na forma de queimaduras, fotodermatose e eritemas. Os efeitos prolongados incluem lesões que podem evoluir para câncer de pele, além do envelhecimento precoce da pele devido a interrupção da síntese de colágeno e o estresse oxidativo provocado. MERIN et al. (2022) descreve efeitos secundários em razão a exposição crônica a radiação solar na forma de alergias fotoinduzidas e efeitos imunossupressores.

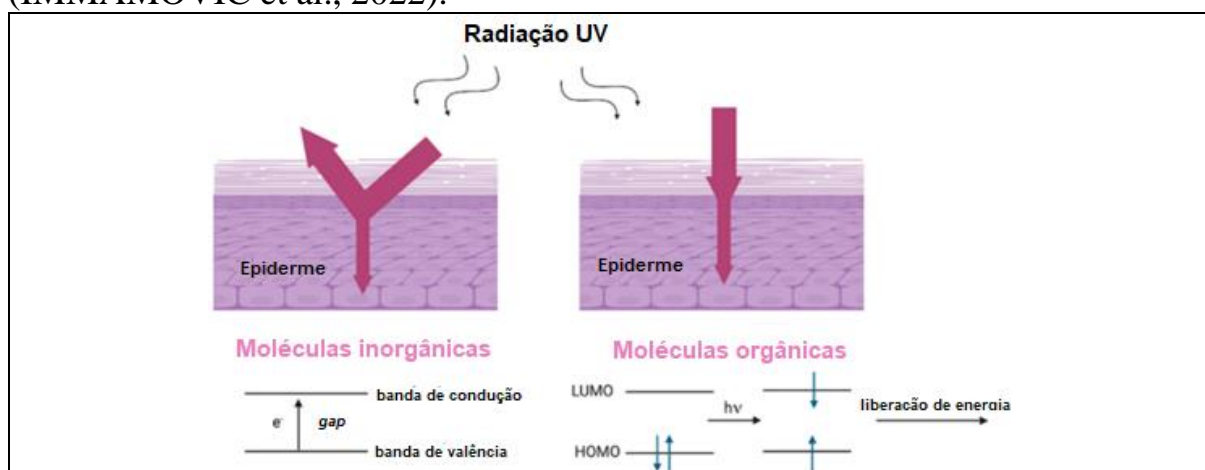
A fotoproteção é indispensável para reduzir e evitar esses efeitos. A fotoproteção inclui o uso de roupas, cosméticos, óculos de sol e protetor solar (KULLAVANIJAYA et al, 2005). Fotoproteção inclui fatores primários e secundários de preservação. O protetor solar é o fator primário, seja na forma de barreiras que refletem a radiação incidente ou que a absorvem no lugar das células.

O fator secundário inclui antioxidantes , que auxiliam na diminuição do dano da pele devido a cascata de eventos celulares causado pela exposição à radiação.

Fotoprotetores são classificados segundo a natureza do ativo envolvido, sendo eles inorgânicos ou orgânicos. Geralmente fotoprotetores orgânicos agem pela absorção da radiação e os inorgânicos pela reflexão (FLOR et al., 2007). Os filtros inorgânicos são compostos por óxidos metálicos, cujo fenômeno de espalhamento e reflexão da radiação dependem diretamente do tamanho de partícula dos óxidos. Os filtros orgânicos são compostos por moléculas capazes de absorver a radiação ultravioleta segundo a presença de grupos cromóforos.

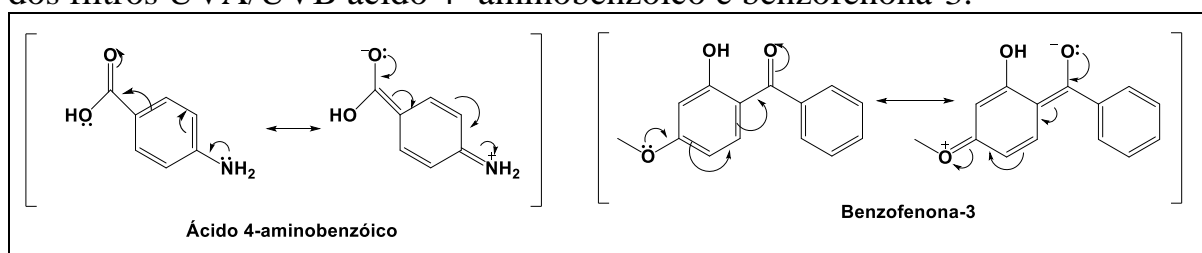
O fenômeno de absorção envolve a excitação energética de elétrons no orbital HOMO (orbital molecular de maior energia) para o orbital LUMO (orbital molecular de menor energia). O restabelecimento do estado original libera energia em comprimentos de onda maiores que não representam perigo a saúde humana (FIGURA 23). As transições energéticas que compreendem a absorção do espectro UVA e UVB são aquelas possibilitadas por anéis aromáticos, grupos carbonílicos e conjugados com elétrons não ligantes e ligações  $\pi$ .

FIGURA 23: Mecanismo de ação de filtros solares inorgânicos e orgânicos (IMMAMOVIC et al., 2022).



Os principais representantes da classe de fotoprotetores orgânicos comerciais são as benzofenonas sintéticas e os derivados do ácido aminobenzóico. Os aminobenzoatos são os bloqueadores UVB mais potentes disponíveis comercialmente, e os derivados da benzofenona como a oxibenzona (3-oxidobenzofenona) é um filtro de amplo espectro UVB. A presença de substituintes do anel aromático doadores de densidade eletrônica nas posições *orto* e *para*, geram um deslocamento da região de absorção para maiores comprimentos de onda que uma transição  $n-\pi^*$  comum, aumentando seu potencial de absorção na região do UVB (FIGURA 24).

FIGURA 24: Delocalização eletrônica que fornece estabilidade ao estado excitado dos filtros UVA/UVB ácido 4-aminobenzóico e benzofenona-3.



Tem cada vez mais sido discutido os efeitos na saúde humana e ambiental dessas substâncias. Fotoalergias e dermatites de contato são associadas a esses tipos de filtros, assim como não há uma unanimidade na comunidade científica sobre a segurança e os riscos carcinogênicos e hormonais (HEURUNG et al., 2014)). Além disso, recentemente a atenção tem se voltado para os perigos que substâncias fotoprotetivas fornecem ao ambiente aquático. A tendência de acumulação em sistemas biológicos e reatividade frente a espécies cloradas geram um debate sobre a segurança do uso de fotoprotetores baseados em benzofenonas. Como resultado alguns órgãos de regulamentação têm limitado ou proibido o uso de fotoprotetores contendo esses ingredientes. Atualmente a ANVISA permite o uso de até 10% de benzofenonas e aminobenzoatos em formulações de protetores solares.

É de grande importância a pesquisa e desenvolvimento de novos fotoprotetores. Com o surgimento do interesse em produtos de origem natural, a procura de moléculas extraídas de matrizes vegetais para substituir as sintéticas e inorgânicas existentes no mercado tem ganhado atenção (SERAFINI et al., 2015). A grande variabilidade estrutural encontrada nesses materiais garante uma gama extensa de fotoproteção. Entre substâncias de origem vegetal, são de interesse aquelas que além de promover a absorção da radiação solar, tenham capacidade de neutralizar radicais livres presentes na epiderme logo após a exposição ao sol (GUARATINI et al., 2009).

### 5.3.1. Extratos de *G. max*

A resolução da ANVISA RDC N° 629 de 2022 define um valor mínimo de fator de proteção solar igual a seis para definir um fotoprotetor. Para avaliar o potencial fotoprotetivo, os extratos de soja e padrões comerciais de isoflavonas foram testados e comparados com o controle positivo de benzofenona. Os valores de concentração mínima efetiva calculados são apresentados na TABELA 18 e TABELA 19. Foi possível verificar faixas de atividade fotoprotetiva entre 59 e 215 µg/mL para os padrões. Quando comparado com o controle positivo, os padrões de daidzeína e genisteína apresentaram melhor atividade fotoprotetiva.

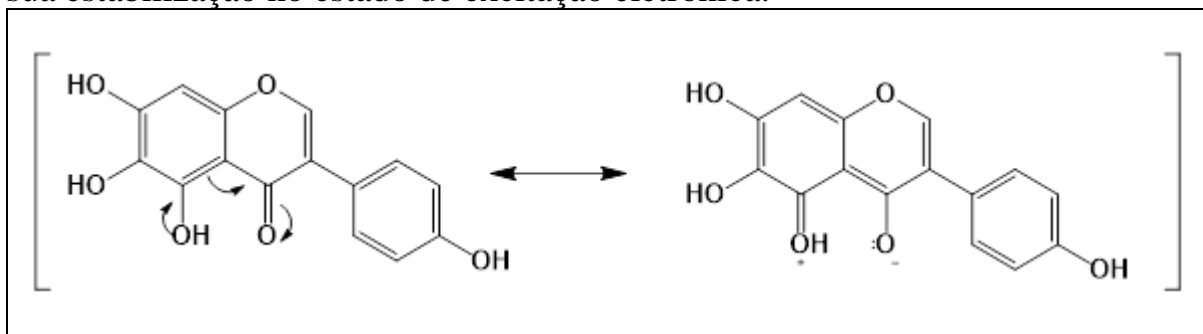
TABELA 18: Valores de concentração mínima efetiva (CME) para atividade fotoprotetiva *in vitro* de padrões comerciais de isoflavonas de soja. Letras diferentes representam uma diferença estatística a 95% de certeza. Valores de efetividades calculados para um fator de proteção solar = 6, segundo a resolução RDC N° 629 de 2022.

<b>Amostra</b>	<b>CME ± DP* (mg/mL)</b>	<b>Amostra</b>	<b>CME ± DP* (mg/mL)</b>
<b>Benzofenona (CP)</b>	0,0943 ± 0,03 <sup>a</sup>	<b>Glicitina</b>	0,215 ± 1,85 <sup>e</sup>
<b>Daidzeína</b>	0,0595 ± 1,34 <sup>b</sup>	<b>Genisteína</b>	0,0702 ± 0,249 <sup>f</sup>

<b>Daidzina</b>	$0,152 \pm 0,973^c$	<b>Genistina</b>	$0,212 \pm 1,19^e$
<b>Gliciteína</b>	$0,247 \pm 2,79^d$		

A estrutura química das isoflavonas permite transições eletrônicas na faixa que compreende a radiação UVA e UVB sendo assim um alvo de interesse no desenvolvimento de fotoprotetores orgânicos. Entre os resultados obtidos a daidzeína e a genisteína se destacaram entre os padrões testados. A presença de grupos doadores de densidade eletrônica para o anel garantem a estabilidade do sistema em seu estado de excitação eletrônica (FIGURA 25). É possível verificar ainda que, segundo os dados de absorbância, daidzeína e genisteína absorvem com mais intensidade na região entre 300-310 nm, desempenhando uma fotoproteção mais acentuada na região do UVB.

FIGURA 25: Estruturas de ressonância possíveis para a genisteína, permitindo sua estabilização no estado de excitação eletrônica.



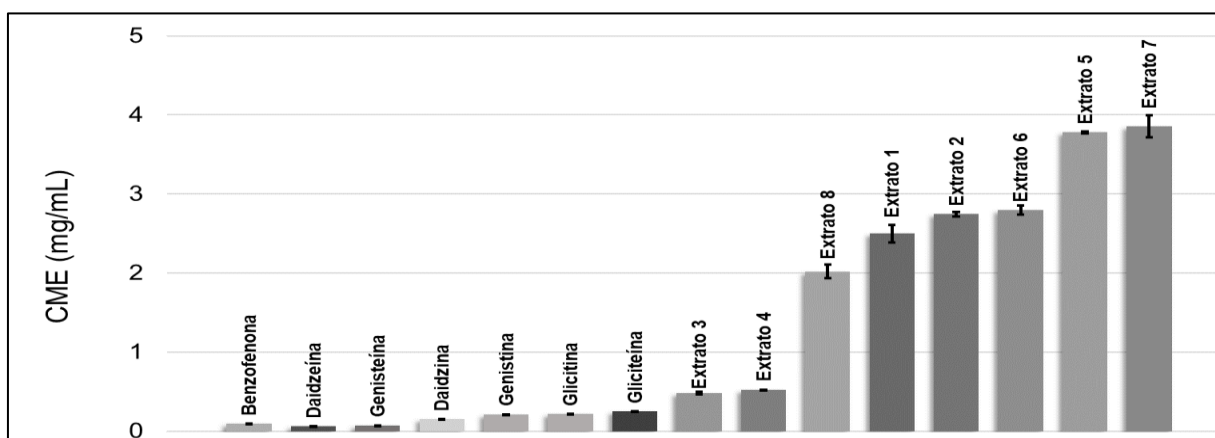
O valor de FPS é utilizado para medir o quanto de radiação solar é necessário para provocar queimaduras na pele. Uma pessoa de pele clara que pode ficar exposta ao sol por 20 min sem protetor solar, até que haja a formação de eritema, passa a poder ficar um período 15 vezes maior ao sol com o uso de um protetor com FPS=15. Obviamente esses parâmetros levam em consideração condições climáticas, tipo de pele e aplicação correta do protetor (FLOR e DAVOLOS, 2006).

Segundo o observado, é possível apontar que um extrato de soja rico em Daidzeína e Genisteína terá a tendência em apresentar uma melhor atividade fotoprotetiva. Para verificar qual dos extratos preparados desempenha melhor atividade fotoprotetiva comparou-se os resultados de CME para as oito amostras preparadas (FIGURA 26). As amostras **ES3**, **ES4** e **ES8** se destacaram entre as outras com valores de CME abaixo de 1 mg/mL. Nenhuma das amostras desempenhou melhor atividade que o controle de benzofenona, mas como uma mistura de várias substâncias os extratos apresentam grande potencial como agentes fotoprotetores.

TABELA 19: Valores de concentração mínima efetiva para atividade fotoprotetiva *in vitro* de extratos de soja. Letras diferentes representam uma diferença estatística a 95% ( $\alpha = 0,05$ ) de certeza. Valores de efetividades calculados para um fator de proteção solar = 6, segundo a resolução RDC N° 629 de 2022.

Amostra	CME $\pm$ DP* (mg/mL)	Amostra	CME $\pm$ DP* (mg/mL)
<b>Controle positivo</b>	0,094,3 $\pm$ 0,03	<b>ES5</b>	3,78 $\pm$ 0,012 <sup>d</sup>
<b>ES1</b>	2,50 $\pm$ 0,109 <sup>a</sup>	<b>ES6</b>	2,79 $\pm$ 0,058 <sup>b</sup>
<b>ES2</b>	2,74 $\pm$ 0,025 <sup>b</sup>	<b>ES7</b>	3,85 $\pm$ 0,140 <sup>d</sup>
<b>ES3</b>	0,482 $\pm$ 0,018 <sup>c</sup>	<b>ES8</b>	2,02 $\pm$ 0,086 <sup>e</sup>
<b>ES4</b>	0,524 $\pm$ 0,011 <sup>c</sup>		

FIGURA 26: Comparação entre os valores de FPS medidos *in vitro* para padrões comerciais de isoflavonas e extratos de *G. max* preparados em diferentes solventes.



Os resultados obtidos corroboram com o descrito por CHIANG et al. (2007) que demonstrou a inibição da morte induzida por UVB em queratinócitos pelo extrato e pelo isolado enriquecido com as agliconas. As isoflavonas são ainda descritas como substâncias capazes de evitar o processo de formação de carcinomas induzidos por radiação ultravioleta (MOORE et al., 2006), formando seu potencial terapêutico e preventivo como agente de fotoproteção.

### 5.3.2. Óleos essenciais

Os resultados obtidos para os óleos essenciais são apresentados na TABELA 20, com valores de CME entre 11 e 8  $\mu\text{g/mL}$ . Comparando com o controle positivo de benzofenona (FIGURA 27), os óleos performaram mais de dez vezes melhor que o óleo essencial de cedro, com menor valor de CME entre os óleos. Entre as amostras o óleo de cedro se destaca com uma concentração mínima FPS = 6 de 6,60  $\mu\text{g/mL}$ .

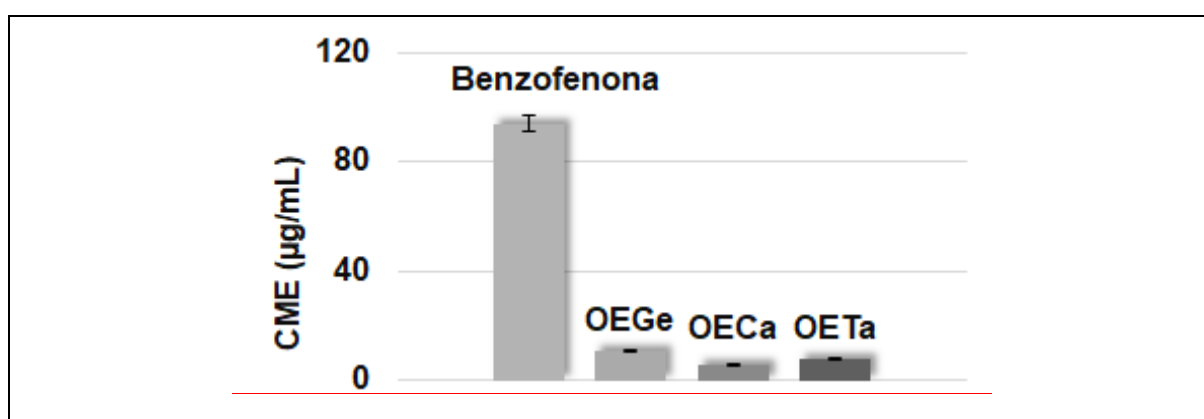
Além de agentes aromatizantes, a diversa composição dos óleos essenciais os torna matérias primas valiosas para diferentes fins no segmento dos cosméticos. Como agentes fotoprotetivos, KAUR e colaboradores (2010) avalia a capacidade de absorver radiação UV de diversos óleos de origem vegetal usados na indústria cosmética. Valores de FPS acima de 6 foram obtidos para soluções a 0,1% (v/v) de coco e azeite de oliva, conhecidos por integrarem as formulações como veículos e emulsionantes. Entre os óleos aromáticos, VELLA et al. (2021) descreve o potencial óleo essencial de bergamota (*Citrus bergamia*) com FPS = 9,7. É reportado um valor de 3,75 (0,1% v/v) para o óleo de tangerina, diferente do que foi obtido neste trabalho. LOHANI et al. (2017) reporta um valor 6,45 (0,1 % m/v) para o FPS do óleo de gerânio, o que corrobora as baixas concentrações de eficiência apresentados. Poucos trabalhos relatam a atividade

fotoprotetiva do óleo de cedro atlas, evidenciando o óleo como um agente de importância como agente fotoprotetivo.

TABELA 20: Valores de concentração mínima efetiva para atividade fotoprotetiva *in vitro* de óleos essenciais comerciais. Letras diferentes representam uma diferença estatística a 95% de certeza. Valores de efetividades calculados para um fator de proteção solar = 6 , segundo a resolução RDC N° 629 de 2022.

Amostra	CME±DP* (µg/mL)	CME±DP* (µL/mL)
<b>Controle positivo</b>	94,3 ± 0,030 <sup>a</sup>	-
<b>OEGe</b>	11,0 ± 0,330 <sup>b</sup>	9,82 ± 0,330 <sup>b</sup>
<b>OECa</b>	6,60 ± 0,015 <sup>c</sup>	6,14 ± 0,015 <sup>c</sup>
<b>OETa</b>	8,20 ± 0,72 <sup>d</sup>	6,95 ± 0,720 <sup>d</sup>

FIGURA 27: Comparação entre os valores de FPS medidos *in vitro* para os óleos essenciais **OEGe**: Gerânio; **OECa**: Cedro atlas; **OETa**: Tangerina.



Considerando que o desenvolvimento de uma formulação fotoprotetora não só envolve alta absorção UV mas também a garantia de segurança e efetividade dos ingredientes adicionais como emolientes e emulsionantes, a investigação de potenciais princípios ativos se faz necessário para nortear a pesquisa de novas matérias primas, assim como determinar a viabilidade.

Segundo os resultados obtidos para a avaliação do FPS solar para os extratos de soja e para os óleos essenciais de origem comercial, foi possível



determinar que há uma relação direta entre o método de extração na atividade fotoprotetiva do extrato de soja e que os óleos avaliados são eficientes em garantir uma fotoproteção mínima em concentrações muito baixas.

Extraindo-se os metabólitos de soja com uma solução de etanol (**ES3**) ou álcool de cereais fortificado com DMSO (**ES4**) e acetato de etila (**ES8**) sob agitação em sonda ultrassônica foi possível obter resultados comparáveis ao principal ativo disponível no mercado para fotoprotetores, a classe das benzofenonas.

Embora o objetivo inicial desse trabalho incluísse associar uma substância antibacteriana a outra com capacidade fotoprotetiva, os óleos essenciais se mostram eficientes como agentes com potencial contra exposição solar prolongada. No entanto, ainda são necessários extensos estudos para considerar um óleo essencial ou o extrato de soja para fotoproteção primária e a melhor forma de incorporá-los em produtos de proteção solar criando a oportunidade de avançar no desenvolvimento de novos itens do segmento de cosméticos.

#### **5.4. Atividade antioxidante de extratos de *Glycine max* e Óleos essenciais**

Segundo a capacidade de provocar a formação de espécies radicalares altamente reativas, agentes antioxidantes são considerados um fator secundário da proteção contra os efeitos a exposição de radiação ultravioleta. As espécies reativas de oxigênio representam os radicais livres majoritários em sistemas biológicos, isso inclui espécies como o radical hidroxila ( $\dot{\text{O}}\text{H}$ ), o ânion superóxido ( $\dot{\text{O}}_2^-$ ) e peróxidos. Essas espécies tendem a reagir com moléculas do meio como forma de atingir estabilidade. A presença dessas espécies é comum a todos os sistemas biológicos, o problema está em seu acúmulo a partir de fontes exógenas. É possível registrar o aumento considerável de  $\dot{\text{O}}\text{H}$  logo após um período de exposição de 15 minutos a luz ultravioleta. As reações fotocatalisadas que formam essas espécies ocorrem principalmente na faixa do UVA (CHEN et al., 2012).

A exposição excessiva a radiação ultravioleta é relacionada ao surgimento de doenças pulmonares, cardiovasculares, neurológicas e carcinogênicas. O resultado do acúmulo dessas espécies leva ao estresse oxidativo, capaz de degradar as bases nitrogenadas do DNA, lipídeos e proteínas de membranas gerando mutações gênicas diversas. Na pele, o fotoenvelhecimento é o principal efeito. Após exposição à radiação solar, espécies radicalares desencadeiam mecanismos pro-inflamatórios que levam a degradação de colágeno e diminuem sua produção. Esse efeito é diretamente associado a perda de elasticidade da pele e sua desidratação.

Quando associado a um fotoprotetor químico, um antioxidante prolonga o processo de proteção contra radiação solar. Muitos protetores solares comerciais incluem antioxidantes como a vitamina C e polifenóis derivados do

chá verde. Dessa forma, um material que possa fornecer tanto proteção imediata quanto prolongada é desejável.

#### **5.4.1. Extratos de *G. max*.**

Os resultados obtidos para o teor de redutor total nas amostras de extrato de soja são apresentados na TABELA 21. O método colorimétrico adotado é um método simples que se baseia na interação de substâncias redutoras com o reagente de molibdato de Folin-Ciocalteu. Substâncias redutoras atuam como antioxidantes capazes de sofrer oxidação, neutralizando uma espécie radical reativa. Antioxidantes diversos compõem as classes de metabólitos naturais, sobretudo os polifenóis.

Em meio alcalino, os polifenóis perdem um próton formando o ânion fenolato. Esse ânion por sua vez é capaz de reduzir o reagente formando óxido de tungstênio e óxido de molibdênio. O teste é frequentemente usado para determinar o conteúdo fenólico de uma amostra, no entanto não é um ensaio seletivo apenas para flavonoides e ácidos fenólicos, apresentando resultado positivo frente a qualquer espécie redutora (PIRES et al., 2017). Dessa forma, o ensaio com reagente de Folin-Ciocalteu foi utilizado para determinar o potencial antioxidante preliminar das amostras testadas.

As amostras **ES3**, **ES4**, **ES5** e **ES8** apresentaram maior conteúdo de agentes redutores (6-9 mg EAG/100 g) na concentração de 0,6 mg/mL. Foi observado a influência da solução extratora na atividade antioxidante das amostras. Assim como discutido anteriormente, a utilização do surfactante DMSO (**ES3** e **ES4**) extrai uma quantidade considerável de agentes redutores. Além disso, as soluções extratoras não-convencionais de isopropanol:água (**ES5**) e acetato de etila (**ES8**) são eficientes para esse propósito. Os padrões de isoflavonas foram também avaliados quanto a capacidade de reduzir o reagente

de molibdato. Não houve diferença estatística entre as medidas observadas, e os padrões apresentaram menor atividade quando comparado ao controle positivo de quercetina.

TABELA 21: Teor de fenólicos totais para extratos de *G. max* e padrões de isoflavonas. Letras diferentes representam uma diferença estatística a 95% ( $\alpha = 0,05$ ) de certeza.

