

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO COSMÉTICA DE
DERIVADOS BENZILADOS DA QUERCETINA

CAROLINA QUEIROZ VALENTIM

MANAUS
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

CAROLINA QUEIROZ VALENTIM

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO COSMÉTICA DE
DERIVADOS BENZILADOS DA QUERCETINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

MANAUS
2018

O conteúdo deste trabalho é confidencial e não poderá ser copiado.

**Os dados aqui obtidos serão submetidos a solicitação de proteção à
propriedade intelectual.**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

V155s Valentim, Carolina Queiroz
Síntese, caracterização e aplicação cosmética de derivados benzilados da quercetina / Carolina Queiroz Valentim. 2018
89 f.: il. color; 31 cm.

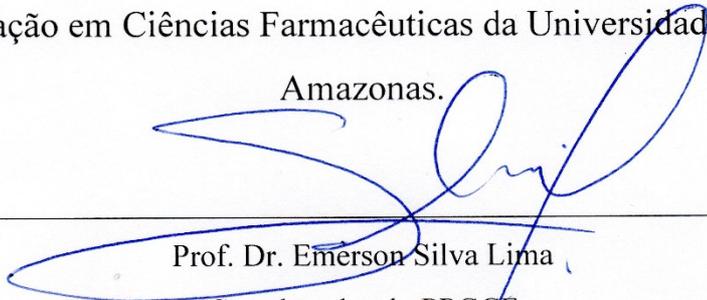
Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Quercetina. 2. Benzilação. 3. Pele. 4. Envelhecimento. 5. Cosméticos. I. Lima, Prof. Dr. Emerson Silva II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

“SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO COSMÉTICA DE
DERIVADOS BENZILADOS DA QUERCETINA”

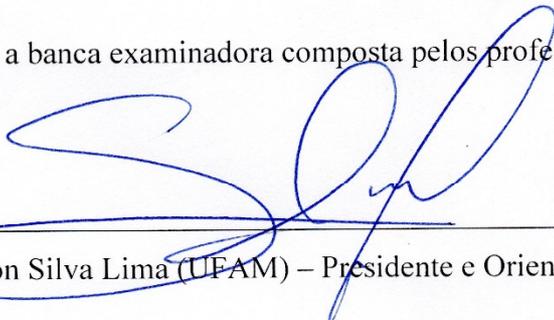
CAROLINA QUEIROZ VALENTIM

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Bioanálises e Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

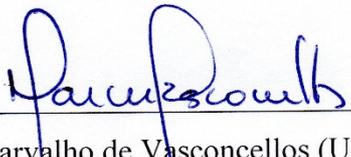


Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Coordenador do PPGCF

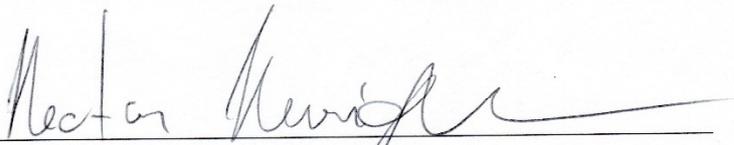
Apresenta perante a banca examinadora composta pelos professores:



Prof. Dr. Emerson Silva Lima (UFAM) – Presidente e Orientador



Prof. Dr. Marne Carvalho de Vasconcellos (UFAM) – Membro Interno



Prof. Dr. Héctor Henrique Ferreira Koolen (UEA) – Membro Externo

Manaus, 26 de março de 2018

*Dedico à Sagrada
Família, aos meus pais, à
minha irmã, aos meus
familiares e a todos
aqueles que estiveram ao
meu lado durante a
realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos derramas sobre a minha vida, uma delas a conclusão desse mestrado, pelo amor e pelo cuidado de sempre.

À minha Mãezinha do Céu, pela sua intercessão, amor e pelo colo dado durante os momentos difíceis.

Aos meus pais, Milton e Francisca, por todo apoio, amor, dedicação, abdicação, por sempre acreditarem nas minhas escolhas e pela educação que me deram.

À minha irmã, Fernanda, pela amizade, apoio e pela descontração nos momentos que precisei.

Aos meus familiares, pelo amor, companheirismo e por sempre estarem por perto para comemorar as minhas conquistas.

Ao Marco Aurélio, por ser um dos meus maiores incentivadores, por me amar e por ter me compreendido nos momentos mais estressantes durante essa conquista.

Aos meus amigos do Biophar, pelas inúmeras ajudas, risadas, conversas e por tornarem o ambiente de trabalho sempre agradável. Em especial, agradeço às minhas amigas maravilhosas que esse grupo me deu de presente: Leilane, Lorena, Kríscia, Márcia, Tallita, Ellen, Ângela, Bárbara, Camila, Taynara.

À Larissa Borges, por toda ajuda para a execução desse trabalho, você contribuiu grandemente para que tudo desse certo.

Aos amigos da graduação que sempre estiveram por perto: Rodrigo Silva, Maíra Henriques e Gutemberg Lopes.

À turma do Mestrado, pela alegria e companheirismo durante esses dois anos.

Ao meu orientador, professor Dr. Emerson Silva Lima, pelos ensinamentos, pela oportunidade e por me lapidar como aluna/pesquisadora. Você é uma grande inspiração e seu amor pela pesquisa é admirável.

Aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas que ministraram as disciplinas do mestrado, contribuindo imensamente para o crescimento de todos da turma.

À professora Dra. Fernanda Guilhon Simplício por ter cedido seu laboratório para realização da síntese.

À professora Dra. Ana Cristina por toda ajuda no desenvolvimento da síntese.

À Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas, em especial ao Dr. Felipe Moura e Msc. Bruna Ribeiro por toda ajuda e paciência.

Agradeço a Universidade Federal do Amazonas por proporcionar as instalações prediais para o desenvolvimento deste projeto.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que ajudaram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

O desenvolvimento de novas moléculas que possam prevenir os danos resultantes do envelhecimento cutâneo é de grande relevância para sociedade moderna, visto que a população busca cada vez mais por uma aparência física melhor. A quercetina possui muitas propriedades de interesse para aplicação cosmética que auxiliam nessa prevenção. Os cosméticos desenvolvidos atualmente buscam oferecer multiatividades. Entretanto, poucos estudos têm avaliado os efeitos da quercetina ou de derivados com esse propósito. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção de derivados da quercetina com diversas atividades para uso cosmético. Inicialmente, realizou-se uma síntese, por meio da reação de benzilação utilizando brometo de benzila. Então, foi realizado o isolamento por cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa, onde foram obtidos dois produtos da reação. Com a caracterização por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear foi possível a elucidação da estrutura química de dois derivados da quercetina, codificados como ACD32A e ACD32B. Por meio dos ensaios DPPH, ABTS e ensaios em cultura de células, verificou-se que os derivados não apresentaram atividade antioxidante. No ensaio de glicação *in vitro*, os derivados inibiram a formação de produtos finais de glicação avançada em colágeno pela via do glioxal, com CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) igual a $12,18 \pm 4,47$ (ACD32A) e $21,27 \pm 2,04$ (ACD32B). Os derivados não exibiram atividade inibitória sobre as enzimas elastase, hialuronidase e tirosinase. No ensaio de citotoxicidade, por método de Alamar Blue, as substâncias apresentaram baixa toxicidade aos fibroblastos humanos até a concentração de $200 \mu\text{g/mL}$. Na avaliação da capacidade proliferativa e de migração celular de fibroblastos humanos, os derivados demonstraram atividade superior àquela obtida pela quercetina. Na atividade inibitória sobre a collagenase, por método zimográfico, os derivados também exibiram inibição de metaloproteinases melhor que a quercetina. Por último, foi previsto *in silico* o coeficiente de partição e de permeabilidade cutânea da ACD32A e ACD32B pelo servidor SwissADME e foi verificado que os derivados exibiram um aumento desses coeficientes, quando comparados com a quercetina. O presente estudo pela primeira vez descreveu a obtenção de duas substâncias benziladas da quercetina com diversas propriedades a serem aplicadas em cosméticos. Futuros estudos serão necessários para explorar detalhadamente essas aplicações, assim como os mecanismos envolvidos nas atividades.

Palavras-chave: quercetina, benzilação, pele, envelhecimento, cosméticos.

ABSTRACT

The development of new molecules that can prevent damage resulting from skin aging is of great relevance for modern society as the population increasingly seeks a better physical appearance. Quercetin has many properties of interest for cosmetic application that aid in this prevention. The currently developed cosmetics seek to offer multiactivities. However, few studies have evaluated the effects of quercetin or derivatives for this purpose. Therefore, the present study had the objective of obtaining quercetin derivatives with various activities for cosmetic use. Initially, a synthesis was performed, by the substitution reaction between rutin and benzyl bromide (benzylation). After, the isolation was carried out by high performance liquid chromatography semipreparative, where two products of the reaction were obtained. By the characterization through mass spectrometry and nuclear magnetic resonance was possible the elucidation of the chemical structure of two quercetin derivatives, encoded as ACD32A and ACD32B. By DPPH, ABTS, and cell culture assays, the derivatives showed no antioxidant activity. In the *in vitro* glycation assay, the derivatives inhibited the formation of advanced glycation end products in collagen by the glyoxal pathway, with IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) of 12.18 ± 4.47 (ACD32A) and $21.27 \pm 2,04$ (ACD32B). The derivatives did not exhibit inhibitory activity against the enzymes elastase, hyaluronidase, and tyrosinase. In the cytotoxicity assay, by Alamar Blue method, the substances present low toxicity to human fibroblasts up to the concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$. In the evaluation of the proliferative capacity and cellular migration of human fibroblasts, the derivatives demonstrated higher activity than the obtained by quercetin. In the inhibitory activity against collagenase, by zimographic method, the derivatives also exhibited inhibition of metalloproteinases better than quercetin. Finally, the partition coefficient and cutaneous permeability of the ACD32A and ACD32B were predicted *in silico* by the SwissADME server and the derivatives exhibited an increase in these coefficients, when compared to quercetin. The present study described for the first time the obtention of two benzylated substances of quercetin with various properties to be applied in cosmetics. Future studies will be needed to explore these applications in detail, as well as the mechanisms involved in the activities.

Key words: quercetin, benzylation, skin, aging, cosmetics.

Lista de Siglas e Abreviaturas

% – porcentagem

± – mais ou menos

Δ – aquecimento

® – registered

°C – grau Celsius

1D – uma dimensão

2D – duas dimensões

AAPH - dihidroclorato de 2,2'-azobis(2metilpropionamida)

ABIHPEC - Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

Abs – absorvância

ABTS - 2,2'-azino-bis(ácido-etilbenzoato-6-sulfônico)

AGEs – produtos finais de glicação avançada

aq – aquoso

BCTA - hexadecyltrimethylammonium bromide

CAM – Centro de Apoio Multidisciplinar

CCD – cromatografia em camada delgada

cm – centímetros

CML – carboximetil-lisina

CoA – coenzima A

D.P.M – desvio padrão da média

DAD - detector de arranjo de diodos

DCFH-DA – 2,7-diclorofluoresceína-diacetato

dd – duplo duplete

DMEM – meio essencial mínimo de Dulbecco

DMF – dimetilformamida

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

DPPH – 2-difenil-1-picril-hidrazila

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

ESI – fonte de electrospray

et al – entre outros

FBS – soro fetal bovino

FCF – Faculdade de Ciências Farmacêuticas

g/mol – grama por mol

h – hora

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

Hz – hertz

J – constante de acoplamento escalar

M – molar

m – multiplete

m/z – razão massa sobre a carga

m² – metro quadrado

MEC – matriz extracelular

mg – miligrama

MHz – megahertz

min – minuto

mL – mililitros

mm – milímetros

mM – milimolar

mmol – milimol

MMPs – metaloproteinases de matriz

MRC-5 – linhagem de fibroblastos humanos

MS – espectrometria de massas

nm – nanômetro

PBS – tampão fosfato-salino

pH – potencial hidrogeniônico

ppm – partes por milhão

Redox – reações de oxirredução

RMN – ressonância magnética nuclear

s – simpleto

SDS - dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

TIMPs - inibidores teciduais de metaloproteinases

TMS – tetrametilsilano

™ – trademark

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

UV – ultravioleta

x – vezes

β - beta

δ – deslocamento químico

λ_{em} – comprimentos de onda de emissão

λ_{ex} – comprimentos de onda de excitação

μL – microlitros

μm – micrometros

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estrutura da pele humana composta por anexos cutâneos e por três camadas de tecidos: epiderme, derme e hipoderme..... | 22 |
| Figura 2. Estrutura da epiderme humana composta pelas camadas córnea, granulosa, espinhosa, basal e pelas células de Langerhans, células de Merkel e Melanócito..... | 23 |
| Figura 3. Diferença do colágeno normal que na pele jovem a camada superior da pele está íntegra e do colágeno glicado que na pele madura contribui para a formação de rugas..... | 33 |
| Figura 4. Formação dos AGEs pela via de Maillard, via poliólica e do estresse carbonílico... | 35 |
| Figura 5. Estrutura molecular dos AGEs carboximetil-lisina (CML), pirralina e pentosidina..... | 36 |
| Figura 6. Estrutura básica dos flavonóides e representantes de seus subgrupos: flavonas (apigenina e luteolina), flavonóis (quercetina e kaempferol), chalcona (floretilina e chalconaringenina), antocianinas (delfinidina e cianidina), flavanonas (naringenina e hesperetina) e isoflavonas (genisteína e daidzeína)..... | 38 |
| Figura 7. Estrutura química da quercetina..... | 41 |
| Figura 8. Fluxograma da síntese entre a rutina e o brometo de benzila para obtenção dos derivados..... | 47 |
| Figura 9. CCD da reação de substituição (MR) comparada com a rutina (RUT), a qual foi utilizada como produto de partida. O tempo de retenção da MR foi modificada, demonstrando a formação de produtos diferentes da rutina..... | 56 |
| Figura 10. Cromatogramas com tempos de retenção em 4,63 (ACD32A) e 8,42 (ACD32B) minutos..... | 57 |
| Figura 11. Espectros de absorção obtidos por HPLC-DAD dos derivados ACD32A (A) e ACD32B (B) na região do UV (200-400 nm)..... | 58 |
| Figura 12. Cromatogramas apresentados por HPLC semipreparativo para isolamento dos derivados ACD32A (A) e ACD32B (B)..... | 58 |
| Figura 13. Espectro de massas da amostra ACD32A com pico base de m/z 393..... | 59 |
| Figura 14. Espectro de NMR de ^1H (500 MHz, DMSO deuterado) da amostra ACD32A..... | 60 |
| Figura 15. Mapa de contorno HSQC (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, DMSO deuterado) da amostra ACD32A..... | 61 |
| Figura 16. Mapa de contorno HMBC (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, DMSO deuterado) da amostra ACD32A..... | 61 |
| Figura 17. Estrutura do derivado da quercetina (ACD32A) com substituição do grupamento hidroxila por uma benzila na posição 4'..... | 62 |
| Figura 18. Espectro de massas da amostra ACD32B com pico base de m/z 483..... | 63 |
| Figura 19. Espectro de NMR de ^1H (500 MHz, DMSO deuterado) da amostra ACD32B..... | 63 |

| | |
|---|----|
| Figura 20. Mapa de contorno HMBC (¹ H 500 MHz, ¹³ C 125 MHz, DMSO deuterado) da amostra ACD32B..... | 64 |
| Figura 21. Estrutura do derivado da quercetina (ACD32B) com substituição do grupamento hidroxila por uma benzila na posição 4' e 7..... | 65 |
| Figura 22. Inibição da glicação de colágeno com glioxal para a formação dos AGEs pela ACD32A, ACD32B, quercetina nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781 µg/mL. Dados são expressos como média ± desvio padrão (em relação ao padrão de rutina) analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. *p < 0,05..... | 68 |
| Figura 23. Avaliação da citotoxicidade dos derivados ACD32A, ACD32B, quercetina e rutina. As células testadas foram MRC-5 por 24, 48 e 72 horas. Dados expressos como média ± desvio padrão (em relação ao controle de DMSO) analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. *p < 0,05 e nenhuma significância (ns)..... | 71 |
| Figura 24. Avaliação da proliferação celular da ACD32A, ACD32B, quercetina, rutina e o padrão de vitamina C em células MRC-5. O gráfico indica a proliferação das células após incubação com amostras por 24, 48 e 72 h e a fotomicrografia mostra a proliferação no tempo de 48 h, conforme avaliado por coloração com azul de tripan. Dados expressos como média ± desvio padrão (em relação ao controle de DMSO) analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. *p < 0,05 e nenhuma significância (ns)..... | 73 |
| Figura 25. Avaliação da migração celular da ACD32A, ACD32B, quercetina, rutina e o padrão de vitamina c em células MRC-5. A fotomicrografia indica a migração das células para o fechamento de uma estria, mimetizando um dano tecidual, em uma monocamada de células após incubação com amostras por 24, 48 e 72 h..... | 75 |
| Figura 26. Avaliação dos efeitos da ACD32A, ACD32B, quercetina e rutina na inibição da atividade de collagenase de <i>Clostridium Hystoliticum</i> . A) A foto indica as bandas 1 e 2 de collagenase. B) Gráficos de inibição das bandas 1 e 2 de collagenase pelas amostras (12,5 µg/mL) após a coleta do sobrenadante das células MRC-5 nos tempos de 24, 48 e 72 h. A análise foi realizada utilizando o software ImageJ®. Dados são expressos como média ± desvio padrão (em relação ao controle DMSO) analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. *p < 0,05..... | 77 |

Lista de Quadro

| | |
|---|----|
| Quadro 1. Principais tipos e classes de colágenos e suas distribuições em diferentes tecidos..... | 27 |
| Quadro 2. Classificação das metaloproteinases de matriz de acordo com sua estrutura organizacional e substrato..... | 29 |
| Quadro 3. Produtos antiglicantes comercialmente disponíveis com princípio ativo natural.... | 37 |
| Quadro 4. Exemplos de diferentes flavonóides e suas atividades estudadas em relação ao envelhecimento da pele..... | 40 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Dados de NMR de ^1H e ^{13}C da amostra ACD32A..... | 61 |
| Tabela 2. Dados de NMR de ^1H e ^{13}C da amostra ACD32B..... | 64 |
| Tabela 3. Estudo da atividade antioxidante pelos ensaios de DPPH, ABTS e antioxidante celular. Todas as amostras encontram-se na concentração única de 100 $\mu\text{g/mL}$ e os dados expressos em porcentagem de inibição com desvio padrão..... | 66 |
| Tabela 4. Avaliação <i>in silico</i> do coeficiente de partição e permeação cutânea da ACD32A, ACD32B, quercetina e rutina por SwissADME..... | 78 |

Sumário

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 20 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA..... | 22 |
| 2.1 Pele..... | 22 |
| 2.1.1 Epiderme | 23 |
| 2.1.2 Derme | 25 |
| 2.1.3 Hipoderme..... | 27 |
| 2.2 Envelhecimento cutâneo | 27 |
| 2.2.1 Metaloproteinases de matriz | 28 |
| 2.2.2 Ácido Hialurônico..... | 30 |
| 2.2.3 Tirosinase | 31 |
| 2.2.4 Glicação | 32 |
| 2.3 Flavonóides para uso em cosméticos | 37 |
| 2.4 Quercetina | 41 |
| 3. OBJETIVOS..... | 43 |
| 3.1 Objetivo Geral..... | 43 |
| 3.2 Objetivos Específicos..... | 43 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 44 |
| 4.1 Materiais | 44 |
| 4.2 Análises cromatográficas | 44 |
| 4.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)..... | 44 |
| 4.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) | 44 |
| 4.3 Análises espectrométricas/espectroscópicas | 45 |
| 4.4 Análises de aplicação cosmética | 46 |
| 4.4.1 Leitor de ELISA..... | 46 |
| 4.4.2 Eletroforese | 46 |
| 4.5 Síntese e isolamento..... | 46 |
| 4.6 Ensaio para aplicação cosmética | 48 |
| 4.6.1 Atividade sequestrante do radical DPPH | 48 |
| 4.6.2 Ensaio de varredura do radical ABTS..... | 48 |
| 4.6.3 Atividade inibitória sobre a glicação de colágeno | 49 |
| 4.6.4 Inibição enzimática | 49 |
| 4.6.4.1 Tirosinase | 49 |
| 4.6.4.2 Elastase | 50 |
| 4.6.4.3 Hialuronidase..... | 51 |
| 4.7 Ensaio em cultura de células | 51 |
| 4.7.1 Citotoxicidade pelo ensaio do Alamar Blue | 52 |
| 4.7.2 Atividade Antioxidante Celular | 52 |
| 4.7.3 Avaliação sobre a proliferação celular..... | 53 |
| 4.7.4 Ensaio de migração <i>in vitro</i> | 54 |
| 4.7.5 Ensaio de inibição da collagenase por método zimográfico <i>in vitro</i> | 54 |
| 4.8 Previsão do coeficiente de partição e permeação cutânea por SwissADME..... | 55 |
| 4.9 Análises estatísticas..... | 55 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 56 |
| 5.1 Síntese..... | 56 |
| 5.2 Análises químicas dos produtos de síntese | 56 |
| 5.3 Determinação estrutural | 59 |
| 5.3.1 ACD32A | 59 |
| 5.3.2 ACD32B | 62 |

| | | |
|------|--|----|
| 5.4 | Atividade antioxidante | 65 |
| 5.5 | Atividade inibitória sobre a glicação de colágeno | 67 |
| 5.6 | Atividade inibitória sobre as enzimas elastase, hialuronidase e tirosinase | 69 |
| 5.7 | Citotoxicidade pelo ensaio do Alamar Blue..... | 70 |
| 5.8 | Avaliação sobre a proliferação celular | 72 |
| 5.9 | Ensaio de migração <i>in vitro</i> | 74 |
| 5.10 | Ensaio de inibição da collagenase por método zimográfico <i>in vitro</i> | 76 |
| 5.11 | Previsão do coeficiente de partição e permeação cutânea por SwissADME..... | 78 |
| 6 | CONCLUSÃO | 80 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 81 |

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento na expectativa de vida, acredita-se que o Brasil terá cerca de 65 milhões de idosos até o ano de 2050. Diante da chegada do envelhecimento nos últimos anos, a busca pelo cuidado com a aparência demonstra que a juventude está associada com a beleza (GAMBÔA, 2014; ZOUBOULIS e MAKRANTONAKI, 2011).

O envelhecimento resulta de dois processos distintos: intrínseco, geneticamente programado, e extrínseco, causado por um impacto ambiental externo. Apesar de ocorrer em todo o corpo, os sinais mais visíveis do envelhecimento são os da pele e a maior parte da mudança ocorre na derme, que é composta principalmente por uma densa matriz extracelular (MEC) (ALDAG *et al.*, 2016).

Na MEC o envelhecimento está associado não só ao espessamento das fibrilas de colágeno, como também à desorganização do teor total dessa proteína, devido à diminuição da síntese de colágeno tipo I e ao aumento da fragmentação de fibrila. Além disso, a degradação da MEC também está associada a níveis aumentados da atividade enzimática dérmica de collagenase, hialuronidase, elastase e tirosinase (ALDAG *et al.*, 2016; MAITY *et al.*, 2011).

As alterações da MEC associadas ao envelhecimento também foram atribuídas à glicação de açúcares circulantes com proteínas presentes na derme. Entre os açúcares e as proteínas ocorrem ligações que afetam diretamente a suavidade natural da pele, resultante da conhecida reação de Maillard (BOGDANOWICZ *et al.*, 2016).

A MEC possui influência em alguns processos celulares, como proliferação, migração e diferenciação. Em razão disso, e com o envelhecimento, a MEC também sofre modificações que influenciam na cicatrização de feridas. O colágeno tipo I participa de forma significativa desse processo. Sendo assim, uma diminuição do conteúdo dessa proteína na MEC pode levar a uma má cicatrização (KULAR *et al.*, 2014).

Em virtude do envelhecimento gradual e da preocupação da ciência em controlar o seu avanço, a busca por substâncias que consigam controlar os danos à pele é de grande importância. Neste contexto, os produtos naturais têm desempenhado grande papel no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, sendo alvos de modificações estruturais por exercerem efeitos potentes (HAHN *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2014; STONIK, 2009).

O laboratório Biophar investiga diversas atividades biológicas de muitas substâncias naturais e sintéticas. Recentemente, o grupo começou a explorar a modificação estrutural dessas substâncias na busca de moléculas mais ativas. Baseado nas diversas atividades farmacológicas já reportadas na literatura sobre os flavonóides, foi proposta a reação de substituição com brometo de benzila, já que se trata de uma síntese de fácil execução e baixo custo, a fim de potencializar a ação dos mesmos.

A reação de substituição entre a rutina e o brometo de benzila, foi uma das sínteses que apresentou compostos diferentes do produto de partida, resultando em dois derivados da quercetina. Dessa forma, a ACD32A e ACD32B, como foram denominados os produtos dessa reação, foram escolhidas como objeto do presente estudo.

Em razão disso, o presente trabalho propôs a síntese e caracterização de dois derivados da quercetina, com a finalidade de melhorar as atividades de aplicação cosmética da quercetina. Avaliaram-se os efeitos dos derivados sobre a atividade antioxidante, bem como a capacidade de inibir a tirosinase e, conseqüentemente, a melanogênese. Além disso, estudou-se a capacidade desses derivados de inibirem enzimas envolvidas no processo do envelhecimento, tais como a elastase, colagenase e hialuronidase. Avaliou-se também a capacidade de inibirem a reação de glicação de colágeno e a eficácia no estímulo da proliferação e migração celular. Por último, realizou-se um ensaio *in silico* para avaliar o coeficiente de partição e permeação cutânea dos derivados, a fim de ofertar ao mercado da beleza duas substâncias com propriedades cosméticas de grande interesse.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Pele

A pele é um órgão multifuncional e complexo, que é composto por diversos tecidos, diferentes tipos de células e outras estruturas especializadas (Figura 1). Divide-se, essencialmente, em três principais camadas de tecidos: uma camada superior – a epiderme; uma camada intermediária – a derme; e uma camada profunda – a hipoderme ou tecido celular subcutâneo com funções de suporte e de onde provêm os apêndices cutâneos, como os folículos pilosos e as glândulas sebáceas e sudoríparas (TORTORA, 2016).

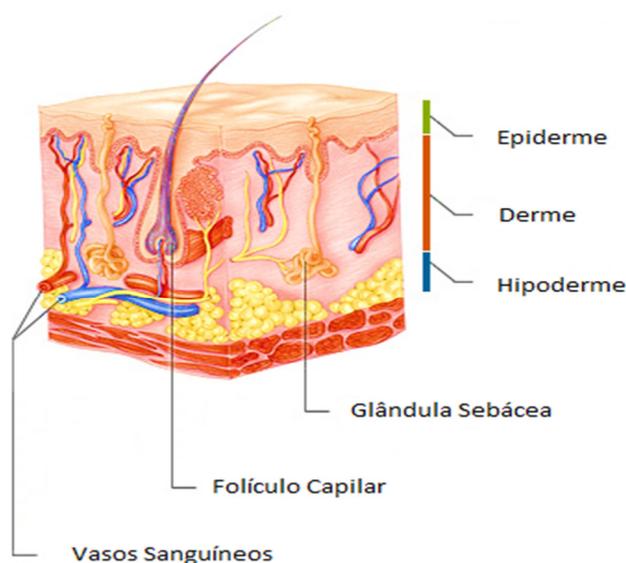


Figura 1. Estrutura da pele humana composta por anexos cutâneos e por três camadas de tecidos: epiderme, derme e hipoderme.

Fonte: adaptado de WebMD, 2016

A pele é o maior órgão presente no corpo humano. Desenvolve diversas funções, dentre elas, a proteção de agentes externos, impede a perda excessiva de água e fornece habilidades sensoriais. A área coberta pela pele é de aproximadamente 1-2 m² e recebe cerca de um terço do total da circulação sanguínea, tornando-se uma alternativa ideal para administração de agentes terapêuticos (N'DA, 2014).

2.1.1 Epiderme

A epiderme, por ser avascularizada, é totalmente dependente da camada de tecido subjacente, a derme. Essa camada garante à epiderme o fornecimento não só de nutrientes, como também a eliminação de resíduos, por difusão, através da junção dermoepidérmica. A epiderme é constituída por tecido epitelial escamoso estratificado, composto por quatro tipos de células: queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (MEDSCAPE, 2015).

Os queratinócitos estão sempre em estágios progressivos de diferenciação. Em decorrência disso, ocorrem alterações moleculares, estruturais e funcionais. Dispostos da superfície interna para a externa, os diferentes estratos estão organizados na seguinte ordem: camada basal, espinhosa, granulosa e córnea, respectivamente (Figura 2). Entretanto, nas regiões palmares e plantares há adição de mais uma camada, o estrato lúcido, localizado entre o estrato granuloso e o estrato córneo (LORENCINI *et al.*, 2014).

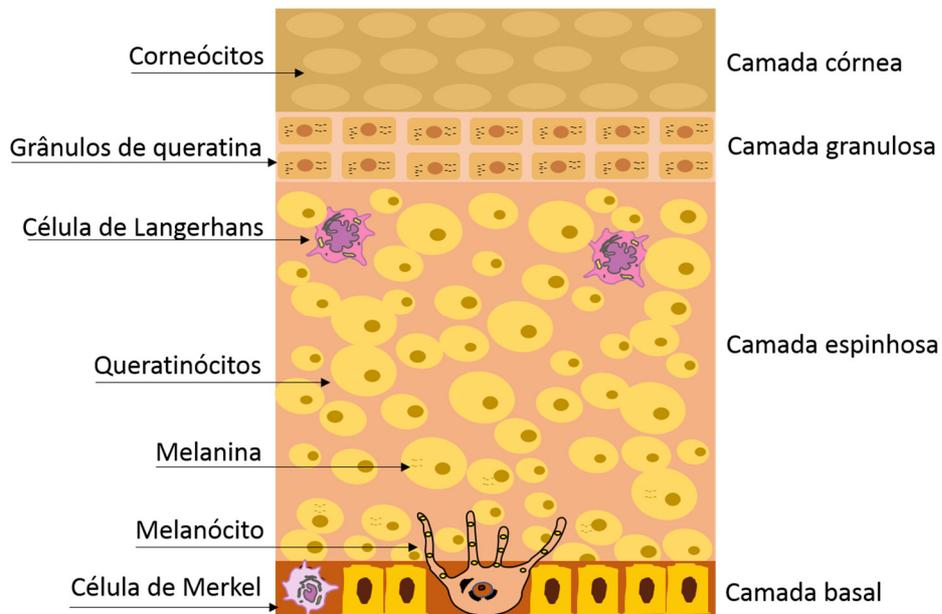


Figura 2. Estrutura da epiderme humana composta pelas camadas córnea, granulosa, espinhosa, basal e pelas células de Langerhans, células de Merkel e Melanócito.

A camada mais interna da epiderme, germinativa ou basal, está em contato com a junção dermoepidérmica. É composta por uma camada de células mitoticamente ativas, conhecidos por queratinócitos basais, responsáveis pela renovação da epiderme. Uma vez que esses queratinócitos deixam a camada basal, ocorre uma migração ascendente desses, podendo durar de 2 a 3 semanas. Após a saída da camada basal, as células iniciam o processo de diferenciação. Além dos queratinócitos, fazem parte desse estrato os melanócitos, que produzem um pigmento, a melanina, sendo esta responsável não só pela absorção dos raios ultravioleta (UV), como também pela coloração da pele e as células de Merkel, especializadas na percepção do toque (BRYANT e NIX, 2016; MEDSCAPE, 2015).

A camada espinhosa está localizada logo abaixo do estrato granuloso. Esta apresenta diversas camadas de células com espessura variada e são reconhecidas por uma estrutura característica desse estrato, os desmossomos, que fazem uma espécie de junção entre os queratinócitos. Esses queratinócitos nucleados provenientes da camada basal não se dividem, apenas produzem queratina. Na preparação para observação microscópica, as células geralmente encolhem e se separam umas das outras, exceto nos locais onde estão unidas pelos desmossomos, conferindo um aspecto espiculado, daí o nome de camada espinhosa. Esse estrato também exhibe células de Langerhans, envolvidas em processos imunológicos (ANDERSON, 2014; BRYANT e NIX, 2016; STANDRING, 2010).

A camada granulosa é formada por 3 a 4 camadas de células achatadas. Esse estrato granuloso é assim chamado devido à presença característica de grânulos querato-hialinos no interior dos queratinócitos, em razão do aumento do teor em queratina. Nesse estrato, essas células perdem o seu núcleo, apresentam um citoplasma, com a presença desses grânulos, e suas organelas degeneram-se (ANDERSON, 2014; STANDRING, 2010).

A camada mais externa da epiderme chama-se córnea. Nesse estrato, a MEC contém 75-80% de proteínas e 5-15% de lipídeos (ceramidas, ácidos graxos, triglicérides, ésteres de

colesterol e fosfolipídios). Além disso, encontram-se várias células, tais como melanócitos, células de Langerhans, de Merkel e os corneócitos. Os queratinócitos, quando adquirem o estado máximo de diferenciação, são chamados de corneócitos, que são células mortas, ricas em queratina e com aspeto escamoso. As células mais internas do estrato córneo (células córneas) continuam conectadas por desmossomos, e as células mais superficiais (células escamosas) perdem os desmossomos e se desprendem da pele, estando este estrato em constante descamação (ANTUNES, 2016; BIDAUX *et al.*, 2015; LORENCINI *et al.*, 2014; YOUNG e HEATH, 2001).

2.1.2 Derme

O tecido conjuntivo localizado abaixo da epiderme, conhecido como derme, é a camada mais espessa da pele e deriva da mesoderme embrionária. Esta região da pele é ricamente vascularizada que apoia nutricionalmente a pele e a sua termorregulação. A adesão da epiderme à derme ocorre pela projeção de pregas epidérmicas, enquanto a derme se projeta superiormente através de suas inúmeras papilas dérmicas. A interface entre essas camadas, conhecida como junção dermoepidérmica, é estabilizada por hemidesmossomos que fixam os queratinócitos à lâmina basal (ANDERSON, 2014; BRYANT e NIX, 2016; KIERSZENBAUM e TRES, 2012).

A derme é dividida em duas camadas não muito distintas: papilar e reticular. A derme papilar é a porção mais superficial e é constituída de tecido conjuntivo frouxo, com feixes delgados de fibras de colágeno tipo I. Nesta região da derme, há presença de capilares que vão realizar o fornecimento de nutrientes e oxigenação da epiderme avascular e contribuir na termorregulação do corpo. Já a derme reticular situa-se junto à hipoderme, ou seja, é a porção mais profunda e, ao contrário da papilar, apresenta um tecido conjuntivo denso, com

feixes espessos de fibras de colágeno tipo I (GARTNER e HIATT, 2012; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013; VAMPUTTE *et al.*, 2016).

A MEC presente no tecido conjuntivo é composta por líquido extracelular, substância fundamental, e fibras. A substância fundamental é um complexo viscoso, onde há a presença de macromoléculas (glicosaminoglicanas e proteoglicanas) e glicoproteínas multiadesivas (laminina, fibronectina, entre outras), que proporcionam resistência e força à matriz. Ainda tem a função de preencher os espaços entre as células e fibras do tecido conjuntivo (elásticas, reticulares e colágenas). Essas fibras colágenas e redes de fibras elásticas sustentam a derme e a une à hipoderme (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

Os fibroblastos são as células principais da derme. Os mesmos são responsáveis por sintetizar os componentes da MEC: colágeno, elastina, glicosaminoglicanas, proteoglicanas e glicoproteínas multiadesivas. O colágeno é uma proteína estrutural relevante encontrada na derme, pois formam as principais fibras do tecido conjuntivo denso, representando 70% do peso da derme. Nessa camada da pele, predomina-se colágeno tipo I (77% a 85%), sendo responsável pela formação de fibras juntamente com o colágeno tipo III (15% a 23%). Também estão presentes quantidades muito pequenas de colágeno tipo V e VI. No Quadro 1 estão representados os principais tipos de colágeno, suas classes e suas distribuições (BRYANT e NIX, 2016; MARIONNET *et al.*, 2015; MEDSCAPE, 2015).

Quadro 1. Principais tipos e classes de colágenos e suas distribuições em diferentes tecidos.

| Colágenos formadores de fibrilas | |
|---|--|
| Tipo I | Ossos, derme, tendão, ligamentos, córnea |
| Tipo II | Cartilagem, corpo vítreo, núcleo pulposo |
| Tipo III | Pele, parede vascular, fibras reticulares da maioria dos tecidos (pulmões, fígado, baço, etc.) |
| Tipo V | Pulmão, córnea, osso, membranas fetais; junto com o colágeno tipo I |
| Colágeno formador de rede | |
| Tipo IV | Membrana basal |
| Colágeno microfibrilar | |
| Tipo VI | Derme, cartilagem, placenta, pulmões, parede vascular, disco intervertebral |

Fonte: adaptado de GELSE *et al.*, 2003

2.1.3 Hipoderme

Também conhecido como tecido subcutâneo, a hipoderme é a continuação mais profunda da derme. A hipoderme proporciona não só a ligação da derme aos órgãos adjacentes, como também é responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas em que se apoia. Essa camada apresenta um tecido conjuntivo frouxo, com fibras elásticas e colágenas. As células que a constituem são os fibroblastos, os adipócitos e os macrófagos. Esses adipócitos atuam como um estoque de energia e proteção contra o frio. A quantidade de tecido adiposo em uma pessoa pode mudar de acordo com a idade, sexo e dieta (KIERSZENBAUM e TRES, 2012; VAMPUTTE *et al.*, 2016).

2.2 Envelhecimento cutâneo

Uma pele em condições adequadas apresenta boa textura superficial, cor e propriedades fisiológicas, tais como a elasticidade, suor, perfume e produção de sebo. Porém, alguns fatores podem afetar a sua aparência e funcionalidade, causando fotoenvelhecimento,

inflamação, redução da função imune, homeostase epidérmica desequilibrada, e outras doenças da pele (BOELSMA *et al.*, 2001).

O processo de envelhecimento desenvolve-se por todo o corpo. Entretanto, os sinais de envelhecimento dos órgãos internos são invisíveis aos nossos olhos, enquanto a pele demonstra facilmente os resultados ocorridos pela passagem do tempo. Esse processo biológico complexo é influenciado pela combinação de fatores endógenos e exógenos. O envelhecimento endógeno é um processo geneticamente determinado e afeta todas as áreas do corpo. Todavia, o envelhecimento extrínseco é ocasionado principalmente por fatores ambientais, entre esses o fotoenvelhecimento, resultante da exposição ao sol. Ambos os processos são acumulativos. Sendo assim, o fotoenvelhecimento é sobreposto ao envelhecimento intrínseco (DRAELOS, 2016; GANCEVICIENE *et al.*, 2012).

Como dito anteriormente, a MEC é responsável por garantir grande parte das propriedades mecânicas da derme. Com o passar do tempo, essas propriedades mecânicas passam por modificações, talvez como resultado direto das mudanças relacionadas à idade nas moléculas da MEC dérmica. Essas mudanças podem estar relacionadas às enzimas envolvidas na degradação da MEC, como metaloproteinases de matriz (MMPs), elastase, hialuronidase e tirosinase. Além disso, estudos demonstram que a glicação de colágeno também é responsável pela degradação da MEC (BOGDANOWICZ *et al.*, 2016; CARRINO *et al.*, 2003; LIMTRAKUL *et al.*, 2016; MAITY *et al.*, 2011).

2.2.1 Metaloproteinases de matriz

As MMPs compreendem um amplo grupo de endopeptidases zinco-dependentes que são responsáveis por degradar as fibras de colágeno e outros componentes da MEC. A partir de sua estrutura e especificidade do substrato, podem ser divididas em cinco subgrupos

principais: colagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinases e MMP de membrana do tipo I (Quadro 2) (PITTAYAPRUEK *et al.*, 2016; QUAN *et al.*, 2009).

Quadro 2. Classificação das metaloproteínas de matriz de acordo com sua estrutura organizacional e substrato

| Classificação | Metaloproteínase | Substrato/Função |
|----------------------------------|-------------------------|---|
| Colagenases | MMP - 1 | Capazes de clivar preferencialmente colágeno fibrilar (tipos I, II, III, VII, VIII, X) |
| | MMP - 8 | |
| | MMP - 13 | |
| Gelatinases | MMP - 2 | Capazes de processar enzimaticamente vários substratos da MEC, tais como colágeno I e IV |
| | MMP - 9 | |
| Estromelisinases | MMP - 3 | Capazes de hidrolisar o colágeno IV, mas não clivam colágeno I |
| | MMP - 10 | |
| | MMP - 11 | |
| Matrilisinases | MMP - 7 | Capazes de processar colágeno IV, mas não colágeno I |
| | MMP - 26 | |
| MMP de Membrana do tipo I | MMP - 14 | Contêm na posição C-terminal um domínio adicional, representado por uma região intermembranar, completado por uma pequena cauda citoplasmática. Apenas MMP-14 e MMP-16 são capazes de clivar colágeno I |
| | MMP - 15 | |
| | MMP - 16 | |
| | MMP - 17 | |
| | MMP - 24 | |
| | MMP - 25 | |
| Metaloelastase | MMP - 12 | Degrada elastase |

Fonte: PEDROSA, 2013

Diferentes tipos de células na pele são responsáveis pela produção de MMPs, tais como fibroblastos, queratinócitos, macrófagos, células endoteliais, mastócitos e eosinófilos. É de grande importância manter o equilíbrio entre a produção e atividade dessas MMPs com seus inibidores teciduais de metaloproteínases (TIMPs), a fim de manter a integridade tecidual. Como as MMPs exercem papéis importantes em uma variedade de processos biológicos, deve-se manter o controle da regulação de suas atividades. Caso contrário, o desequilíbrio de sua atividade e expressão pode afetar o fotoenvelhecimento, a cicatrização de

feridas, o crescimento e remodelamento esquelético, artrite, inflamação, angiogênese e o câncer (GOMES, 2014; PITTAYAPRUEK *et al.*, 2016; STANIFORTH *et al.*, 2012)

Diante do seu envolvimento em diversas fisiopatologias, o desenvolvimento de inibidores de MMPs são de grande interesse devido o seu potencial terapêutico (ZHANG e KIM, 2009).

Um estudo realizado por SIN e KIM (2005) demonstrou que flavonóides inibiram a atividade da colagenase. KIM e colaboradores (2012) realizaram um estudo do efeito do composto chito-oligossacarídeo que promoveu o aumento da síntese de colágeno e uma diminuição na expressão de MMPs degradantes de colágeno em fibroblastos dérmicos humanos.

2.2.2 Ácido Hialurônico

Uma das causas do envelhecimento da pele está associada à perda de umidade da pele. O ácido hialurônico é um glicosaminoglicano que está presente na MEC, sendo uma molécula chave envolvida na umidade da pele, já que possui uma capacidade única para ligar e reter moléculas de água (PAPAKONSTANTINO *et al.*, 2012).

O ácido hialurônico possui alta massa molecular e uma estrutura linear composta por repetições de unidades de ácido dissacarídeo de *N-acetil-d*-glucosamina e *d*-glucurônico. Os fibroblastos são as células responsáveis pela síntese do ácido hialurônico, tendo uma taxa de produção 10 vezes maior do que os queratinócitos que também o sintetiza. As suas funções incluem hidratação da pele, lubrificação das juntas e capacidade de preenchimento do espaço entre as células. Além disso, é um ambiente útil para a migração de células da MEC, sua síntese está aumentada durante a lesão de tecidos e cicatrização de feridas, regulando vários aspectos da reparação tecidual (LEE *et al.*, 2016; PAPAKONSTANTINO *et al.*, 2012).

Tendo uma taxa de rotatividade dinâmica, o ácido hialurônico tem uma meia-vida de 3 a 5 minutos no sangue, menos de um dia na pele e 1 a 3 semanas na cartilagem. Para isso, ele é degradado em fragmentos de tamanho variável por hialuronidases através da hidrolização das ligações β (1-4) hexossaminídicas entre os resíduos de ácido N-acetil-D-glucosamina e D-glucurônico. Em estudos anteriores, relatou-se que a exposição repetida à radiação UV acelera a síntese dessa enzima, diminuindo a capacidade da pele para manter a sua hidratação, o que implica no seu enrugamento. Os inibidores dessa enzima são de grande relevância em cosméticos e medicamentos para proteger a pele contra o envelhecimento, por isso a necessidade da pesquisa de novas substâncias (MAITY *et al.*, 2011; PAPAKONSTANTINO *et al.*, 2012; TU e TAWATA, 2015).

TU e TAWATA (2015) realizaram um estudo com óleo essencial de *tairin*, obtida das folhas de *Alpinia zerumbet*, que apresentou forte atividade antienvelhecimento inibindo colagenase, tirosinase, hialuronidase e elastase. MCCOOK e colaboradores (2015) avaliaram a atividade do complexo de clorofilina de cobre de sódio, um composto semissintético, que apresentou atividade inibidora de hialuronidase, podendo aumentar o nível de ácido hialurônico da MEC dérmica para a melhoria da aparência do envelhecimento da pele facial.

2.2.3 Tirosinase

A hiperpigmentação causa envelhecimento da pele humana e ocorre como resultado de fatores internos e externos, incluindo os relacionados a hormônios, exposição aos raios UV, drogas e a presença de vários produtos químicos. A tirosinase é uma enzima dependente de cobre que está envolvida no controle da produção da melanina, que é produzida através do processo de melanogênese. Esse processo ocorre dentro de organelas intracelulares específicas nos melanócitos, os chamados melanossomas. Essa enzima, que está envolvida em duas etapas da síntese da melanina, catalisa a hidroxilação de L-tirosina para L-DOPA e

oxidação adicional de L-DOPA para dopaquinona. Portanto, a inibição da atividade da tirosinase tende a induzir clareamento da pele devido a uma redução da síntese de melanina (EBANKS *et al.*, 2009; LIMTRAKUL *et al.*, 2016).

A tirosinase tem um papel significativo na melanogênese. Em razão disso, novos inibidores da enzima são sempre pesquisados para tratar a pigmentação anormal da pele. Ao longo desses anos, vários inibidores da tirosinase, dentre eles os compostos fenólicos, têm sido estudados. Em consequência dessas grandes quantidades de pesquisas realizadas, houve a descoberta de diversos tipos de inibidores, como a arbutina, ácido kójico e hidroquinona. No entanto, devido a baixa estabilidade, atividade insuficiente, efeitos secundários, toxicidade elevada e capacidade de penetração insuficiente, a utilização de agentes disponíveis no mercado é bastante limitada (PEDROSA, 2013).