<b>Amostra</b>	<b>mg EAG/100 g</b>	<b>Amostra</b>	<b>mg EAG/100 g</b>
<b>Quercetina (C+)</b>	5,9	<b>ES8</b>	9,5
<b>ES1</b>	2,8	<b>Daidzeína</b>	3,5
<b>ES2</b>	3,4	<b>Daidzina</b>	3,3
<b>ES3</b>	9,2	<b>Gliciteína</b>	3,7
<b>ES4</b>	6,1	<b>Glicitina</b>	4,1
<b>ES5</b>	7,9	<b>Genisteína</b>	4,5
<b>ES6</b>	1,7	<b>Genistina</b>	4,4
<b>ES7</b>	2,4		

Além de atuarem como agentes antioxidantes exógenos, as isoflavonas desempenham a ação de aumentar a atividade de enzimas oxido-redutases em modelos murinos, aumentando a proteção endógena do organismo ao estresse oxidativo (KURZER et al., 1997)

#### **5.4.2. Óleos essenciais.**

Os resultados obtidos são apresentados na TABELA 22, os valores variam entre 5-30 mg EAG/g de óleo essencial. Nas condições testadas, o óleo de tangerina apresentou uma capacidade redutora total maior em comparação com os outros óleos. WANG e colaboradores (2017) e PASIAS et al. (2021) descreveram o potencial redutor total dos óleos de gerânio, cedro e tangerina de origem vegetal frente ao reagente de Folin-Ciocalteu. Os valores obtidos neste trabalho foram bem menores do que aqueles reportados para os óleos de cedro e gerânio com cerca de 68,2 e 11,5 mg EAG/g respectivamente e um valor de 21,3 mg EAG/100g para o óleo de tangerina.

LOHANI e colaboradores (2017) reportaram a ação de prevenção do estresse oxidativo do óleo essencial de gerânio e o potencial de utilização desse óleo para produtos de cuidado com a pele. Apesar de pouco explorados como agentes de proteção primária contra a radiação UVA e UVB, o potencial antioxidante e antiinflamatório de óleos essenciais é um fator complementar ao se considerar em uma formulação cosmética voltada para essa finalidade. Esse fato é relevante não apenas como princípio ativo de interesse, mas como ingrediente na composição do veículo, prevenindo a degradação do ativo disperso.

TABELA 22: Teor de fenólicos totais para extratos óleos essenciais.

<b>Amostra</b>	<b>mg EAG/g</b>
<b>Controle positivo</b>	5,9
<b>OEGe</b>	19,4
<b>OECa</b>	7,6
<b>OETa</b>	30,2

Segundo apresentado, os extratos **ES3, ES4, ES5 e ES8** apresentaram maior capacidade redutora total. De acordo com os resultados anteriores, os extratos **ES3, ES4 e ES8** foram selecionados para avaliação subsequentes, de forma a obter uma atividade fotoprotetiva e antioxidante maximizada.

### **5.5. Capacidade redutora do radical DPPH.**

A redução do radical DPPH mede a capacidade antioxidante em si de uma amostra, segundo a neutralização do radical, semelhante ao mecanismo observado em sistemas biológicos. Quando a solução de DPPH entra em contato com uma substância capaz de reduzir, a cor violeta inicial é substituída por uma coloração laranja e sua intensidade é diretamente relacionada com a quantidade de substância reduzida. O efeito antioxidante de compostos fenólicos frente ao radical ocorrer geralmente pela transferência de hidrogênio ou de um elétron, não

excluindo a ocorrência simultânea desses dois processos (FIGURAS 28-29). Essas reações são particularmente facilitadas pela presença de grupos capazes de fornecer estabilidade adicional ao estado de excitação da molécula (GULCIN et al. 2023).

FIGURA 28: Reação do radical DPPH com uma molécula de isoflavona pela transferência de um hidrogênio radicalar, formando uma hidrazina de coloração laranja.

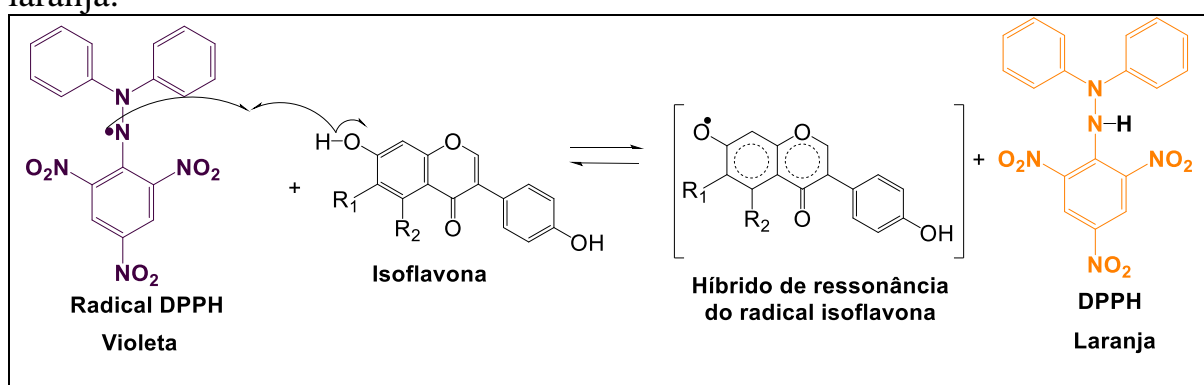
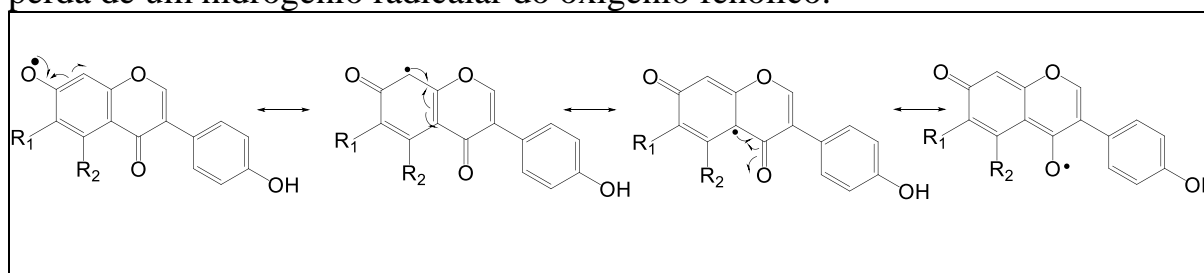


FIGURA 29: Estruturas de ressonância para uma molécula de isoflavona após a perda de um hidrogênio radicalar do oxigênio fenólico.



A atividade antioxidante foi medida em diferentes concentrações de amostra, permitindo o cálculo da concentração para inibição de 50% do radical em solução. Na faixa de concentração estada, as amostras **ES3** e **ES4** apresentaram valor de  $CI_{50}$  estatisticamente iguais, precisando de 1,30 mg/mL para diminuir a concentração do radical pela metade (TABELA 23). Para a amostra **ES8**, o valor de  $CI_{50}$  ultrapassou a faixa de trabalho, com valor de 2,5 mg/mL. É possível verificar que, para atividade antioxidante há também uma

influência direta da solução extratora. Assim, uma solução de extração de etanol/álcool de cereais com DMSO sob agitação ultrassônica extraem substâncias antioxidantes em comparação com acetato de etila.

TABELA 23: Atividade antioxidante pela redução do radical DDPH de extratos de *G. max.*. Letras diferentes representam uma diferença estatística a 95% ( $\alpha = 0,05$ ) de certeza.

Concentração (mg/mL)	%AAO		
	ES3	ES4	ES8
0,3	-98,0	-115	-128,3
0,6	-31,3	-334	-64,9
0,9	15,2	13,4	-39,8
1,2	44,0	43,4	6,85
1,5	64,5	49,9	13,7
1,8	77,5	43,6	13,7
<b>CI<sub>50</sub> (mg/mL)</b>	1,31 <sup>a</sup>	1,36 <sup>a</sup>	2,58 <sup>b</sup>

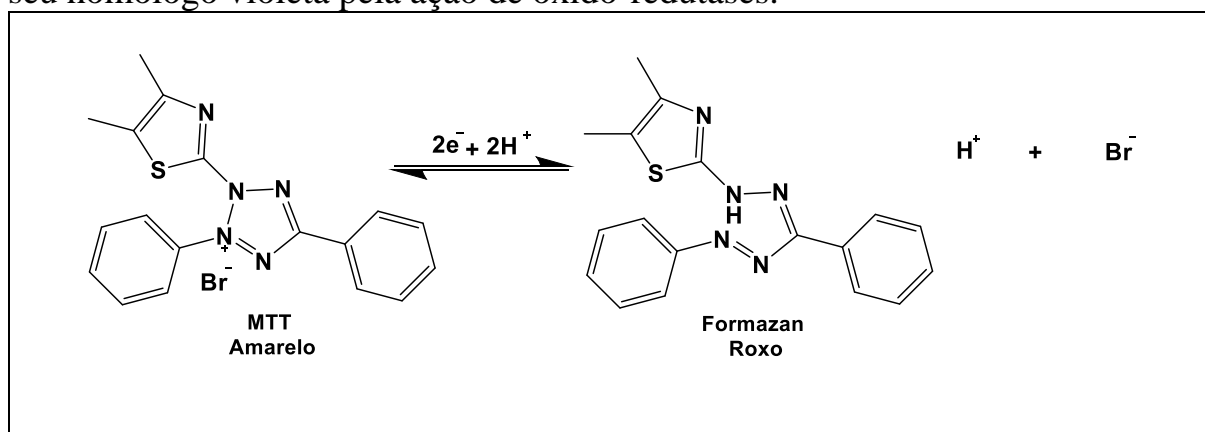
A literatura descreve extensamente a capacidade antioxidante das isoflavonas de soja, frente a modelos *in vitro* e *in vivo*. A aplicação tópica de isoflavonas apresentam diminuição dos efeitos oxidativos fotoinduzidos e atividade antihialuronidase, enzima relacionada ao processo de envelhecimento celular (WEI et al., 2003).

## 5.6. Atividade citotóxica de extratos de *Glycine max* e Óleos essenciais.

Antes que qualquer novo produto para fins de uso humanos sejam aprovados para consumo, são realizados extensos e exaustivos ensaios de toxicidade em sistemas *in vivo* e *in vitro*. Como um indicativo inicial da capacidade de uma substância provocar uma resposta biológica indesejada, testes de citotoxicidade são empregados de forma a avaliar o efeito de morte celular provocada.

O efeito citotóxico preliminar de extratos de *Glycine max* e óleos essenciais de origem comercial foram investigados frente a linhagem celular de fibroblastos de pulmão MRC-5 segundo o método colorimétrico de redução do MTT. A redução do complexo é um resultado direto da atividade celular, através de enzimas desidrogenases e oxirredutases ativas, o contato com a substância testada provoca a transferência de elétrons para o meio, convertendo a solução rosa em violeta, segundo a formação de cristais de formazan (FIGURA 30).

FIGURA 30: Reação de conversão do reagente MTT de coloração amarelada em seu homólogo violeta pela ação de oxido-redutases.



A partir de diferentes concentrações das amostras foi possível calcular a concentração necessária para morte celular de 50% das células do meio. Os resultados dispostos na TABELA 24 indicam valores entre 2 e 18 mg/ mL de extrato para provocar 50% de viabilidade celular. É possível verificar que o extrato **ES3** provoca uma resposta celular em menores concentrações em comparação as outras amostras, mostrando a influência direta da solução de extração na extensão de atividade citotóxica.



TABELA 24: Resultado dos testes de citotoxicidade de extratos de *G. max* e óleos essenciais frente a linhagem MRC-5. \*  $CC_{50}$  MRC-5/  $CI_{50}$  *S. aureus*; \*\* $CC_{50}$  MRC-5/  $CI_{50}$  *S. epidermidis*.

Amostra	$CC_{50}$ (mg/mL) $\pm$ DP	$R^2$	IS
<b>ES3</b>	1,97	0,985	ND
<b>ES4</b>	7,02	0,974	ND
<b>ES8</b>	17,8	0,939	ND
Amostra	$CC_{50}$ ( $\mu$ L/mL) $\pm$ DP	$R^2$	IS
<b>OEGe</b>	9,47 $\pm$ 2,71	0,917	0,173*
<b>OEGe</b>	9,47 $\pm$ 2,71	0,917	1,68**
<b>OECa</b>	7,04 $\pm$ 1,77	0,904	0,159**
<b>OETa</b>	2,56 $\pm$ 0,164	0,898	0,258**

Os óleos essenciais apresentaram valores de concentração citotóxica entre 2 e 9  $\mu$ L/mL de óleo. O índice de seletividade (IS) das amostras foram calculadas frente aos valores de inibição ( $CI_{50}$ ) frente aos microrganismos testados, não existe um consenso para os valores de IS dificultando a determinação de um parâmetro. FAMUYEDE et al. (2019) descreve a atividade de diversos extratos vegetais contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, onde os extratos considerados ativos e não tóxicos atingiram  $IS > 1$ . Por outro lado, de acordo com NOGUEIRA e colaboradores (2010) o IS não deve ser menor que 2, indicando uma seletividade para atividade bactericida em detrimento a atividade tóxica. Valores entre 0,1 e 1,7 foram obtidos, abaixo do indicativo estimado, no entanto os resultados foram utilizados como método de triagem preliminar, sugerindo que o óleo essencial de gerânio apresenta menor citotoxicidade.

Segundo os resultados obtidos nos ensaios de atividade, os extratos **ES3**, **ES4** e **ES8** assim como os óleos essenciais OEGe, OETa e OECa foram submetidos a análises para determinação dos respectivos marcadores selecionados, as isoflavonas de soja e os componentes voláteis principais .



## 5.7. Identificação dos analitos.

### 5.7.1. UHPLC-ESI-TOF-MS

Todos os analitos foram detectados como íons  $[M+H]^+$ , e os íons produtos diagnósticos foram usados para identificação das isoflavonas. Os espectros de massas adquiridos são apresentados em anexo. Os padrões de fragmentação obtidos estão de acordo com aqueles reportados na literatura, possibilitando a identificação das isoflavonas em sua forma glicosilada e aglicona (JUNG et al., 2020). As massas exatas são compatíveis com aquelas determinadas teoricamente, com margem de erro de  $\pm 5$  ppm, viabilizando a determinação da presença dessas isoflavonas nos extratos de soja selecionados, **ES3**, **ES4** e **ES8**.

Os padrões de fragmentação (EC = 30,7 eV) se repetem entre os derivados e as agliconas, segundo a presença da unidade isoflavona. A TABELA 25 sumariza as informações segundo os íons produtos observados. O esqueleto de isoflavona é identificado principalmente pela clivagem dos anéis **A** ( $m/z= 137$ , 167 ou 153) e **B** ( $m/z=119$ ) segundo uma fragmentação do tipo retro Diels-Alder (ZHAO et al., 2018; ANDRES et al., 2015) apresentada na FIGURA 31.

A presença do anel central, é identificada segundo duas perdas consecutivas de monóxido de carbono a partir do íon pseudo molecular  $[M+H]^+$ . NAKATA e colaboradores (2018) descrevem essa perda a partir do grupo cetônico presente no anel **C** a partir de um rearranjo endocíclico de hidrogênio. A segunda molécula de CO é perdida dando origem ao íon de  $m/z = 199$  (RAJU et al., 2015). Na genisteína (3,5 min), gera o íon produto com  $m/z = 215$  e para a gliciteína (2,2 min) só foi possível detectar a primeira perda de CO de  $m/z = 242$ .

A perda de uma molécula de água ( $[M+H-H_2O]^+$ ) a partir do íon precursor foi detectada, sendo atribuída a daidzeína (1,9 min) e seu glicosídeo (1,1 min), gerando o íon produto de  $m/z= 237$ , evidenciando a presença do grupo

hidroxil fenólico. No caso da gliciteína além dos fragmentos inerentes a estrutura isoflavona, a perda neutra do grupo metila é característica, gerando  $m/z=270$ .

O fragmento correspondente a  $m/z=149$  é atribuído a perda de  $[M+H-B-CO]^+$ . O íon é característico em 5-hidroxiisoflavonas como a genisteína. Um rearranjo intramolecular com 6 espécies promove a eliminação do anel B seguida da saída de uma molécula de CO, dando origem a um resíduo do anel C com cinco membros. Esse padrão de fragmentação foi determinando segundo estudo de padrões marcados isotopicamente (NAKATA et al., 2018). O íon  $m/z=91$  é atribuída a perda de 164 e 18 a partir do íon pseudo molecular ( $[M+H-164-18]^+$ ) formando o íon tropílio.

Além dos derivados glicosilados, os ésteres 6-O-acetil e 6-O malonil foram detectados como  $[M+H]^+$  e identificados principalmente pela presença do fragmento relacionado a perda da unidade de açúcar e da porção esterificada com a molécula de glicose, gerando as unidades respectivas de daidzeína, gliciteína e genisteína (FIGURAS 31-34).

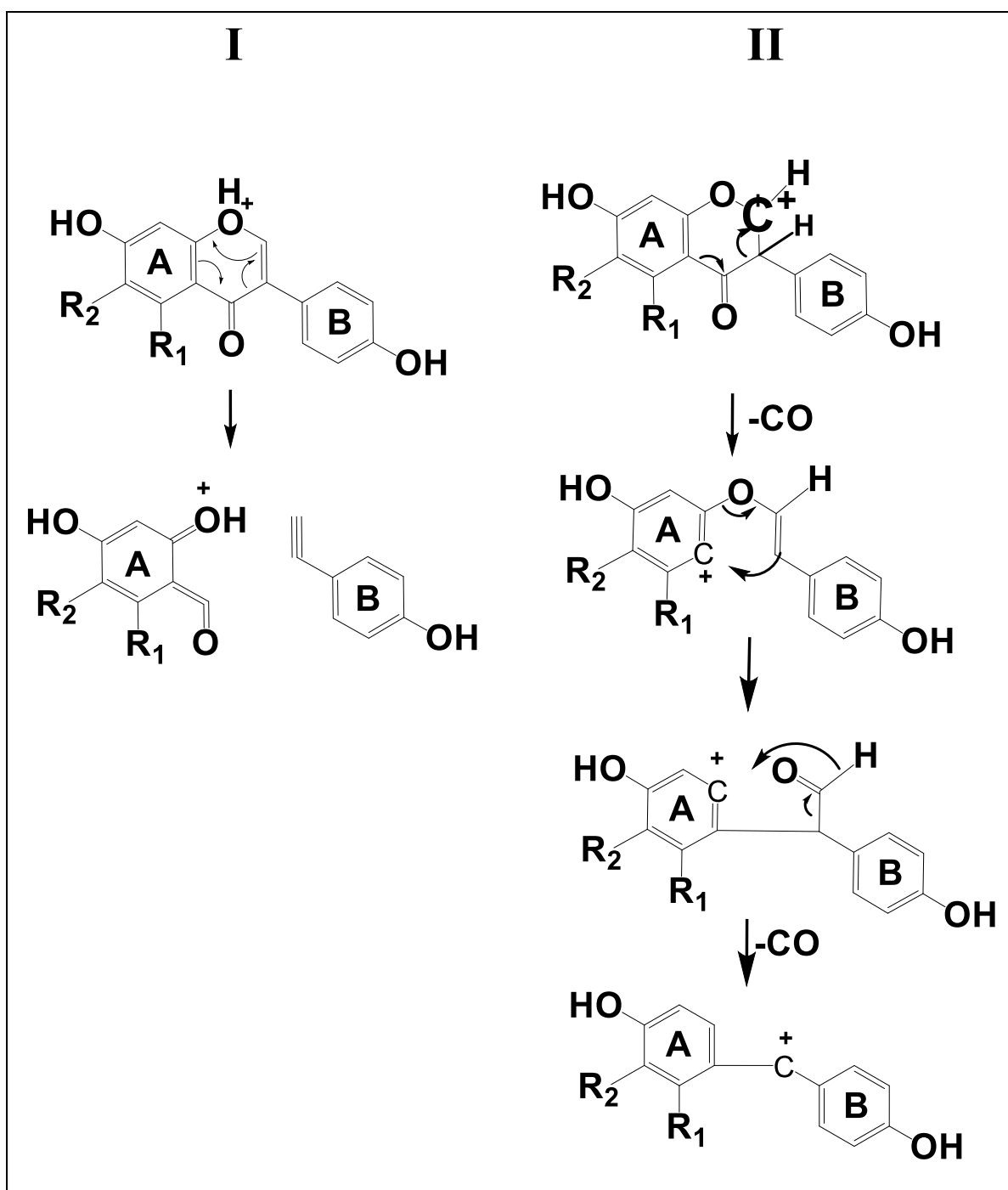
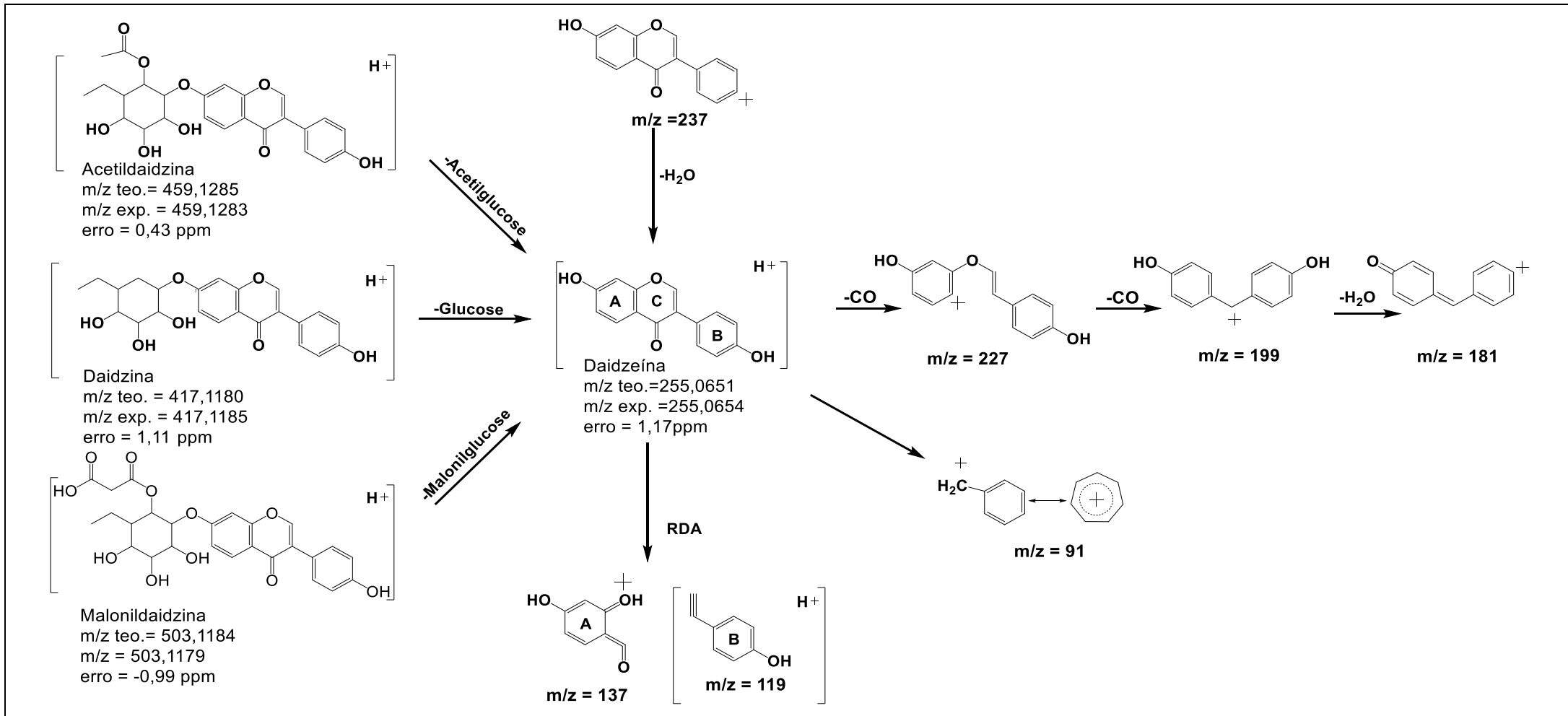


FIGURA 31: Mecanismos de fragmentação comuns do núcleo de isoflavonas em análises por espectrometria de massas. **I:** fragmentação do tipo retro Diels-Alder, formando um dieno (A) e o dienófilo (B); **II:** perda consecutiva de duas moléculas de CO do anel central (C) por um rearranjo de hidrogênio. R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H para daidzeína; R<sub>1</sub>=OH para genisteína e gliciteína; R<sub>2</sub>=OHCH<sub>3</sub> para a gliciteína; R<sub>2</sub>=OH para genisteína.