2.2.4 Glicação

O escurecimento não enzimático que ocorre durante o armazenamento e processamento dos alimentos, foi inicialmente investigado pelo químico Louis Camille Maillard. Esse processo também ocorre *in vivo* e é chamado de glicação proteica. No organismo, a reação ocorre de forma mais lenta e costuma afetar proteínas de vida longa, como o colágeno, onde os produtos finais de glicação avançada (AGEs) formados acumulam-se ao longo da vida. A formação dos AGEs está associada não só ao processo de envelhecimento, mas também à diabetes mellitus, doença de Alzheimer e insuficiência renal (BARBOSA *et al.*, 2016; SASAKI *et al.*, 1998; SCHMID *et al.*, 2002; WAUTIER e GUILLAUSSEAU, 2001).

Como dito anteriormente, o colágeno é responsável pela manutenção da integridade de tecidos e células em função de suas propriedades mecânicas. A glicação do colágeno provoca ligações cruzadas intermoleculares, resultando no aumento da rigidez e redução da

flexibilidade da pele (Figura 3). Em razão disso, a cicatrização de feridas, possivelmente, é afetada por essa mudança na estrutura do colágeno, já que essa proteína contribui significativamente no reparo de feridas. A formação desses AGEs também poderá levar à modificação da interação entre colágeno e outras moléculas, como proteoglicanos, enzimas como, por exemplo, a colagenase, e integrinas celulares. Além disso, a modificação torna o colágeno mais resistente à degradação por MMPs, provocando o acúmulo dessa proteína modificada com AGEs na MEC durante o envelhecimento (GKOGKOLOU e BÖHM, 2012; PUTTE *et al.*, 2016; SNEDEKER e GAUTIERI, 2014).

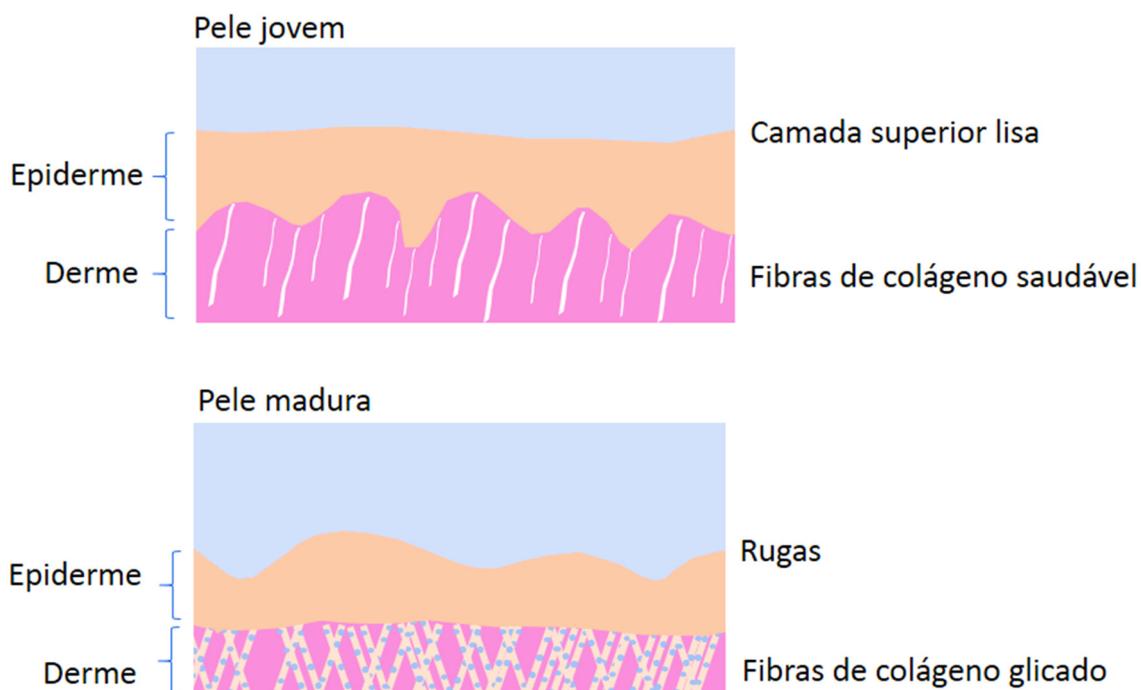


Figura 3. Diferença do colágeno normal que na pele jovem a camada superior da pele está íntegra e do colágeno glicado que na pele madura contribui para a formação de rugas.

Para a formação dos AGEs ocorre uma reação chamada de glicação. Nesse processo, ocorre a formação da base de Schiff, composto instável, gerado pela condensação de grupamento carbonila, de um açúcar redutor, com um grupamento amina, presente em proteína, lipídeo ou ácido nucléico. Essa base de Schiff sofre rearranjos, dando origem a produtos de estrutura mais estável, os produtos de Amadori. As bases de Schiff e os produtos

Amadori são reações reversíveis. Os grupos carbonilas reativos presentes nos produtos de Amadori, condensam-se irreversivelmente com os grupos aminas dando origem aos AGEs (GKOGKOLOU e BÖHM, 2012; MONARO, 2012).

Entretanto, a formação desses produtos não se dá apenas pela via supracitada, outros caminhos também podem levar a formação dos AGEs. Conhecida por via do “estresse carbonílico”, a formação dos AGEs ocorre pela auto-oxidação de glicose e a peroxidação de lipídeos, devido ao aumento do estresse oxidativo, gerando compostos dicarbonílicos intermediários altamente reativos. Esses compostos conhecidos como α -oxaldeídos (glioxal, metilglioxal e 3-desoxiglucosona) formam AGEs pela interação com aminoácidos (CONTRERAS e NOVAKOFSKI, 2010).

Outro mecanismo citado na literatura que contribui para a formação dos AGEs é a via poliólica. Essa via, baseia-se numa família de enzimas aldo-ceto-redutase que podem utilizar como substratos uma grande variedade de compostos carbonilas e reduzir estes aos seus respectivos álcoois de açúcar. Nessa via a glicose é convertida em sorbitol pela enzima aldose redutase e depois em frutose pela ação da sorbitol desidrogenase. A frutose-3-fosfato, um metabólito da frutose, converte-se em α -oxaldeídos e interagem com aminoácidos para formarem AGEs. Sendo assim, há três rotas que levam a formação dos AGEs: reação de Maillard, oxidação de glicose e peroxidação de lipídeos e via poliólica (Figura 4) (CONTRERAS e NOVAKOFSKI, 2010).

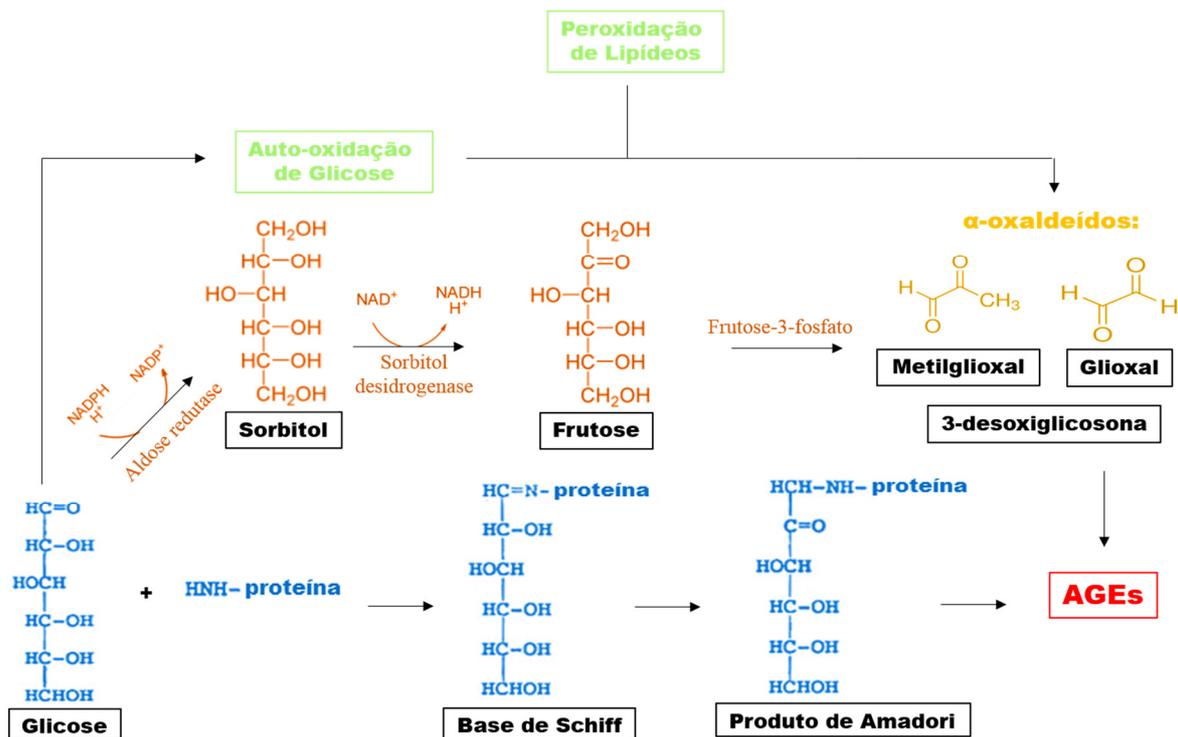


Figura 4. Formação dos AGEs pela via de Maillard, via poliólica e do estresse carbonílico.

Em virtude dos AGEs serem um grupo complexo e heterogêneo de proteínas, somente alguns AGEs foram claramente identificados: carboximetil-lisina (CML), pentosidina e pirralina (Figura 5). Quando falamos de produtos finais em alimentos, uma característica que identifica a maioria deles é a formação de cor, sendo possível mensurar a absorvância, transmissão ou reflectância da luz na região visível. Entretanto, *in vivo*, essa formação da cor não é relevante, sendo possível detectar a formação dos AGEs através da medição de fluorescência, já que muitos desses produtos finais, dentre eles a pentosidina e a pirralina são fluorescentes. Essa característica de fluorescência está associada com a presença de anéis aromáticos na estrutura dos AGEs (BARBOSA *et al.*, 2016; GOMES, 2011; SINGH *et al.*, 2001).

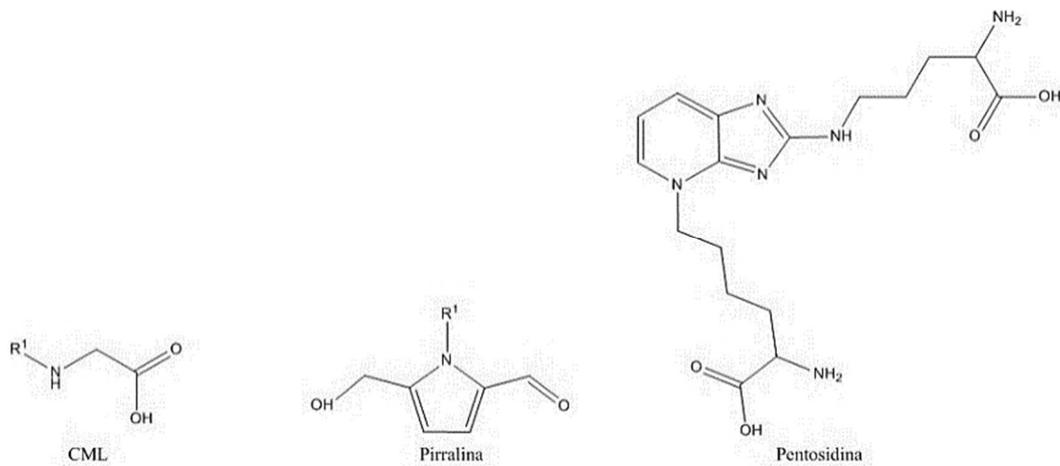


Figura 5. Estrutura molecular dos AGEs carboximetil-lisina (CML), pirralina e pentosidina.

Para controlar os níveis dos AGEs, muitas células desenvolveram mecanismos de desintoxicação contra o acúmulo dos mesmos. O sistema de glicoxalase dependente de glutationa, consistindo em glicoxalase I e II, é responsável pela conversão de α -oxaldeídos, como o metilglicoxal e glicoxal, em produtos menos tóxicos. Além desse, existem outros sistemas enzimáticos, a frutosamina-3-quinase e a frutosamina oxidase, que são também responsáveis pela interrupção de reações de glicação em diferentes estágios. Entretanto, sob condições de excesso de AGEs, como no diabetes, hiperlipidemia, insuficiência renal e em indivíduos que consomem dieta com alto conteúdo de AGEs, esses sistemas não são suficientes para diminuir esse acúmulo no organismo (BARBOSA *et al.*, 2008; GKOGKOLOU e BÖHM, 2012).

As consequências da acumulação dos AGEs levam ao interesse na pesquisa de se buscar alternativas que melhore a aparência e função da pele com o envelhecimento. Devido ao envolvimento de oxidantes e metais na formação dos AGEs, a busca por nutrientes antioxidantes e quelantes é de interesse crescente. Dessa forma, muitos estudos estão à procura de nutrientes e vitaminas, os chamados "suplementos nutritivos", como ferramentas naturais contra AGEs (GKOGKOLOU e BÖHM, 2012; OTT *et al.*, 2014).

Em um estudo, a piridoxamina causou uma diminuição significativa do AGE, carboximetil-lisina, reticulação e fluorescência no colágeno da pele de ratos diabéticos. Além dessa substância, o chá verde e as vitaminas C e E demonstraram retardar a reticulação do colágeno em camundongos adultos. O chá verde também foi capaz de evitar a ascensão de marcadores fluorescentes de envelhecimento no colágeno. Outro tratamento com oxerutina e a combinação de N-acetil-cisteína e taurina resultaram numa redução do acúmulo de fluorescência ligada ao colágeno na pele (DEGENHARDT *et al.*, 2002; ODETTI *et al.*, 2003; RUTTER, *et al.*, 2003).

Alguns produtos, que utilizam substâncias naturais, já estão disponíveis no mercado com ação antiglicante (Quadro 3):

Quadro 3. Produtos antiglicantes comercialmente disponíveis com princípio ativo natural.

| Linha | Marca | Princípio ativo |
|--------------------------------------|-----------------|------------------------|
| Chronos Sérum Intensivo Pró-firmeza® | Natura™ | Concentrado de jatobá |
| A.G.E Interrupter® | SkinCeuticals™ | Extrato de blueberry |
| Retexturing Activator® | SkinCeuticals™ | Extrato de kombucha |
| Derm AOX® | La Roche-Posay™ | Carnosina |
| Derma Clássico® | Dermatus™ | Carnosina |

2.3 Flavonóides para uso em cosméticos

Os flavonóides pertencem a uma classe de metabólitos secundários de plantas com estrutura polifenólica, amplamente encontrada em frutas, vegetais e certas bebidas. O núcleo fundamental dos flavonóides é constituído por 15 átomos de carbono que são distribuídos em três anéis A, C e B do tipo C6-C3-C6, respectivamente. Possuem vários subgrupos, que incluem isoflavonas, antocianinas, chalconas, flavonas, flavonóis e flavanonas (Figura 6). Estes compostos podem ocorrer na forma de aglicona e glicosídeo. A variabilidade estrutural entre estes compostos está no comportamento dos anéis das agliconas, em relação ao seu

estado de oxidação/redução, seu padrão e posição dos radicais hidroxila, e nas diferenças entre os substituintes dos grupamentos hidroxila (PANCHE *et al.*, 2016; ZUANAZZI *et al.*, 2011).

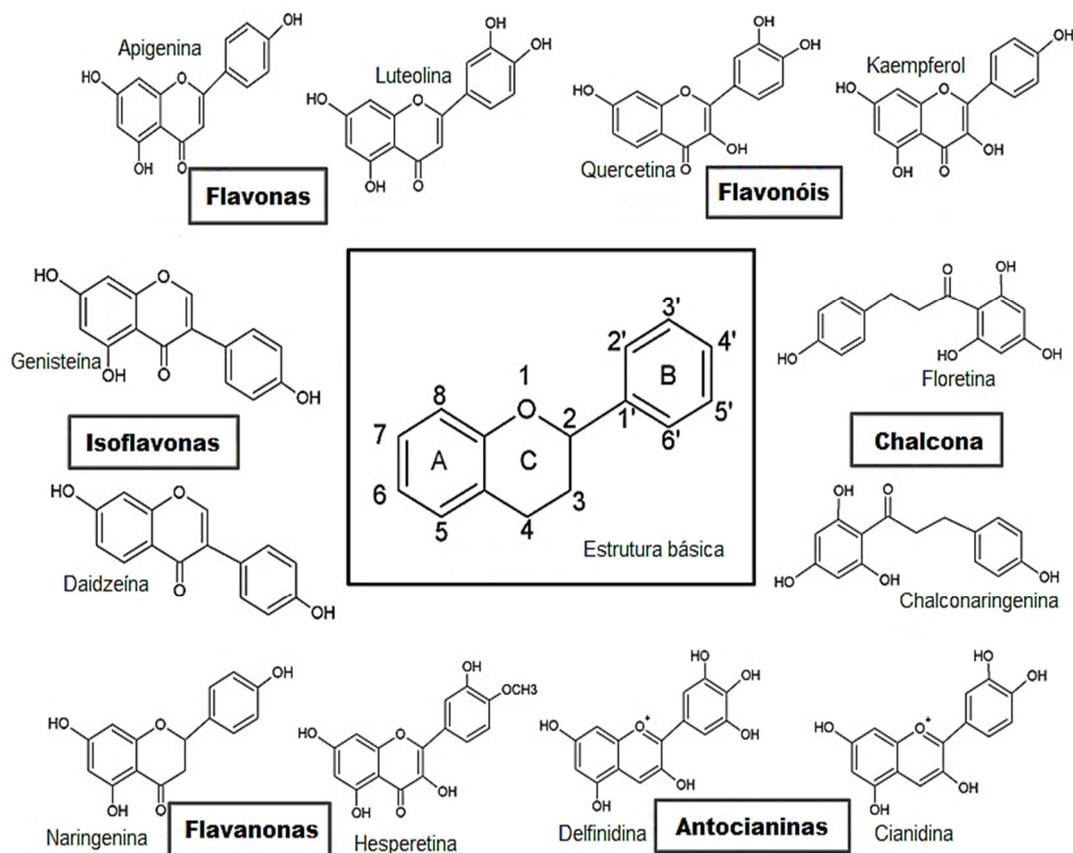


Figura 6. Estrutura básica dos flavonóides e representantes de seus subgrupos: flavonas (apigenina e luteolina), flavonóis (quercetina e kaempferol), chalcona (floreína e chalconaringenina), antocianinas (delfinidina e cianidina), flavanonas (naringenina e hesperetina) e isoflavonas (genisteína e daidzeína).

Fonte: adaptado de PANCHE *et al.*, 2016

A biossíntese dos flavonóides ocorre a partir das vias acetato e chiquimato. Resumidamente, ocorre uma condensação das rotas do ácido chiquímico e acetil-CoA, onde, respectivamente, há uma conjugação entre a molécula de 4-cumaril-CoA com três moléculas de malonil-CoA, originando a chalcona, principal composto intermediário da via de biossíntese dos flavonóides subsequentes (DEWICK, 2002; ORTMANN, 2013).

A pesquisa sobre os flavonóides tem crescido significativamente, em razão de seus benefícios versáteis para a saúde relatados em vários estudos epidemiológicos. O interesse recente nessas substâncias foi estimulado pela sua grande atividade antioxidante. Além disso,

estudos relatam suas atividades, como agentes antimicrobianos, hepatoprotetores, anti-inflamatórios, anticancerígenos, antivirais, seus efeitos protetores contra doenças cardiovasculares e outras doenças relacionadas à idade (KUMAR e PANDEY, 2013).

Os flavonóides representam um grande grupo de compostos de baixo peso molecular. Sua estrutura química permite reduzir o estresse oxidativo de algumas formas: inibindo a formação de radicais livres, interrompendo as reações em cadeia da auto-oxidação, regulando e protegendo mecanismos de defesa de antioxidantes celulares, neutralizando a ação de íons pró-oxidantes metálicos, inibindo a ação de enzimas pró-oxidativas e aumentando as atividades de outros antioxidantes (SOTO *et al.*, 2015).

Como falado anteriormente, envelhecimento da pele é uma deterioração complexa e progressiva causada por fatores intrínsecos e extrínsecos. A pele é o maior órgão do corpo e a sua capacidade de autorreparo com idade avançada é limitada. Isso ocorre em resposta ao desgaste dos telômeros, exaustão hormonal, estresse oxidativo, eventos genéticos e exposição à radiação ultravioleta, instabilidade genômica e mutações epigenéticas. A formação de radicais livres, que pode reagir com DNA, proteínas e ácidos graxos, pode causar danos oxidativos e é um mecanismo amplamente aceito por causar o envelhecimento da pele. Em decorrência disso, muitos problemas acabam comprometendo a integridade da pele, como enrugamentos, fotoenvelhecimento, elastose, desidratação, rugosidade, aparência de linhas finas, falta de elasticidade e hiperpigmentação (SOTO *et al.*, 2015).

Como a pele está sujeita a muitos danos, uma característica desejável dos cosméticos desenvolvidos atualmente é que eles apresentem multiatividades que permitam efeitos complexos multidirecionais, ainda que em formulações relativamente simples. As indústrias cosméticas estão em constante busca por substâncias, sendo compreensível que estas deem mais atenção aos produtos multiativos, que atuem em diferentes sistemas de receptores e que forneçam efeitos de cuidados complexos como resultado dessa ação. Tais substâncias podem

ser encontradas em muitas matérias-primas naturais, especialmente de origem vegetal. Apesar de suas propriedades multiativas, os flavonóides estão longe de serem totalmente utilizados (ARCT e PYTKOWSKA, 2008).

Em virtude do envelhecimento gradual e da preocupação da ciência em controlar o seu avanço, a busca por substâncias que consigam controlar esses danos causados pela idade é de grande importância. Segundo o setor que representa a beleza, Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), as vendas de cosméticos e similares no Brasil foi de R\$ 102,2 bilhões em 2016 e a estimativa é que chegue a R\$ 115 bilhões em 2020. Os cosméticos antienvhecimento estão crescendo rapidamente no mercado e podem potencialmente beneficiar o tratamento de rugas, elasticidade, densidade dérmica e tom de pele (ABIHPEC, 2017; HAHN *et al.*, 2016).

Diante disso, as atividades antienvhecimento dos flavonóides estão sendo amplamente estudadas (Quadro 4):

Quadro 4. Exemplos de diferentes flavonóides e suas atividades estudadas em relação ao envelhecimento da pele

| Flavonóides | Atividade | Referências |
|--|--|---|
| Artocarpanona | Inibição de tirosinase | NGUYEN <i>et al.</i> , 2016 |
| Rutina, kaempferol, quercetina e miricetina | Inibição de hialuronidase | LEE e KIM, 2010 |
| Apigenina, luteolina, a baicalina e baicaleína | Inibição de colagenase | LEE e KIM, 2010 |
| Galangina, kaempferol, quercetina e miricetina | Inibição de elastase | KANASHIRO <i>et al.</i> , 2007 |
| Quercetina | Antiglicante de colágeno/ Antioxidante | CERVANTES-LAUREAN <i>et al.</i> , 2006 / ZHENG <i>et al.</i> , 2017 |
| Rutina | Antiglicante de colágeno | CERVANTES-LAUREAN <i>et al.</i> , 2006 |
| Apigenina | Síntese de colágeno | ZHANG <i>et al.</i> , 2015 |

2.4 Quercetina

A quercetina (3,3',4',5,7-penta-hidroxi-flavona) (Figura 7) pertence à classe chamada flavonóis e apresenta coloração amarela. Esse flavonóide tem sido utilizado como suplemento nutricional e pode ser benéfico contra uma variedade de doenças: proteção cardiovascular, anticancerígena, antitumoral, antiúlcera, antialérgico, antiviral, anti-inflamatória, antidiabético, efeitos gastroprotetores, anti-hipertensivos, imunomoduladores, anti-infecciosos e outros (DAVID *et al.*, 2016).