Identificação de isoflavonas em extratos de <i>Glycine max</i> por UHPLC-ESI-QTOF-MS												
Substância	FM	[M+H] <sup>+</sup>	<i>m/z</i> íons produtos observados									
			1,3 A <sup>+</sup>	1,3 B <sup>+</sup>	[M+H-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	[M+H-CO] <sup>+</sup>	[M+H-2CO] <sup>+</sup>	[M+H-2CO-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	[M+H-164-18] <sup>+</sup>	[M+H-B-CO] <sup>+</sup>	[M+H-G/E] <sup>+</sup>
Daidzeína	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	255,0654	137,0234	119,048 1	ND	237,0561	227,0711	199,0756	181,0646	91,00542	ND	ND
Daidzina	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	417,1185	ND	ND	ND	237,1447	ND	199,0760	ND	ND	ND	255,0654
Acetildaidzeína	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	459,12834	137,0234	ND	ND	ND	227,0709	199,0759	ND	ND	ND	255,0651
Malonildaidzina	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	503,1179	137,0228	ND	ND	ND	227,0697	199,0739	ND	ND	ND	255,0652
Gliciteína	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	285,0769	167,9170	119,051 0	270,0523	ND	242,0576	ND	ND	ND	ND	ND
Glicitina	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	447,1289	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	285,0756
Acetilglicitina	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	489,1390	ND	ND	270,0522	ND	ND	ND	ND	ND	ND	285,0752
Genisteína	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	271,0599	153,0179	119,048 3	ND	ND	243,0650	215,0696	197,0585	91,0542	149,0712	
Genistina	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	433,1130	ND	ND	ND	ND	ND	215,0696	ND	ND	ND	271,0601
Acetilgenistina	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	475,1244	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	271,0599
Malonilgenistina	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>13</sub>	519,1124	153,0156	ND	ND	ND	243,0632	215,0684	ND	ND	ND	271,0599

**TABELA 25:** Íons diagnósticos de isoflavonas em extratos de *G. max* obtidos em UHPLC-ESI-QTOF-MS no modo positivo.



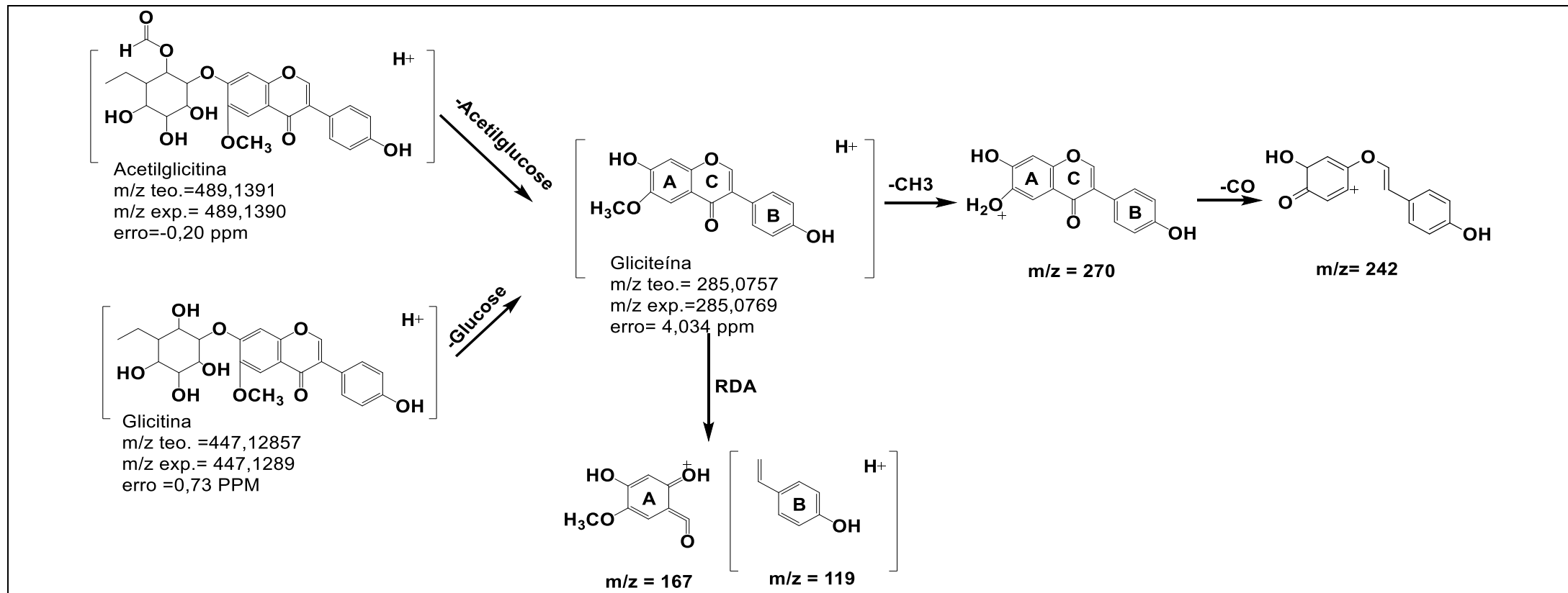


FIGURA 33: padrões de fragmentos atribuídos a Gliciteína por UHPL-ESI-TOF-MS em modo positivo.



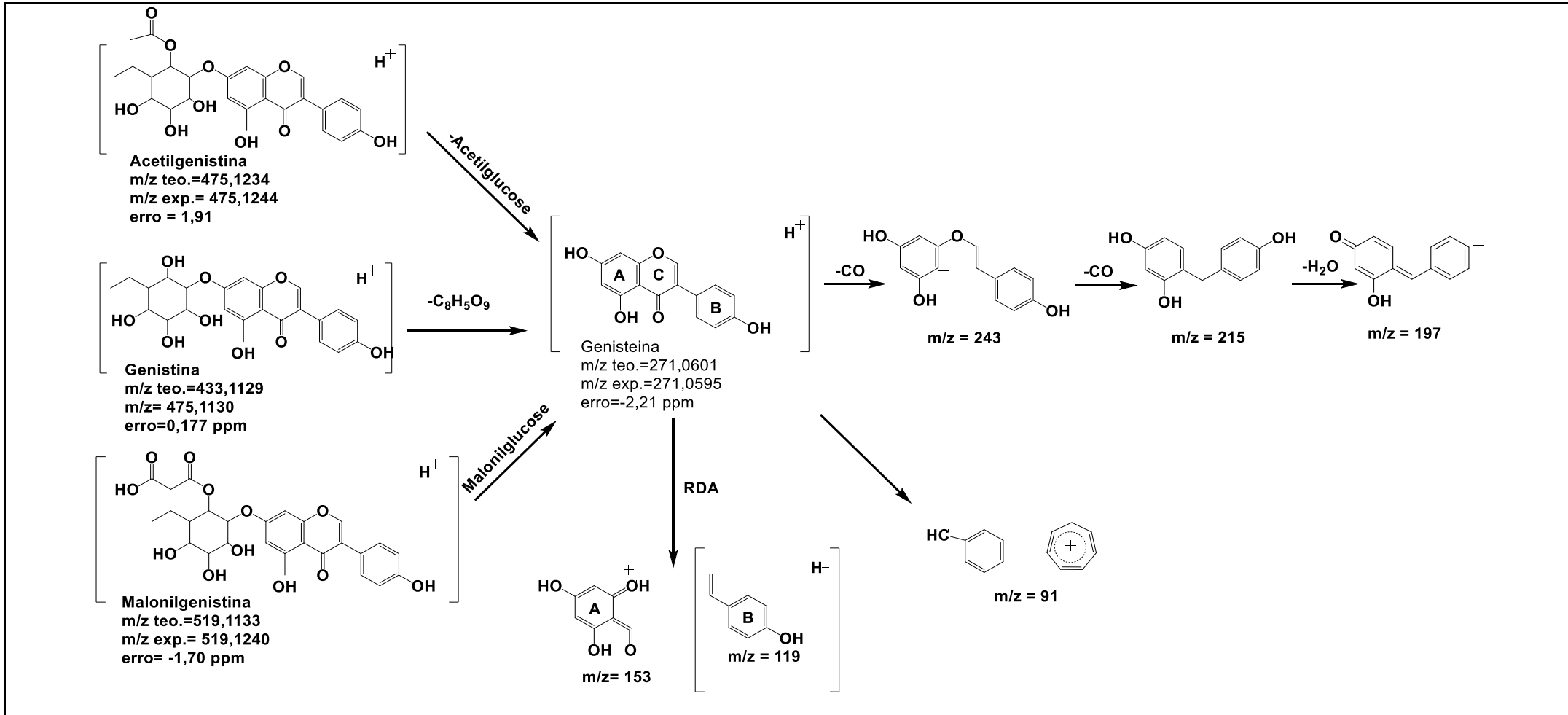


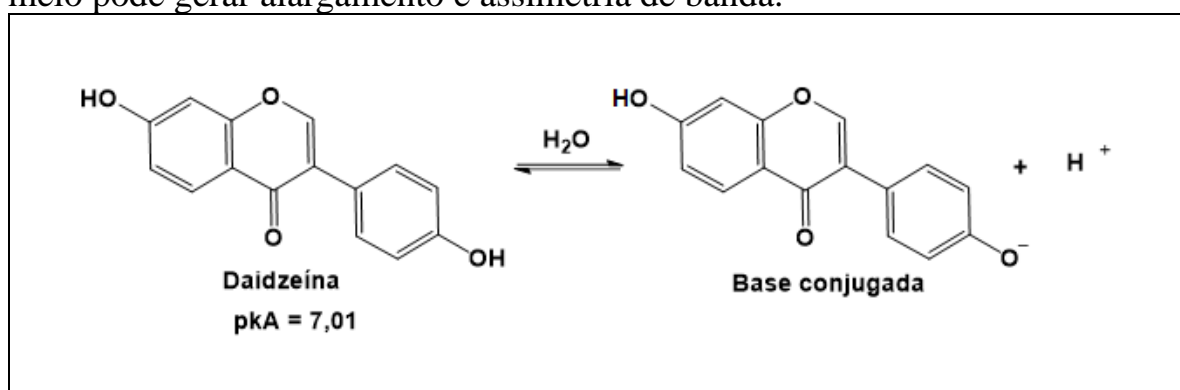
FIGURA 34: Padrões de fragmentos atribuídos a Genisteína por UHPL-ESI-TOF-MS em modo positivo.

### 5.7.2. Doseamento de isoflavonas por HPLC-UV/DAD.

As amostras de extrato foram submetidos a determinação do conteúdo de isoflavonas segundo metodologia desenvolvida em HPLC-UV. A eluição cromatográfica foi otimizado segundo a fase móvel, e a presença de aditivos na fase móvel. Uma coluna de fase reversa octodecila modificadas com grupos fenil-hexil foi escolhida de acordo com a seletividade da coluna para substâncias fenólicas. Os grupos aromáticos da coluna retêm compostos através de interações  $\pi$ - $\pi$  principalmente, garantindo a retenção das isoflavonas e separação segundo afinidade pela fase móvel.

A utilização de aditivos na fase móvel é indispensável nesse caso. Os analitos apresentam grupos hidroxilas facilmente ionizáveis na presença de água (FIGURA35). O equilíbrio ácido-base formado gera duas espécies simultaneamente disponíveis no meio, fator principal na formação de alargamento e assimetria de bandas.

FIGURA 35: Equilíbrio ácido-base entre as formas protonadas e desprotonadas das isoflavonas, exemplificada pela daidzeína. A presença das duas formas no meio pode gerar alargamento e assimetria de banda.



Com a presença de grupos com pares de elétron não ligantes, estes estão disponíveis para abstrair um próton do meio formando uma base conjugada, o uso de um aditivo ácido leva a protonação desses grupos deslocando o equilíbrio para a espécie protonada. A escolha do aditivo é feita com base nas propriedades do

analito, um aditivo ácido deve ser tal que doe  $H^+$  para a molécula e não o contrário. Esse parâmetro é verificado pelo pKa do aditivo, que deve ser menor que o do analito, e por tanto um ácido mais forte, como o ácido acético (pKa = 4,74).

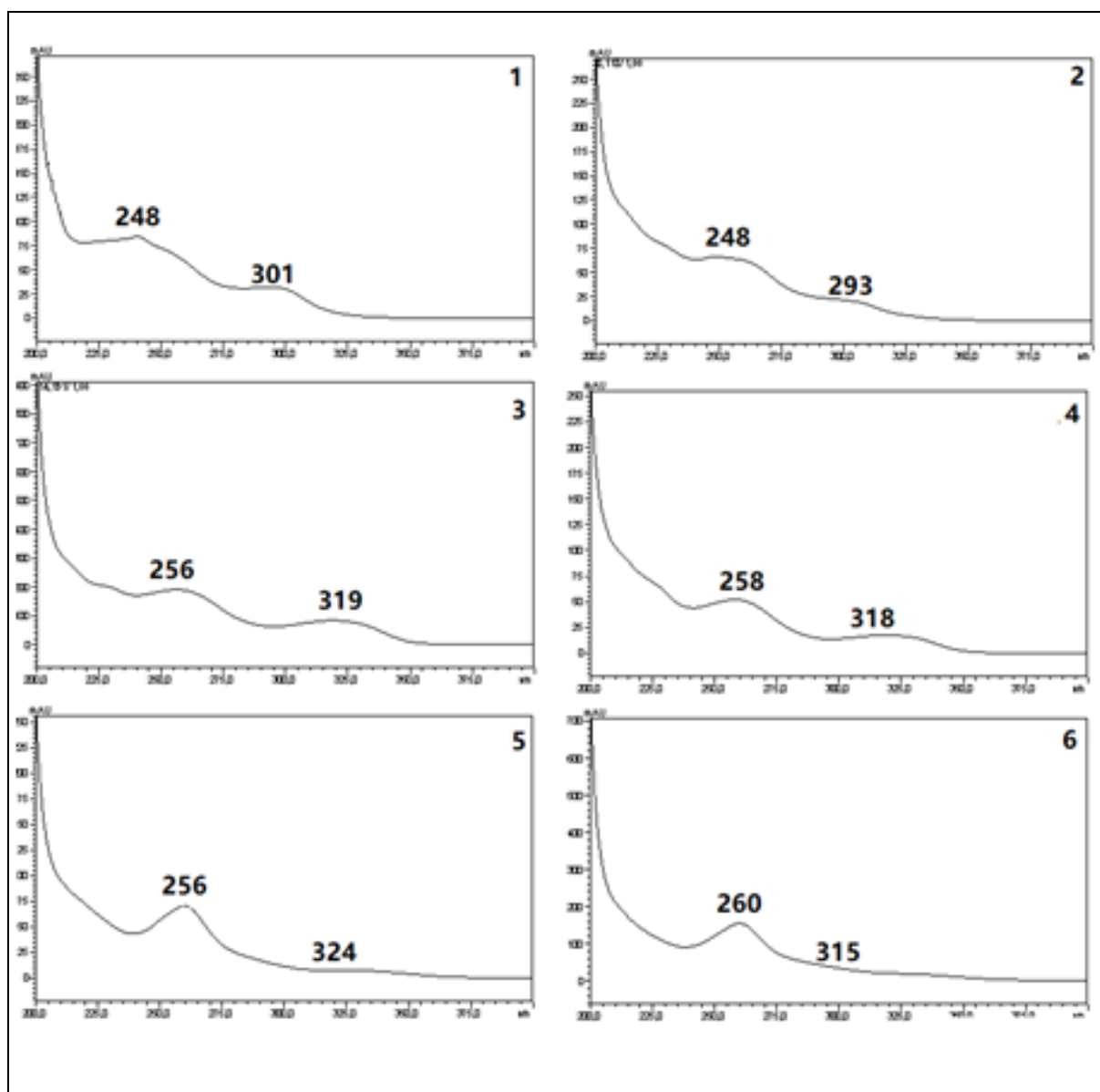


FIGURA 36: Espectro de varredura de 200 a 400 nm de soluções padrões de isoflavonas de soja obtidos em HPLC-DAD. **1:** Daidzeína; **2:** Daidzina; **3:** Gliciteína; **4:** Glicitina; **5:** Genisteína; **6:** Genistina.

A varredura espectral entre 200-400 nm permitiu a identificação do melhor comprimento de onda para a determinação simultânea dos analitos. Considerando os cromatogramas obtidos por análises de soluções padrões dos analitos (FIGURA 37), o comprimento de onda de 256 nm foi selecionado para as análises seguintes. A maioria dos flavonóides apresentam duas bandas de absorção máxima, a primeira entre 300 e 380 nm associada ao anel B que aparece como ‘um ombro’ e a segunda entre 240 e 280 nm relacionada com o anel A (MABRY et al., 1970; BUSTAMANTE-RANGEL, 2018).

A identificação dos marcadores das amostras foi feita por comparação com os tempos de retenção dos analitos e dos espectros UV (FIGURAS 36-41), os respectivos tempos de retenção dos padrões de isoflavonas são apresentados na TABELA 26. Foi possível verificar o perfil química extremamente semelhante das amostras de extrato de *G. max* evidenciando que as soluções extratoras selecionadas tiveram êxito em extrair majoritariamente isoflavonas.

Os dados adquiridos para as curvas analíticas preparadas para análise do conteúdo de daidzeína, gliciteína e genisteína são apresentados na TABELA 27, os limites de detecção e quantificação dos analitos ficaram na faixa entre 0,4 e 4,5  $\mu\text{g/mL}$  com coeficiente de correlação acima de 0,998 (TABELA 28).

FIGURA 37: Cromatograma obtido para os padrões de isoflavonas 1-6 a 45  $\mu\text{g/mL}$  em HPLC-UV em 256 nm.

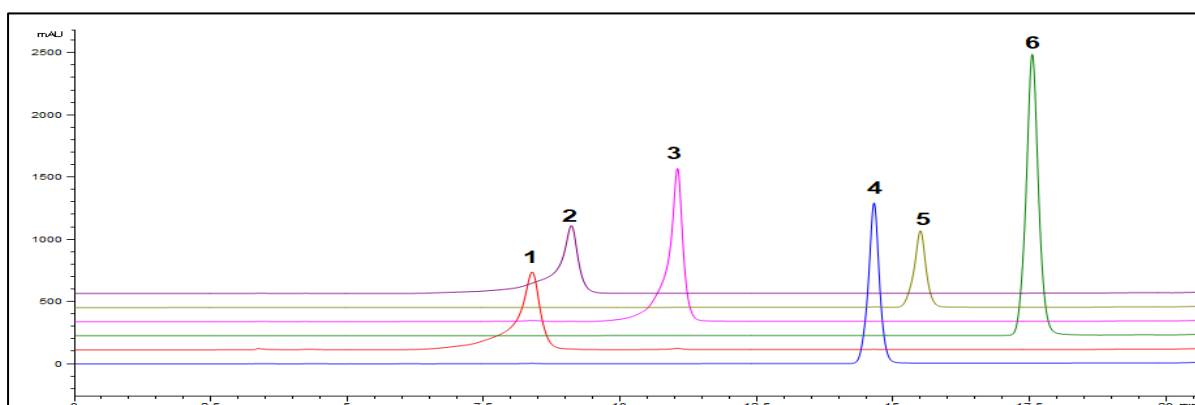


FIGURA 38: Cromatograma obtido para uma mistura de padrões de isoflavonas 1-6 a 10 µg/mL cada em 256 nm.

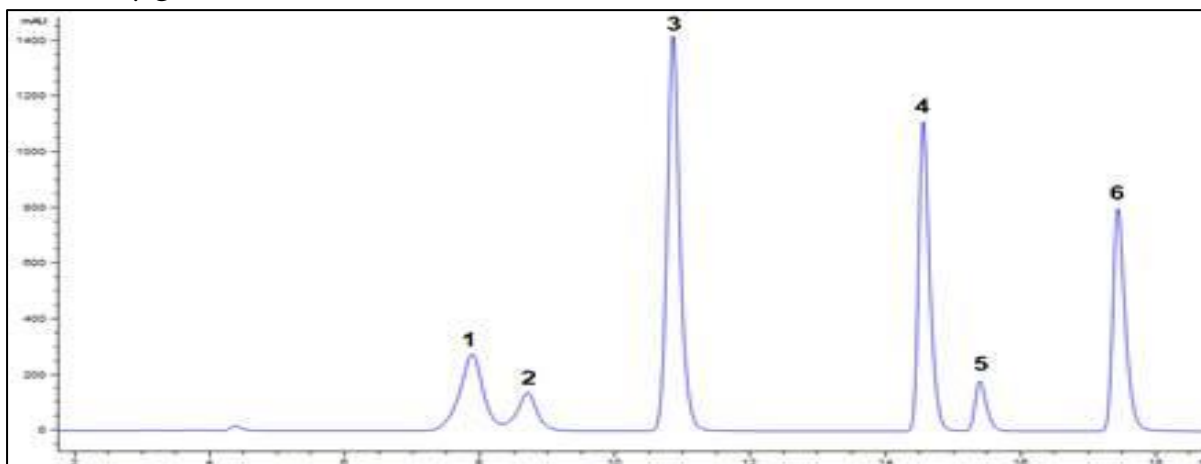


TABELA 26: tempos de retenção no gradiente de eluição realizado em HPLC-UV de uma mistura das isoflavonas 1-6.

Isoflavona	Tr (min.)
Daidzina (1)	7,87
Glicitina (2)	8,69
Genisteína (3)	10,8
Daidzeína (4)	14,5
Genistina (5)	15,5
Gliciteína (6)	17,4

FIGURA 39: Cromatograma obtido para a amostra **ES3** a 3mg/mL a 256 nm.

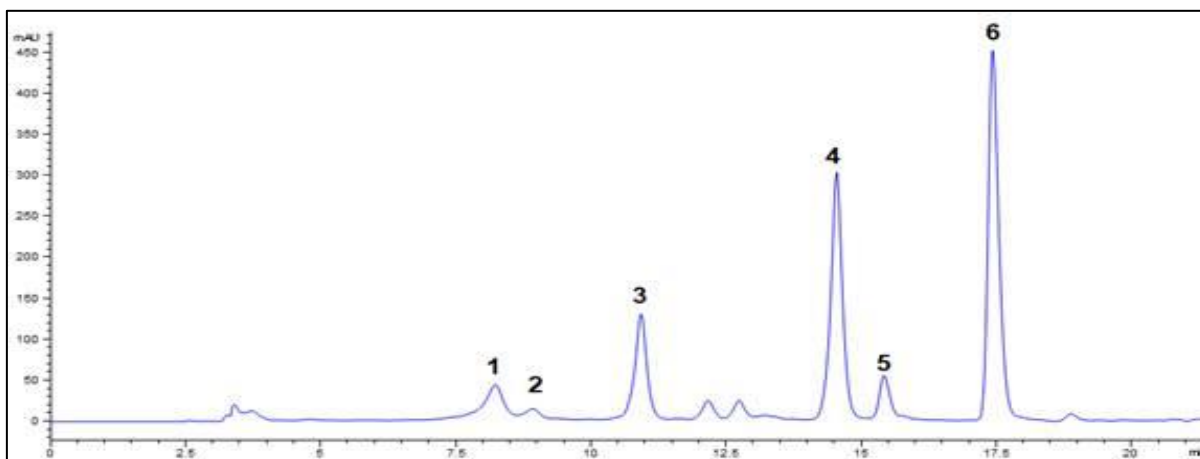
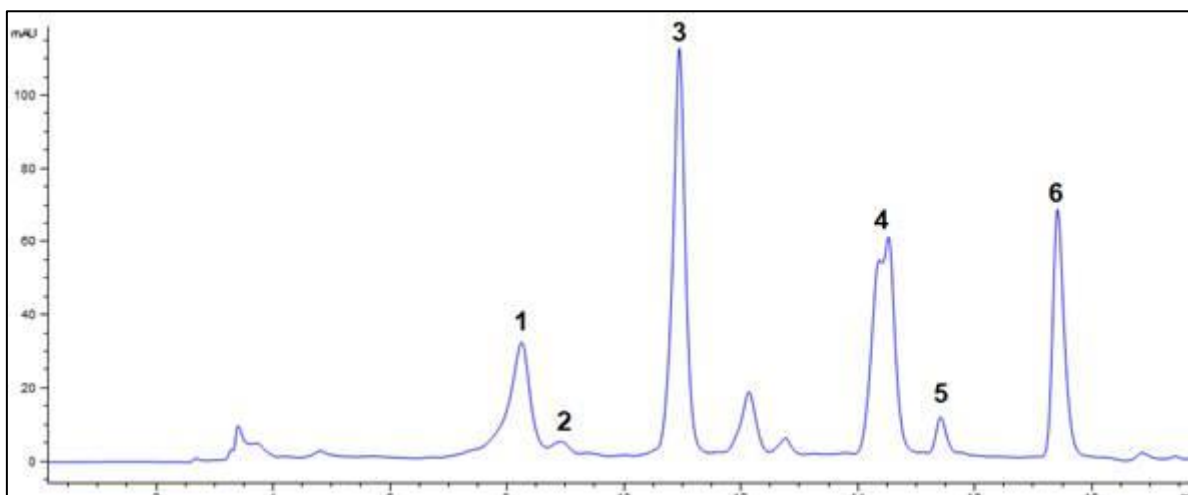
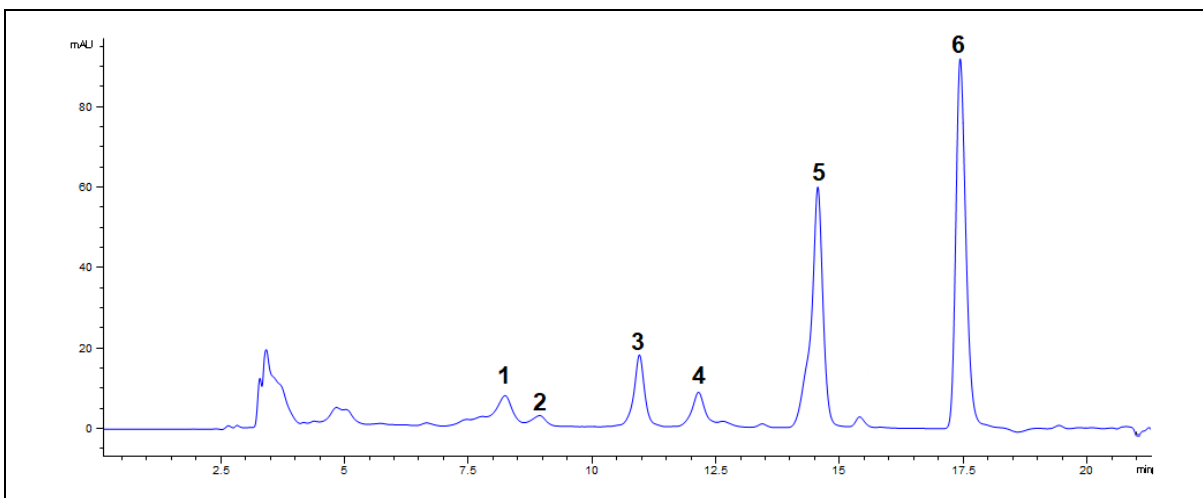
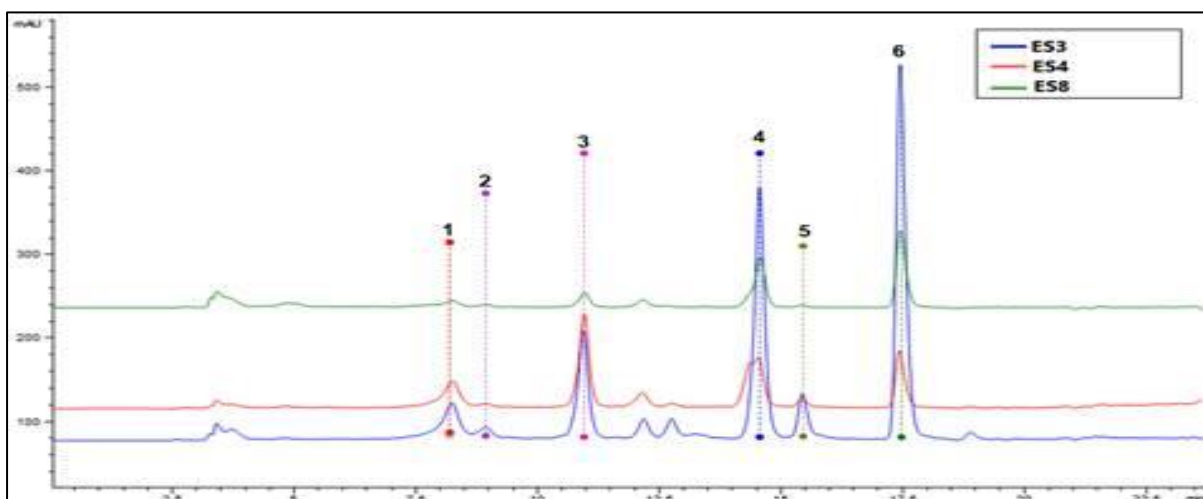


FIGURA 40: Cromatograma obtido para a amostra **ES4** a 3mg/mL a 256 nm.FIGURA 41: Cromatograma obtido para a amostra **ES8** a 3mg/mL a 256 nm.FIGURA 42: Cromatogramas sobrepostos das amostras **ES3**, **ES4** e **ES8** evidenciando a banda referente a cada isoflavona.

Como esperado, o conteúdo de daidzeína e genisteína é maior em relação ao de gliciteína, corroborando o com os dados de atividade fotoprotetiva, onde a daidzeína e a genisteína apresentam uma CME menor quando comparada com a gliciteína. Não houve diferença significativa entre os teores de agliconas entre as amostras **ES4** e **ES8**, onde o teor de gliciteína ficou abaixo do limite de detecção na amostra **ES8**.

TABELA 27: Doseamento de Isoflavonas agliconas em extrato de *G. max*. Letras diferentes representam diferença estatística 95% de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).

Amostra	Teor (mg/100g)			
	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína	Agliconas totais
<b>ES3</b>	58,0 ± 4,33 <sup>a</sup>	7,37 ± 0,575 <sup>a</sup>	61,9 ± 4,06 <sup>a</sup>	127,27
<b>ES4</b>	21,0 ± 0,810 <sup>b</sup>	14,3 ± 0,103 <sup>b</sup>	15,1 ± 0,598 <sup>b</sup>	50,4
<b>ES8</b>	22,7 ± 1,53 <sup>b</sup>	<LQ	21,3 ± 2,28 <sup>b</sup>	44,0

TABELA 28: Dados das curvas analíticas para doseamento de isoflavonas. LQ: limite de quantificação; LD: limite de detecção.

Analito	Equação da reta	R <sup>2</sup>	LQ (µg/mL)	LD (µg/mL)
<b>Daidzeína</b>	y=89,6x+7,48	0,999	1,19	3,61
<b>Gliciteína</b>	y=156x+36,7	0,999	1,49	4,52
<b>Genisteína</b>	y=190x-62,9	0,999	0,4	1,3

Foi possível verificar a influência da solução extratora no conteúdo de agliconas extraído, sendo que entre as soluções avaliadas, EtOH: DMSO a 80% (v/v) apresentou um maior conteúdo dos analitos, sendo então mais eficiente. SELVAKUMAR et al. (2021) descreve a utilização de DMSO na extração de componentes fenólicos em resíduo de frutas, com porcentagem de DMSO a 0,6% com assistência de sonda ultrasônica. CRANCIANINOV e colaboradores (2005) utiliza metanol associado a DMSO (8:2) para extrair isoflavonas de sementes de soja, no entanto neste trabalho é apresentada alternativas menos tóxicas, como o

etanol e o álcool de cereais. Os valores obtidos corroboram com aqueles determinados por BATISTA e colaboradores (2020) onde não houveram diferenças significativas na utilização entre etanol e álcool de cereais na extração de daidzeína e genisteína.



### 5.7.3. Compostos voláteis de óleos essenciais comerciais por GC-MS.

Os componentes voláteis dos óleos de gerânio, cedro e tangerina foram determinados por análises em CG-MS. A identificação dos componentes foi realizada segundo a biblioteca espectral interna fornecida pelo instrumento (NIST) e confirmada segundo o cálculo do Índice de Kovats e comparação com a literatura disponível.

Plantas da família *Geraniaceae* constituem ervas comuns em climas subtropicais e temperados. O gênero *Pelargonium* é constituído por mais de 750 espécies. O óleo essencial de gerânio extraído das partes aéreas é o maior interesse comercial do gerânio, pelo seu aroma muito semelhante ao de rosas. Por esse motivo, é um substituto mais barato do óleo de rosas. Além de sua aplicação como aromatizante e saborizante, o óleo de gerânio é reconhecido por suas múltiplas aplicações farmacológicas (NARNOLIYA et al., 2019). Poucos trabalhos descrevem contraindicações quanto ao uso do óleo essencial de forma tópica, sendo descrito como não-alergênico e não-irritante e seguro quando usado apropriadamente.

Foi possível a identificação de 18 componentes no óleo de gerânio (**OEGe**) com compatibilidade maior que 92% (FIGURA 43). O componente principal é o citronelol com cerca de 19% do conteúdo total relativo do óleo, corroborando com o determinado por KUMAR et al. (2020). Além do citronelol, linalol, limoneno, geraniol e  $\alpha$ -pineno compõem os cinco compostos majoritários encontrados no óleo. O alto teor de citronelol confere ao óleo sua atividade antimicrobiana, como verificado por LOPEZ-ROMERO (2015) além de sua atividade antioxidante (SANTOS et al., 2018).

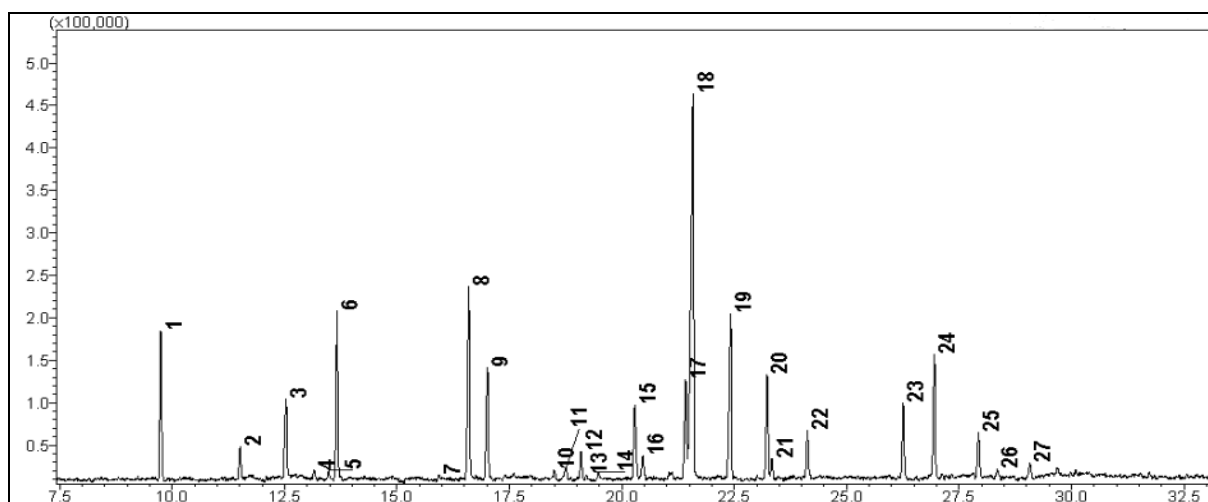


FIGURA 43: Cromatograma de íons totais do óleo **OEGe**.

TABELA 29: Componentes voláteis do óleo **OEGe** (*Pelargonium graviolens*) obtidos por análise em CG-MS.

No	Tr (min)	IK	Composto Biblioteca	Composto Literatura	Ref.	%
1	9,7	936	$\alpha$ -Pineno	$\alpha$ -Pinene	ADAMS, R.P; KUMAR et al. (2020)	7,56
2	11,5	980	$\beta$ -Pineno	Isolimoneno	ADAMS, R.P	1,52
3	12,5	1006	Carbitol	Carbitol	Fabricante	3,85
5	13,5	1030	<i>o</i> -Cimeno	<i>o</i> -Cimeno, $\alpha$ -mirceno	Fabricante	0,40
6	13,7	1033	<i>D</i> -Limoneno	<i>D</i> -Limoneno	ADAMS, R.P; KUMAR et al. (2020)	8,36
8	16,6	1105	Linalol	Linalol	ADAMS, R.P; Fabricante	9,68
9	17,0	1116	Álcool Feniletílico	Álcool Feniletílico	ADAMS, R.P	5,54
12	19,1	1169	<i>L</i> -Mentona	Iso-Mentona	KUMAR et al. (2020)	1,36
16	20,5	1205	$\gamma$ -Terpineol	$\gamma$ -Terpineol	ADAMS, R.P	1,06
17	21,4	1230	Nerol	Nerol	ADAMS, R.P	4,97
18	21,6	1235	Citronelol	Citronelol	ADAMS, R.P; Fabricante	19,33
19	22,4	1257	Geraniol	Geraniol	ADAMS, R.P; Fabricante	8,38
20	23,2	1279	Formato de Citronelil	Formato de Citronelil	KUMAR et al.	5,09
21	23,3	1282	Acetato de Nerolidil	-	-	1,02
22	24,1	1304	Formato de Neril	Formato de Neril	KUMAR et al.	2,32
23	26,3	1366	Acetato de Neril	Acetato de Neril	ADAMS, R.P	3,82
24	27,0	1387	Acetado de Geranil	Acetao de Geranil	ADAMS, R.P	6,17
25	27,9	1407	$\alpha$ -Gurjuneno	$\alpha$ -Gurjuneno	ADAMS, R.P	2,33

A FIGURA 44 apresenta o cromatograma de íons totais obtido para o óleo essencial de cedro atlas (**OECa**). Dez substâncias foram anotadas segundo a biblioteca espectral.  $\beta$ -Himachaleno compõe mais de 50% do óleo, assim como alguns isômeros,  $\alpha$ -Himachaleno e  $\gamma$ -Himachaleno e a antlatona.

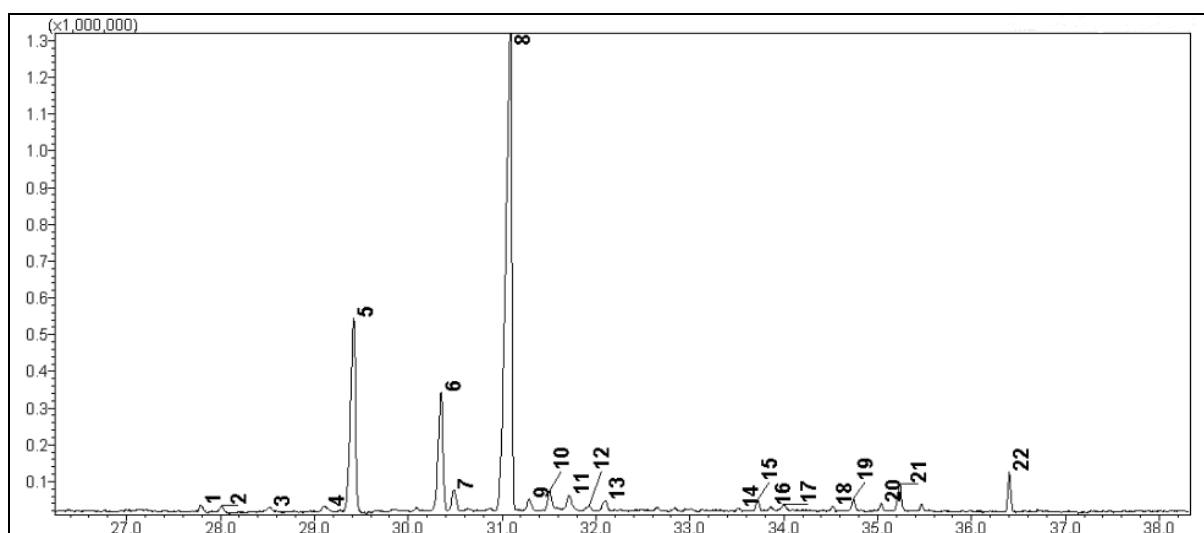


FIGURA 44: Cromatograma de íons totais de óleo **OECa**.

O gênero *Cedrus* é composto por quatro espécies de coníferas, *C. libani*, *C. deodara*, *C. cedar* e *C. atlântica*. O cedro atlas é particularmente nativo das Cordilheiras do Atlas na Algeria e Marrocos. As espécies são de grande interesse comercial e farmacológico segundo a resistência e aroma da madeira extraída, utilizada para construção de diversas estruturas e na medicina popular ao longo de milhares de anos (CHAUIYAKH et al., 2023). O óleo essencial é extraído de diferentes partes da planta, como flores, folhas e madeira. O aroma característico é descrito como uma nota amadeirada e penetrante. É rico em compostos que apresentam atividades antifúngicas, antivirais, analgésicas e

repelentes, tornando-se um agente multifuncional contra uma ampla variedade de patógenos (SKANDERI et al., 2020).

TABELA 30: Componentes voláteis de óleo essencial **OECa** (*Cedrus Atlantica*) obtidos por análise em CG-MS.

No	Rt (min)	IK	Composto Biblioteca	Composto Literatura	Ref	%
1	27,8	1405	Decahidro-4-metil-1-metileno-7-(1-metiletilideno) Naftaleno	$\beta$ -cariofileno	BOUTOS et al. (2020)	0,35
2	28,0	1408	Longifoleno	Longifoleno	ADAMS, R. P (2007)	0,43
3	28,5	1415	Himachala-2,4-dieno	Himachala-2,4-dieno	UEHARA et al. (2017)	0,30
5	29,4	1426	$\alpha$ -Himachaleno	$\alpha$ -Himachaleno	ADAMS, R. P (2007)	18,04
6	30,3	1438	$\gamma$ -Himachaleno	$\gamma$ -Himachaleno	ADAMS, R. P (2007)	10,54
7	30,5	1440	Himachala-1,4-dieno	Himachala-1,4-dieno	UEHARA et al. (2017)	1,68
8	31,1	1448	$\beta$ -Himachaleno	$\beta$ -Himachaleno	ADAMS, R. P (2007)	56,64
10	31,5	1453	$\delta$ -Cadineno	$\delta$ -Cadineno	ADAMS, R. P (2007)	1,56
20	34,7	1495	$\gamma$ -Atlantona	$\gamma$ -Atlantona	ADAMS, R. P (2007)	0,39
22	35,2	1509	Atlantona	Atlantona	ADAMS, R. P (2007)	2,02
<b>Total</b>						91,95

Como esperado, o componente principal identificado no óleo essencial **OETa** foi o limoneno (>94%), seguido de o-cimeno e  $\beta$ -mirceno. A composição varia conforme conforme o tipo de cultivar de tangerina, período de coleta do material vegetal, parte extraída e método de extração. O alto conteúdo de limoneno encontrado na espécie exercem uma extensa gama de propriedades biológicas, segundo foi possível verificar com os resultados obtidos neste trabalho. Além de um amplo espectro antimicrobiano, sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória contribuíram para a demanda crescente na indústria cosmética.

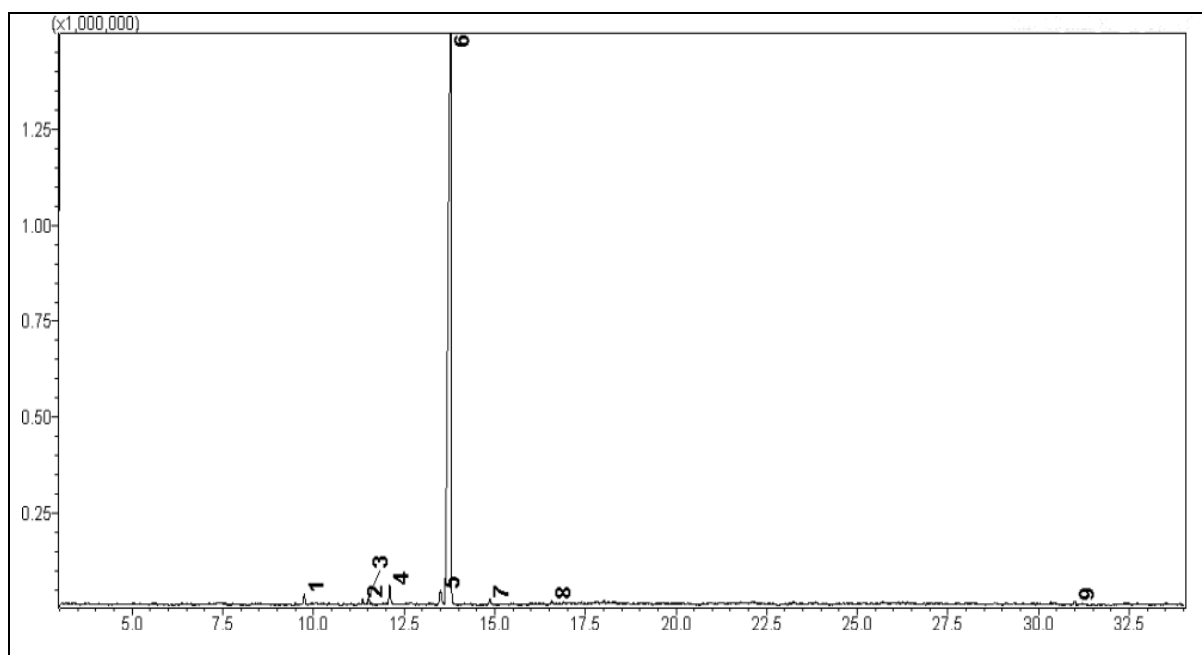


FIGURA 45: Cromatograma de íons totais de óleo essencial OETA.

TABELA 31: Componentes voláteis de óleo essencial **OETA** (*Citrus reticulata*) obtidos por análise em CG-MS.

No	Rt (min)	IK	Composto Biblioteca	Composto Literatura	Ref	%
1	27,8	1405	$\alpha$ -Pino	-	-	0,84
2	28,0	1408	$\beta$ -Sabineno	Longifoleno	ADAMS, R.P	0,34
3	28,5	1415	$\beta$ -Pino	$\beta$ -Pino	ADAMS, R.P	0,43
4	29,4	1426	$\beta$ -Mirceno	$\beta$ -Mirceno	ADAMS, R.P	1,25
5	30,3	1438	<i>p</i> -Cimeno	<i>o</i> -Cimeno	ADAMS, R.P	1,39
6	30,5	1440	<i>D</i> -Limoneno	<i>D</i> -Limoneno	MERYEM et al.	94,73
7	31,1	1448	$\gamma$ -Terpinene	$\gamma$ -Terpinene	FAHMY, et al.	0,38
8	31,5	1453	Linalol	Linalol	ADAMS, R.P	0,28
9	34,7	1495	$\alpha$ -Longipino	-		0,36
<b>Total</b>						100

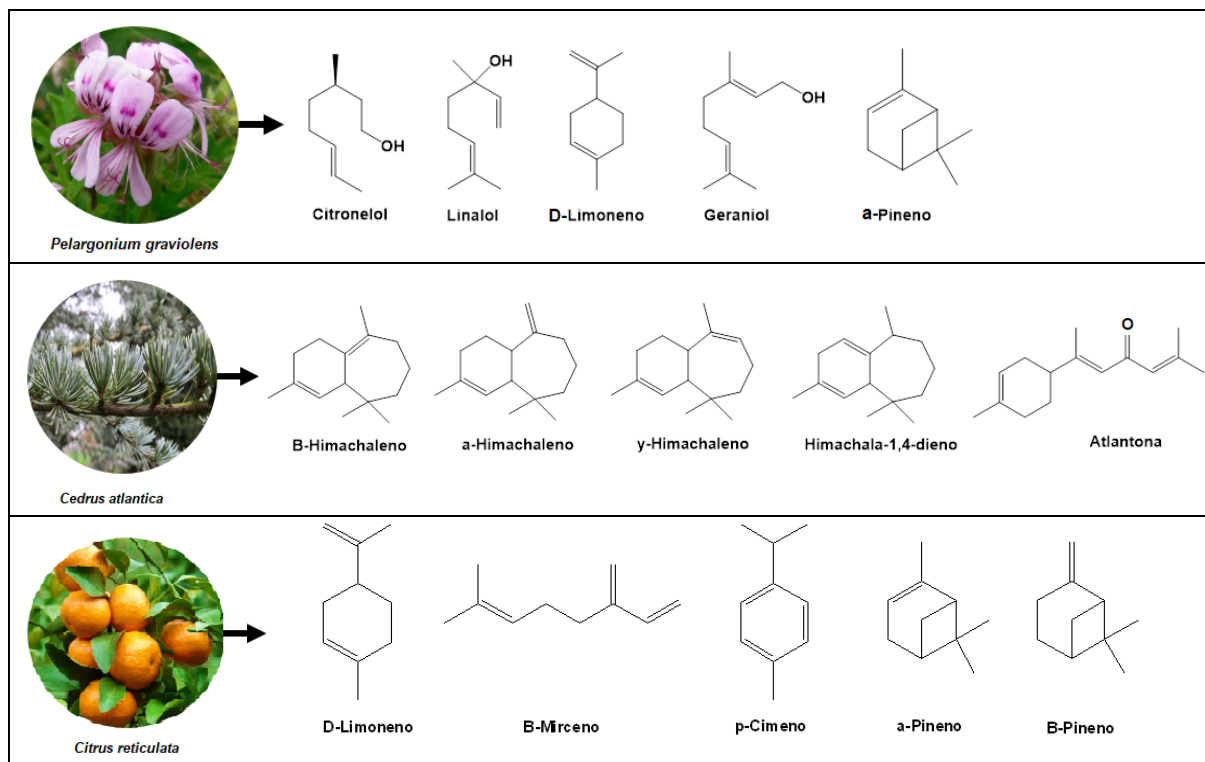


FIGURA 46: Compostos majoritários identificados por análise em CG-MS dos óleos essenciais de gerânio (**OEGe**), cedro atlas (**OECa**) e tangerina (**OETa**).

## 5.8. Caracterização dos carreadores poliméricos

Segundo o que foi apresentado, o óleo essencial de gerânio e o extrato de *G. max* enriquecido com isoflavonas **ES3**, foram selecionados como material ativo para preparo de nanopartículas poliméricas.

A caracterização do carreador polimérico constituiu-se da investigação de estabilidade e características físico-químicas da suspensão coloidal e do material encapsulado. As soluções coloidais tendem a formar uma única fase por meses após o seu preparo, pela utilização de surfactantes, no entanto durante o tempo de armazenamento pode ocorrer a aglomeração das nanopartículas, formando precipitados e partículas com diâmetro maior do que o inicial, o que pode alterar significativamente a penetração do material no sítio de ação desejado (MOURDIKOU DIS et al., 2018; SCHAFFAZICK et al., 2003).

### 5.8.1. pH das suspensões

Mudanças na estabilidade da suspensão coloidal podem ser verificados segundo o monitoramento do pH do meio. A alteração de pH pode ser um indício da degradação da parede polimérica após períodos longo de armazenamento, assim como degradações da fase oleosa, liberando ácidos graxos no meio de dispersão. O pH da partícula também é uma forma de avaliar a compatibilidade da partícula com a região de ação. Para produtos de cuidados com a pele, por exemplo, valores entre 4,5-6,5 são preferíveis.

A avaliação do pH das suspensões coloidais preparadas a partir das amostras **ES3** e **OEGe** ao longo de 15 dias é apresentado na FIGURA 47. Foi possível verificar variações bruscas nesse parâmetro entre os dias 10-12 após o preparo das partículas. Mudanças bruscas em períodos curtos podem ser atribuídas a ionização de grupos ácidos ou básicos presentes no polímero, devido

à relaxação das cadeias poliméricas. Para determinações mais precisas de estabilidade em função do pH, recomenda-se o período de monitoramento por até seis meses consecutivos.