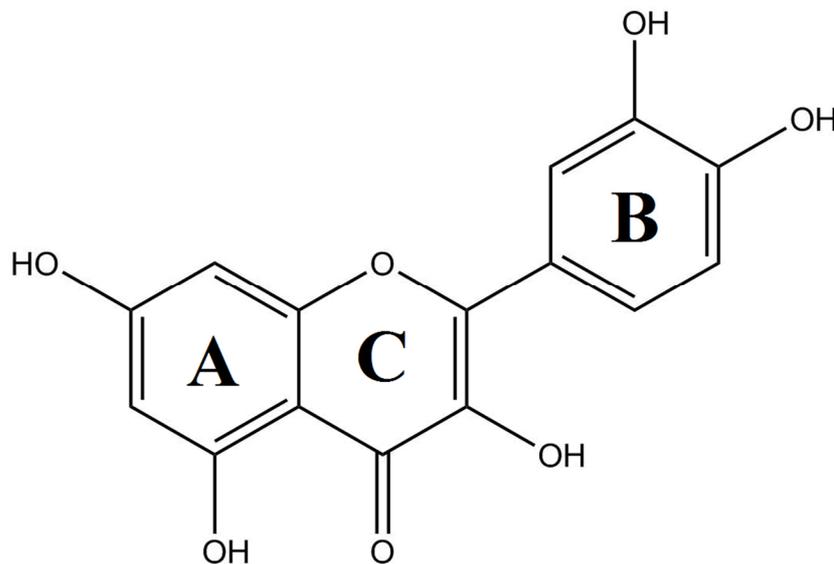


Figura 7. Estrutura química da quercetina

Evidências sugerem diversos benefícios no uso de compostos fenólicos não só pela dieta, mas também através da aplicação na pele. Em virtude de sua origem natural e baixa toxicidade, os compostos fenólicos são uma ferramenta promissora na eliminação das causas e efeitos do envelhecimento, doenças e danos à pele, incluindo feridas e queimaduras. (DZIALO *et al.*, 2016).

Um estudo realizado por CASAGRANDE e colaboradores (2006) demonstrou que a quercetina, flavonóide com maior atividade antioxidante, diminui o dano da pele induzida pela exposição à radiação UV. Esse achado sugeriu uma possível utilidade da quercetina em formulações tópicas para prevenir danos a pele pela radiação UV.

Outro achado na literatura investigou a atividade inibidora da formação dos AGEs em colágeno pela quercetina. Esse flavonóide inibiu a formação dos AGEs fluorescentes e não fluorescentes induzidos pela glicação de colágeno com glicose *in vitro* (CERVANTES-LAUREAN *et al.*, 2006).

CHEN e KUBO (2002) estudaram os efeitos da quercetina, kaempferol e morina sobre a atividade da tirosinase de cogumelo. A quercetina mostrou atividade inibitória sobre a tirosinase de forma superior aos flavonóides testados.

A atividade cicatrizante da quercetina também foi avaliada por GOPALAKRISHNAN e colaboradores (2016). Os resultados sugerem que a aplicação tópica da quercetina pode promover a cicatrização de feridas.

A quercetina e seus derivados são fortes representantes na atividade antioxidante com expansão para várias situações relacionadas à oxidação, como doenças e envelhecimento de vários tecidos, incluindo pele. Seus efeitos rejuvenescedores relatados colocam esse flavonóide entre os mais pesquisados para produtos naturais antienvhecimento (CHONDROGIANNI *et al.*, 2010).

Diante do exposto, baseando-se nas atividades de aplicação cosmética da quercetina, este trabalho visa sintetizar, caracterizar e avaliar as aplicações cosméticas de dois derivados desse flavonóide na prevenção do envelhecimento cutâneo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Sintetizar, caracterizar e avaliar aplicações cosméticas de derivados benzilados da quercetina.

3.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar os derivados benzilados da quercetina;
- Avaliar as propriedades antioxidante, antiglicante e de inibição de enzimas de aplicação cosmética dos derivados benzilados;
- Estudar os efeitos dos derivados benzilados sobre a viabilidade, migração e proliferação de fibroblastos;
- Avaliar por meio de ensaio *in silico* o coeficiente de partição e de permeação cutânea dos derivados benzilados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Marca Sigma Aldrich: DPPH, ABTS, glioxal, rutina, quercetina, ácido gálico, DMSO, SDS, Comassie Blue, enzima colagenase (obtido de *Clostridium histolyticum*), enzima hialuronidase (Tipo IV-S: obtido de testículo bovino, DCF-DA, AAPH, gelatina (obtida da pele de bovinos), doxorubicina, poliacrilamida, ácido kójico, substrato N-succinil-Ala-Ala-Ala-p nitroanilida, ácido elágico, heparina, enzima tirosinase, enzima elastase pancreática, enzima hialuronidase, substratoácido hialurônico, *hexadecyltrimethylammonium bromide* (BCTA).

Outras marcas: colágeno tipo I (Corning), azida sódica (Nuclear), FBS, DMEM e penicilina/estreptomicina (Gibco®, Life Technologies), vitamina C (VETEC).

4.2 Análises cromatográficas

4.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises em camada delgada foram realizadas em cromatoplasmas de alumínio (sílica gel 60 - ALUGRAM®), com espessura de 0,20 mm e indicador de fluorescência UV₂₅₄. Os spots foram revelados com luz UV (254 e 366 nm), bem como reagente NP-PEG (difetilboriloxietilamina 1,0 % em MeOH).

4.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As análises foram obtidas no laboratório da Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM).

As análises em HPLC analítico foram realizadas em cromatógrafo Accela® (*Thermo Scientific*) equipado com bomba Accela 600 *Pump*, autoamostrador Accela *Autosampler Plus*, válvula de injeção Rheodyne (25 µL), operando simultaneamente com detector de arranjo de diodos (DAD) Accela PDA e de espectrometria de massas (MS) (TSQ Quantum Access).

As análises em HPLC semipreparativo foram realizadas em cromatógrafo modelo UFLC® (Shimadzu) equipado com bomba LC-6AD (sistema binário), degaseificador DGU-20A5, detector de UV SPD-20AV, módulo de comunicação CBM-20A e válvula de injeção Rheodyne (200 µL).

4.3 Análises espectrométricas/espectroscópicas

As análises foram obtidas no laboratório da Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM).

Os espectros de massas foram registrados em equipamento do tipo ion-trap, modelo LCQ Fleet® (*Thermo Scientific*), ou Triplo Quadrupolo, modelo TSQ Quantum Access (*Thermo Scientific*), operando com fonte de electrospray (ESI) ou com fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI).

Os espectros das análises de ressonância magnética nuclear (RMN) de uma e duas dimensões (1D e 2D) foram adquiridos em equipamentos Bruker AVANCE III HD, operando a 11,75 teslas, observando os núcleos de ^1H e ^{13}C a 500 e 125 MHz, respectivamente, equipado com uma sonda multinuclear de 5 mm (BBFO Plus SmartProbe™) com gradiente de campo na direção Z. As amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) deuterado. Todos os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm relativos ao sinal do tetrametilsilano (TMS). As constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz).

4.4 Análises de aplicação cosmética

4.4.1 Leitor de ELISA

As análises de absorvância e fluorescência dos experimentos de aplicação cosmética foram obtidas em leitor de ELISA, modelo DTX800, marca BeckmanCoulter.

4.4.2 Eletroforese

A corrida do gel do ensaio de colagenase por método zimográfico foi realizada em equipamento de eletroforese BioRad® Protean II, Hercules, USA.

4.5 Síntese e isolamento

Os compostos foram sintetizados (Figura 8) a partir da metodologia proposta por ZHANG e colaboradores (2011). Pesou-se a rutina (21,2 mg; 0,0347 mmol) em balão de reação de 50 mL e adicionou-se dimetilformamida (DMF) (3,0 mL), carbonato de potássio (K_2CO_3) (9,6 mg; 0,0694 mmol) e brometo de benzila (BnBr) (2 mL), deixou-se sob agitação e aquecimento ($\Delta = 40\text{ }^\circ\text{C}$) por 24 h. A formação do produto foi acompanhada por CCD usando hexano: diclorometano: acetato de etila (5:1:4). A reação foi finalizada com a lavagem da solução com hidróxido de sódio (NaOH(aq)) a 1 % (2x 5 mL), em seguida com água destilada (2x 10 mL) e extraída com acetato de etila (AcOEt). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro, filtrado em papel de filtro e evaporado, obtendo um produto bruto de massa de 167,2 mg.

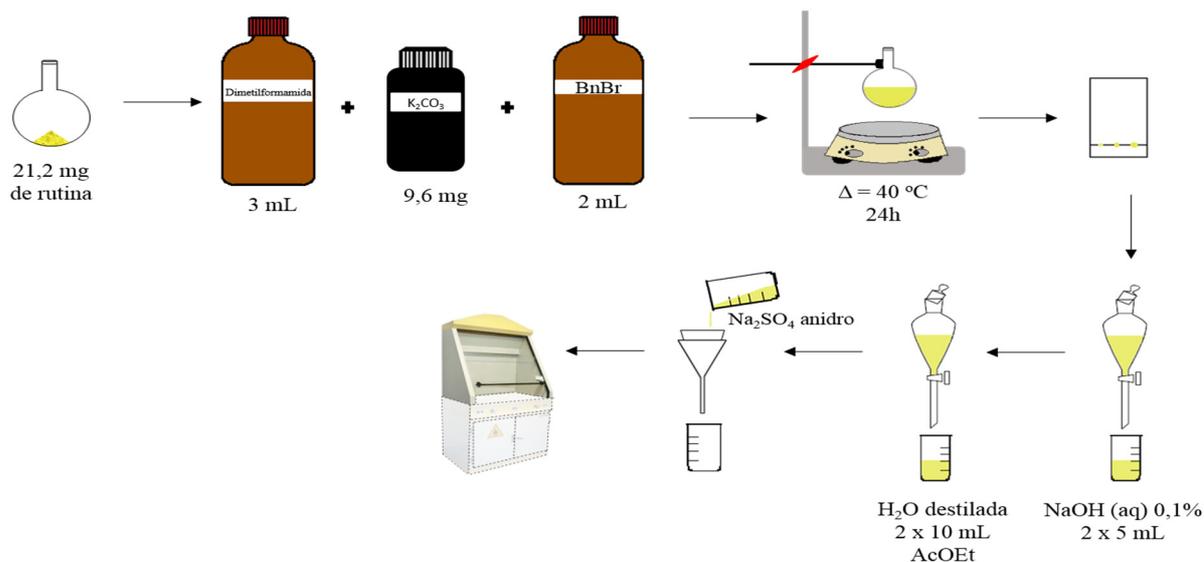


Figura 8. Fluxograma da síntese entre a rutina e o brometo de benzila para obtenção dos derivados

O método utilizado para isolamento em HPLC semipreparativo foi desenvolvido em sistema HPLC analítico, sendo utilizadas as seguintes condições: 10 μL da solução estoque (1 mg/mL) foram analisados em sistema HPLC-DAD-MS, utilizando uma coluna C18 (Luna) (5 μm , 150 x 4,60 mm) da Phenomenex. Como fases móveis foram utilizadas uma solução aquosa ácida (2 % ácido fórmico) (A) e metanol (B), com gradiente de eluição de 75-100 % (B) em 9 minutos (1 mL/min), seguido de 100 % por mais 10 minutos. O detector de DAD monitorou a faixa de 200-400 nm. Os parâmetros analíticos utilizados na fonte de APCI foram os seguintes: *discharge current*: 5 μA ; *vaporizer temperature*: 350 $^\circ\text{C}$; *capillary temperature*: 270 $^\circ\text{C}$; *sheath gas*: 35 psi; aux gas: 15 arb, *mass range*, *m/z* 150-800.

Para o isolamento em HPLC semipreparativo utilizou-se as mesmas condições supracitadas. 20 mg do produto de síntese foram solubilizadas em 200 μL de metanol e submetidos a fracionamento. Nesta etapa, utilizou-se uma coluna C18 (Luna) (5 μm , 250 x 10,00 mm) da Phenomenex. Os comprimentos de onda foram monitorados nas faixas de 256 e 370 nm. O fluxo utilizado na análise foi de 4,7 mL/min. O fracionamento resultou nas amostras ACD32A (15,3 mg) e ACD32B (1,8 mg). Para elucidação estrutural, os produtos da síntese foram submetidos às análises de espectrometria de massa (fonte ESI) e RMN.

4.6 Ensaio para aplicação cosmética

4.6.1 Atividade sequestrante do radical DPPH

O ensaio foi realizado segundo metodologia utilizada por MOLYNEUX (2004), com modificações. Foram pesados 2 mg de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e dissolvidos em 12 mL de etanol absoluto. Em seguida, adicionou-se 270 µL dessa solução e 30 µL de etanol na microplaca, fazendo-se o ajuste com etanol na solução até que fosse atingida a absorvância de $1,00 \pm 0,1$ nm. Para conhecer a absorvância dos brancos, em uma placa de 96 poços foram adicionados 30 µL dos derivados da quercetina (1 mg/mL) e 270 µL de álcool etílico. Para o teste, foram adicionados 30 µL dos derivados da quercetina e 270 µL da solução de DPPH e a placa permaneceu incubada ao abrigo de luz por 30 minutos. Após esse tempo, realizou-se a leitura a 517 nm no leitor de ELISA. Como padrão e controle negativo, utilizou-se o ácido gálico e DMSO, respectivamente. Os resultados foram calculados segundo a equação abaixo:

$$\% \text{ de atividade antioxidante} = 100 - (\text{Abs da amostra}/\text{média controle}) \times 100$$

4.6.2 Ensaio de varredura do radical ABTS

O 2,2'-azino-bis(ácido-etilbenzoalina-6-sulfônico) (ABTS), foi diluído em água destilada e oxidado com persulfato de potássio à 5 mM por 24 horas e coberto com papel alumínio, no escuro, em temperatura ambiente. Para conhecer a absorvância dos brancos, em uma placa de 96 poços foram adicionados 30 µL dos derivados da quercetina (1 mg/mL) e 270 µL de água. Para o teste, foram adicionados 30 µL dos derivados da quercetina e 270 µL da solução de ABTS e a placa permaneceu incubada ao abrigo de luz por 30 minutos. Após esse tempo, realizou-se a leitura a 630 nm no leitor de ELISA. Como padrão e controle negativo, utilizou-se ácido gálico e DMSO, respectivamente. Em seguida, foram efetuados os

cálculos de inibição conforme metodologia descrita por WAHYNUNINGRUM e colaboradores (2016), com modificações, por meio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de atividade antioxidante} = 100 - (\text{Abs da amostra/média controle}) \times 100$$

4.6.3 Atividade inibitória sobre a glicação de colágeno

Primeiramente, preparou-se uma solução de tampão fosfato a 200 mM, pH 7,4 com conservante azida sódica 3 mM. Após isso, obteve-se uma solução de glioxal a 90 mM, e colágeno tipo I a 0,5 mg/mL, em tampão fosfato na concentração e pH supracitada. Na cavidade do branco, colocou-se 30 µL dos derivados da quercetina nas concentrações de (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781 µg/mL), 135 µL de colágeno e 135 µL de tampão. No teste, colocou-se 30 µL dos derivados da quercetina (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781 µg/mL), 135 µL de colágeno e 135 µL de glioxal. Em seguida, a placa foi vedada com plástico Parafilm M® e incubada em estufa a 37 °C por 4 dias. Após esse tempo, realizou-se a leitura por fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$) em leitor de ELISA. Como padrão, utilizou-se a rutina (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781 µg/mL) e controle negativo DMSO. Em seguida, foram efetuados os cálculos por meio da seguinte fórmula:

$$100 - (\text{luminescência da amostra} / \text{luminescência do controle}) \times 100$$

4.6.4 Inibição enzimática

4.6.4.1 Tirosinase

O ensaio foi realizado segundo a metodologia descrita por HERING (1987), utilizando tampão fosfato pH 6,5 10 mM, enzima tirosinase dissolvida em tampão, e o reagente de cor L-DOPA a 1 mmol/L dissolvido em tampão.

Para realização do ensaio, adicionou-se, primeiramente, em cada cavidade da microplaca, 20 µL dos derivados da quercetina (1 mg/mL), o padrão ácido kójico e o controle negativo DMSO. Foram adicionados 80µL da solução de enzima e a placa foi incubada por 5 minutos em temperatura de 37 °C. Após esse tempo, realizou-se a primeira leitura (branco) em 405 nm em leitor ELISA. Em seguida, 100µL do reagente de cor foi adicionado e, imediatamente, a leitura do tempo 0' foi realizada. A microplaca foi incubada a temperatura ambiente e o monitoramento da absorvância foi realizado durante 20 minutos, de 5 em 5 minutos.

A atividade inibitória foi expressa em percentagem de acordo com o cálculo a seguir:

$$\% \text{ inibição} = 100 - (\text{Abs2 amostra} - \text{Abs1 amostra} / \text{Abs2 controle} - \text{Abs1 controle}) \times 100$$

4.6.4.2 Elastase

O ensaio foi realizado segundo a metodologia descrita por THRING e colaboradores (2009), utilizando tampão Tris-HCL pH 7,5, elastase pancreática (0,4 mg/mL) dissolvida em água estéril e o substrato N-succinil-Ala-Ala-Ala-*p* nitroanilida a 1,6 mM dissolvido em tampão.

Adicionou-se, em cada cavidade da microplaca, 10 µL dos derivados da quercetina (1 mg/mL), o padrão ácido elágico, o diluente tampão e o controle negativo DMSO. Foram adicionados 90 µL da solução de enzima, seguida de incubação por 15 minutos a 37 °C. Em seguida, adicionou-se 100 µL do substrato e realizou-se a primeira leitura em 405 nm em leitor ELISA. A microplaca foi incubada a temperatura ambiente e o monitoramento da absorvância foi realizado durante 50 minutos, de 5 em 5 minutos.

A atividade inibitória foi expressa em percentagem de acordo com o cálculo a seguir:

$$\% \text{ inibição} = 100 - (\text{Abs2 amostra} - \text{Abs1 amostra} / \text{Abs2 controle} - \text{Abs1 controle}) \times 100$$

4.6.4.3 Hialuronidase

O ensaio foi realizado segundo a metodologia descrita MARCHESAN e colaboradores (2006) com modificações, utilizando tampão fosfato 10 mM pH 6,5, hialuronidase (2 mg/mL) dissolvida em tampão, o substrato ácido hialurônico (1 mg/mL) dissolvido em água e *hexadecyltrimethylammonium bromide* (BCTA) a 2,5 % dissolvido em solução de NaOH 2%.

Adicionou-se, em cada cavidade da microplaca, 10 µL dos derivados da quercetina (1 mg/mL), o padrão heparina e o controle negativo DMSO. Foram adicionados 30 µL da solução de enzima (derivados e controle) e 90 µL no branco, seguida de incubação por 5 minutos a 37 °C. Em seguida, adicionou-se 60 µL do substrato (derivados e controle) e incubou-se por 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, adicionou-se 200 µL de BCTA (derivados, controle e branco) e realizou-se a leitura em 405 nm em leitor ELISA.

A atividade inibitória foi expressa em percentagem de acordo com o cálculo a seguir:

$$\% \text{ de inibição} = (\text{Abs amostra} / \text{Abs padrão}) \times 100$$

4.7 Ensaio em cultura de células

As células utilizadas foram fibroblastos humanos (MRC-5), adquiridas do Banco de Células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF). No Laboratório de Cultura Celular da FCF da Universidade Federal do Amazonas (FCF/UFAM), as células foram cultivadas com meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) alta glicose, suplementados com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina-estreptomicina, em estufa à 37 °C, atmosfera úmida e com injeção de 5 % de CO₂.

4.7.1 Citotoxicidade pelo ensaio do Alamar Blue

O alamar blue, identificado como resazurina, é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox, que como ocorre com os sais de tetrazólio, reduz-se em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável).

O teste do Alamar Blue foi realizado conforme a metodologia de AHMED e colaboradores (1994) com o intuito de se analisar a viabilidade celular em células da linhagem MRC-5 após exposição por 24, 48 e 72 h aos derivados da quercetina. Em placa de 96 poços, as células de MRC-5 foram plaqueadas na concentração de $0,5 \times 10^4$ células por poço. Após 24 horas de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com os compostos bioativos nas concentrações de (200, 100, 75, 50, 25, 1 $\mu\text{g/mL}$).

Passados os tempos de tratamento, adicionou-se 10 μL da solução de uso de Alamar Blue (solução estoque 0,4% 1:20 em meio de cultura), ou seja, da resazurina na respectiva triplicata de tratamento. Para controle negativo foi utilizado apenas o meio de cultura com DMSO a 0,01 %. Após o tempo de metabolização da resazurina (3h), realizou-se a leitura da fluorescência em leitor de ELISA. A viabilidade foi calculada conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{ viabilidade} = (\text{Abs da amostra} / \text{média da Abs do controle negativo}) \times 100$$

4.7.2 Atividade Antioxidante Celular

A avaliação da atividade antioxidante celular foi realizada segundo a metodologia descrita por WOLFE e LIU (2007), com modificações. Nesse ensaio, utilizou-se células MRC-5, plaqueadas na concentração de 6×10^4 , em 100 μL do DMEM alta glicose, e incubadas por 24 horas. Após o período de incubação, os poços foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS). Posteriormente, adicionou-se, em uma microplaca de 96 poços, 100 μL de uma solução de 2,7-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) à 25 μM , dissolvida em

tampão de Hank's, contendo os derivados da quercetina (50 µg/mL), e incubados durante 60 minutos a 37 °C e 5 % CO₂. Após o período de incubação, os poços foram novamente lavados com PBS. Em seguida, tratou-se com 600 µM de dihidroclorato de 2,2'-azobis(2metilpropionamida) (AAPH), e a fluorescência dos mesmos foi mensurada utilizando leitor de ELISA, imediatamente, no comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão 520 nm, durante 60 minutos, em intervalos de 5 minutos. O controle positivo (quercetina – 50 µg/mL) foi preparado com DCFH-DA e tampão Hank's e o controle negativo (DMSO) com PBS. Os resultados foram calculados segundo a equação abaixo:

$$\% \text{ de atividade antioxidante} = 100 - (\text{Abs da amostra}/\text{média controle}) \times 100$$

4.7.3 Avaliação sobre a proliferação celular

O ensaio avaliou a proliferação celular pelo método de exclusão por Azul de Tripán (FRESHNEY, 1994) com modificações. As células MRC-5 foram plaqueadas na concentração de 1×10^4 de células/mL (meio DMEM, com SBF 10 %) em placas de 12 poços, mantidas em estufa a 37 °C, e 5% de CO₂.

Após atingirem uma confluência celular de 80 % da superfície ocupada, as células foram tratadas na concentração não citotóxica de 50 µg/mL dos derivados da quercetina, determinada previamente pelo ensaio de viabilidade celular. Como padrão e controle negativo, utilizou-se vitamina C e DMSO, respectivamente. O estudo teve intervalos medidos em três tempos experimentais: 24, 48 e 72 h de contato com a substância. Após tripsinização e inativação com meio e PBS, utilizou-se 90 µL da suspensão celular e 10 µL de azul de tripan. Desta suspensão celular, transferiu-se 10 µL para a câmara de Neubauer para a contagem celular, excluindo-se aquelas que se apresentaram coradas de azul (células não viáveis).

Para o cálculo do número de células de cada poço foi utilizada a seguinte equação:

$$NC \times D \times 10^4$$

NC= média do número de células viáveis contadas, D= diluição da amostra.