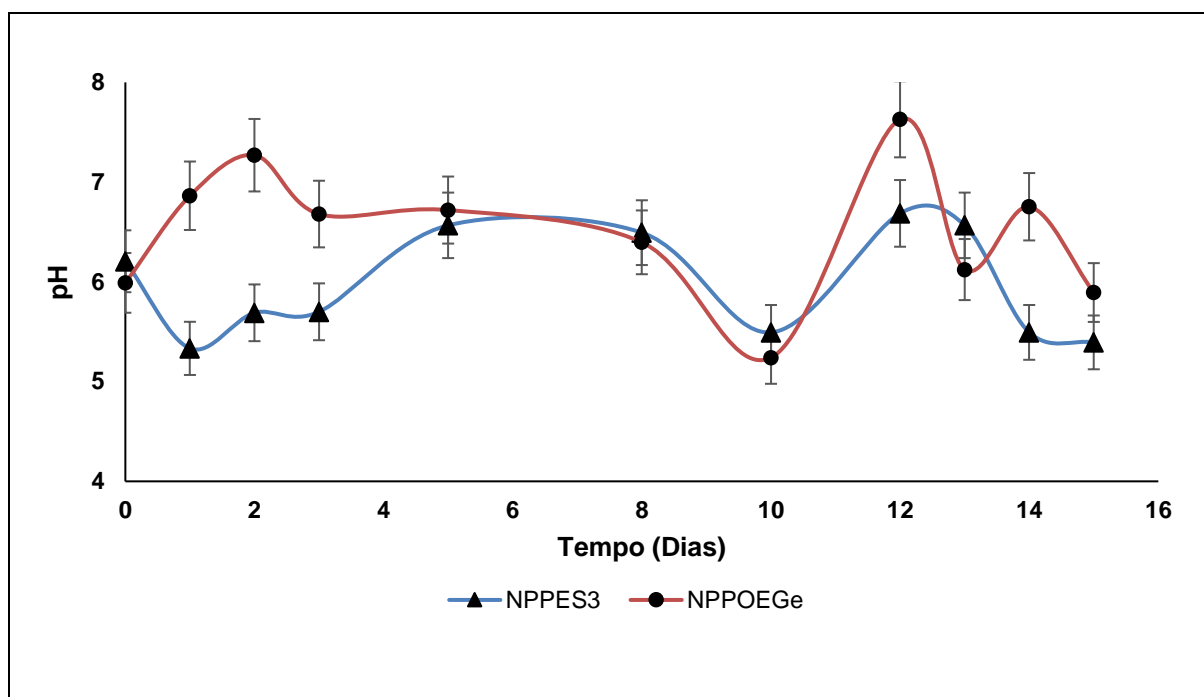


FIGURA 47: Análise da variação de pH ao longo do tempo das suspensões coloidais **NPPE3**: Nanopartícula polimérica com extrato de **G. max** enriquecido **ES3** e **NPPOEGe**: Nanopartícula polimérica com óleo essencial de gerânio **OEGe**.

### 5.8.2. Diâmetro de partícula

Os diâmetros obtidos em zeta-sizer das partículas produzidas através de método de precipitação do polímero pré-formado variaram entre 350 e 400 nm. A técnica de espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering*, DLS) avalia a variação de intensidade da luz espalhada que foi incidida em determinado ângulo sobre uma partícula em suspensão. A variação observada é um resultado direto do movimento browniano contínuo das partículas no meio de dispersão. A



partir dessa técnica é possível determinar o tamanho médio das nanopartículas na suspensão coloidal.

A composição das fases assim como as proporções utilizadas e os métodos de preparação são fatores determinantes no diâmetro de sistemas nanoestruturados. O principal fator é a natureza do óleo utilizado como núcleo, devido diferenças de viscosidade, hidrofobicidade ou tensão superficial do material. O transporte de substâncias através da epiderme é restringido geralmente a moléculas com baixo peso molecular, lipofilicidade moderada e hidrofiliicidade suficiente para permitir sua passagem através das camadas lipídicas e mais internas da pele.

A aplicabilidade industrial de suspensões aquosas de nanopartículas pode ser limitada devido os problemas de estabilidade a longo prazo. Além da agregação de partículas e estabilidade dos ativos integrados, formulações líquidas são suscetíveis a contaminações por microrganismos, necessitando a adição de agentes conservantes, ou da adição de uma etapa de secagem, resultando em uma formulação sólida. O diâmetro de partícula médio dos produtos secos por nebulização em *Spray-Drying* foram determinado pela ressuspensão do material em água ultrapura. É possível verificar um aumento substancial do diâmetro de partícula após o processo de secagem (3521 nm). O adjuvante de secagem (dióxido de silício coloidal) é adicionado como agente de suporte para aderência das nanocápsulas secas. O processo de secagem por nebulização pode gerar a alteração da organização das nanoestruturas causando a aglomeração.

### **5.8.3. Potencial zeta**

O potencial zeta das suspensões coloidais preparadas a partir das amostras **ES3** e **OEGe** são apresentados na TABELA 32 e FIGURAS 48 e 49,

potenciais entre 23 e 31 mV negativos foram registrados. Poliésteres como a policaprolactona (PLA) fornecem potenciais negativos na interface, devido ao grupo carboxil. Valores de potencial zeta  $> \pm 20-30$  mV ou mais indicam estabilidade da suspensão, dessa forma foi possível aferir a estabilidade da suspensão logo após seu preparo.

TABELA 32: Medidas de diâmetro de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta para as preparações de nanopartículas em suspensão coloidal e no material sólido seco por aspersão atômica. **NPPE3**: Nanopartícula polimérica com extrato de **G. max** enriquecido **ES3** e **NPPOEGe**: Nanopartícula polimérica com óleo essencial de gerânio **OEGe**.

Amostra	Diâmetro médio (nm)	PDI	PZ (mV)
<b>NPPE3</b>	373,6	0,370	-31,7
<b>NPPOEGe</b>	401,7	0,539	-23
<b>NPPE3-OEGe</b>	3521	0,445	-24

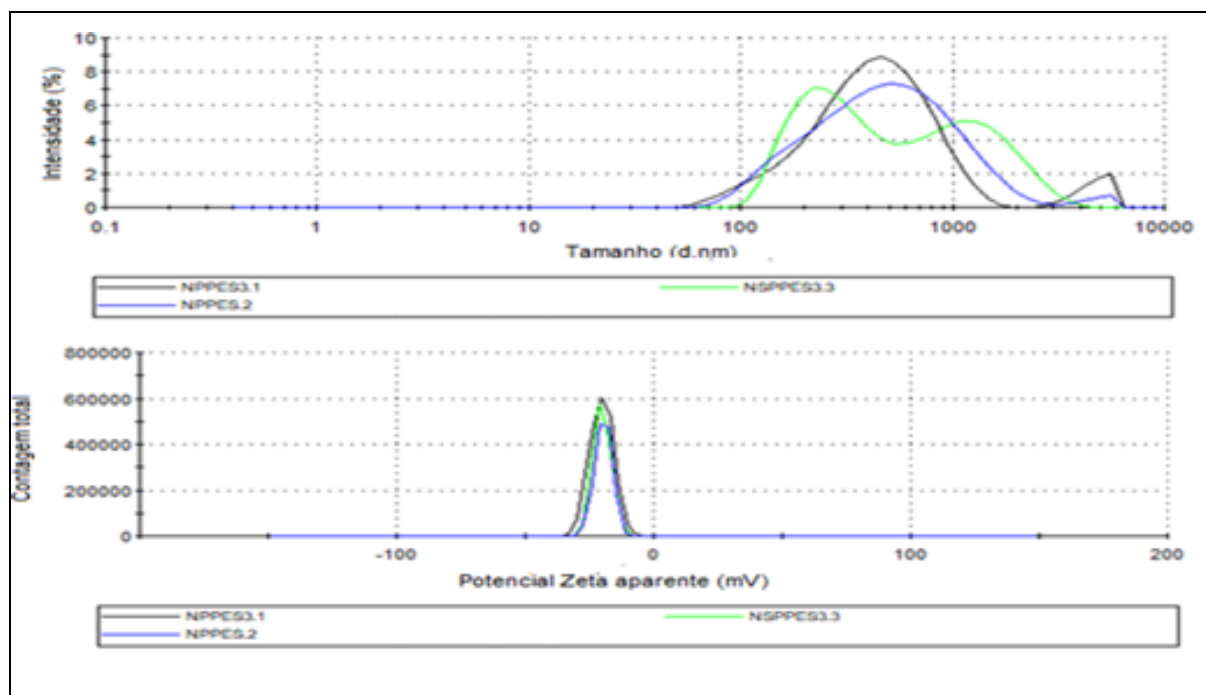


FIGURA 48: Medidas de diâmetro de partícula e potencial zeta da suspensão coloidal de nanopartículas carregadas com extrato de *G. max*, **NPPE3**.

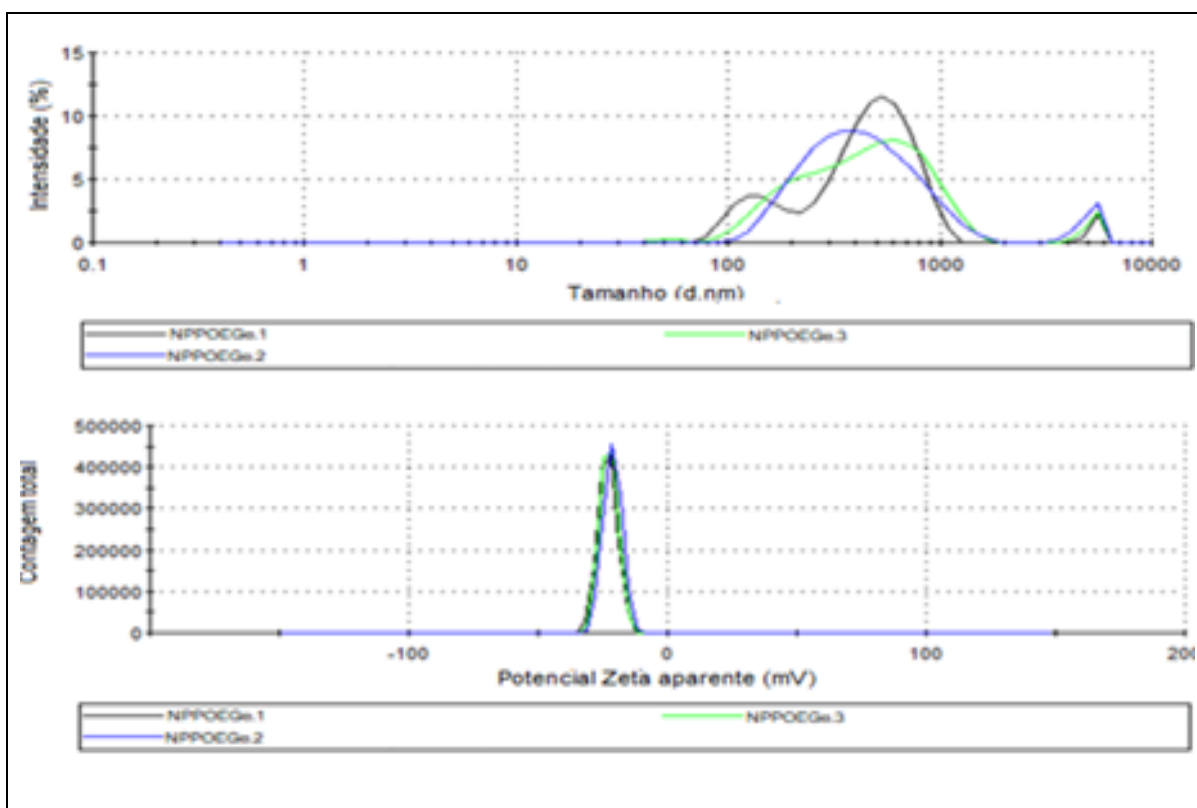


FIGURA 49: Medidas de diâmetro de partícula e potencial zeta da suspensão coloidal de nanopartículas carregadas com óleo essencial de gerânio, **NPPOEGe**.

O potencial zeta é um importante indicador da estabilidade de dispersões coloidais. Esse parâmetro se relaciona com o potencial de superfície das partículas, que são diretamente influenciados pelas mudanças na interface e interação com o meio de dispersão. A ionização de grupos funcionais na superfície da partícula e a adsorção de espécies iônicas do meio aquoso afetam diretamente esse parâmetro. Em módulo, valores altos de carga tendem a formar uma suspensão coloidal mais estável, pelo fenômeno de afastamento entre essas partículas, evitando floculação.

#### 5.8.4. Índice de polidispersão.

Os índices de polidispersão obtidos são apresentados na TABELA 32. O índice polidispersão indica a homogeneidade da suspensão coloidal, a

uniformidade do tamanho de partículas presentes no meio de dispersão. Valores entre 0,1 e 0,4 indicam sistemas moderadamente polidispersos, e valores maiores 0,4 indicam suspensões altamente polidispersas. Valores superiores a 0,5 foram obtidos para a suspensão preparada com óleo essencial de gerânio e para o produto de nebulização combinado com o extrato enriquecido de *G. max*. Esse parâmetro avalia distribuição de tamanho das partículas e valores altos são indicativo de aglomeração de partículas e uma baixa homogeneização. O fator principal relacionado a variação do tamanho de partículas do meio é o fluxo de injeção da fase orgânica na fase aquosa, processo que afeta diretamente na nucleação das partículas e agregação das mesmas.

### 5.8.5. Eficiência de encapsulamento e secagem

As suspensões coloidais e o produto seco por aspersão, combinando tanto o extrato **ES3** quanto o óleo **OEGe** foram analisados por HPLC-UV. A eficiência de encapsulamento foram calculadas em função das três isoflavonas determinadas como ativas (TABELA 33). Valores maiores que 94 % foram obtidos para a daidzeína e genisteína presentes no extrato de *G max*. Não foi possível determinar a eficiência em função da gliciteína, onde as concentrações ficaram abaixo do limite de detecção. A eficiência do processo de secagem por aspersão foi de 52% em relação a massa de material recuperada.

**TABELA 33:** Cálculos da eficiência de encapsulamento e eficiência de secagem dos nanocarreadores poliméricos **NPES3** contendo extrato enriquecido de *G. max* e **NPES3-OEGe** contendo extrato enriquecido de *G. max* e óleo essencial **OEGe**.

<b>Amostra</b>	<b>Analito</b>	<b>C.Total (mg/L)</b>	<b>C. livre (mg/L)</b>	<b>EE (%)</b>
<b>NPES3</b>	Daidzeína	3,12	0,139	95,5

<b>NPES3</b>	Gliciteína	<LOQ	<LOQ	ND
<b>NPES3</b>	Genisteína	4,052	0,183	94,8
<b>NPES3-OEGe</b>		<b>Massa seca teo.</b>	<b>Massa seca exp.</b>	<b>ES (%)</b>
		5,43	2,84	52,25

## 6. CONCLUSÕES

Em síntese, a presente dissertação explorou o desenvolvimento de carreadores nanopoliméricos contendo substâncias encontradas em óleos essenciais de origem comercial e no extrato enriquecido de soja, como bioativos para fins cosméticos. Ao longo deste estudo, pôde-se verificar a viabilidade dos metabólitos secundários majoritários, com ênfase para as isoflavonas e compostos voláteis, identificados nos materiais de estudo como agentes antimicrobianos, fotoprotetivos e antioxidantes, propriedades extremamente relevantes na prospecção de matérias primas dermocosméticas,

Foi estabelecido que a solução extratora não convencional EtOH: DMSO 80% (v/v), empregando um agente surfactante e a extração assistida por ultrassom, extrai quantitativamente Daidzeína, Genisteína e Gliciteína de sementes de soja. Esse método é considerado rápido e eficiente em comparação com técnicas tradicionais. Além disso, foi demonstrado o potencial fotoprotetor de óleos essenciais de Gerânio, Cedro atlas e Tangerina em baixas concentrações, preenchendo lacunas na literatura sobre o assunto. A técnica de nanoencapsulação utilizando policaprolactona como polímero biodegradável foi eficaz, produzindo partículas com diâmetro de 300 nm e eficiência superior a 90%. Contudo, a otimização dos parâmetros de secagem por aspersão no Spray-Drying pode ser necessária para atingir eficiência acima de 50% e tornar viável o uso de formulações sólidas de nanocápsulas.

Em última análise, essa dissertação oferece uma visão abrangente sobre nanocarreadores como sistemas de liberação de agentes dermocosméticos, e os resultados obtidos destacam a viabilidade e eficácia das técnicas e para a extração e encapsulação de compostos bioativos, fornecendo possibilidades para continuidade do desenvolvimento de produtos e processos inovadores.

## 7. REFERÊNCIAS

ABDEL-MOTTALEB M. M.; MOULARI B.; BEDUNEAU A.; PELLEQUER Y.; LAMPRECHT A.; **Nanoparticles enhance therapeutic outcome in inflamed skin therapy.** Eur. Jour. Pharm Biopharm. 82(1):151-7, 2012.

ABELAN U. S.; OLIVEIRA A. C.; CACOCI É.; MARTINS T.; GIACON V.; VELASCO M.; LIMA C.; **Potential use of essential oils in cosmetic and dermatological hair products: A review.** Jour. Cosmet. Dermatol. 21(4):1407-18, 2022.

ABIHPEC. **A indústria de higiene pessoal; perfumaria e cosméticos: essencial para o Brasil.** Disponível em <[https://abihpec.org.br/site2019/wp-content/uploads/2021/04/Panorama\\_do\\_Setor\\_Atualizado\\_1208.pdf](https://abihpec.org.br/site2019/wp-content/uploads/2021/04/Panorama_do_Setor_Atualizado_1208.pdf)> Acesso em Fevereiro de 2023.

ACCORSI-NETO A.; HAIDAR M.; SIMÕES R.; SIMÕES M; SOARES J. Jr.; BARACAT E. **Effects of isoflavones on the skin of postmenopausal women: a pilot study.** Clinics. 64(6):505-10, 2009.

AL-FARSI M. A.; LEE C. Y. **Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds.** Food Chem. 108(3):977-85, 2008.

ALVAREZ-ROMÁN R.; NAIK A.; KALIA Y. N.; GUY R. H.; FESSI H. **Enhancement of Topical Delivery from Biodegradable Nanoparticles.** Pharm. Res. 21:1818–25, 2004.

ANDRES S.; HANSER U.; NIEMANN B.; PALAVINSKAS R.; LAMPEN A. **Determination of the isoflavone composition and estrogenic activity of commercial dietary supplements based on soy or red clover.** Food Funct. 6(6):2017-25, 2015.

ANVISA. **Conceito e definições.** Disponível em <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/perguntasfrequentes/cosmeticos/conceitos-e-definicoes>> Acesso em Fevereiro de 2023.

ANVISA. **Farmacopeia brasileira.** 6ª ed. Brasília, 2019.

ANVISA. **RDC N° 528.** Disponível em <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/cosmeticos/informes/anvisa-revisa-atos-normativos-da-area-de-cosmeticos>. Acesso em Agosto de 2023.

ANVISA. **RDC N° 600**. Disponível em <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/cosmeticos/informes/anvisa-revisa-atos-normativos-da-area-de-cosmeticos>. Acesso em Agosto de 2023

ARAGÃO A.; CONTINI E. **O agro no Brasil e no Mundo: uma síntese do período de 2000 a 2020**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/10180/62618376/O+AGRO+NO+BRASIL+E+NO+MUNDO.pdf>> Acesso em Fevereiro de 2023.

AYALA-FUENTES J.; CHAVEZ-SANTOSCOY R. A. **Nanotechnology as a Key to Enhance the Benefits and Improve the Bioavailability of Flavonoids in the Food Industry**. *Foods*. 10(11), 2021.

BAKI G.; ALEXANDER K. S. **Introduction to cosmetic formulation and technology**. United States of America: The University of Toledo; College of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2015.

BAKKALI F; AVERBECK S; AVERBECK D; IDAOMAR M. **Biological effects of essential oils: a review**. *Food Chem. Toxicol.* 46(2):446-75, 2008.

BALVOLGYI S.; DUSZA E.; NAMUKWAMBI F. K.; KISS I.; STEFANOVITS-BÁNYAI É.; VATAI G. **Optimization of Extraction of Phenolic Compounds from Tokaji Aszú Marc Using Response Surface Methodology**. *Prog. Agric.* 16, 2020.

BALWIERZ; R. et al. **Potential Carcinogens in Makeup Cosmetics**. *Int. Jour. Of Env. Res. Pub. Health.* 20(6), 2023.

BATISTA V.; NUNES G.; VIEGAS G.; LUCAS B.; BOCHI V.; EMANUELLI T.; BARIN J.; MENEZES C.; ROSA C. **Extraction, characterization and microencapsulation of isoflavones from soybean molasses**. *Cienc. Rural.* 50 (3), 2020.

BAUER A. W.; KIRBY W. M. M.; SHERRIS J. C.; TURCK M. **Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method**. *Amer. Jour. Clin. Path.* 45, 493-96, 1996.

BHATTACHARJEE S. **DLS and zeta potential – What they are and what they are not**. *Jour. Cont. Release.* 235:337-51, 2016.



BIZZO R. H.; REZENDE C. M. **O mercado de óleos essenciais no Brasil e no mundo na última década.** Quim. Nova. 45(8): 949-58, 2022.

BLICHARSKI T.; ONISZCZUK A. **Extraction Methods for the Isolation of Isoflavonoids from Plant Material.** Open Chemistry. 15 (1):34-45, 2017.

BODE AM; ROH E. **FDA-Approved Sunscreen Components Effective in Preventing Solar UV-Induced Skin Cancer?** Cells. 9(7):1674, 2020.

BOM S.; JORGE J.; RIBEIRO H. M.; MARTO J. **A step Forward on Sustainability in the Cosmetics Industry: A Review.** Jour. Clea. Prod. 225, 2019.

BOM S.; FITAS M.; MARTINS A. M.; PINTO P.; **Replacing synthetic ingredients by sustainable natural alternatives: a case study using topical o/w emulsions.** Mol. 25:4887; 2020.

BOUTOS S.; TOMOU E.; RANCIC A.; SOKOVIC M.; HADJIPAVLOU-LITINA D.; NIKOLOU K.; SKAL TSA, H. **Composition of the essential oil of *Cedrus brevifolia* needles Evaluation of its antimicrobial and antioxidant activities.** Amer. Jour. Ess. Oils Nat. Prod. 8(2):01-5, 2020.

BROOKS G. F.; JAWETZ M. A.; BUTEL J.S.; MORSE S. A. Med. Mic.. 23<sup>a</sup> Ed. Singapore, McGraw Hill Companies Inc., 2004.

BRISTOW A. **Accurate mass measurement for the determination of elemental formula: a tutorial.** Mass Spec. Rev. 25, 2006.

BUCAR F. **Phytoestrogens in plants: with special reference to isoflavones.** In: Isoflavones: Chemistry, Analysis, Function and Effects. Cambridge: The royal Society of chemistry, 2013.

BUSTAMANTE-RANGEL M.; DELGADO-ZAMARREÑO M. M; PÉREZ-MARTÍN L. ; RODRÍGUEZ-GONZALO E.; DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ J. **Analysis of isoflavones in foods.** Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 17(2):391-411, 2018.

BYRNE F. P.; JIN S.; PAGGIOLA G. **Tools and techniques for solvent selection: green solvent selection guides.** Sus. Che. Pro. 4:7, 2016.

CAKMAK O. K. **Biodegradable Polymers: a Review on Properties, Processing, and Degradation Mechanism.** *Circ. Econ. Sust.*, 2023.

CASANOVA; F.; SANTOS; L. **Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application – a review.** *Jour. Micro.* 33:1, 2016.

CHALESHTORI S. A. H.; KACHOIE M. A.; JAZI S. M. H. **Antibacterial effects of the methanolic extract of *Glycine Max* (Soybean).** *Microb. Reas.* 8, 2017.

CHEN L. R.; CHEN K. H. **Utilization of Isoflavones in Soybeans for Women with Menopausal Syndrome: An Overview.** *Intern. Jour. Mol. Sci.* 22(6), 2021.

CHEN L.; HU J.Y.; WANG S. Q. **The role of antioxidants in photoprotection: a critical review.** *Jou. Amer. Acad. Dermatol.* 67(5):1013-24, 2012.

CHIANG H. S.; WU W. B.; FANG J. Y.; CHEN B. H.; KAO T. H.; CHEN Y. T.; HUANG C. C.; HUNG C. F. **UVB-Protective effects of isoflavone extracts from soybean cake in human keratinocytes.** *Int. Jour. Mol. Sci.* 8(7):651–61, 2007.

CIOLA R. **Fundamentos de Cromatografia Líquido de alto desempenho: HPLC.** São Paulo: Edgard Blucher, 2003.

CISOJA; CENTRO DE INTELIGÊNCIA DA SOJA. **Utilização do grão de soja.** 2006. Disponível em: <[www.cisoja.com.br](http://www.cisoja.com.br)> Acesso em Fevereiro de 2023.

CRANCIANINOV W. S.; FREITAS A. M.; SANTANA A. C.; MANDARINO J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI M. C. **Composição química de soja verde para consumo como hortaliça.** In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS; 6. *Resumos...* Campinas: Unicamp/FEA: SBCTa, 2005.

CRUZ T.; TORRES F.; PETRUCCELLI M.; ABREU M. SILVA S.; MARINS M.; BELEBONI R.; FACHIN A. **Antimicrobial and synergistic activity of essential oils facing isolated bacteria from surgical staff's.** *Rev. Pre. Infec. Saúde.* 5:8970, 2019.

CUI S.; HASSAN R.; HEINTZ-BUSCHART A.; BILITEWSKI U. **Regulation of *Candida albicans* Interaction with macrophages through the Activation of HOG pathway by genistein.** *Molecules.* 28 (2):162, 2016.

DAVIES J. T. **Local eddy diffusivities related to “burst” of fluid near solid walls.** *Chem. Eng. Sci.* 30, 996–97, 1975.

DENKOVA-KOSTOVA R.; TENEVA D.; TOMOVA T.; GORANOV B.; DENKOVA Z.; SHOPSKA V.; SLAVCHEV A.; HRISTOVA-IVANOVA Y. **Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from tangerine (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.), lemon (*Citrus lemon* L.) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume).** *Naturforsch.* 76 (5-6): 175-85, 2021.

DEWICK; P.M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach.** 3<sup>a</sup> ed. John Wiley & Sons; Ltd. 2009.

DHIFI W.; BELLILLI S.; JAZI S.; BAHLOUL N.; MNIF W. **Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review.** *Medicines* (Basel). 3(4), 2016.

DIFFEY B. L. **Human exposure to solar ultraviolet radiation.** *Jou. Cosmet. Dermatol.* 1(3):124-30, 2002.

EDMOND S.; VINCENT H. **Mass spectrometry principles and applications.** 3<sup>a</sup> ed. Wiley, 2007.

ELOFF J. N. **A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria.** *Planta Med.* 64(8):711-3, 1998.

ELSHIKH M.; AHMED S.; FUNSTON S.; DUNLOP P.; McGAW M.; MARCHANT R.; BANAT I. M. **Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants.** *Biotechnol Lett.* 38(6):1015-9, 2016.

ESTEVINHO B. N.; ROCHA F.; SANTOS L.; ALVES A. **Microencapsulation with chitosan by *spray drying* for industry applications: a review.** *Trend. Food. Scien. Techno.* 31(2), 2013.

FAMUYIDE I. M.; ARO A .O.; FASINA F. O.; ELOFF J. N.; McGAW L. J. **Antibacterial and antibiofilm activity of acetone leaf extracts of nine under-investigated south African *Eugenia* and *Syzygium* (*Myrtaceae*) species and their selectivity indices.** *BMC Complem. Altern. Med.* 19 (141), 2019.

FESSI H.; PUISIEUX F.; DEVISSAGET J. P.; AMMOURY N.; BENITA S. **Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement.** *Int. Jour. Pharm.* 55:25–28, 1989.

FESSI H.; PUISIEUX F.; DEVISSAGUET J. P. **Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules.** European Patent 274961 A1, 1988.

FLOR J.; DAVOLOS M.; CORREA M. **Protetores solares.** *Quim. Nova* 30 (1), 2007.

FONSECA-SANTOS; B.; CORRÊA; M. A.; CHOROLLI; M. **Sustainability, natural and organic cosmetics: consumer; products; efficacy; toxicological and regulatory considerations.** *Braz. Jour. Pharm. Scien.* 51:1; 2015.

FRANZ C.; NOVAK J. Sources of essential oils. In: Hüsnü Can Baser K.; Buchbauer G.; editors. **Handbook of Essential Oils and Science; Technology and Applications.** CRC Press Taylor & Francis Group; Boca Raton; FL; USA, 2010.

FYTIANOS, G.; ABBAS R.; GEORGE Z. K. **Nanomaterials in Cosmetics: Recent Updates.** *Nanomaterials.* 10,5:979, 2020.

GAO L; LIU X; LUO X; LOU X; LI P; LI X; LIU X. **Antiaging effects of dietary supplements and natural products.** *Front Pharmacol.* 27(14), 2023.

GOULA A. M. **Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil – Kinetic modeling,** *Jour. of Food Engin.* 117 (4):492-498, 2013.

GRUIJL F. R **Photocarcinogenesis: UVA vs UVB.** *Methods Enzymol* 319: 359–66, 2000.

GUARATINI T.; CALLEJON D.; PIRES D.; LOPES J.; LIMA L.; NETO D.; SUSTOVICH C.; LOPES N. **Natural products derived sunscreen: market perspectives and interactions between business and research institutes.** *Quim. Nova.* 32 (3), 2009.

GUENTHER E. *The essential oils.* New York, D. Van Nostrand Company, 1950.

GULCIN I.; ALWASEL S. H; **DPPH radical scavenging assay.** *Processes.* 11(8):2248, 2023.

HALLA N.; FERNANDES I. P.; HELENO S. A.; COSTA P.; BOUCHERIT-OTMANI Z.; BOUCHERIT K.; RODRIGUES A. E; FERREIRA I. C. F. R.; BARREIRO M.F. **Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies.** *Molecules*, 2018.

HATANO T.; SHITANI Y.; AGA Y.; SHIOTA S.; TSUCHIYA T.; YOSHIDA T. **Phenolic constituents of licorice: structures of glicophenone and glicoisoflavanone, and effects of licorice phenolics on methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Chem. Pharm. Bull.* 48, 1286-92, 2000.

HERMAN A; HERMAN A. P. **Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review.** *Jour. Pharm Pharmacol.* 67(4):473-85,2015.

HEURUNG AR; RAJU SI; WARSHAW EM. **Adverse reactions to sunscreen agents: epidemiology; responsible irritants and allergens; clinical characteristics; and management.** *Dermatitis.*25(6):289-26, 2014.

HONG H.; LANDAUER M. R.; FORISKA M. A.; LEDNEY G. D. **Antibacterial activity of the soy isoflavone genistein.** *Jou. Basic. Microbiol.* 46: 329-335, 2006.

HOSSEINZADEH R; KHORSANDI K.; HEMMANTY S. **Study of the effect of surfactants on extraction and determination of polyphenolic compounds and antioxidant capacity of fruits extracts.** 8(3), 2008.

HUNGRIA M.; CAMPO R.; MENDES, I. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura de soja.** Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitStream/CNPSO/18515/1/circTec35.pdf>>. Acesso em Agosto de 2023.

IMMAMOVIC B; TREBSE P; OMERAGIC E; BECIC E; PECET A; DEDIC M. **Stability and Removal of Benzophenone-Type UV Filters from Water Matrices by Advanced Oxidation Processes.** *Molecules.*27(6):1874 2022.

JUNG Y. S.; RHA C. S.; BAIK M. Y. ; BAEK N. I.; KIM D. O. **A brief history and spectroscopic analysis of soy isoflavones.** *Food Sci. Biotechnol.* 29(12):1605-17, 2020.

KACANIOVA M.; GALOVICOVA L.; VALKOVA V.; DURANOVA H.; STEFANIKOVA J.; CMIKOVA N.; VUKIC M.; VUKOVIC N. L.

KOWALCZEWSKI P. L. **Chemical Composition, Antioxidant, In Vitro and In Situ Antimicrobial, Antibiofilm, and Anti-Insect Activity of Cedar atlantica Essential Oil.** *Plants* 11 (3): 358, 2022.

KATZ L. M.; DEWAN K.; Bronaugh R. L. Nanotechnology in cosmetics. *Food. Chem. Tox.* 85:127, 2015.

KAUL S.; GULATI N.; VERMA D.; MUKHERJEE S.; NAGAICH, U. **Role of Nanotechnology in Cosmeceuticals: A review of Recent Advances.** *Jour. Pharm.*, 2018.

KAUR C. D.; SARAF S. **In vitro sun protection factor determination of herbal oils used in cosmetics.** *Pharmacog. Res.* 2 (1): 22-25, 2010.

KIM H. J.; KIM T. H.; KANG K. C.; PYO H. B.; JEONG H. H. **Microencapsulation of rosmarinic acid using polycaprolactone and various surfactants.** *Int. Jour. Cosmet. Sci.* 32 (3):185-91, 2010.

KO H. M.; CHOI J.; LEE W. S.; CHOI U. K. **Quality characteristics of cheonggukjang made with the smoked soybeans.** *Korean Jour. Food Nutr.* 27(2):274–79, 2014.

KOKKALI M.; FRANCISCO J.; MARTÍ-QUIJAL M.; TARONCHER M. R.; KOUSOLAKI K.; FRANCISCO J. **Improved Extraction Efficiency of Antioxidant Bioactive Compounds from *Tetraselmis chuii* and *Phaeoactylum tricorutum* Using Pulsed Electric Fields.** *Molecules* 25, 2020.

KREBS E.; ENSRUD K. E.; MACDONALD R.; WILT T. J. **Phytoestrogens for Treatment of Menopausal Symptoms: A Systematic Review.** *Obstetrics and Gynecology* 104 (4):824-36, 2004.

KRIZOVA L.; DADAKOVA K.; KASPAROVSKA J.; KASOAROVSKY T. **Isoflavones.** *Molecules.* 19:24(6):1076, 2019.

KULLAVANIJAYA P.; LIM H. W. **Photoprotection.** *Jou. Am. Acad. Dermatol.* 52(6):937-58, 2005.

KUMAR K. J; GOKILA V. M.; WANG C. S; CHEN C. C; CHEN Y. C; LU L. P; HUANG C. H; LAI C. S; WANG S. Y. **Geranium and lemon essential oils**

**and their active compounds downregulate angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), a SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain in epithelial cells.** Plants, 2020.

KURZER M.S.; XU X. **Dietary phytoestrogens.** Ann. Rev. Nutri. 17:353-381, 1997.

LALOUCKOVA K.; MALA L.; MARIK P.; SKRIVANOVA E. ***In Vitro* Antibacterial Effect of the Methanolic Extract of the Korean Soybean Fermented Product Doenjang against *Staphylococcus aureus*.** Animals. 11, 2021.

LINCE F.; MARCHISIO D.L.; BARRESI A. A. **Strategies to control the particle size distribution of poly-ε-caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications.** Journ. Colloid Interf. Sci. 322, 505–515, 2008.

LOHANI A.; MISHRA, A. K.; VERMA A. **Cosmeceutical potential of geranium and calendula essential oil: determination of antioxidant activity and *in vitro* sun protection factor.** Jou. Cosmet. Dermatol. 18: 550–557, 2019.

LOPES DE MORAIS M.; BAVARESCO E. **Análise comparativa entre dois sistemas de cultivo de soja transgênica desenvolvidos em Sulina-PR na safra 2019/2020.** Revista Campo Digital. 18:1–21, 2023.

LOPEZ-ROMERO J. C; GONZÁLEZ-RÍOS H.; BORGES A.; SIMÕES M. **Antibacterial Effects and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.** Evid. Based Compl. Alter. Med. 2015:795435, 2015.

MABRY T. J.; MARKHAM K. R; THOMAS M. B. **The ultraviolet spectra of flavones and flavonols.** In: The Systematic Identification of Flavonoids. Berlin. Springer, 1970.

MALVIYA R.; BANSAL V.; PAL O. P.; SHARMA P. K. **High performance liquid chromatography: a short review.** Jour. Glob. Phar. Tech. 2, 22-26, 2010.

MANSUR J. S.; BREDER M. N. R.; MANSUR M. C. A.; AZULAY R. D. **Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria.** An. Bras. Dermatol. 61:121-124, 1986.

MARISA R. B.; LILLIAN B.; MONTESARRAT D.; CARVALHO A. M.; SANTOS-BUELGA C.; FERNANDES I. P.; BARREIRO, M. F; FERREIRA I. **Exploring the antioxidant potential of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench phenolic compounds for cosmetic applications: Chemical characterization, microencapsulation and incorporation into a moisturizer.** Ind. Cro. and Pro. 53:330-336, 2014.

McMANAMEY W. J.; DAVIES J. T. ; WOOLLEN J.M.; COE J. R. **The influence of molecular diffusion on mass transfer between turbulent liquids.** Chem. Eng. Sci. 28, 1061–1069, 1973.

McMASTER M. **HPLC: a practical user's guide.** 2<sup>a</sup> ed. John Willey & Sons, 1994.

MERIN K. A.; SHAJI M.; KAMESWARAN R. **A review on sun exposure and skin diseases.** Indian Jou. Dermatol. 67:625, 2022.

MOORE J. O; WANG Y.; STEBBINS W. G.; GAO D.; ZHOU X.; PHELPS R.; LEBWOHL M.; WEI H. **Photoprotective effect of isoflavone genistein on ultraviolet B-induced pyrimidine dimer formation and PCNA expression in human reconstituted skin and its implications in dermatology and prevention of cutaneous carcinogenesis.** Carcinogenesis. 2006 27(8):1627-35, 2006.

MORA-HUERTAS C. E.; FESSI H.; EIAISSAIRI A. **Polymer-based nanocapsules for drug delivery.** Int. Jour. Pharm. 29,385(1-2):113-42, 2010.

MORAIS; A. A. C.; SILVA; A. L. **Soja: suas aplicações.** Rio de Janeiro: Medsi; 1996.

MOREL C.; STERMITZ F. R; TEGOS G.; LEWIS K. **Isoflavones as potentiators of antibacterial activity.** Jour. Agri. Food Chem. 51: 5677-5679, 2003.

MOSMANN T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** Jour. Immunol. Methods. 16, 65(1-2):55-63, 1983.

MOURDIKOU DIS S.; PALLARES R.; THANH N. **Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle Properties.** Nanoscale, 10:12871-34, 2018.



NAGATA C.; KABUTO M.; KURISU Y. **Decreased serum estradiol concentration associated with high dietary intake of soy products in premenopausal Japanese women.** *Nutr Cancer* 29:228–33,1997.

NAKATA R.; YOSHINAGA N.; TERAISHI M.; OKUMOTO Y.; HUFFACKER A.; SCHMELZ E. MORI N. **A fragmentation study of isoflavones by IT-TOF-MS using biosynthesized isotopes.** *Biosci. Biotech. Biochem.* 82 (8): 1309-15, 2018.

NARNOLYIA L. K; JADAUN J. S; SINGH S. P. **The Phytochemical Composition: Biological Effects and Biotechnological Approaches to the Production of High-Value Essential Oil from Geranium.** *Essential Oil Research.* 9:327–52, 2019.

NOGUEIRA F.; do ROSÁRIO V. E.; **Methods for assessment of antimalarial activity in the different phases of the Plasmodium life cycle.** *Rev. Pan-Amaz Saude.* 1(3):109–24, 2010.

ORCHARD A.; SANDASI M.; KAMATOU G.; VILJOEN A.; VAN VUUREN S.; **The *in vitro* antimicrobial activity and chemometric modelling of 59 commercial essential oils against pathogens of dermatological relevance.** *Chem Biodivers.* 14 (1), 2017.

ORIVE G.; ANITUA E.; PEDRAZ J. L.; EMERICH D. F.; **Biomaterial for promoting brain protection, repair and regeneration.** *Nat. Ver. Neurosci.* 10:682-92, 2009.

OUSSAMA C.; ELMOSTAFA E.; SAMAR A.; OUMAIMA N.; LAHCEN O. FATIHA B. ABDELAZIZ C.; AZIZ E. ***In vitro* biological control of *Cedrus atlantica* 's lignivorous fungi by the extracted essential oils from the infected woo.,** *Intern. Wood Prod. Jour.,* 2023.

PATEL K. N.; PATEL J. K.; PATEL M. P.; RAJPUT G. C.; PATEL H. A. **Introduction to hyphenated techniques and their applications in pharmacy.** *Pharm Methods.*1(1):2-13, 2010.

PAZYAR N.; YAGHOobi R. **Soybean: a potential antipsoriasis agent.** *Jundishapur Jour. Nat. Pharm. Prod.,* 2015.

PFALLER M. A; MESSER S. A; COFFMANN S. **Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth**

**microdilution methods to test five antifungal agents; including the new triazole D0870.** Jour. Clin. Microbiol. 33(5):1094-7 1995.

PIRES J. S.; TORRES P.; CHOW F.; SANTOS D. **Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do FolinCiocalteu para extratos de algas.** Instituto de Biociências; Universidade de São Paulo. 2017a.

PIRES J. S.; TORRES P.; CHOW F.; SANTOS D. **Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas.** Instituto de Biociências; Universidade de São Paulo; 2017b.

PITT J. J. **Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry.** Clin Biochem Rev. 30(1):19-34, 2009. Quim. Nova. 30(1), 2007.

RAJU K.; KADIAN N.; TANEJA I.; WAHAJUDDIN M. **Phytochemical analysis of isoflavonoids using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.** Phytochem. Rev. 14: 469–498, 2015.

RANCAN F.; BLUME-PEYTAVI U.; VOGT A. **Utilization of biodegradable polymeric materials as delivery agents in dermatology.** Clin. Cosmet. Investig. Dermatol. 9:23-34, 2014.

RESENDE D.; AIVES G. C. S.; COUTO R. O. SANCHES, C.; CHEQUER, F. M. D. **Can parabens be added to cosmetics without posing a risk to human health? A systematic review of its toxic effects.** Rev. Cie. Farm. Apli. 42:706, 2021.

ROSTAGNO M. A.; PALMA M.; BARROSO C. G. **Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones.** Jour. Chromatogr A. 19, 1012(2):119-28, 2003.

SAAB A. M; GAMBARI R.; SACCHETTI G.; GUERRINI A.; LAMPRONTI I.; TACCHINI M.; EISAMRANI A.; MEDAWAR S.; MAKHLOUF H.; TANNOURY M.; ABOUD J.; DIAB-ASSAF M.; KIJOA A.; TUNDIS R.; AOUN J.; EFFERTH T.; **Phytochemical and pharmacological properties of essential oils from Cedrus species.** Nat. Prod. Res. 32(12):1415-27, 2018.

SADGROVE N. J.; PADILLA-GONZALES G. F.; Phumthum M. **Fundamental Chemistry of Essential Oils and Volatile Organic Compounds: Methods of Analysis and Authentication.** Plants (Basel), 2022.

SANTOS D.; FREITAS C.; FERREIRA B.; AFONSO I.; RODRIGUES C.; CASTRO H. ***Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar**. Jour. Bras. Patol. Med. Lab. 43(6), 2007.

SANTOS F. N.; FONSECA L. M.; JANSEN-ALVES C.; CRIZEL R. L.; PIRES J. B.; KRONING I. S.; SOUZA J. F.; FAJARDO A. R.; LOPES G. V.; DIAS A. R. G.; ZAVAREZE E. R. **Antimicrobial activity of geranium (*Pelargonium graveolens*) essential oil and its encapsulation in carioca bean starch ultrafine fibers by electrospinning**. Int. Jour. Bio. Macromol. 265, 2024.

SAYRE R. M.; AGIN P. P.; LEVEE G. J.; MARLOWE E. **Comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreens formulas**. Photochem. Photobio. 29:559-566, 1979.

SCHAFFAZICK S.; GUTERRES S.; FREITAS L.; POHLMANN A. **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos**. Quim. Nova. 26 (5), 2023.

SEIBERG M. **Non-Denatured Soybean Extracts in Skin Care: Multiple Anti-Aging Effects: Soybean Biochemistry, Chemistry and Physiology**. InTech, 2011.

SELVAKUMAR P.; KARTHIK V.; KUMAR P. S.; ASAITHAMBI P.; KAVITHA S.; SIVASHANMUGAM P. **Enhancement of ultrasound assisted aqueous extraction of polyphenols from waste fruit peel using dimethyl sulfoxide as surfactant: Assessment of kinetic models**. Chemosphere. 263: 128071, 2021.

SEQUINEL R.; HATANAKA R. R.; GUALTIERI C. E.; FLUMIGNAN D. L. OLIVEIRA J. E.; FILHO J. P. **Cromatografia gasosa ultrarrápida: uma visão geral sobre parâmetros, instrumentação e aplicações**. Quim. Nova. 33 (10), 2010.

SERAFINI M. R.; GUIMARÃES A. G.; QUINTANS J. S.; ARAÚJO A. A.; NUNES P. S.; QUINTANS-JÚNIOR L. J. **Natural compounds for solar photoprotection: a patent review**. Expert Opin. Ther. Pat. 25(4):467-78, 2015.

SEVERINO; P.; FANGUEIRO; J. F.; CHAUD; M. V.; CORDEIRO; J.; SILVA; A. M.; SOUTO; E. B. **Advances in nanobiomaterials for topical administrations: new galenic and cosmetic formulations**. In: GRUMEZESCU;

A. M. *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics*. vol. 10. Cambridge: Elsevier Inc.; 2016.

SHAMSUDIN N. F.; AHMED Q.; MAHMOOD S.; SHAH S.; KHATIB A.; MUKHTAR S.; ALSHARIF M.; PARVENN H.; ZAKARIA Z. **Antibacterial Effects of flavonoids and their structure-activity relationship study: a comparative interpretation**. *Molecules*. 27 (4): 1149, 2022.

SHARMA S.; KORI S.; PARMAR A. **Surfactant mediated extraction of total phenolic contents (TPC) and antioxidants from fruits juices**. *Food Chemistry*. 185:284-88, 2015.

SHARMEEN J.B.; MAHOMOODLY F. M.; ZENGIN G.; MAGGI F. **Essential Oils as Natural Sources of Fragrance Compounds for Cosmetics and Cosmeceuticals**. *Molecules*, 2021.

SILHAVY T. J.; KAHNE D.; WALKER S. **The bacterial cell envelope**. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2(5), 2010.

SILVA J.; MAGARELLI G.; PEDROZA T.; CAVALCANTE R.; SOUZA J.; SILVA J.; CARRÃO-PANIZZI M.; CASTRO C. **Determination of total isoflavones and rutin in seeds, roots, and leaves of Brazilian soybean cultivars by using voltammetric methods**. *Jour. of Agr. and Food Res.*, 2021.

SKANDERI I. CHOUITAH O. **Chemical characterization and antioxidant activity of *Cedrus atlantica* manetti tar (atlas cedar Tar)**. *French-Ukrainian Jou. Chem*. 8:244-55, 2020.

SOHN S.; AHN J.; PANDIAN S.; Oh Y-J; SHIN E. KANG H.; CHO W.; CHO Y.; SHIN K. **Dynamics of Bacterial Community Structure in the Rhizosphere and Root Nodule of Soybean: Impacts of Growth Stages and Varieties**. *Intern. Jour. of Mol. Sci*. 22(11), 2021.

SOUSA D.P.; DAMASCENO R.; AMORATI R.; ELSHABRAWY H. A.; Castro R. D.; BEZERRA D. P.; NUNES V. R. V.; GOMES R. C.; LIMA T. C.; **Essential Oils: Chemistry and Pharmacological Activities**. *Biomolecules*. 13(7), 2023.

SOUTO E. B; SEVERINO P.; SANTANA M. H. **Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II**. *Polímeros*. 22(1), 2012.

SUBRAMANIAN S.; STACEY, G; YU O. **Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*.** The Plant Journal, 48: 261-73, 2006.

TAN S. T.; SHIN. T. ; TAN C .X. **Soy protein: bioactive peptides; and isoflavones: A review of their safety and health benefits.** PharmaNutrition, 2023.

TRAN T. N. T; CHEW K. W.; BUI X. V. **Optimization of isoflavones extraction from soybeans using full factorial design.** Jour. Food Proc. Preserv. 43:14078, 2019.

TUNDIS R; LOIZZO M.R.; BONESI M; MENICHINI F. **Potential role of natural compounds against skin aging.** Curr. Med. Chem. 22:1515–38, 2015.

UZEL R. **Effect of extraction method and extraction solvent on recovery of phenolic compounds from olive leaves in Kemalpaşa-İzmir (Turkey): Oleuropein recovery as a case exemple.** Sep. Scie. Tech., 2018.

VELLA F. M.; CAUTELA D.; LARATTA B. **Determination of Antioxidant Activity and Sun Protection Factor of Commercial Essential Oils.** Bio. Life Sci. Forum. 6 (1): 96, 2021.

WANG H.; YIH K.; YANG C.; HUANG K. **Anti-oxidant activity and major chemical component analyses of twenty-six commercially available essential oils.** Jour. of Food and Drug Ana. 25 (4):881-89, 2017.

WAQAS M. K.; AKHTAR N.; MUSTAFA R; JAMSHAD M; KHAN H. M. S.; MURTAZA G. **Dermatological and cosmeceutical benefits of Glycine max (Soybean) and its active components.** Acta Pol Pharm. 72(1):3-11, 2015.

WEI H. **Isoflavone genistein: photoprotection and clinical implications in dermatology.** Jour Nutri. 133, 2003.

WU T.; HE M.; ZANG X.; ZHOU Y.; QIU T.; PAN S.; XU X. **A structure–activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect.** Biochim. Biophys. Acta 1828 (11):2751-2756.

XAVIER-JUNIOR F. H.; EGITO S. T. S.; MORAIS A. R.; ALENCAR E. N.; MACIUK E. **Experimental design approach applied to the development of chitosan coated poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules encapsulating**

**copaiba oil. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp.** 536:251-58, 2018.

YAN L.; YANG Y.; ZHANG W.; CHEN X. **Advanced materials and nanotechnology for drug delivery.** Adv. Mater. 26:5533-5540, 2014.

YOON G.; PARK S. **Antioxidant action of soy isoflavones on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in exercised rats.** Nutr. Res. Pract. 8(6):618-24, 2014.

YU J.; BI X.; YU B.; CHEN D. **Isoflavones: Anti-Inflammatory Benefit and Possible Caveats.** Nutrients. 8(6):361, 2016.

ZHAO W.; SHANG Z.; LI Q.; HUANG M.; HE W.; WANG Z.; ZHANG J. **Rapid screening and identification of daidzein metabolites in rats based on UHPLC-LTQ-Orbitrap mass spectrometry coupled with data-mining technologies.** Molecules. 23(1), 2012.

ZIELINKA A.; CARREIRÓ F.; OLIVEIRA A.M.; NEVES A.; PIRES B.; VENKATESH D. N.; DURAZZO A.; LUCARINI M.; EDER P.; SILVA A. M.; SANTINI A.; SOUTO E. B. **Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology.** Molecules. 25(16), 2020.

## APÊNDICES

Valores do produto EE x I x Abs para diferentes concentrações de benzofenona utilizados para o cálculo de FPS segundo o método de Mansur.