4.7.4 Ensaio de migração *in vitro*

No experimento de cicatrização *in vitro*, as células de MRC-5 foram plaqueadas em placa de 6 poços, com uma densidade de 5×10^5 células/poço e foram incubadas a 37 °C com 5% CO₂, ar atmosfera até 100% de confluência. A placa com as células foi arranhada manualmente com uma pipeta de 200 µL, removendo células de uma área com desvio entre 380 e 580 nm. As células foram lavadas com PBS e tratadas com os derivados da quercetina na concentração de 50 µg/mL, determinada previamente pelo ensaio de viabilidade celular, juntamente com meio DMEM. Como padrão e controle negativo, utilizou-se vitamina C e DMSO, respectivamente. A placa foi analisada por microscopia óptica após os tempos de tratamento de 24h, 48h e 72h de acordo com ASCIONE e colaboradores (2016).

4.7.5 Ensaio de inibição da collagenase por método zimográfico *in vitro*

A atividade de inibição da collagenase foi avaliada pelo ensaio zimográfico de eletroforese em gel (poliacrilamida 10 %, gelatina 0,1 %), segundo o método descrito por SALAMONE e colaboradores (2015); SNOEK e VON (2005), com algumas modificações. As células MRC-5 foram semeados em placas de 12 poços numa densidade de 1×10^4 de células/mL. Após 24 h, o meio foi substituído por meio de cultura isento de FBS contendo os derivados, quercetina e rutina a 50 µM. Decorrido o período de 24, 48 e 72 horas de tratamento, esse meio foi coletado para tubos ependorfs para realização do teste de eletroforese em gel de SDS-PAGE 1,0 mm, poliacrilamida 30 %, contendo 10 % de dodecil

sulfato de sódio (SDS), copolimerizado com 1,0 % de gelatina. Cada poço do gel foi carregado com os derivados da quercetina nas concentrações de 12,5 µg/mL e brevemente solubilizadas em tampão de amostra (62 mM Tris-HCl pH 6,8; 10 % glicerol; 2% SDS; 0,01 % azul de bromofenol e 25 µg/mL de colagenase (obtido de *Clostridium histolyticum*). A eletroforese foi realizada com tampão de corrida (0,025 M TRIS, 0,192 M glicina, e 0,1% SDS, pH 8,5) à 100 V constante por 150 min. Após isso, os géis foram lavados duas vezes por 30 min em 2,5 % Triton X-100 (v/v) para remover o SDS e em seguida incubados a 37 °C, *overnight* em solução tampão (Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, ZnCl₂ 50 mM). Após este período, o gel foi corado pelo corante Comassie Blue G-250 e descorado com uma solução de metanol e ácido acético até a visualização das bandas características da atividade das colagenases. A avaliação da atividade enzimática foi realizada através do software ImageJ®

4.8 Previsão do coeficiente de partição e permeação cutânea por SwissADME

A previsão do coeficiente de partição e permeação cutânea dos compostos sintetizados foi comparada com a quercetina e rutina através da ferramenta online SwissADME do *Swiss Institute of Bioinformatics* (<http://www.sib.swiss>) (DAINA *et al.*, 2017). No servidor SwissADME as estruturas foram desenhadas e depois convertidas para modelo SMILES, obtendo-se os resultados.

4.9 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média ± D.P.M. (desvio padrão da média) de dois ensaios independentes. As médias foram analisadas pelo software GraphPad Prisma® 6.0 através da análise de variância two-way ANOVA seguida do teste de Dunnett de comparações múltiplas com nível de significância de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese

A partir da reação de substituição entre a rutina e o brometo de benzila, obteve-se um produto sólido amorfo de coloração amarela com massa igual a 167,2 mg. A partir de 20 mg desse produto, foi realizado o isolamento por HPLC semipreparativo, onde foram obtidas duas substâncias, codificadas como ACD32A e ACD32B. A porcentagem da fração isolada de cada derivado foi de 76,5 % (ACD32A) e 9 % (ACD32B). Os derivados foram então armazenados na temperatura de -22 °C, até serem submetidos às análises de caracterização e de aplicação cosmética.

5.2 Análises químicas dos produtos de síntese

A reação de substituição entre a rutina e brometo de benzila foi avaliada por CCD (Figura 9), onde foi observada a formação de produtos isoláveis. Esses produtos apresentaram menor polaridade que a rutina e maior afinidade pelo sistema de eluição.



Figura 9. CCD da reação de substituição (MR) comparada com a rutina (RUT), a qual foi utilizada como produto de partida. O tempo de retenção da MR foi modificada, demonstrando a formação de produtos diferentes da rutina.

De acordo com os cromatogramas obtidos por HPLC-DAD (Figura 10), observou-se dois picos majoritários nos tempos de 4,63 e 8,42 minutos, os quais foram codificados como ACD32A e ACD32B, respectivamente.

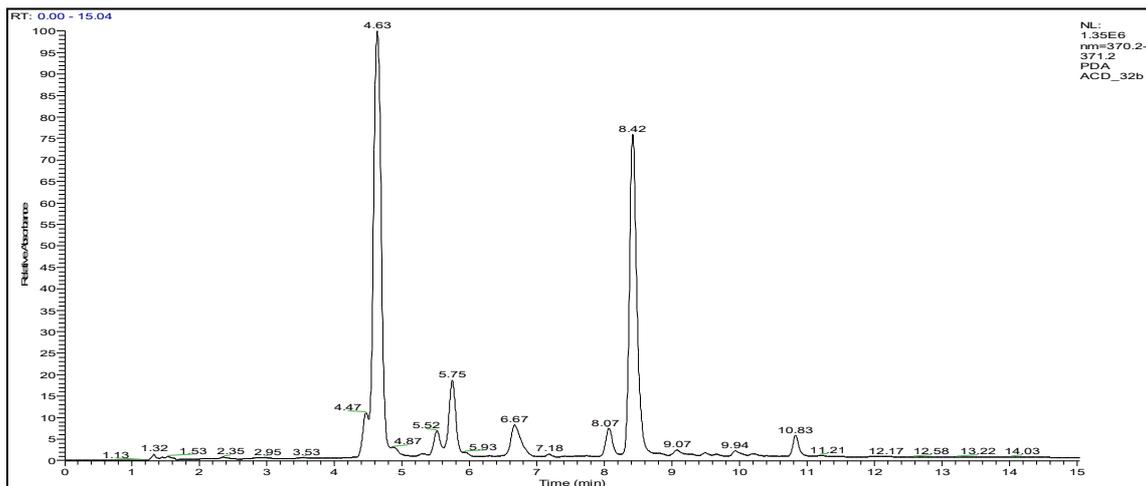


Figura 10. Cromatogramas com tempos de retenção em 4,63 (ACD32A) e 8,42 (ACD32B) minutos.

No HPLC de fase reversa os compostos polares são eluídos primeiro e os mais apolares eluídos posteriormente, já que essa ordem de eluição é baseada no aumento da hidrofobicidade dos solutos. Com esse entendimento, pode-se dizer que, com base nos tempos de retenção, os derivados ACD32A e ACD32B são mais hidrofóbicos ou menos hidrossolúveis que a rutina, característica esperada visto que o brometo de benzila é uma substância pouco solúvel em água (AGUILAR, 2004; PUBCHEM, 2018).

Os espectros de absorção obtidos por HPLC-DAD (Figura 11) foram utilizados para se obter o comprimento de onda máximo de cada derivado e para confirmar as absorções características de derivados da quercetina. Os picos majoritários na região do UV (200-400 nm) dos derivados apresentaram absorbâncias típicas de flavonóis, os quais exibem dois grandes picos de absorção na região de 240-280 nm (comumente referido como Banda II) e 300-380 nm (comumente referido como Banda I) (SINGH *et al.*, 2010).

No estudo de SINGH e colaboradores (2010), observou-se que não havia mudanças significativas nas bandas I e II dos espectros de absorção dos flavonóis, quando substituídos nas posições 4' e 7. Na síntese houve uma substituição das hidroxilas por um grupamento benzila na posição 4' (ACD32A) e posições 7 e 4' (ACD32B), demonstrando similaridades espectrais entre os derivados.

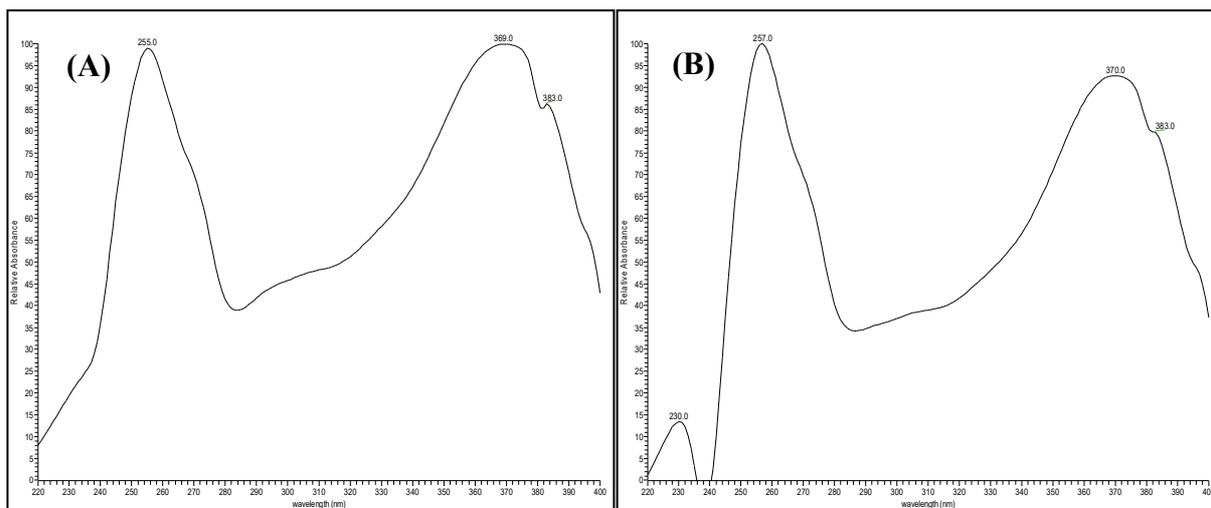


Figura 11. Espectros de absorção obtidos por HPLC-DAD dos derivados ACD32A (A) e ACD32B (B) na região do UV (200-400 nm).

O isolamento dessas moléculas foi realizado por HPLC semipreparativo (Figura 12) e, em seguida, submetidas à determinação estrutural.

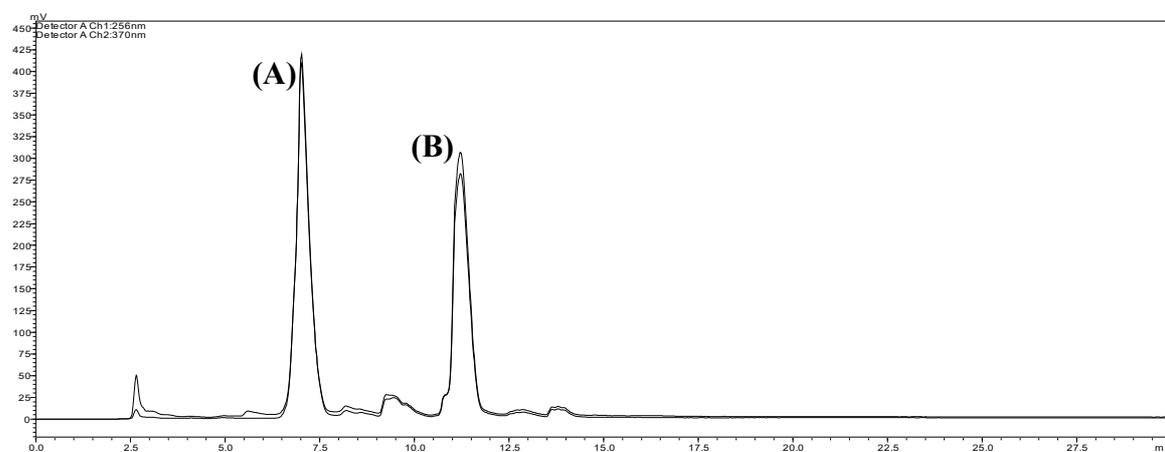


Figura 12. Cromatogramas apresentados por HPLC semipreparativo para isolamento dos derivados ACD32A (A) e ACD32B (B).

5.3 Determinação estrutural

5.3.1 ACD32A

A amostra codificada como ACD32A, apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarela. O espectro de íons totais, modo positivo, revelou a presença de um pico base de m/z 393 (Figura 13). A partir desse espectro, pode-se dizer que a peso molecular da amostra é de, aproximadamente, 392 g/mol, já que no modo positivo há o acréscimo de uma unidade de massa devido à adição de um próton na molécula.

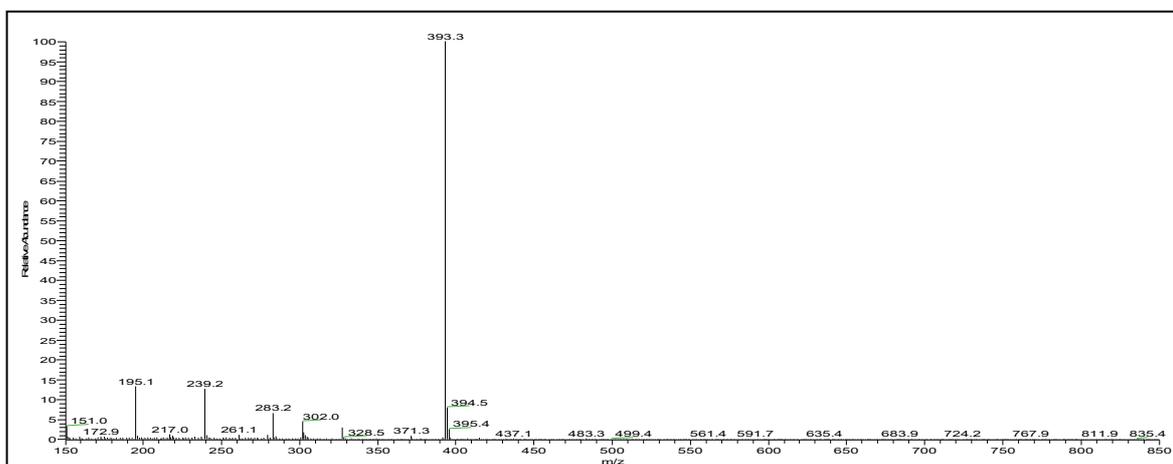


Figura 13. Espectro de massas da amostra ACD32A com pico base de m/z 393.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 14) foram observados diversos sinais de hidrogênios aromáticos em δ 6,19 (1H, d), 6,42 (1H, d), 7,71 (1H, d), 7,15 (1H, d) e 7,60 (1H, dd), correspondendo respectivamente aos hidrogênios H6, H8, H2', H5' e H6' da estrutura da quercetina. Em adição, foram observados sinais referentes aos hidrogênios aromáticos do grupamento benzila em δ 7,50 (2H, m), 7,40 (2H, m) e 7,33 (1H, m), além do hidrogênio metilênico em δ 5,20 (2H, s).

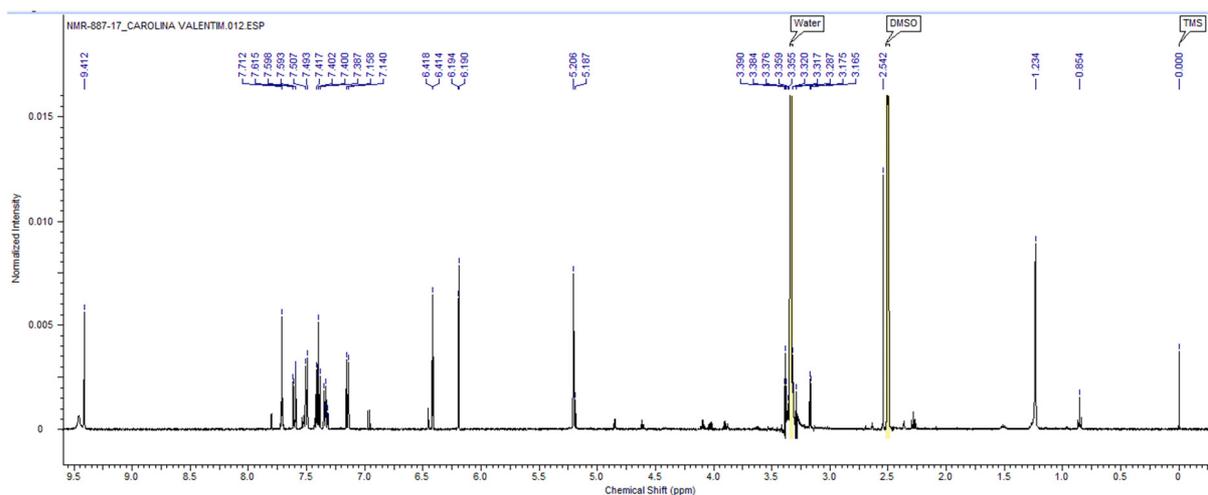


Figura 14. Espectro de NMR de ^1H (500 MHz, DMSO deuterado) da amostra ACD32A

Através do mapa de contorno HSQC (Figura 15) foi observado a correlação J^1 dos hidrogênios em δ 5,20, δ 7,33, δ 7,40 e δ 7,50 com os respectivos carbonos em δ 70,36, 128,53, 128,87 e 128,36. No HMBC (Figura 16), observou-se correlação a longa distância dos hidrogênios em δ 5,20, com os carbonos δ 128,3, 137,2 e 148,7. A confirmação de substituição da hidroxila no anel B se deu a partir da comparação dos dados obtidos (Tabela 1) com aqueles existentes na literatura para a quercetina (MOUFFOK *et al.*, 2012), sendo proposta a substância 2-(4-(benziloxi)-3-hidroxifenil)-3,5,7-tri-hidroxi-4H-cromen-4-ona (Figura 17).

Uma extensa busca foi realizada na literatura, a fim de verificar se a ACD32A estava entre os derivados da quercetina já sintetizados. Muitas moléculas apresentaram semelhanças, mas nenhuma dessas exibiu a exata estrutura da substância de estudo, indicando que, pela primeira vez, essa molécula está sendo descrita e que provavelmente seja inédita.

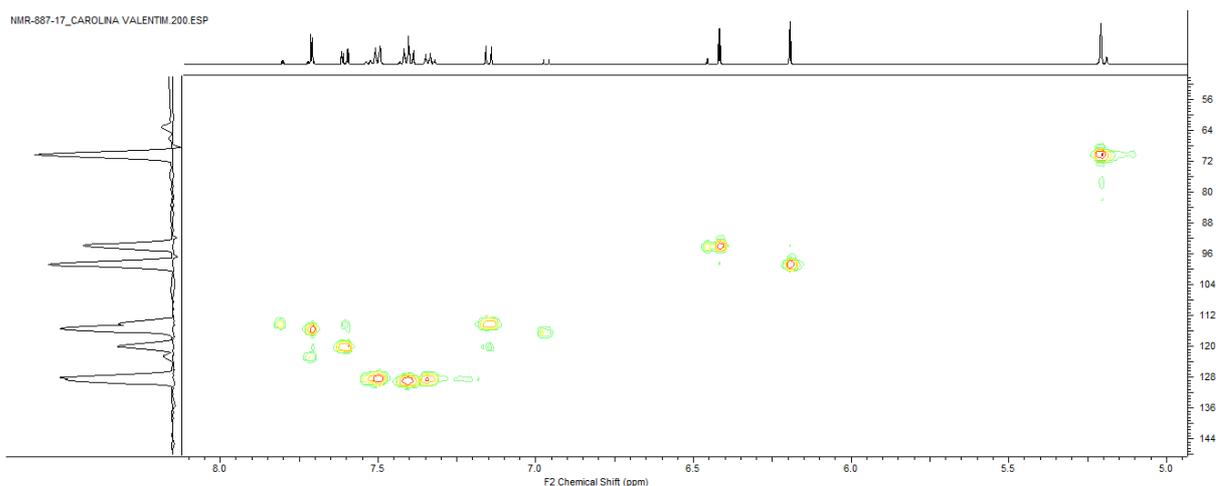


Figura 15. Mapa de contorno HSQC (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, DMSO deuterado) da amostra ACD32A.

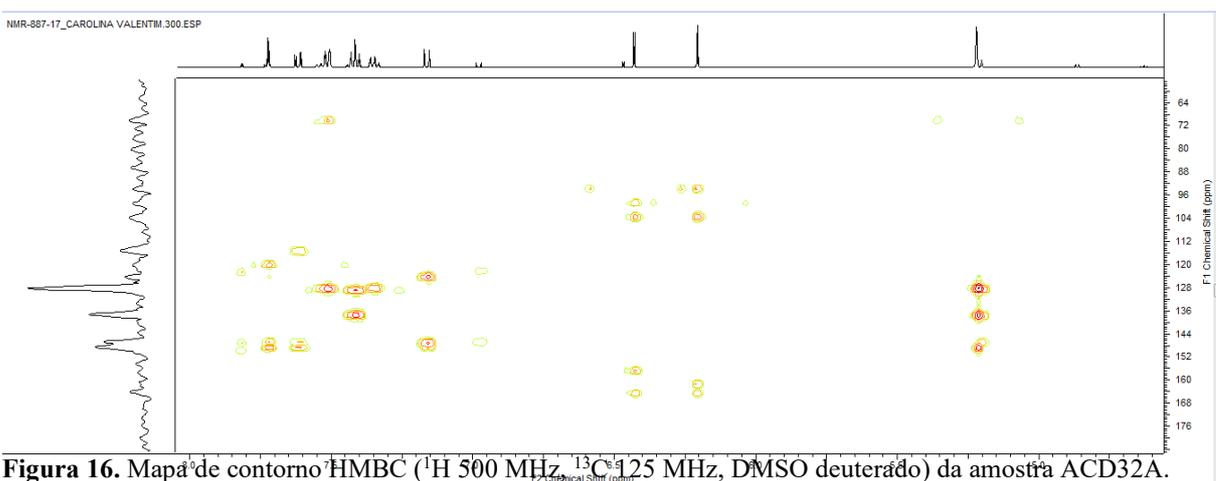


Figura 16. Mapa de contorno HMBC (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, DMSO deuterado) da amostra ACD32A.

Tabela 1. Dados de NMR de ^1H e ^{13}C da amostra ACD32A.

| Posição | ^1H δ (mult., J em Hz) ^a | ^1H δ (mult., J em Hz) ^b | HSQC ^c | HMBC ^c |
|---------|---|---|-------------------|------------------------------|
| 6 | 6,19 (1H, d, 2,1) | 6,18 (1H, d, 2,0) | 98,8 | 94,0/ 103,5/ 161,2/ 164,5 |
| 7 | - | - | 164,5 | - |
| 8 | 6,42 (1H, d, 2,1) | 6,39 (1H, d, 2,0) | 94,0 | 98,8/ 103,5/ 156,7/ 164,5 |
| 2' | 7,71 (1H, d, 2,1) | 7,74 (1H, d, 2,1) | 115,5 | 120,1/ 146,6/ 148,7 |
| 4' | - | - | 148,7 | - |
| 5' | 7,15 (1H, d, 8,9) | 6,88 (1H, d, 8,3) | 114,1 | 124,3/ 147,2 |
| 6' | 7,60 (1H, dd, 8,5 e 2,5) | 7,62 (1H, dd, 8,3 e 2,1) | 120,1 | 115,5/ 146,6/ 148,7 |
| 1'' | 5,20 (2H, s) | - | 70,3 | 128,3/ 137,2/ 148,7 |

| | | | | |
|-----------|--------------|---|-------|--------------|
| 3'' e 7'' | 7,50 (2H, m) | - | 128,3 | 128,5 |
| 4'' e 6'' | 7,40 (2H, m) | - | 128,8 | 128,8/ 137,2 |
| 5'' | 7,33 (1H, m) | - | 128,5 | 128,3 |

^a O experimento foi realizado a 500 MHz para ¹H em DMSO deuterado, utilizando TMS como padrão interno.