EE x I x Abs							
$\lambda$ (nm)	Concentrações (mg/mL)						
	5	2,5	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
290	0,053	0,029	0,006	0,004	0,005	0,003	0,004
295	0,174	0,089	0,021	0,013	0,018	0,010	0,011
300	0,292	0,148	0,040	0,022	0,033	0,018	0,019
305	0,158	0,079	0,028	0,013	0,022	0,010	0,011
310	0,059	0,029	0,013	0,005	0,010	0,004	0,004
315	0,025	0,012	0,006	0,002	0,004	0,002	0,002
320	0,005	0,008	0,001	0,0005	0,001	0,0006	0,0004

Valores do produto EE x I x Abs para diferentes concentrações de Daidzeína utilizados para o cálculo de FPS segundo o método de Mansur.

EE x I x Abs							
$\lambda$ (nm)	Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ )						
	100	90	50	0,075	0,060	0,030	0,015
290	0,015	0,012	0,0079	0,007	0,006	0,003	0,0007
295	0,083	0,068	0,042	0,023	0,022	0,007	0,0002
300	0,309	0,248	0,132	0,080	0,075	0,016	0,003
305	0,346	0,279	0,176	0,079	0,052	0,015	0,005
310	0,173	0,142	0,093	0,027	0,017	0,006	0,004
315	0,048	0,040	0,028	0,048	0,004	0,028	0,002
320	0,007	0,006	0,004	0,007	0,0004	0,004	0,0004

Valores do produto EE x I x Abs para diferentes concentrações de Daidzina utilizados para o cálculo de FPS segundo o método de Mansur.

EE x I x Abs							
$\lambda$ (nm)	Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ )						
	100	90	50	0,075	0,060	0,030	0,015
290	0,007	0,005	0,005	0,020	0,005	0,005	0,001
295	0,039	0,030	0,02	0,106	0,024	0,021	0,003
300	0,133	0,099	0,086	0,371	0,082	0,070	0,014
305	0,141	0,102	0,090	0,40	0,087	0,074	0,015
310	0,068	0,051	0,044	0,186	0,042	0,036	0,007
315	0,021	0,016	0,013	0,057	0,013	0,011	0,057
320	0,003	0,002	0,002	0,010	0,002	0,002	0,010

Valores do produto EE x I x Abs para diferentes concentrações de Gliciteína utilizados para o cálculo de FPS segundo o método de Mansur.

EE x I x Abs							
--------------	--	--	--	--	--	--	--

$\lambda$ (nm)	Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ )						
	100	90	50	0,075	0,060	0,030	0,015
290	0,004	0,00358	0,00246	0,01038	0,007525	0,00476	0,000305
295	0,022	0,017103	0,013072	0,05414	0,037364	0,020942	-0,00193
300	0,076	0,059204	0,045505	0,142646	0,131533	0,074245	-0,00345
305	0,094	0,069166	0,053868	0,201051	0,149695	0,075831	-0,00186
310	0,047	0,035851	0,027482	0,118302	0,081382	0,051527	9,94E-05
315	0,018	0,014655	0,010532	0,050639	0,036071	0,010532	0,050639
320	0,003	0,002874	0,002209	0,01087	0,007372	0,002209	0,01087

Valores do produto EE x I x Abs para diferentes concentrações de Glicitina utilizados para o cálculo de FPS segundo o método de Mansur.

$\lambda$ (nm)	EE x I x Abs						
	Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ )						
	100	90	50	0,075	0,060	0,030	0,015
290	0,00415	0,00357	0,00223	0,01347	0,009205	0,006665	0,00097
295	0,021651	0,018818	0,012064	0,064407	0,043519	0,03012	0,00079
300	0,077215	0,066677	0,042823	0,223885	0,154142	0,108254	0,003257
305	0,092658	0,083589	0,050918	0,269889	0,189578	0,130027	0,00448
310	0,053099	0,04724	0,029992	0,167636	0,117979	0,076132	0,002585
315	0,023626	0,021129	0,012784	0,069928	0,04454	0,020156	0,069928
320	0,005017	0,004308	0,002646	0,01489	0,011848	0,002646	0,01489

Valores do produto EE x I x Abs para diferentes concentrações de Genistina utilizados para o cálculo de FPS segundo o método de Mansur.

$\lambda$ (nm)	EE x I x Abs						
	Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ )						
	100	90	50	0,075	0,060	0,030	0,015
290	0,00686	0,006945	0,004035	0,02768	0,01825	0,01225	0,00477
295	0,030774	0,030883	0,0186	0,135704	0,081128	0,05256	0,018246
300	0,088136	0,090914	0,054798	0,411365	0,246781	0,15807	0,054798
305	0,080311	0,085665	0,05212	0,392704	0,235688	0,149477	0,050481
310	0,036932	0,03938	0,022834	0,204232	0,122701	0,077064	0,025512
315	0,014372	0,015905	0,008933	0,081142	0,03813	0,016134	0,081142
320	0,002759	0,003277	0,001835	0,016738	0,010288	0,001835	0,016738

Valores do produto EE x I x Abs para diferentes concentrações de Genisteína utilizados para o cálculo de FPS segundo o método de Mansur.

$\lambda$ (nm)	EE x I x Abs						
	Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ )						
	100	90	50	0,075	0,060	0,030	0,015
290	0,01942	0,01598	0,00951	0,033295	0,032625	0,02765	0,00448
295	0,095017	0,076798	0,046378	0,208335	0,191995	0,153242	0,014897
300	0,295447	0,239692	0,141784	0,791308	0,653643	0,444129	0,043589
305	0,288683	0,232192	0,138332	0,912595	0,651994	0,432259	0,035949
310	0,135904	0,109143	0,063016	0,516514	0,337434	0,219101	0,01526



315	0,052149	0,041665	0,024697	0,220137	0,099701	0,042954	0,220137
320	0,009979	0,008123	0,004851	0,043624	0,024262	0,004851	0,043624

Valores do produto EE x I x Abs para diferentes concentrações de ES1 utilizados para o cálculo de FPS segundo o método de Mansur.

$\lambda$ (nm)	EE x I x Abs						
	Concentrações (mg/mL)						
	5	2,5	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
290	0,012	0,007	0,003	0,001	0,004	0,003	0,001
295	0,057	0,039	0,015	0,007	0,021	0,014	0,007
300	0,160	0,117	0,049	0,022	0,068	0,045	0,023
305	0,185	0,116	0,050	0,022	0,069	0,044	0,024
310	0,094	0,061	0,025	0,011	0,035	0,023	0,012
315	0,038	0,025	0,011	0,005	0,014	0,009	0,005
320	0,007	0,005	0,002	0,001	0,002	0,002	0,001

Valores do produto EE x I x Abs para diferentes concentrações de ES2 utilizados para o cálculo de FPS segundo o método de Mansur.

$\lambda$ (nm)	EE x I x Abs						
	Concentrações (mg/mL)						
	5	2,5	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
290	0,010	0,006	0,003	0,003	0,004	0,003	0,001
295	0,050	0,031	0,016	0,014	0,021	0,014	0,007
300	0,160	0,098	0,050	0,045	0,068	0,045	0,023
305	0,163	0,100	0,051	0,046	0,069	0,044	0,024
310	0,082	0,050	0,026	0,023	0,035	0,023	0,012
315	0,034	0,021	0,011	0,009	0,014	0,009	0,005
320	0,007	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,001

Valores do produto EE x I x Abs para diferentes concentrações de ES3 utilizados para o cálculo de FPS segundo o método de Mansur.

$\lambda$ (nm)	EE x I x Abs						
	Concentrações (mg/mL)						
	5	2,5	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
290	0,010	0,008	0,013	0,011	0,008	0,005	0,003
295	0,065	0,044	0,063	0,049	0,038	0,027	0,014
300	0,200	0,128	0,196	0,157	0,119	0,087	0,044
305	0,197	0,123	0,196	0,157	0,118	0,083	0,042
310	0,095	0,059	0,096	0,077	0,058	0,041	0,021
315	0,0366	0,023	0,039	0,029	0,022	0,016	0,008
320	0,007	0,004	0,007	0,007	0,005	0,003	0,00153

Valores do produto EE x I x Abs para diferentes concentrações de ES4 utilizados para o cálculo de FPS segundo o método de Mansur.

$\lambda$ (nm)	EE x I x Abs						
	Concentrações (mg/mL)						

	<b>5</b>	<b>2,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>
290	0,011445	0,014045	0,011405	0,009885	0,008225	0,004615	0,00264
295	0,056754	0,069282	0,056373	0,048857	0,040605	0,022794	0,013072
300	0,180583	0,21919	0,178667	0,154813	0,128564	0,072137	0,041386
305	0,184442	0,222576	0,181273	0,157344	0,130683	0,073427	0,041958
310	0,091212	0,109479	0,089286	0,077605	0,067663	0,036162	0,02069
315	0,035098	0,041866	0,036189	0,029729	0,026037	0,013844	0,007943
320	0,00636	0,007542	0,006192	0,005382	0,005028	0,002502	0,00144

Valores do produto EE x I x Abs para diferentes concentrações de ES5 utilizados para o cálculo de FPS segundo o método de Mansur.

<b>EE x I x Abs</b>							
<b><math>\lambda</math> (nm)</b>	<b>Concentrações (mg/mL)</b>						
	<b>5</b>	<b>2,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>
290	0,010435	0,00553	0,00397	0,007215	0,002265	0,001005	0,00397
295	0,046515	0,024537	0,01811	0,024347	0,011547	0,004739	0,024047
300	0,131629	0,069263	0,059971	0,049816	0,038512	0,015232	0,094363
305	0,119756	0,062938	0,06414	0,035075	0,041412	0,014314	0,113856
310	0,054553	0,028519	0,034484	0,015098	0,018764	0,007207	0,066421
315	0,020388	0,010599	0,015102	0,005957	0,009732	0,002909	0,030232
320	0,003726	0,001944	0,002796	0,001194	0,001626	0,000972	0,005574

Valores do produto EE x I x Abs para diferentes concentrações de ES6 utilizados para o cálculo de FPS segundo o método de Mansur.

<b>EE x I x Abs</b>							
<b><math>\lambda</math> (nm)</b>	<b>Concentrações (mg/mL)</b>						
	<b>5</b>	<b>2,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>
290	0,011265	0,006005	0,002655	0,002325	0,00151	0,00102	0,000625
295	0,054222	0,029004	0,012827	0,011275	0,007326	0,004984	0,003214
300	0,168033	0,090148	0,039853	0,035159	0,022896	0,015999	0,010155
305	0,167724	0,090254	0,039664	0,035293	0,022837	0,015188	0,009725
310	0,083072	0,044798	0,019634	0,017397	0,017832	0,007394	0,004784
315	0,033057	0,017815	0,007803	0,006908	0,004559	0,002964	0,00193
320	0,00639	0,003438	0,001512	0,001338	0,001032	0,000666	0,000378

Valores do produto EE x I x Abs para diferentes concentrações de ES7 utilizados para o cálculo de FPS segundo o método de Mansur.

<b>EE x I x Abs</b>							
<b><math>\lambda</math> (nm)</b>	<b>Concentrações (mg/mL)</b>						
	<b>5</b>	<b>2,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>
290	0,010225	0,00995	0,004335	0,004755	0,002855	0,002105	0,00397
295	0,045126	0,020588	0,020588	0,022958	0,013617	0,011002	0,024047
300	0,126743	0,063515	0,063515	0,07185	0,04196	0,033338	0,094267
305	0,115167	0,063265	0,063265	0,072444	0,041958	0,034091	0,113856
310	0,052441	0,031129	0,031129	0,032869	0,02069	0,017459	0,066421

315	0,019605	0,012082	0,012082	0,014375	0,008054	0,007104	0,030232
320	0,003582	0,00225	0,00225	0,002682	0,001506	0,00135	0,005574

Valores do produto EE x I x Abs para diferentes concentrações de ES8 utilizados para o cálculo de FPS segundo o método de Mansur.

$\lambda$ (nm)	EE x I x Abs						
	Concentrações (mg/mL)						
	5	2,5	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
290	0,00873	0,007225	0,00339	0,00295	0,00222	0,00182	0,00095
295	0,04055	0,033688	0,01585	0,013835	0,010403	0,008551	0,004494
300	0,123486	0,103081	0,048858	0,042631	0,032189	0,026537	0,014083
305	0,122597	0,102383	0,048733	0,042614	0,032124	0,026443	0,014095
310	0,059586	0,049707	0,023921	0,020815	0,015658	0,012986	0,006959
315	0,022709	0,018961	0,009145	0,007998	0,006041	0,005034	0,002713
320	0,004158	0,003462	0,001692	0,001482	0,001116	0,000936	0,000504

Análise de variação para FPS dos extratos de *Glycine max.*

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	34,82938497	7	4,975626	917,34301	1,28618E-19	2,6571966
Dentro dos grupos	0,086783266	16	0,005424			
<b>Total</b>	<b>34,91616824</b>	<b>23</b>				

Resultado do teste t de Tukey para FPS dos extratos de *Glycine max.* Os contrastes representam a CME (mg/mL) em ordem crescente. \*Diferença mínima significativa para 8 tratamentos, 16 graus de liberdade e 95% de confiança. Valores < DMS foram omitidos.

		Contrastes							
		ES7	ES5	ES6	ES2	ES1	ES8	ES4	ES8
		3,85	3,78	2,79	2,74	2,50	2,01	0,524	2,02
<b>ES7</b>	<b>3,85</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>ES5</b>	<b>3,78</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>ES6</b>	<b>2,79</b>	1,060	0,983	-	-	-	-	-	-
<b>ES2</b>	<b>2,74</b>	1,112	1,035	-	-	-	-	-	-
<b>ES1</b>	<b>2,50</b>	1,358	1,281	0,298	0,246	-	-	-	-
<b>ES8</b>	<b>2,01</b>	1,838	1,761	0,778	0,727	0,480	-	-	-
<b>ES4</b>	<b>0,524</b>	3,330	3,254	2,271	2,219	1,972	1,492	-	-
<b>ES8</b>	<b>2,02</b>	3,373	3,296	2,313	2,261	2,015	1,535	-	-
<b>DMS*</b>		0,208							

Valores do produto EE x I x Abs para diferentes concentrações de OEGe utilizados para o cálculo de FPS segundo o método de Mansur.

$\lambda$ (nm)	EE x I x Abs					
	Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	250	100	50	30	20	10
290	0,010545	0,012935	0,019025	0,025255	0,029705	0,03069
295	0,05414	0,076335	0,094091	0,122931	0,125001	0,132871
300	0,160082	0,250613	0,310775	0,317481	0,36701	0,387703
305	0,125547	0,253171	0,28311	0,340803	0,340912	0,367464
310	0,051888	0,112977	0,12449	0,117413	0,150176	0,224146
315	0,015499	0,03813	0,036871	0,028543	0,046984	0,061952
320	0,00245	0,00719	0,006997	0,006253	0,004363	0,009937

Valores do produto EE x I x Abs para diferentes concentrações de OECA utilizados para o cálculo de FPS segundo o método de Mansur

$\lambda$ (nm)	EE x I x Abs					
	Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	250	100	50	30	20	10
290	0,011605	0,01557	0,02235	0,02713	0,033855	0,03947
295	0,062174	0,086275	0,12609	0,156238	0,210323	0,245263
300	0,230878	0,319972	0,468845	0,582177	0,786422	0,902915
305	0,28901	0,402211	0,585888	0,718756	0,905711	1,037596
310	0,183635	0,255971	0,370818	0,443843	0,52269	0,592317
315	0,088624	0,125472	0,181621	0,216974	0,261349	0,285232
320	0,020018	0,028525	0,040984	0,048581	0,058202	0,058198

Valores do produto EE x I x Abs para diferentes concentrações de OETA utilizados para o cálculo de FPS segundo o método de Mansur.

$\lambda$ (nm)	EE x I x Abs					
	Concentrações (mg/mL)					
	250	100	50	30	20	10
290	0,030145	0,024265	0,0238	0,0334	0,043995	0,043955
295	0,158307	0,107136	0,102397	0,199103	0,265035	0,261386
300	0,377165	0,266803	0,263929	0,592044	1,001685	0,939127
305	0,25623	0,202034	0,204766	0,525245	1,173633	0,893255
310	0,097369	0,085241	0,086129	0,234392	0,540262	0,367382
315	0,036524	0,031628	0,0313	0,091194	0,217639	0,121638
320	0,00697	0,006059	0,005909	0,016622	0,041711	0,029777

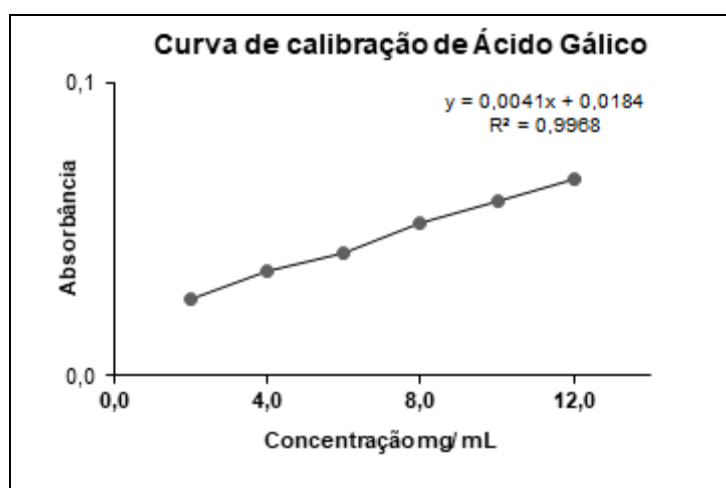
#### Análise de variação para FPS dos óleos essenciais.

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1838,487149	3	612,829	3422,5607	9,03821E-13	4,066180551
Dentro dos grupos	1,432445718	8	0,179056			
Total	1839,919594	11				

Resultado do teste t de Tukey para FPS dos óleos essenciais. Os contrastes representam a CME ( $\mu\text{g/mL}$ ) em ordem crescente.\*Diferença mínima significativa para 4 tratamentos, 8 graus de liberdade e 95% de confiança. Valores <DMS foram omitidos.

		Contrastes			
		C+	OEGe	OETa	OECa
		<b>94,3</b>	<b>11,1</b>	<b>8,2</b>	<b>6,6</b>
C+	<b>94,3</b>	-	-	-	-
OEGe	<b>11,1</b>	88,000	-	-	-
OETa	<b>8,2</b>	83,000	3,000	-	-
OECa	<b>6,6</b>	86,000	5,000	2	-
<b>DMS*</b>		1,11			

Curva de calibração de ácido gálico para determinação de conteúdo fenólico total.



Análise de variação de regressão para a curva de calibração de ácido gálico.

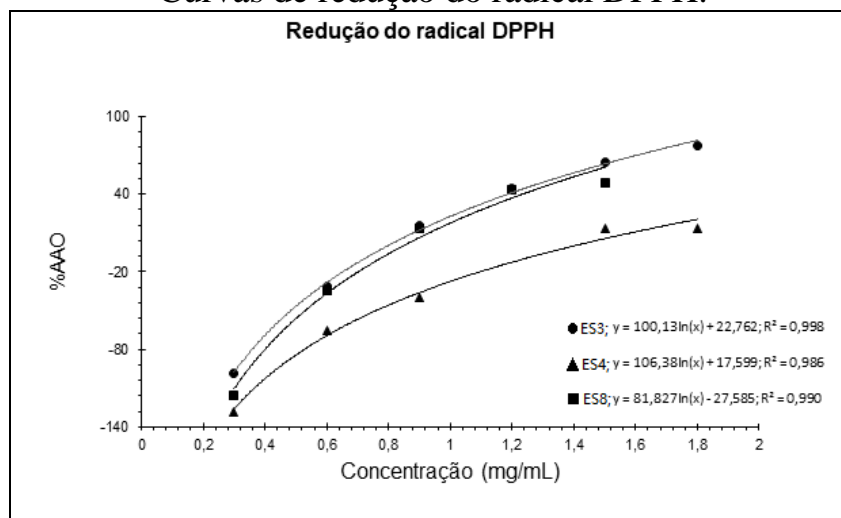
ANOVA					
Fonte da variação	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	0,002886334	0,002886334	380,698	$4,51343^{-12}$
Resíduos	15	0,000113725	$7,58169^{-06}$		
Total	16	0,003000059			

Resultado do teste t de Tukey para teor fenólico total de extratos de *Glycine max* e padrões de isoflavonas. Os contrastes representam mg de EAG/ g de amostra em ordem crescente.\*Diferença mínima significativa para tratamentos, graus de liberdade e 95% de confiança. Valores <DMS foram omitidos.

		Contrastes			
		C+	OEGe	OETa	OECa
		<b>94,3</b>	<b>11,1</b>	<b>8,2</b>	<b>6,6</b>
C+	<b>94,3</b>	-	-	-	-

OEGe	11,1	88,000	-	-	-
OETa	8,2	83,000	3,000	-	-
OECa	6,6	86,000	5,000	2	-
<b>DMS*</b>				1,11	

Curvas de redução do radical DPPH.



Valores nominais para a curva analítica de Daidzeína em HPLC-UV a 256 nm

Concentração (µg/mL)	A1	A2	A3	Média	DP	CV (%)
5,00	419	421	424	421	2,62	0,62
10,0	887	867	882	878	10,5	1,20
15,0	1,27x10 <sup>3</sup>	1,29x10 <sup>3</sup>	1,30x10 <sup>3</sup>	1,28x10 <sup>3</sup>	16,9	1,32
20,0	1,80x10 <sup>3</sup>	1,82x10 <sup>3</sup>	1,83x10 <sup>3</sup>	1,82x10 <sup>3</sup>	14,4	0,79
25,0	2,37x10 <sup>3</sup>	2,35x10 <sup>3</sup>	2,29x10 <sup>3</sup>	2,34x10 <sup>3</sup>	41,6	1,78
30,0	2,76x10 <sup>3</sup>	2,76x10 <sup>3</sup>	2,70x10 <sup>3</sup>	2,74x10 <sup>3</sup>	30,9	1,13
40,0	3,58x10 <sup>3</sup>	3,52x10 <sup>3</sup>	3,64x10 <sup>3</sup>	3,58x10 <sup>3</sup>	56,7	1,59
50,0	4,58x10 <sup>3</sup>	4,59x10 <sup>3</sup>	4,45x10 <sup>3</sup>	4,54x10 <sup>3</sup>	77	1,70
80,0	7,05x10 <sup>3</sup>	7,23x10 <sup>3</sup>	7,10x10 <sup>3</sup>	7,13x10 <sup>3</sup>	96	1,35

Análise de variação para a curva analítica de Daidzeína

ANOVA					
Fonte da variação	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	9,98x10 <sup>7</sup>	9,98x10 <sup>7</sup>	4,51x10 <sup>3</sup>	9,33x10 <sup>-30</sup>
Resíduos	25	5,53x10 <sup>5</sup>	2,21x10 <sup>4</sup>		
Total	26	1,00x10 <sup>8</sup>			

Valores nominais para a curva analítica de Glciteína em HPLC-UV a 256 nm

Concentração (µg/mL)	A1	A2	A3	Média	DP	CV (%)
2,0	262	265	270	266	3,8	1,41
5,0	755	750	747	750	4,0	0,53

9,0	1,38x10 <sup>3</sup>	1,39x10 <sup>3</sup>	1,39x10 <sup>3</sup>	1,39x10 <sup>3</sup>	4,0	0,286
10,0	1,63x10 <sup>3</sup>	1,57x10 <sup>3</sup>	1,54x10 <sup>3</sup>	1,58x10 <sup>3</sup>	45,8	2,90
15,0	2,46x10 <sup>3</sup>	2,40x10 <sup>3</sup>	2,42x10 <sup>3</sup>	2,43x10 <sup>3</sup>	28,3	1,17
20,0	3,21x10 <sup>3</sup>	3,25x10 <sup>3</sup>	3,25x10 <sup>3</sup>	3,24x10 <sup>3</sup>	22	0,69
50,0	8,16x10 <sup>3</sup>	8,09x10 <sup>3</sup>	8,05x10 <sup>3</sup>	8,10x10 <sup>3</sup>	56	0,69
80,0	1,27x10 <sup>4</sup>	1,28x10 <sup>4</sup>	1,28x10 <sup>4</sup>	1,28x10 <sup>4</sup>	82	0,64
100,0	1,55x10 <sup>4</sup>	1,55x10 <sup>4</sup>	1,55x10 <sup>4</sup>	1,55x10 <sup>4</sup>	22	0,143

### Análise de variação para a curva analítica de Gliciteína

ANOVA					
Fonte da variação	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	7,38 x10 <sup>8</sup>	7,38 x10 <sup>8</sup>	3,42 x10 <sup>4</sup>	2,27 x10 <sup>-39</sup>
Resíduos	24	5,18 x10 <sup>5</sup>	2,16 x10 <sup>4</sup>		
Total	25	7,39 x10 <sup>8</sup>			

Valores nominais para a curva analítica de Genisteína feita em HPLC-UV a 256 nm.