^b Dados da literatura da quercetina de acordo com MOUFFOK *et al.*, 2012 (metanol deuterado, 500 MHz).

^c Para os carbonos protonados foram usados os dados de HSQC e carbonos quartenários foram usados dados de HMBC.

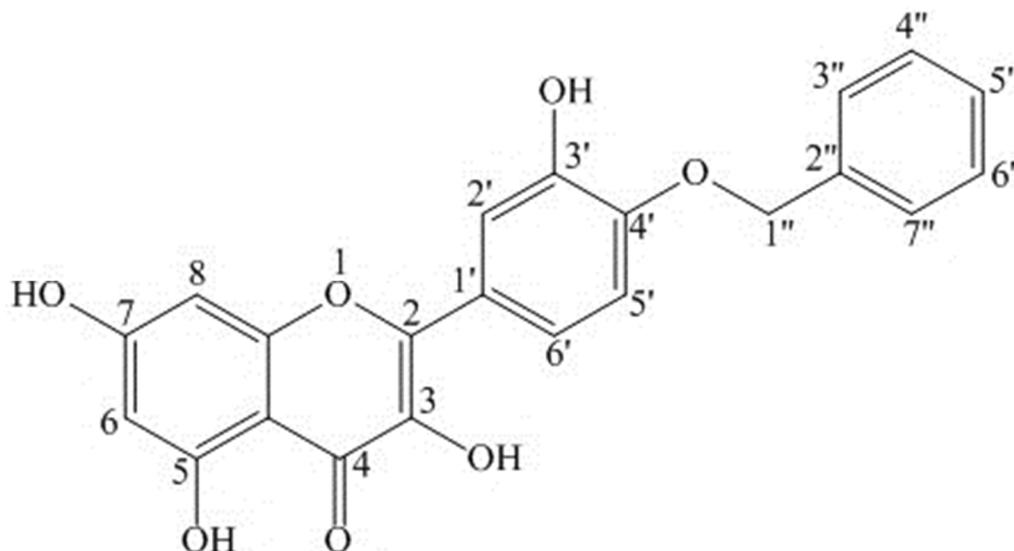


Figura 17. Estrutura do derivado da quercetina (ACD32A) com substituição do grupamento hidroxila por uma benzila na posição 4'.

5.3.2 ACD32B

A amostra codificada como ACD32B, apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarela. O espectro de íons totais, modo positivo, revelou a presença de um pico base de m/z 483 (Figura 18). A partir desse espectro, pode-se dizer que a peso molecular da amostra é de, aproximadamente, 482 g/mol, já que no modo positivo há o acréscimo de uma unidade de massa devido à adição de um próton na molécula.

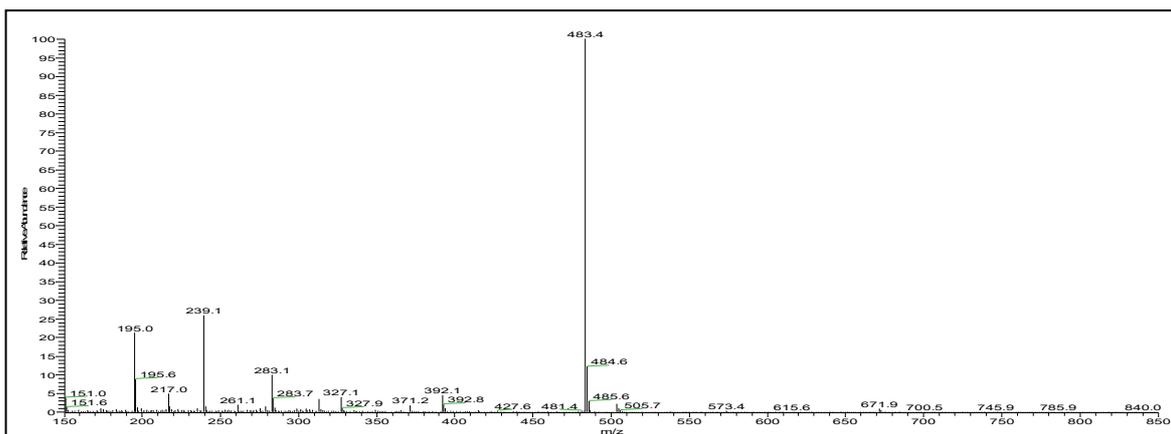


Figura 18. Espectro de massas da amostra ACD32B com pico base de m/z 483.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 19) foram observados diversos sinais de hidrogênios aromáticos em δ 6,43 (1H, d), 6,81 (1H, d), 7,75 (1H, d), 7,16 (1H, d) e 7,62 (1H, dd), correspondendo respectivamente aos hidrogênios H6, H8, H2', H5' e H6' da estrutura da quercetina. Em adição, foram observados sinais referentes aos hidrogênios aromáticos do grupamento benzila em δ 7,50 (4H, m), 7,41 (4H, m) e 7,35 (2H, m), além do hidrogênio metilênico em δ 5,23 (2H, s).

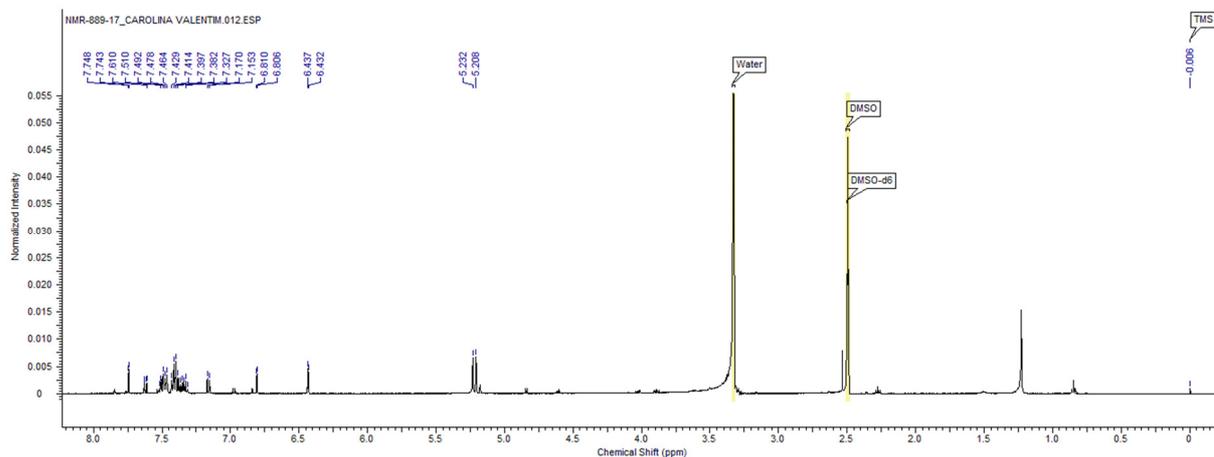


Figura 19. Espectro de NMR de ^1H (500 MHz, DMSO deuterado) da amostra ACD32B

No HMBC (Figura 20), observou-se correlação a longa distância dos hidrogênios em δ 5,21, com os carbonos δ 128,4, 137,5 e 148,9 e δ 5,23, com os carbonos δ 128,4, 136,8 e 164,6. A confirmação de substituição da hidroxila no anel B e anel A se deu a partir da comparação dos dados obtidos (Tabela 2) com aqueles existentes na literatura para a

quercetina (MOUFFOK *et al.*, 2012), sendo proposta a substância 7-(benziloxi)-2-(4-(benziloxi)-3-hidroxifenil)-3,5-di-hidroxi-4H-cromen-4-ona (Figura 21).

Uma extensa busca foi realizada na literatura, a fim de verificar se a ACD32B estava entre os derivados da quercetina já sintetizados. Muitas moléculas apresentaram semelhanças, mas nenhuma dessas exibiu a exata estrutura da substância de estudo, indicando que, pela primeira vez, essa molécula está sendo descrita e que provavelmente seja inédita.

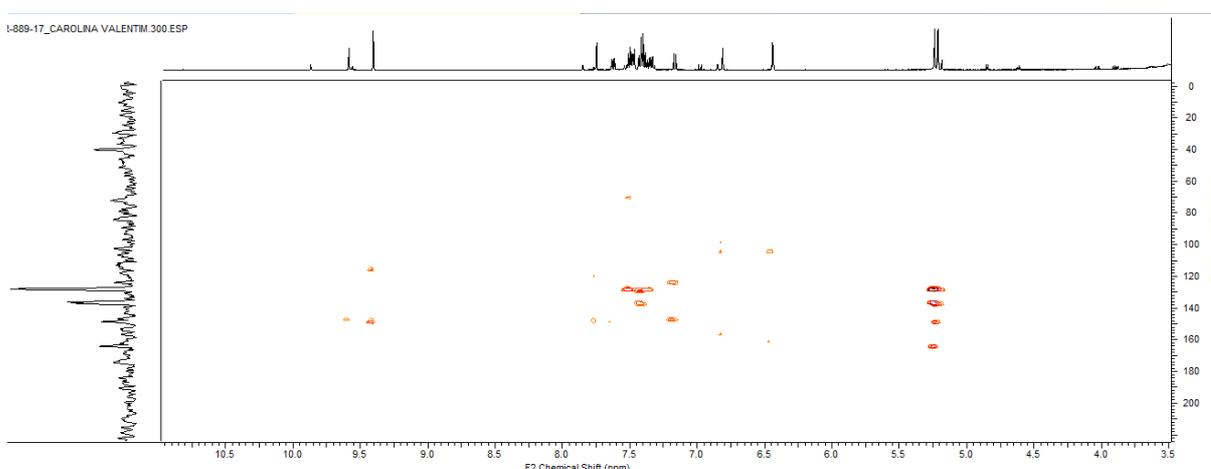


Figura 20. Mapa de contorno HMBC (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, DMSO deuterado) da amostra ACD32B.

Tabela 2. Dados de NMR de ^1H e ^{13}C da amostra ACD32B.

| Posição | ^1H δ (mult., J em Hz) ^a | ^1H δ (mult., J em Hz) ^b | HMBC ^c |
|-------------|---|---|------------------------------|
| 6 | 6,43 (1H, d, 2,1) | 6,18 (1H, d, 2,0) | 94,0/ 103,5/ 161,2/ 164,5 |
| 8 | 6,81 (1H, d, 2,1) | 6,39 (1H, d, 2,0) | 98,8/ 103,5/ 156,7/ 164,5 |
| 2' | 7,75 (1H, d, 2,1) | 7,74 (1H, d, 2,1) | 120,1/ 146,6/ 148,7 |
| 5' | 7,16 (1H, d, 8,9) | 6,88 (1H, d, 8,3) | 124,3/ 147,2 |
| 6' | 7,62 (1H, dd, 8,5 e 2,4) | 7,62 (1H, dd, 8,3 e 2,1) | 115,5/ 146,6/ 148,7 |
| 1'' | 5,21 (2H, s) | - | 128,4/ 137,5/ 148,9 |
| 3'' e 7'' | 7,50 (2H, m) | - | 128,4 |
| 4'' e 6'' | 7,41 (2H, m) | - | 128,8/ 137,5 |
| 5'' | 7,35 (1H, m) | - | 128,4 |
| 1''' | 5,23 (2H, s) | - | 128,4/ 136,8/ 164,6 |
| 3''' e 7''' | 7,50 (2H, m) | - | 128,4 |

| | | | |
|-------------|--------------|---|--------------|
| 4''' e 6''' | 7,41 (2H, m) | - | 128,8/ 136,8 |
| 5''' | 7,35 (1H, m) | - | 128,4 |

^a O experimento foi realizado a 500 MHz para ¹H em DMSO deuterado, utilizando TMS como padrão interno.

^b Dados da literatura da quercetina de acordo com MOUFFOK *et al.*, 2012 (metanol deuterado, 500 MHz).

^c Para os carbonos protonados foram usados os dados de HSQC e carbonos quartenários foram usados dados de HMBC.

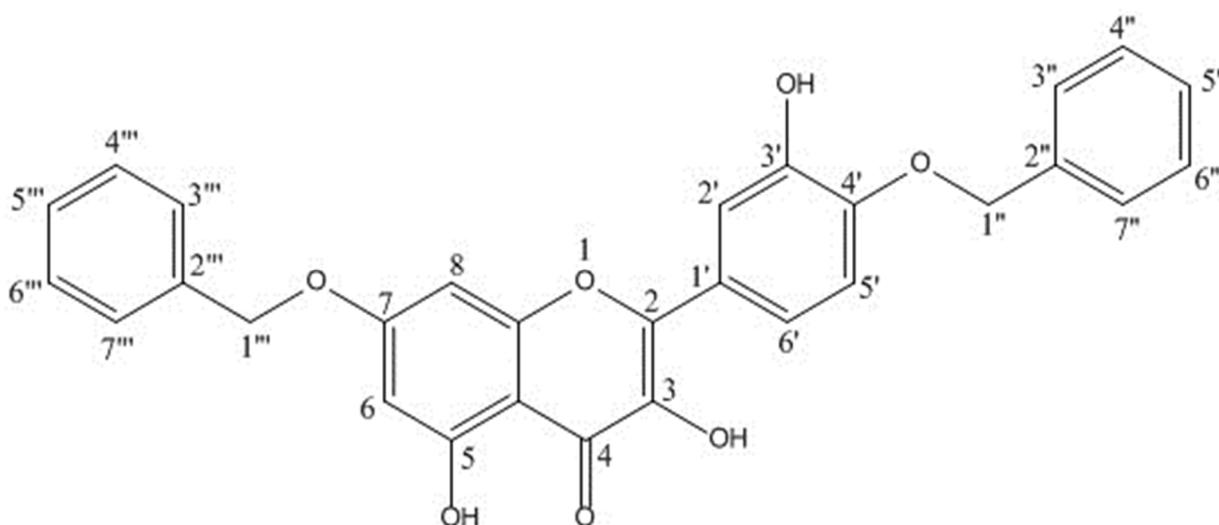


Figura 21. Estrutura do derivado da quercetina (ACD32B) com substituição do grupamento hidroxila por uma benzila na posição 4' e 7.

Ensaio para aplicação cosmética

Todos os ensaios de atividade biológica foram realizados comparado-se a quercetina com os seus derivados (ACD32A e ACD32B) e a rutina que foi o produto de partida da síntese.

5.4 Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante da ACD32A e ACD32B foi avaliada não só por ensaios colorimétricos, através da atividade sequestrante dos radicais DPPH e ABTS, mas também pelo ensaio de atividade antioxidante celular. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição (Tabela 3).

Tabela 3. Estudo da atividade antioxidante pelos ensaios de DPPH, ABTS e antioxidante celular. Todas as amostras encontram-se na concentração única de 100 µg/mL e os dados expressos em porcentagem de inibição com D.P.M.

| Amostras | DPPH | ABTS | Antioxidante celular |
|---------------------|-------------|-------------|-----------------------------|
| Ácido Gálico | 86,1 ± 1,19 | 99,8 ± 0,18 | - |
| ACD32A | 11,4 ± 1,81 | 2,6 ± 1,08 | 41,8 ± 3,51 |
| ACD32B | 13,2 ± 3,74 | 5,9 ± 1,45 | 2,5 ± 2,77 |
| Quercetina | 85,3 ± 2,28 | 98,7 ± 0,72 | 98,4 ± 0,20 |
| Rutina | 75,1 ± 0,62 | 85,5 ± 0,81 | 79,9 ± 1,29 |

A partir da análise dos resultados, conclui-se que os derivados não possuem atividade antioxidante, já que na concentração única de 100 µg/mL a porcentagem de inibição em todos os ensaios foi menor que 50 %, quando comparados com o padrão de ácido gálico (DPPH e ABTS) e quercetina (antioxidante celular).

A atividade antioxidante de um flavonóide, ou seja, de inibir eventos mediados por radicais livres é conduzida pela sua estrutura química. Os múltiplos grupos de hidroxilas presentes na estrutura conferem à molécula esse potencial antioxidante (FLORA, 2009).

Um estudo realizado por MATERSKA (2008) relatou que a alta atividade anti-radical da quercetina na reação com o radical DPPH, mostrou-se determinada pela presença de 1,2-dihidroxibenzeno (anel B) em sua estrutura. Também foi demonstrado que derivados da quercetina que foram glicosilados na posição 4' tiveram uma diminuição relevante na capacidade de doação de H.

ZIELIŃSKA e colaboradores (2010) realizaram os ensaios de DPPH e ABTS da rutina e descreveram que sua atividade antioxidante está mais correlacionada com a capacidade do anel B ser mais facilmente oxidável do que o anel A. A rutina e a quercetina são flavonóides estruturalmente similares, diferindo apenas no açúcar presente na rutina, por essa razão, ambas possuem a mesma correlação entre a capacidade antioxidante e as suas estruturas (LADAN *et al.*, 2017).

Essa característica estrutural, compartilhada pelas substâncias supracitadas, foi modificada e, possivelmente, está relacionada com a incapacidade antioxidante dos derivados, já que a ACD32A teve uma hidroxila substituída por um grupamento benzila na posição 4' e a ACD32B teve duas hidroxilas substituídas nas posições 7 e 4'.

Além dos ensaios colorimétricos, a capacidade antioxidante também foi avaliada em células. Entretanto, os derivados também não apresentaram inibição acima de 50%, apesar da ACD32A ter exibido um aumento dessa inibição, quando comparada com os resultados obtidos pelos ensaios de DPPH e ABTS. É provável que esse aumento seja em razão do método ser mais biologicamente relevante, pois avalia os compostos antioxidantes sob aspectos de absorção e metabolismo dentro das células (WOLFE e LIU, 2007).

5.5 Atividade inibitória sobre a glicação de colágeno

Os AGES têm ganhado destaque por sua relação com o envelhecimento da pele, em razão do comprometimento do colágeno. Alguns desses AGES, como falado anteriormente, possuem propriedades autofluorescentes, o que permite a sua avaliação *in vitro* (GKOGKOLOU e BÖHM, 2012).

A atividade inibitória sobre a glicação de colágeno da ACD32A e ACD32B foram avaliadas e comparadas com a quercetina e rutina que já possuem relatos na literatura como agentes antiglicantes dessa proteína (CERVANTES-LAUREAN *et al.*, 2006).

Na figura 22 é possível observar que na formação dos AGEs via glioxal, a ACD32A apresentou inibição significativa na concentração de 100 µg/mL, sendo essa inibição superior a quercetina e ao padrão de rutina. Observa-se uma inibição dose-dependente em todas as substâncias, pois conforme a diminuição da concentração, houve uma diminuição da inibição da formação dos AGEs.

Nas concentrações de 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ os derivados exibiram inibição superior a quercetina. No entanto, os derivados só apresentaram inibição acima de 50 % até a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ e a rutina e a quercetina tiveram inibição acima de 50% até a concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Nesta via, a ACD32A, ACD32B, quercetina e rutina apresentaram CI_{50} , igual a $12,18 \pm 4,47$, $21,27 \pm 2,04$, $11,64 \pm 0,68$ e $5,75 \pm 1,76$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

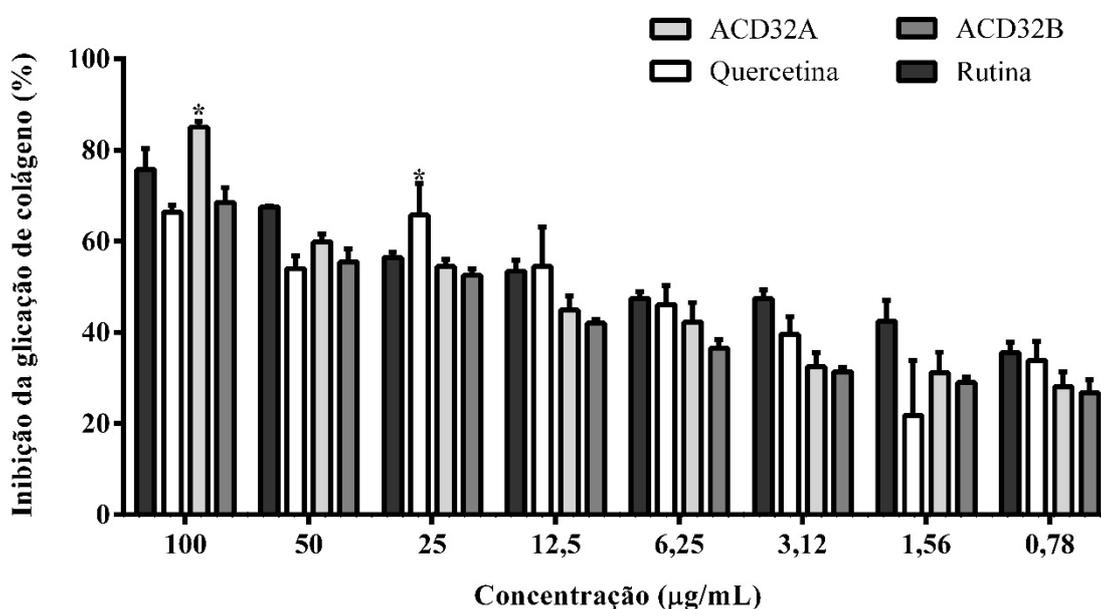


Figura 22. Inibição da glicação de colágeno com glicoxal para a formação dos AGEs pela ACD32A, ACD32B, quercetina nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781 $\mu\text{g/mL}$. Dados são expressos como média \pm desvio padrão (em relação ao padrão de rutina) analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. * $p < 0,05$

De acordo com YOUNUS e ANWAR (2016), o glicoxal, uma espécie de carbonila reativa, é formado durante o processo de peroxidação lipídica, auto-oxidação de glicose e na via poliol, contribuindo para a formação de AGEs. Sendo assim, os derivados conseguiram prevenir a ligação entre essa espécie reativa de carbonila com o grupamento amina presente no colágeno nas concentrações de 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de forma superior a quercetina. Ressalta-se que a ACD32A teve uma porcentagem de inibição superior que o próprio padrão de rutina na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Na literatura, relata-se que a atividade antiglicante de flavonóides pode estar associada com sua atividade antioxidante. Entretanto, a não atividade antioxidante dos derivados sugere que mais estudos sejam feitos, a fim de avaliar outros meios de inibição desses AGEs (YOUNUS e ANWAR, 2016).

Diante disso, pode-se dizer que os derivados apresentam potencial para o desenvolvimento de produtos que previnam o envelhecimento cutâneo, por meio da inibição de glicação de colágeno.

5.6 Atividade inibitória sobre as enzimas elastase, hialuronidase e tirosinase

Os derivados ACD32A e ACD32B, na concentração única de 100 µg/mL, não apresentaram atividade inibitória sobre enzimas elastase, hialuronidase e tirosinase.

Na inibição da elastase, os derivados não apresentaram atividade, enquanto o padrão utilizado, ácido elágico, apresentou média de 99% de inibição.

Na atividade inibitória da enzima hialuronidase, os derivados exibiram médias com valores menores que 50 %. A ACD32A apresentou inibição de 15,2 % e a ACD32 de 3,7 %, enquanto o padrão utilizado, heparina, apresentou média de 88 % de inibição.

Assim como na inibição da elastase, os derivados não apresentaram atividade, enquanto o padrão utilizado, ácido kójico, apresentou média de 81 % de inibição.