Concentração (µg/mL)	A1	A2	A3	Média	DP	CV (%)
1,0	128	125	124	126	2,3	1,86
2,0	292	299	298	297	4,1	1,38
3,0	4,95x10 <sup>2</sup>	4,96x10 <sup>2</sup>	4,93x10 <sup>2</sup>	4,95x10 <sup>2</sup>	1,98	0,401
5,0	8,84x10 <sup>2</sup>	8,81x10 <sup>2</sup>	8,87x10 <sup>2</sup>	8,84x10 <sup>2</sup>	3,1	0,35
10,0	1,83x10 <sup>3</sup>	1,82x10 <sup>3</sup>	1,86x10 <sup>3</sup>	1,84x10 <sup>3</sup>	19,0	1,04
20,0	3,84x10 <sup>3</sup>	3,87x10 <sup>3</sup>	3,87x10 <sup>3</sup>	3,86x10 <sup>3</sup>	17	0,45
50,0	9,28x10 <sup>3</sup>	9,55x10 <sup>3</sup>	9,27x10 <sup>3</sup>	9,37x10 <sup>3</sup>	157	1,67
80,0	1,52x10 <sup>4</sup>	1,51x10 <sup>4</sup>	1,51x10 <sup>4</sup>	1,5x10 <sup>4</sup>	64,7	0,43
100,0	1,92x10 <sup>4</sup>	1,86x10 <sup>4</sup>	1,92x10 <sup>4</sup>	1,90 x10 <sup>4</sup>	343	1,805

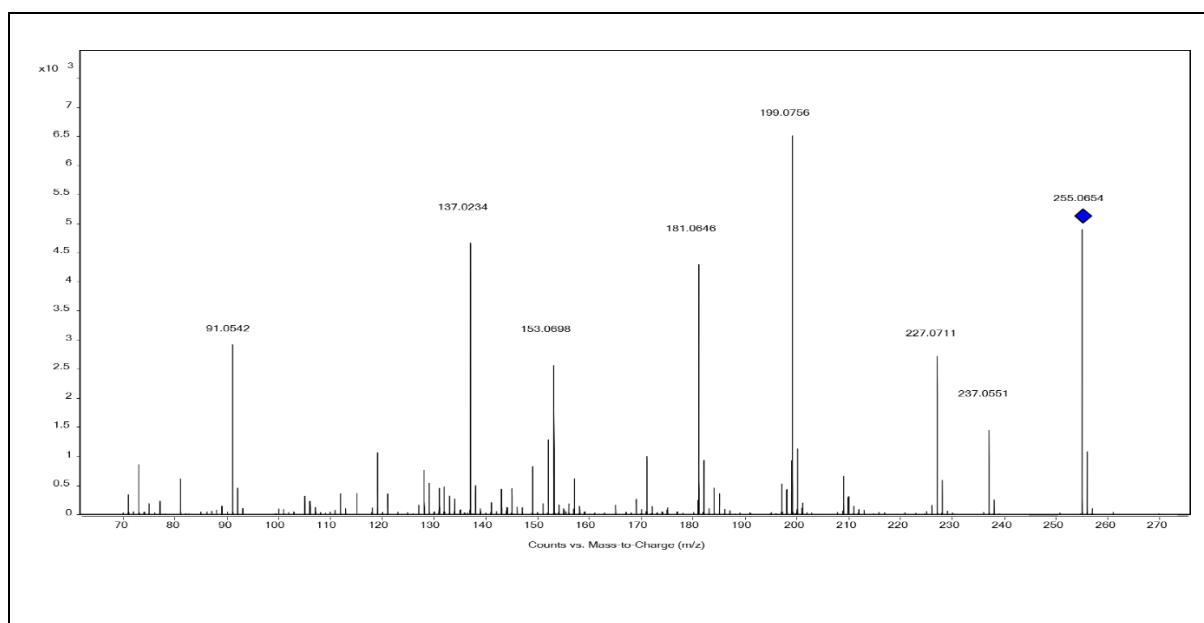
### Análise de variação para a curva analítica de Genisteína

ANOVA					
Fonte da variação	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,23x10 <sup>9</sup>	1,23x10 <sup>9</sup>	8,35x10 <sup>4</sup>	1,41x10 <sup>-45</sup>
Resíduos	25	3,67x10 <sup>5</sup>	1,47x10 <sup>4</sup>		
Total	26	1,23x10 <sup>9</sup>			

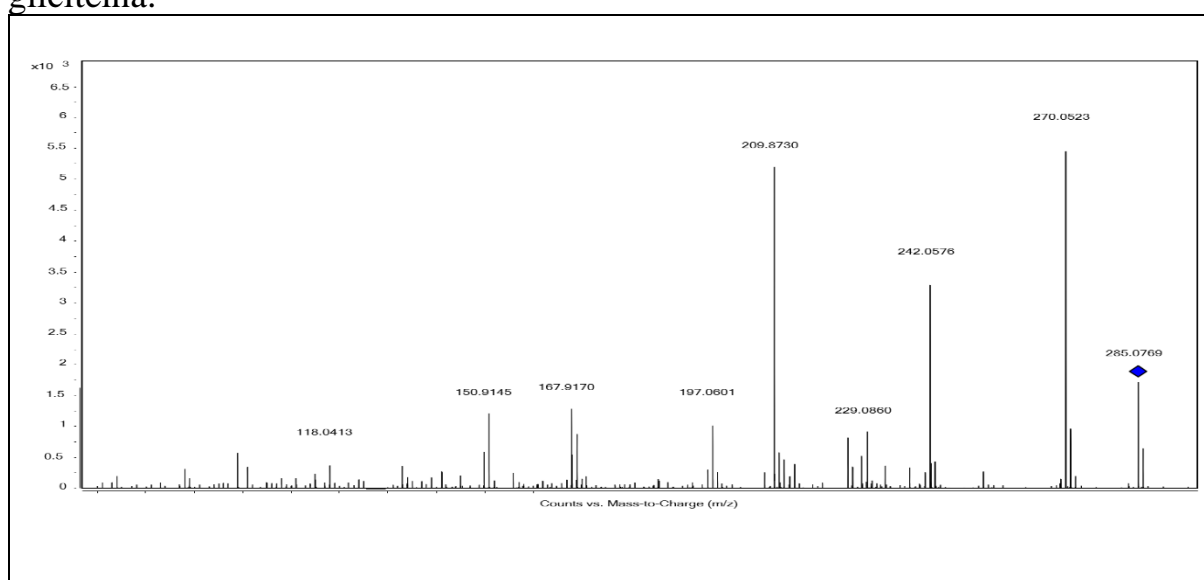
Análise de variação para a determinação do teor de Daidzeína em extratos de *G. max*

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	24692632	2	1,23E+07	7,76E+01	2,61E-03	9,55E+00
Dentro dos grupos	477415,9	3	1,59E+05			
Total		5				

Espectro de massas de *Glycine max.* Obtido para pico presente no tempo de retenção de 1,924 min. O padrão de fragmentação é atribuído a molécula de daidzeína.

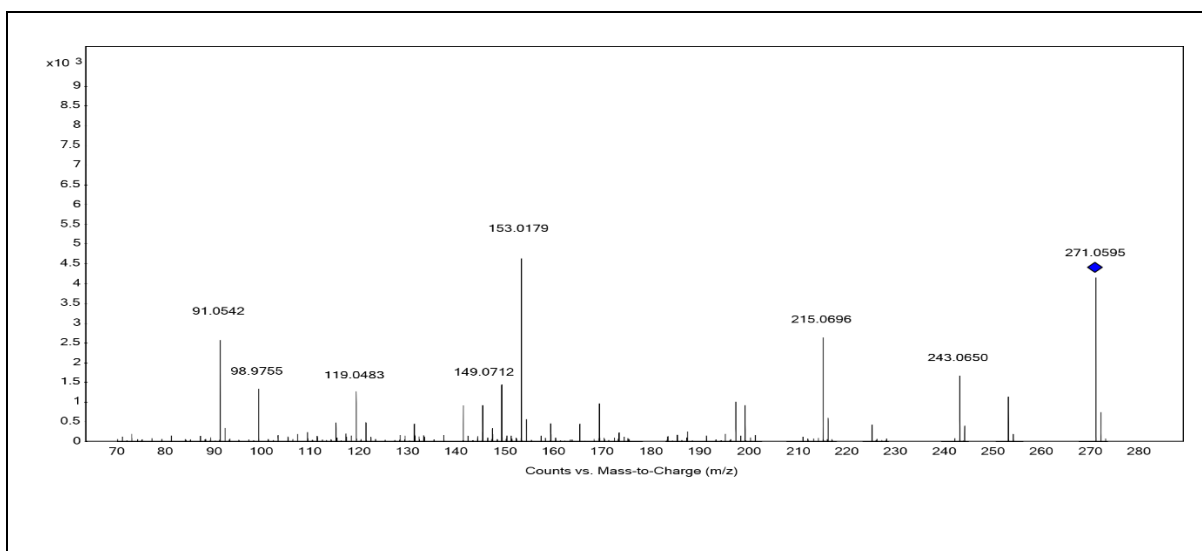


Espectro de massas de *Glycine max.* Obtido para pico presente no tempo de retenção de 2,2 min. O padrão de fragmentação é atribuído a molécula de gliciteína.

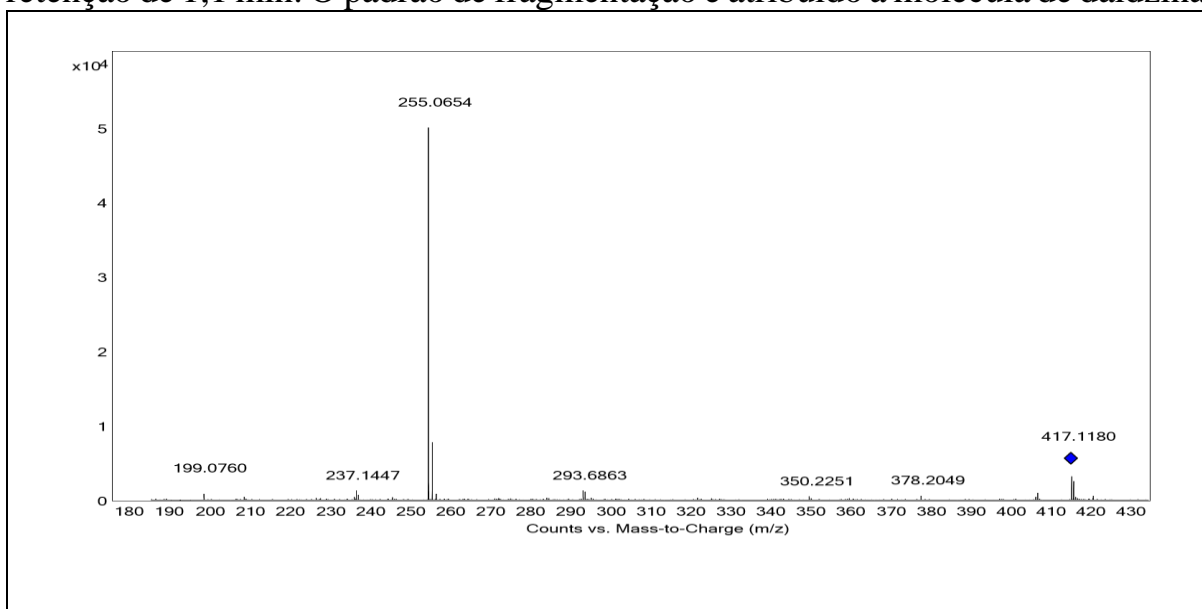




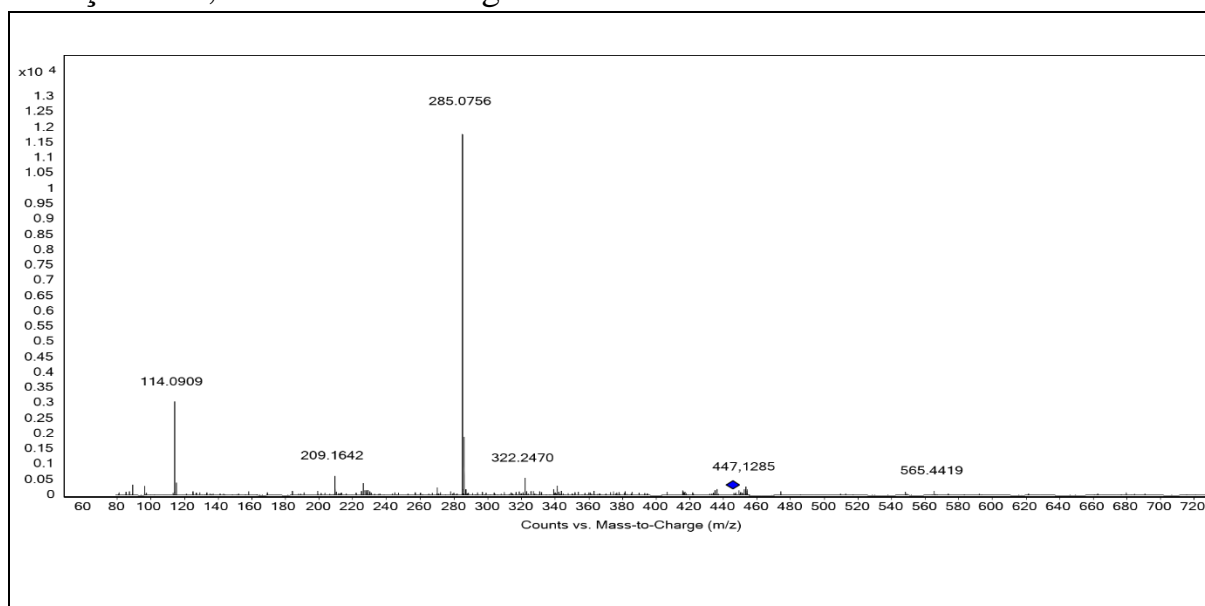
Espectro de massas de *Glycine max.* Obtido para pico presente no tempo de retenção de 3,5 min. O padrão de fragmentação é atribuído a molécula de genistina.



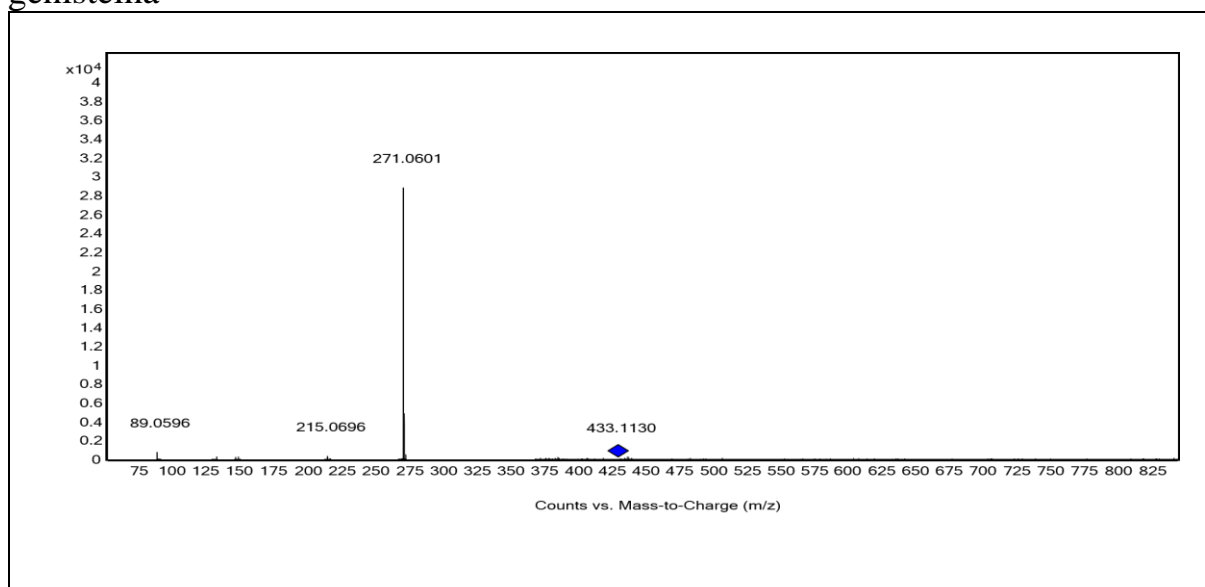
Espectro de massas de *Glycine max.* Obtido para pico presente no tempo de retenção de 1,1 min. O padrão de fragmentação é atribuído a molécula de daidzina.



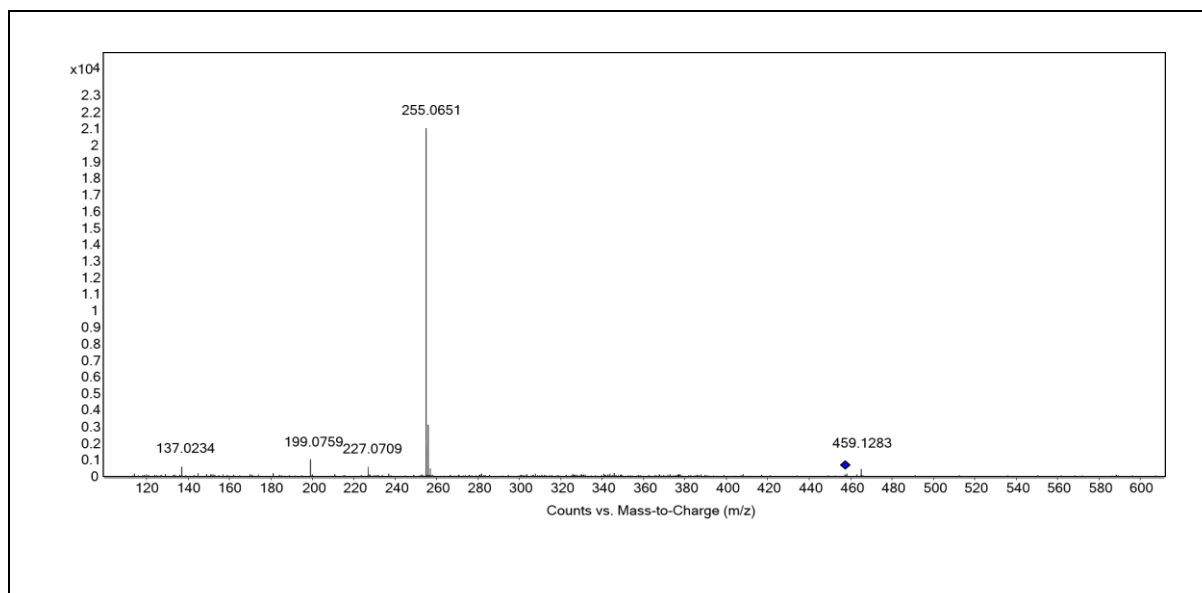
Espectro de massas de *Glycine max.* Obtido para pico presente no tempo de retenção de 1,7 min atribuído a glicitina.



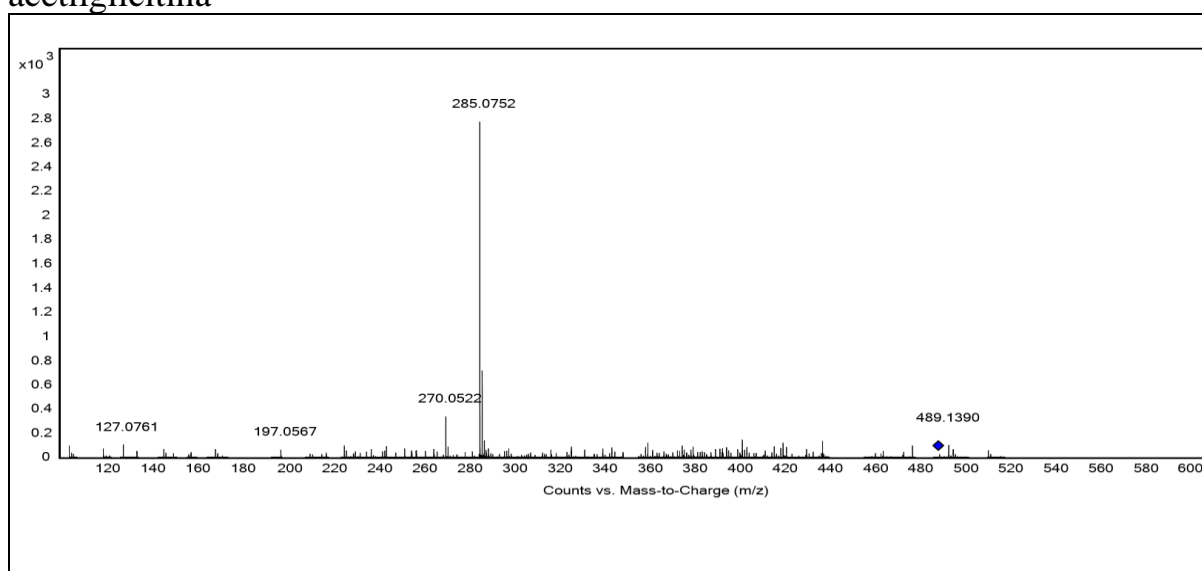
Espectro de massas de *Glycine max.* Obtido para pico presente no tempo de retenção de 1,2 min. O padrão de fragmentação é atribuído a molécula de genisteína



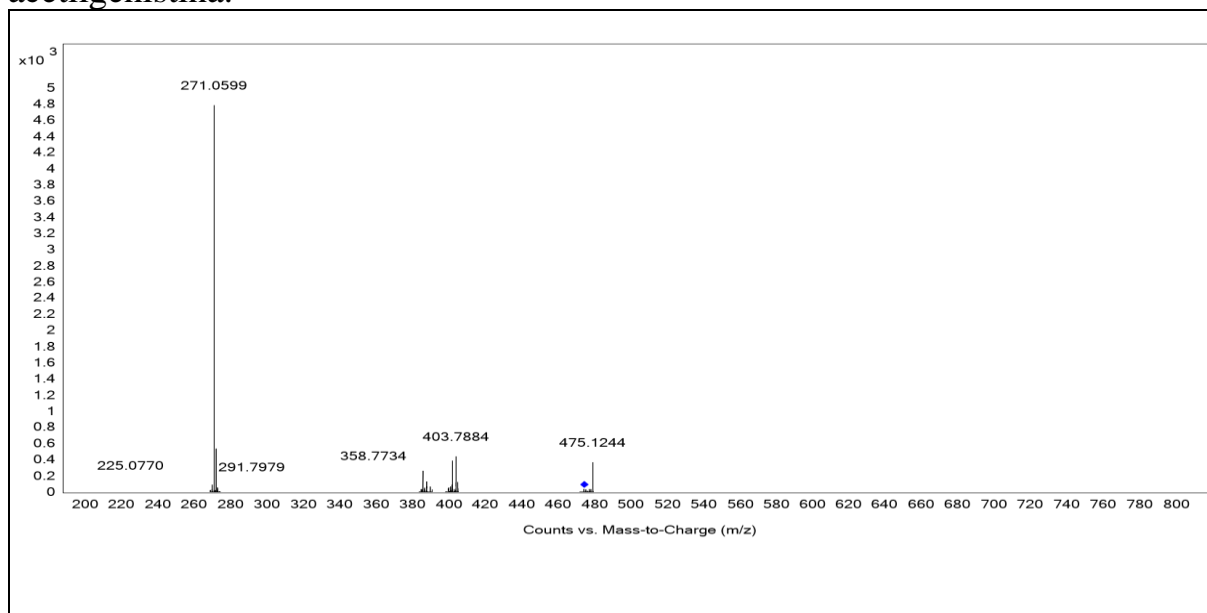
Espectro de massas de *Glycine max.* Obtido para pico presente no tempo de retenção de 1,3 min. O padrão de fragmentação é atribuído a molécula de acetildaidzeína.



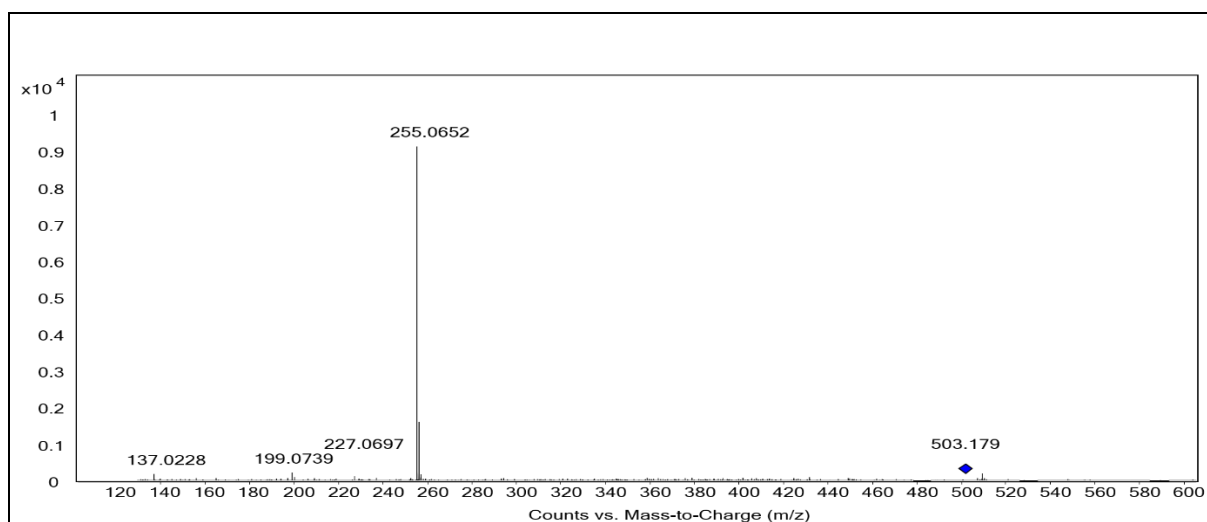
Espectro de massa de *Glycine max.* Obtido para pico presente no tempo de retenção de 1,4. O padrão de fragmentação é atribuído a molécula de acetilglicitina



Espectro de massas de *Glycine max.* Obtido para pico presente no tempo de retenção de 1,6. O padrão de fragmentação é atribuído a molécula de acetilgenistina.



Espectro de massas de *Glycine max.* Obtido para pico presente no tempo de retenção de 1,8. O padrão de fragmentação é atribuído a molécula de malonildaidzina.



Espectro de massas de *Glycine max.* Obtido para pico presente no tempo de retenção de 1,9 min. O padrão de fragmentação é atribuído a molécula de malonilgenistina.