5.7 Citotoxicidade pelo ensaio do Alamar Blue

A quercetina, rutina e os derivados ACD32A e ACD32B foram avaliados quanto à citotoxicidade pelo método de alamar blue, a fim de determinar não só as concentrações a serem utilizadas nos ensaios celulares, como também tornar conhecida a segurança dos derivados em testes *in vitro*.

Uma curva concentração-resposta de cada substância foi construída para verificar quais as concentrações seguras para os outros ensaios celulares. As substâncias foram testadas na linhagem de MRC-5, a mesma utilizada para os outros ensaios, nas concentrações de 200, 100, 75, 50, 25, 1 µg/mL nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

Na figura 23, observa-se que em todos os tempos, o derivado ACD32A apresentou, até a concentração de 75 µg/mL, viabilidade superior a 80%, e mesmo na concentração máxima de 200 µg/mL, teve viabilidade superior a 68%.

A ACD32B apresentou, no tempo de 24 h, viabilidade superior a 80% somente na concentração de 1 µg/mL. Entretanto, na concentração máxima de 200 µg/mL ainda apresentou viabilidade acima de 57 %. Nos tempos de 48 e 72 h, exibiu viabilidade superior a 80% até a concentração de 50 µg/mL e na concentração máxima de 200 µg/mL, teve viabilidade superior a 63%.

No tempo de 24 h, a quercetina apresentou viabilidade acima de 80% mesmo na concentração mais alta. Em 48 e 72 h, essa viabilidade permaneceu até a concentração de 100 µg/mL. E, em 200 µg/mL, a viabilidade foi superior a 68% (48H) e 64% (72H).

Em todos os tempos, a rutina exibiu viabilidade acima de 80%, até a concentração de 100 µg/mL, e acima de 62% na concentração máxima.

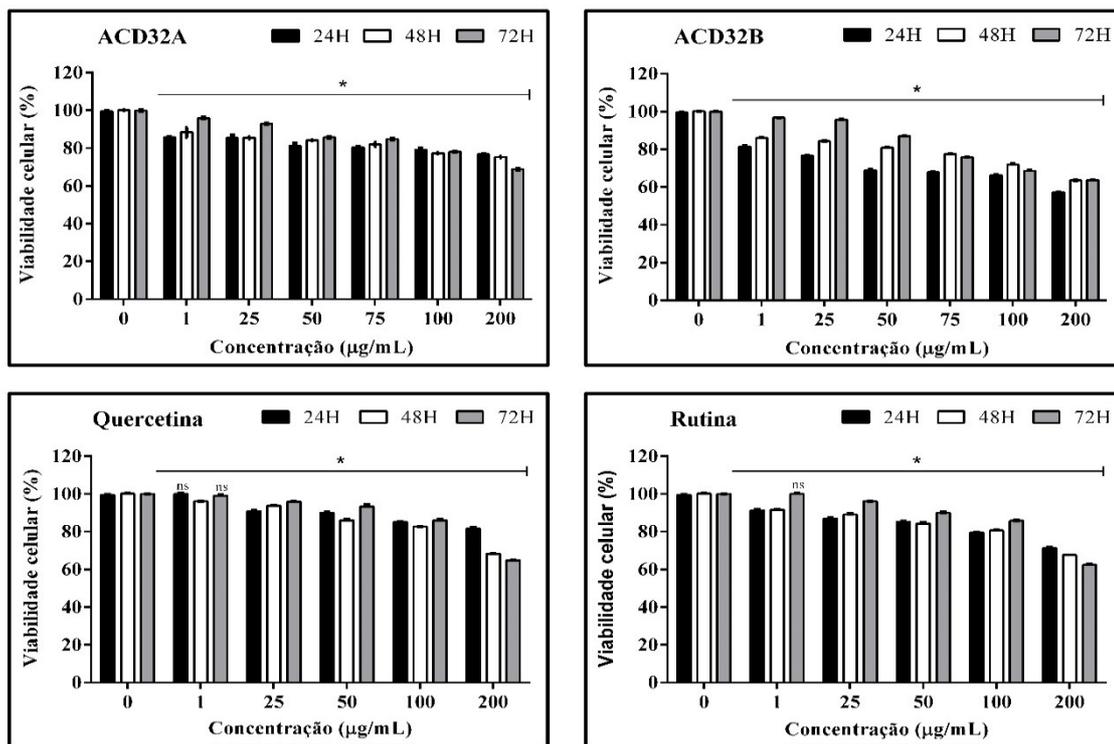


Figura 23. Avaliação da citotoxicidade dos derivados ACD32A, ACD32B, quercetina e rutina. As células testadas foram MRC-5 por 24, 48 e 72 horas. Dados expressos como média \pm desvio padrão (em relação ao controle de DMSO) analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. * $p < 0,05$ e nenhuma significância (ns)

Segundo a padronização internacional dos testes de citotoxicidade *in vitro*, que determina alguns parâmetros quantitativos e qualitativos de avaliação da citotoxicidade, quando a porcentagem de células viáveis está acima de 80% considera-se nenhuma citotoxicidade; entre 80 e 60% baixa; 60 e 40% moderada e abaixo de 40% alta citotoxicidade (ISO 10993-5, 2009).

De acordo com estes parâmetros, as substâncias apresentaram baixa citotoxicidade nas concentrações em todos os tempos testados. As substâncias não apresentaram nenhuma citotoxicidade até a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, exceto a ACD32B que apresentou baixa citotoxicidade a partir de 50 $\mu\text{g/mL}$ (24 h) e 75 $\mu\text{g/mL}$ (48 e 72 h). Dessa forma, escolheu-se a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ para ser utilizada nos ensaios posteriores, já que essa concentração não iria interferir nos resultados.

5.8 Avaliação sobre a proliferação celular

No processo de envelhecimento cutâneo, diversos fatores intrínsecos e extrínsecos contribuem para uma diminuição da produção de fibroblastos. Os fibroblastos são o principal tipo celular responsável pela formação de constituintes da matriz. Dentre esses constituintes está o colágeno, uma proteína de grande relevância na regeneração dos tecidos. A diminuição das células de fibroblastos enfraquece a estrutura dos tecidos da pele, promovendo o seu ressecamento, a diminuição da elasticidade e capacidade de cicatrização de feridas. Dessa forma, o estudo do estímulo da proliferação celular fibroblástica é de grande importância para substâncias de aplicação cosmética (GOMES, 2014).

Na figura 24, observa-se que no tempo de 24 horas o derivado ACD32A exibiu o valor de $14,2 \times 10^4$ números de células, enquanto o DMSO e a rotina apresentaram o valor de $13,1 \times 10^4$, ou seja, a célula tratada com derivado foi mais estimulada a proliferar, quando comparada ao controle sem nenhum tratamento e com a rotina.

Com 48 horas de tratamento, a ACD32A também teve o número de células maior que o DMSO, apresentando o valor de 23×10^4 , ficando bem próxima ao padrão de vitamina C, com $24,1 \times 10^4$ números de células. A vitamina C desempenha funções importantes, como o aumento da proliferação e migração de fibroblastos dérmicos e, conseqüentemente, na formação de colágeno. Este conhecimento é frequentemente usado como razão para a adição de vitamina C a aplicações tópicas, o que indica, possivelmente, que esse derivado também pode ter essa capacidade (PULLAR *et al.*, 2017).

Apesar dos derivados não apresentarem uma proliferação significativa, quando comparados ao controle de DMSO, esses apresentaram aumento no número de células maior que a quercetina em todos os tempos de tratamento, demonstrando uma provável melhora na capacidade proliferativa dos derivados em relação a quercetina.

Um estudo realizado por REN e colaboradores (2016) relatou que a quercetina bloqueou a ativação de fibroblastos intersticiais no rim. Em outra literatura, a quercetina impediu o aumento da proliferação celular e o teor de colágeno tipo I em fibroblastos pulmonares (HAN *et al.*, 2009).

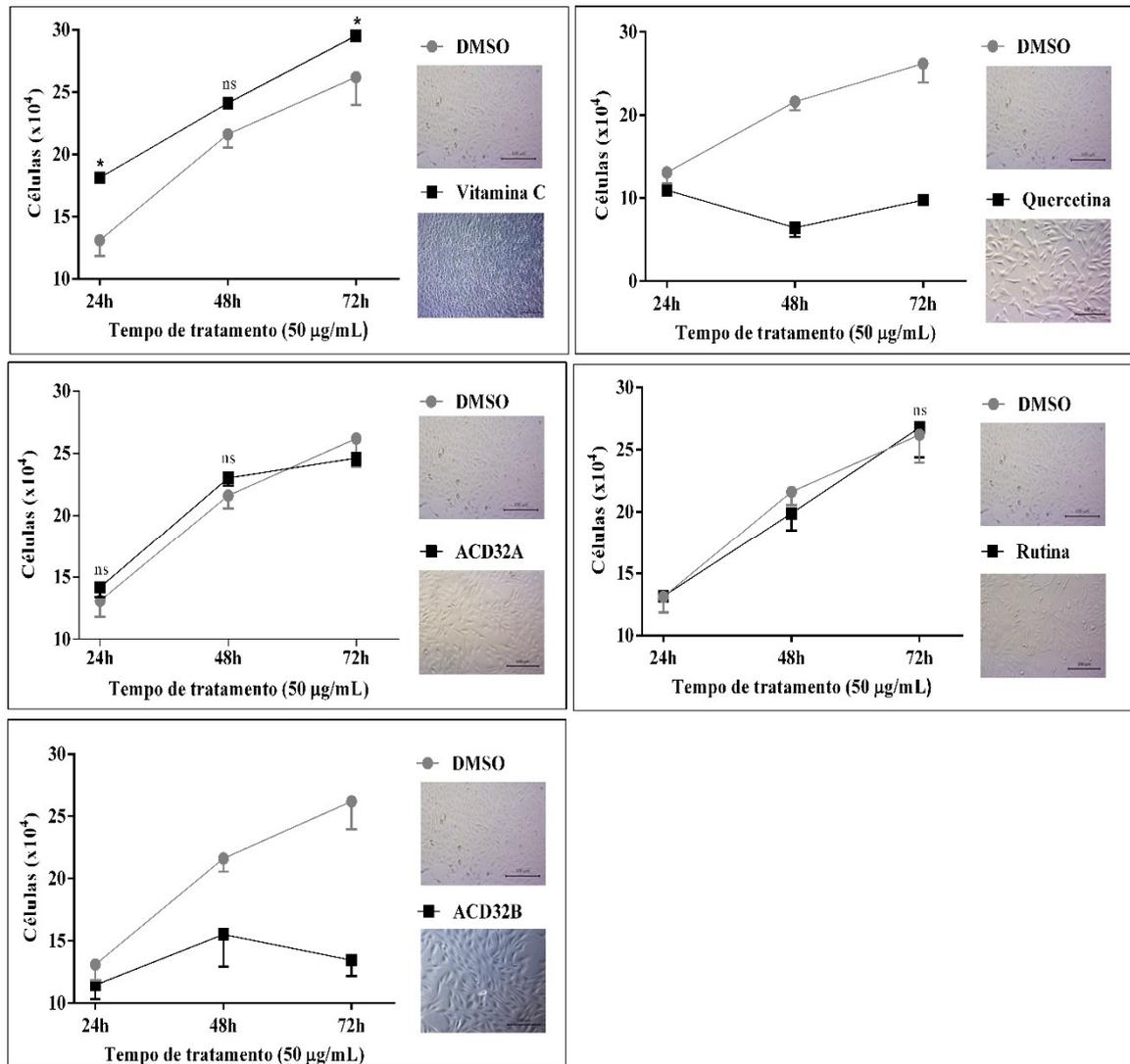


Figura 24. Avaliação da proliferação celular da ACD32A, ACD32B, quercetina, rutina e o padrão de vitamina C em células MRC-5. O gráfico indica a proliferação das células após incubação com amostras por 24, 48 e 72 h e a fotomicrografia mostra a proliferação no tempo de 48 h, conforme avaliado por coloração com azul de tripan. Dados expressos como média \pm desvio padrão (em relação ao controle de DMSO) analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. * $p < 0,05$ e nenhuma significância (ns)

5.9 Ensaio de migração *in vitro*

De forma complementar ao ensaio de proliferação celular, realizou-se a avaliação da atividade migratória de células fibroblásticas tratadas com a ACD32A, ACD32B, quercetina e rutina nos tempos de 24, 48 e 72 h.

Como citado nos resultados de proliferação, as células de fibroblastos possuem grande importância na reparação de tecidos, já que é responsável pela síntese de colágeno. Essa proteína participa ativamente da cicatrização tecidual, tornando-se importante a pesquisa de substâncias que estimulem os fibroblastos a migrarem para região do dano tecidual, para que seja feita a síntese de colágeno (TRAINOTTI e SCHEITHAUER, 2017).

Após a formação de uma estria na monocamada de fibroblastos, mimetizando um dano tecidual, avaliou-se a capacidade das substâncias de estimularem a migração dessas células até a regeneração dessa monocamada (Figura 25).

No tempo de 0 h, observa-se que em todas as amostras foi realizada uma estria, sobre a monocamada de células MRC-5, com os mesmos tamanhos. Após 24h de tratamento, as células nas bordas do espaço recém-criado, foram mais estimuladas a migrarem em direção ao centro da área para que a estria fosse fechada pelos derivados, quando comparados ao DMSO, quercetina e rutina.

Em 48 horas, o padrão de vitamina C apresentou fechamento da estria um pouco mais acentuado que os derivados. Entretanto, essa mesma migração não foi observada na quercetina e rutina, já que apresetaram quase o mesmo espaço que as células não tratadas (DMSO).

Com 72 horas de tratamento, a quercetina ainda apresentou um nítido espaço vazio maior que o DMSO, enquanto as células tratadas com os derivados e a rutina, apresentaram fechamento semelhante ao padrão de vitamina C.

Diante do exposto, nota-se que os derivados tiveram um desempenho melhor que a quercetina neste ensaio. Possivelmente, como relatado na discussão anterior, o não estímulo da proliferação de fibroblastos pela quercetina pode ter dificultado a migração dessas células para o fechamento do espaço vazio (HAN *et al.*, 2009; REN *et al.*, 2016).

Diante desse resultado, pode-se inferir que os derivados possuem potencial para o desenvolvimento de produtos que auxiliem no ressecamento, no aumento da elasticidade e no reparo de danos teciduais.

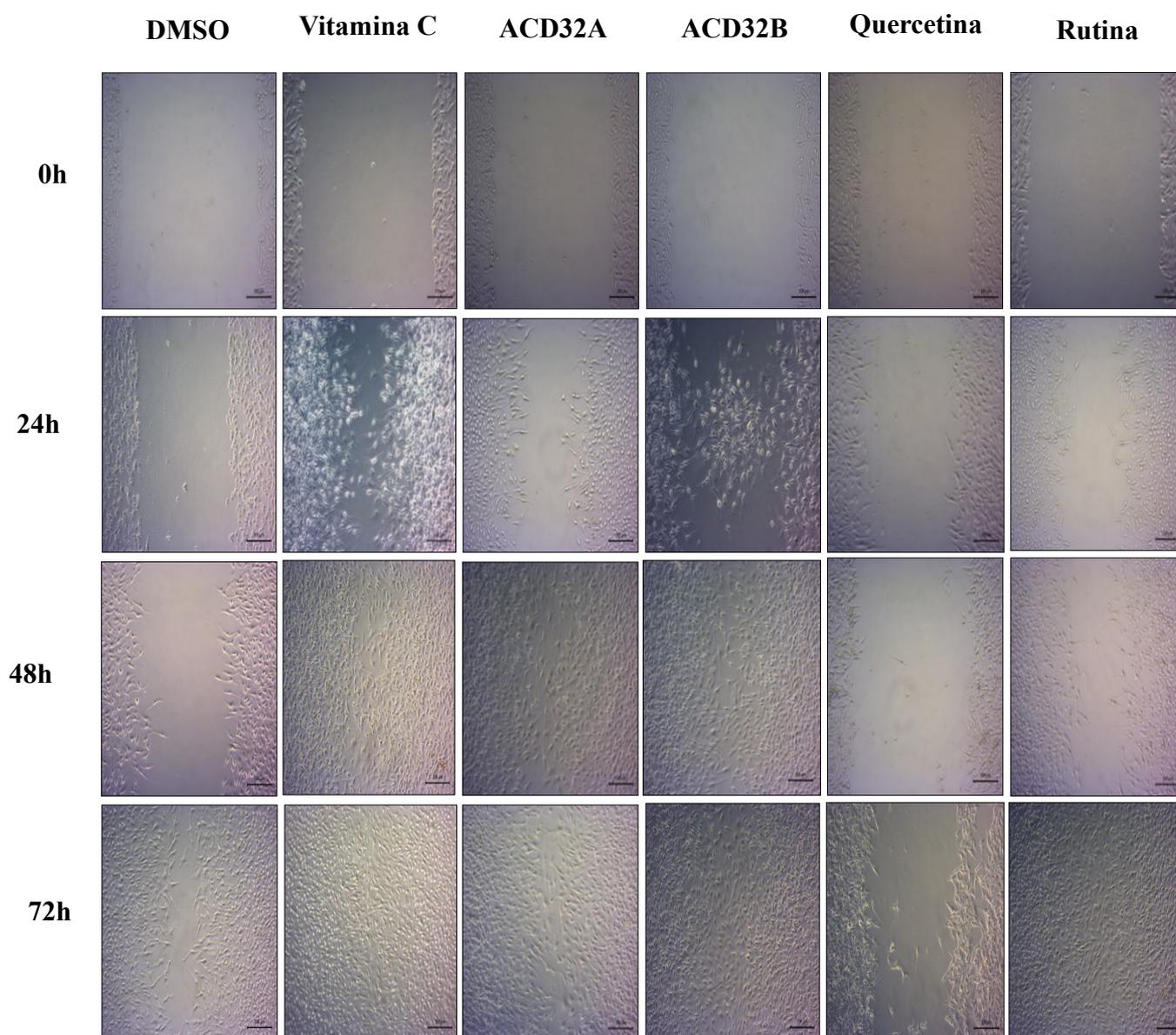


Figura 25. Avaliação da migração celular da ACD32A, ACD32B, quercetina, rutina e o padrão de vitamina c em células MRC-5. A fotomicrografia indica a migração das células para o fechamento de uma estria, mimetizando um dano tecidual, em uma monocamada de células após incubação com amostras por 24, 48 e 72 h.

5.10 Ensaio de inibição da collagenase por método zimográfico *in vitro*

As MMPs participam de forma significativa do envelhecimento da pele, seja este causado por fatores extrínsecos ou intrínsecos. Essas enzimas são responsáveis por degradarem componentes da MEC, principalmente o colágeno. Com o envelhecimento, essas MMPs podem estar desreguladas, promovendo uma degradação acentuada desses componentes. Nesse sentido, o desenvolvimento de inibidores de MMPs podem representar uma estratégia terapêutica importante para auxiliar no antienvelhecimento da pele (SÁRDY, 2009).

Esse ensaio avaliou a inibição da atividade das collagenases de *Clostridium hystolicum* pela ACD32A, ACD32B, quercetina e rutina, quando comparadas com o controle negativo (DMSO).

Observa-se na Figura 26 que todas as substâncias tiveram inibição máxima da atividade de collagenase de forma significativa no tempo de 24 horas, exceto a ACD32A e a quercetina que exibiram 51 e 78% de inibição máxima da banda 1 de collagenase no tempo 48 horas.

As maiores inibições da collagenase ocorreram no tempo 24 horas, onde a ACD32B apresentou inibição de 55% (banda 1) e 47% (banda 2) de collagenase e a rutina 36% (banda 1) e 58% (banda 2), quando comparadas com o controle negativo (DMSO), que foi utilizado para observar 100% de atividade da collagenase.

No geral, os derivados apresentaram melhores inibições da atividade de collagenase do que a quercetina, tornando-os possíveis inibidores de MMPs envolvidas no envelhecimento, já que a quercetina já foi citada na literatura como um agente inibidor de MMPs responsáveis pela degradação de colágenos importantes para a integridade da pele (SONG *et al.*, 2001; VIJAYABABU *et al.*, 2006).

Entretanto, faz-se necessário estudos de inibição de MMPs de forma mais específica, com intuito de diferenciar que tipos de colágenos serão degradados por essas enzimas, já que as MMPs degradam colágenos de tipos diferentes (SÁRDY, 2009).

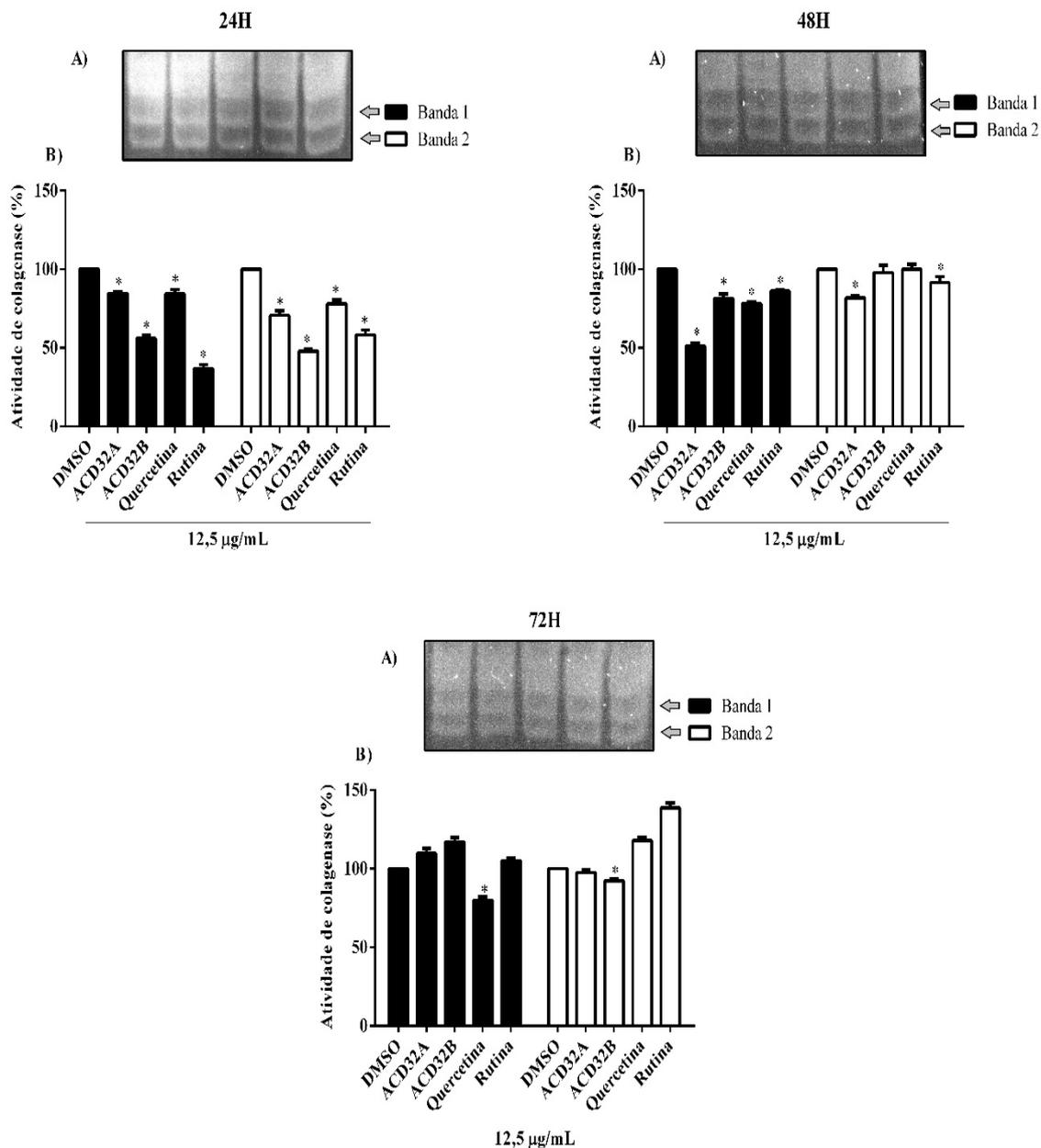


Figura 26. Avaliação dos efeitos da ACD32A, ACD32B, quercetina e rutina na inibição da atividade de colagenase de *Clostridium Hystoliticum*. A) A foto indica as bandas 1 e 2 de colagenase. B) Gráficos de inibição das bandas 1 e 2 de colagenase pelas amostras (12,5 µg/mL) após a coleta do sobrenadante das células MRC-5 nos tempos de 24, 48 e 72 h. A análise foi realizada utilizando o software ImageJ®. Dados são expressos como média ± desvio padrão (em relação ao controle DMSO) analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. *p < 0,05

5.11 Previsão do coeficiente de partição e permeação cutânea por SwissADME

O presente trabalho visa a utilização dos derivados para aplicação cosmética. Dessa forma, foi realizado um ensaio *in silico* para prever a permeação cutânea dos derivados, comparados com a quercetina e a rutina.

De acordo com os dados obtidos pelo SwissADME (Tabela 4) os derivados apresentaram coeficiente de partição (Log P), que representa a lipossolubilidade da substância, maior que a quercetina e a rutina. Entretanto, o derivado ACD32B exibiu maior Log P com valor de 4,41.

No coeficiente de permeabilidade da pele (Log Kp) os melhores resultados também foram aqueles obtidos pela ACD32A (-6,31) e ACD32B (-5,57). Novamente, a ACD32B foi a que exibiu melhor resultado dentre as substâncias avaliadas.

Tabela 4. Avaliação *in silico* do coeficiente de partição e permeação cutânea da ACD32A, ACD32B, quercetina e rutina por SwissADME.

| Amostras | Log P (coeficiente de partição) | Log Kp (permeabilidade cutânea) |
|-------------------|--|--|
| ACD32A | 2,88 | -6,31 cm/s |
| ACD32B | 4,41 | -5,57 cm/s |
| Quercetina | 1,23 | -7,05 cm/s |
| Rutina | -1,12 | -10,26 cm/s |

O coeficiente de partição descreve como uma substância é distribuída entre dois solventes imiscíveis, sendo uma fase orgânica (octanol) e uma fase aquosa. Eles são utilizados não só como uma medida da lipossolubilidade da substância, mas também uma forma de avaliar a sua permeabilidade à membrana. A penetração pelas membranas ocorre de acordo com a solubilidade dos ativos, quanto menor o coeficiente de partição óleo/água, menor é a penetração na pele (ALVES, 2015; BANNAN *et al.*, 2016)

No estudo de ARAÚJO (2016) foi realizada a síntese de novos derivados de flavonóides, onde esses apresentaram coeficiente de partição maior do que seus flavonóides de origem, sugerindo que o aumento da lipofilicidade pode facilitar suas aplicações tecnológicas em meios lipofílicos.

O Log K_p é um modelo adaptado de Potts e Guy, que encontraram K_p linearmente correlacionada com tamanho molecular e lipofilicidade. Quanto mais negativo o log K_p, menos permeável à pele é a molécula (DAINA *et al.*, 2017).

Por meio desses resultados, pode-se dizer que a síntese, possivelmente, melhorou a lipossolubilidade, assim como a permeabilidade na pele dos derivados. Já que o uso tópico da quercetina é freqüentemente dificultado pela sua baixa permeabilidade cutânea (CHESSA *et al.*, 2011).

A partir desses resultados, sugere-se um melhor estudo da permeabilidade cutânea desses derivados como, por exemplo, a avaliação pelo ensaio de células de Franz, que busca avaliar de forma mais específica a permeação de substâncias com potencial para uso tópico.

6 CONCLUSÃO

Por meio da reação de substituição entre a rutina e o brometo de benzila, foi possível a obtenção de dois novos derivados da quercetina: ACD32A (2-(4-(benziloxi)-3-hidroxifenil)-3,5,7-tri-hidroxi-4H-cromen-4-ona) e ACD32B (7-(benziloxi)-2-(4-(benziloxi)-3-hidroxifenil)-3,5-di-hidroxi-4H-cromen-4-ona).

Os derivados não possuem atividade antioxidante. Contudo, inibiram a formação dos produtos finais de glicação avançada em colágeno pela via do glioxal.

A ACD32A e ACD32B apresentaram baixa citotoxicidade aos fibroblastos humanos até a concentração de 200 µg/mL.

Os derivados melhoraram o efeito estimulante sobre a proliferação e migração de fibroblastos, quando comparados a quercetina.

Foi demonstrado que os derivados também exibiram melhor inibição de metaloproteinases de matriz, quando comparados a quercetina, no ensaio de collagenase por método zimográfico.

Quanto ao coeficiente de partição e permeabilidade cutânea, os derivados, possivelmente, tiveram sua permeação melhorada, pois apresentaram valores acima daqueles obtidos pela quercetina.

Esses resultados observados no presente estudo mostram que os derivados possuem potencial para diversas aplicações cosméticas relacionadas à prevenção do envelhecimento da pele.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIHPEC. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. **Crescimento do setor de cosméticos demanda frete**. 2017. Disponível em: <<https://abihpec.org.br/2017/12/crescimento-do-setor-de-cosmeticos-demanda-frete/>>. Acesso em: 07 de janeiro de 2018, às 11:06 h.

AGUILAR, M. I. **HPLC of peptides and proteins: methods and protocols**. Vol. 251. Totowa: Humana Press, p. 9, 2004.

AHMED, S.A.; GOGAL JR., R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

ALDAG, C.; TEIXEIRA, D. N.; LEVENTHAL, P. S. Skin rejuvenation using cosmetic products containing growth factors, cytokines, and matrikines: A review of the literature. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 9, p. 411–419, 2016.

ALVES, N. C. Penetração de ativos na pele: revisão bibliográfica. **Amazônia: Science & Health**, v. 3, n. 4, p. 36–43, 2015.

ANDERSON, B. E. **Coleção Netter de ilustrações médicas: sistema tegumentar**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, v. 4, p. 4-5, 2014.

ANTUNES, A. N. V. Sistemas nanoparticulados aplicados à dermocosmética. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal, 2016.

ARAÚJO, M.E.M.B. Biossíntese de novos derivados acilados de flavonoides e avaliação *in vitro* de sua bioatividade. **Tese** (Doutorado em Ciências da Saúde) Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2016.

ARCT, J.; PYTKOWSKA, K. Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. **Clinics in Dermatology**, v. 26, n. 4, p. 347–357, 2008.

ASCIONE, F. *et al.* Comparison between fibroblast wound healing and cell random migration assays *in vitro*. **Experimental Cell Research**, v. 347, n. 1, p. 123–132, 2016.

BANNAN, C. C. *et al.* Calculating partition coefficients of small molecules in octanol/ water and cyclohexane/water. **J Chem Theory Comput**, v. 12, n. 8, p. 4015–4024, 2016.

BARBOSA, J. H. P. *et al.* A determinação dos produtos avançados de glicação (AGES) e de lipoxidação (ALES) em alimentos e em sistemas biológicos: avanços, desafios e perspectivas. **Quim. Nova.**, v. 39, n. 5, p. 608–620, 2016.

BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. E. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 940–950, 2008.

BIDAUX, G. *et al.* Epidermal TRPM8 channel isoform controls the balance between keratinocyte proliferation and differentiation in a cold-dependent manner. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, p. 3345–3354, 2015.

BOELSMA, E.; HENDRIKS, H.; ROZA, L. Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids. **The American journal of clinical nutrition**, v. 73, n. 1, p. 853–864, 2001.

BOGDANOWICZ, P. *et al.* Results from *in vitro* and *ex vivo* skin aging models assessing the antiglycation and anti-elastase MMP-12 potential of glycylglycine oleamide. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 9, p. 143–150, 2016.

BRYANT, R.; NIX, D. **Acute and chronic wounds: current management concepts**. 5^a ed. St. Louis: Elsevier, p. 40-43, 2016.

CARRINO, D. A. *et al.* Age-related changes in the proteoglycans of human skin. Specific cleavage of decorin to yield a major catabolic fragment in adult skin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 19, p. 17566–17572, 2003.

CASAGRANDE, R. *et al.* Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, n. 1, p. 21–27, 2006.

CERVANTES-LAUREAN, D. *et al.* Inhibition of advanced glycation end product formation on collagen by rutin and its metabolites. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, n. 8, p. 531–540, 2006.

CHEN, Q. X.; KUBO, I. Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 14, p. 4108–4112, 2002.

CHESSA, M. *et al.* Effect of penetration enhancer containing vesicles on the percutaneous delivery of quercetin through new born pig skin. **Pharmaceutics**, v. 3, n. 3, p. 497–509, 2011.

CHONDROGIANNI, N. *et al.* Anti-ageing and rejuvenating effects of quercetin. **Experimental Gerontology**, v. 45, n. 10, p. 763–771, 2010.

CONTRERAS, C. L.; NOVAKOFSKI, K. C. Dietary advanced glycation end products and aging. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1247–1265, 2010.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. October 2016, p. 1–13, 2017.

DAVID, A.V.A.; ARULMOLI, R.; PARASURAMAN, S. Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. **Pharmacognosy Reviews**, v. 10, n. 20, p. 84-89, 2016.

DEGENHARDT, T. P. *et al.* Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. **Kidney International**, v. 61, n. 3, p. 939–950, 2002.

DEWICK, P.M. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach.**, p. 121-166, 2002.

DRAELOS, Z. D. **Cosmetic Dermatology: Products and Procedures.** 2^a ed. Oxford: Wiley-Blackwell, p. 13-20, 2016.

DZIAŁO, M. *et al.* The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, n. 2, p. 1–41, 2016.

EBANKS, J. P.; WICKETT, R. R.; BOISSY, R. E. Mechanisms regulating skin pigmentation: The rise and fall of complexion coloration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 9, p. 4066–4087, 2009.

FLORA, S. J. S. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 4, p. 191–206, 2009.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique.** Wiley-Liss: Nova York, 1994.

GAMBÔA, J. A. J. Sentidos de corpo para maiores de 60 anos: Um estudo de representações sociais com praticantes de atividade física. **Tese** (Doutorado em saúde coletiva) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

GANCEVICIENE, R. *et al.* Skin anti-aging strategies. **Dermato-Endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 308–319, 2012.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Histologia essencial.** Rio de Janeiro: Elsevier, p. 210, 2012.

GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens - Structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 12, p. 1531–1546, 2003.

GKOGKOLOU, P.; BÖHM, M. Advanced glycation end products: key players in skin ageing?. **Dermato-Endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 259–270, 2012.

GOMES, C. Z. Utilização da espectroscopia de fluorescência para mensuramento de moléculas autofluorescentes em indivíduos diabéticos. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

GOMES, F.T.A. Avaliação das atividades citotóxica, genotóxica e sobre a proliferação celular do óleo-resina de eperua oleifera (fabaceae). **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

GOPALAKRISHNANA, A. *et al.* Quercetin accelerated cutaneous wound healing in rats by increasing levels of VEGF and TGF- β 1. **Ind J Exp Biol**, v. 54, n. 3, p. 187–195, 2016.

HAHN, H. J. *et al.* Instrumental evaluation of anti - aging effects of cosmetic formulations containing palmitoyl peptides, Silybum marianum seed oil, vitamin E and other functional ingredients on aged human skin. **Exp. Ther. Med.**, v. 12, n. 2, p. 1171–1176, 2016.

HAN, W. *et al.* α -Defensins increase lung fibroblast proliferation and collagen synthesis via the β -catenin signaling pathway. **FEBS Journal**, v. 276, n. 22, p. 6603–6614, 2009.

HEARING, V. J. JR. Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): purification, properties, and reactions catalyzed. **Methods Enzymol**, n. 142, p. 154-165, 1987.

ISO 10993-5. In: Biological evaluation of medical devices —**Tests for *in vitro* cytotoxicity**. International Organization for Standardization, 2009.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, C. **Histologia Básica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 357-359, 2013.

KANASHIRO, A. *et al.* Elastase release by stimulated neutrophils inhibited by flavonoids: Importance of the catechol group. **Z. Naturforschung**, v. 62, n. 5–6, p. 357–361, 2007.

KIERSZENBAUM, A.L.; TRES, L.L. **Histologia e biologia celular: uma introdução a patologia**. 3^a ed. São Paulo: Elsevier, p. 351-354, 2012.

KIM, J. A. *et al.* Antiphotaging effect of chitoooligosaccharides on human dermal fibroblasts. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, v. 28, n. 6, p. 299–306, 2012.

KULAR, J. K.; BASU, S.; SHARMA, R. I. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. **Journal of Tissue Engineering**, v. 5, p. 1-17, 2014.

KUMAR, S. V. *et al.* An update on prodrugs from natural products. **Asian Pac J Trop Med**, v. 7, n. 1, p. 54-59, 2014.

KUMAR, S.; PANDEY, A. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientif World J.**, v. 4, n. 2, p. 32–48, 2013.

LADAN, M. K. *et al.* FT-IR-based method for rutin, quercetin and quercitrin quantification in different buckwheat (*Fagopyrum*) species. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.

LEE, D. H.; OH, J. H.; CHUNG, J. H. Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging. **Journal of Dermatological Science**, v. 83, n. 3, p. 174–181, 2016.

LEE, J. H.; KIM, G. H. Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 7, p. 212-217, 2010.

LIMTRAKUL, P. *et al.* Anti-aging and tyrosinase inhibition effects of Cassia fistula flower butanolic extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2016.

LORENCINI, M. *et al.* Active ingredients against human epidermal aging. **Ageing Research Reviews**, v. 15, n. 1, p. 100–115, 2014..

MAITY, N. *et al.* Exploring *Tagetes erecta* Linn flower for the elastase, hyaluronidase and MMP-1 inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1300–1305, 2011.

MARCHESAN, E. D. *et al.* Ação dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae) sobre a atividade hialuronidase. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, v. 10, n. 2, p. 63–66, 2006.

MARIONNET, C.; TRICAUD, C.; BERNERD, F. Exposure to non-extreme solar UV daylight: Spectral characterization, effects on skin and photoprotection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, p. 68–90, 2015.

MATERSKA, M. Quercetin and its Derivatives: Chemical Structure and Bioactivity - a Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 58, n. 4, p. 407–413, 2008.

MCCOOK, J. P. *et al.* *In vitro* inhibition of hyaluronidase by sodium copper chlorophyllin complex and chlorophyllin analogs. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 8, p. 443–448, 2015.

MEDSCAPE. Skin Anatomy: Overview, Epidermis, Dermis. 2015. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/1294744-overview#a2>>. Acesso em: 18 de janeiro de 2017, às 10 h.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant Activity. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211–219, 2004.

MONARO, E. L. F. Inibição da formação de produtos da reação de Maillard por extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em sistemas modelo alimento. **Dissertação** (Mestrado em Ciências), Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MOUFFOK, S. *et al.* Chemical constituents of *Centaurea omphalotricha* Coss. & Durieu ex Batt. & Trab. **Records of Natural Products**, v. 6, n. 3, p. 292–295, 2012.

N'DA, D. D. Prodrug strategies for enhancing the percutaneous absorption of drugs. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20780–20807, 2014.

NGUYEN, H. X. *et al.* Tyrosinase inhibitory activity of flavonoids from *Artocarpus heterophyllous*. **Chemistry Central Journal**, v. 10, n. 1, p. 4–9, 2016.

ODETTI, P. R. *et al.* Comparative trial of N-acetyl-cysteine, taurine, and oxerutin on skin and kidney damage in long-term experimental diabetes. **Diabetes**, v. 52, n. 2, p. 499–505, 2003.

ORTMANN, C.F. Avaliação da estabilidade de extratos, frações e flavonoides C-glicosídeos presentes em *Cecropia glaziovii*. **Dissertação** (Mestrado em Farmácia) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

OTT, C. *et al.* Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biology**, v. 2, n. 1, p. 411–429, 2014.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: An overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, n. 47, p. 1–15, 2016.

PAPAKONSTANTINO, E.; ROTH, M.; KARAKIULAKIS, G. A key molecule in skin aging Hyaluronic acid. **Dermato-Endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 253–258, 2012.

PEDROSA, T. N. Avaliação do potencial de derivados do ácido kójico sobre a melanogênese e o envelhecimento cutâneo. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

PITTAYAPRUEK, P. *et al.* Role of matrix metalloproteinases in Photoaging and photocarcinogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, 2016.

PUBCHEM. Benzyl Bromide. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/benzyl_bromide#section=Top>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2018, às 20 h

PULLAR, J. M.; CARR, A. C.; VISSERS, M. C. M. The roles of vitamin C in skin health. **Nutrients**, v. 9, n. 8, 2017.

PUTTE, L. V.; SCHRIJVER, S.; MOORTGAT, P. The effects of advanced glycation end products (AGEs) on dermal wound healing and scar formation: a systematic review. **Scars, Burns & Healing**, v. 2, p. 1-14, 2016.

QUAN, T. *et al.* Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 14, n. 1, p. 20–24, 2009.

REN, J. *et al.* Quercetin inhibits fibroblast activation and kidney fibrosis involving the suppression of mammalian target of rapamycin and β -catenin signaling. **Scientific Reports**, v. 6, n. March, p. 1–11, 2016.

RUTTER, K. *et al.* Green Tea Extract Suppresses the Age-Related Increase in Collagen Crosslinking and Fluorescent Products in C57BL/6 Mice. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 73, n. 6, p. 453–460, 2003.

SALAMONE, M. *et al.* Comprehensive analysis of a *Vibrio parahaemolyticus* strain extracellular serine protease VpSP37. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–19, 2015.

SÁRDY, M. Role of matrix metalloproteinases in skin ageing. *Connective Tissue Research*, v. 50, n. 2, p. 132–138, 2009.

SASAKI, N. *et al.* Advanced glycation end products in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. **American Journal of Pathology**, v. 153, n. 4, p. 1149–1155, 1998.

SCHMID, D.; MUGGLI, R.; ZÜLLI, F. Collagen glycation and skin aging. **Cosmetics and Toiletries Manufacture Worldwide**, p. 6, 2002.

SIN, B. Y.; KIM, H. P. Inhibition of Collagenase by Naturally-Occurring Flavonoids. **Arch. Pharm. Res.**, v. 28, n. 10, p. 1152–1155, 2005.

SINGH, R. *et al.* Advanced glycation end-products: A review. **Diabetologia**, v. 44, n. 2, p. 129–146, 2001.

SINGH, R. *et al.* Identification of the Position of Mono-O-Glucuronide of Flavones and Flavonols by Analyzing Shift in Online UV Spectrum (λ_{max}) Generated from an Online Diode-arrayed Detector. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 17, p. 9384–9395, 2010.

SNEDEKER, J. G.; GAUTIERI, A. The role of collagen crosslinks in ageing and diabetes - The good, the bad, and the ugly. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v. 4, n. 3, p. 303–308, 2014.

SNOEK-VAN BEURDEN, P. A.; VON DEN HOFF, J. W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **BioTechniques**, v. 38, n. 1, p. 73–83, 2005.

SONG, L. *et al.* Quercetin inhibits matrix metalloproteinase-1 expression in human vascular endothelial cells through extracellular signal-regulated kinase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 391, n. 1, p. 72–78, 2001.

SOTO, M.; FALQUÉ, E.; DOMÍNGUEZ, H. Relevance of Natural Phenolics from Grape and Derivative Products in the Formulation of Cosmetics. **Cosmetics**, v. 2, n. 3, p. 259–276, 2015.

STANDRING, S. **Gray's anatomia: a base anatômica da prática clínica**. 40^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 147, 2010.

STANIFORTH, V. *et al.* Ferulic acid, a phenolic phytochemical, inhibits UVB-induced matrix metalloproteinases in mouse skin via posttranslational mechanisms. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 5, p. 443–451, 2012.

STONIK, V. A. Marine Natural Products: A Way to New Drugs. **Acta naturae**, v. 1, n. 2, p. 15–25, 2009.

THRING, T. S. A.; HILI, P.; NAUGHTON, D. P. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 9, n. 1, p. 27, 2009.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Corpo humano: fundamentos de anatomia e fisiologia**. 10^a ed. Porto Alegre: Artmed Editora, p. 99-104, 2016.

TRAINOTTI, S.; SCHEITHAUER, M. Process, disturbances and improvements of wound healing. **HNO.**, v. 65, n. 9, p. 777-778, 2017.

TU, P. T. B.; TAWATA, S. Anti-oxidant, anti-aging, and anti-melanogenic properties of the essential oils from two varieties of *Alpinia zerumbet*. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 16723–16740, 2015.

VAMPUTTE, C. L.; REGAN, J. L.; RUSSO, A. F. **Anatomia e fisiologia de Seeley**. 10^a ed. Porto Alegre: AMGH, p. 145-148, 2016.

VIJAYABABU, M. R. *et al.* Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostate cancer cells (PC-3). **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 287, n. 1–2, p. 109–116, 2006.

WAHYUNINGRUM, R. *et al.* Screening of potential free radicals scavenger and antibacterial activities of Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk). **Tropical Life Sciences Research**, v. 27, n. 1, p. 161-166, 2016.

WAUTIER, J. L.; GUILLAUSSEAU, P. J. Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. **Diabetes Metab**, v. 27, n. 5, p. 535–542, 2001.

WEBMD. An Overview of the Skin. 2016. Disponível em: <<http://www.webmd.com/beauty/cosmetic-procedures-overview-skin#1-3>>. Acesso em: 17 de janeiro de 2017, às 16:40 h.

WOLFE, K.; LIU, R. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 8896-8907, 2007.

YOUNG, B.; HEATH, J. W. **Wheater histologia funcional: texto e atlas em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 157-171, 2001.

YOUNUS, H.; ANWAR, S. Review Article Prevention of non-enzymatic glycosylation (glycation): Implication in the treatment of diabetic complication. **International Journal of Health Sciences**, v. 10, n. 2, 2016.

ZHANG, C.; KIM, S.-K. Matrix Metalloproteinase Inhibitors (MMPi)s from Marine Natural Products: the Current Situation and Future Prospects. **Marine Drugs**, v. 7, n. 2, p. 71–84, 2009.

ZHANG, Y. *et al.* Apigenin induces dermal collagen synthesis via smad2/3 signaling pathway. **European Journal of Histochemistry**, v. 59, n. 2, p. 98–106, 2015.

ZHANG, Y. *et al.* Synthesis of quercetin 3-O-β-d-apiofuranosyl-(1→2)-[α-l-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-d-glucopyranoside. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 24, p. 3154–3157, 2011.

ZHENG, Y. Z. *et al.* Antioxidant activity of quercetin and its glucosides from propolis: A theoretical study. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

ZIELINSKA, D.; SZAWARA-NOWAK, D.; ZIELINSKI, H. Determination of the antioxidant activity of rutin and its contribution to the antioxidant capacity of diversified buckwheat origin material by updated analytical strategies. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 60, n. 4, p. 315–321, 2010.

ZOUBOULIS, C. C.; MAKRANTONAKI, E. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. **Clinics in Dermatology**, v. 29, n. 1, p. 3–14, 2011.

ZUANAZZI, J. A. S. *et al.* Flavonoides. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2011.