

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

OBTENÇÃO DE UM NOVO DERIVADO DA RUTINA E SUA
AVALIAÇÃO PARA APLICAÇÃO COSMÉTICA

BÁRBARA JANAÍNA PAULA DA SILVA

MANAUS

2020

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

BÁRBARA JANAÍNA PAULA DA SILVA

OBTENÇÃO DE UM NOVO DERIVADO DA RUTINA E SUA
AVALIAÇÃO PARA APLICAÇÃO COSMÉTICA

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

Orientador: Profº Dr. Emerson Silva Lima

MANAUS

2020

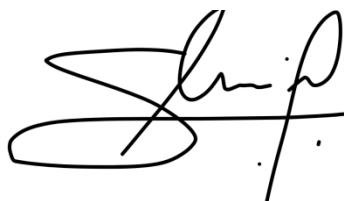
“Obtenção de um novo derivado da rutina e sua avaliação para aplicação cosmética”

DISCENTE: BÁRBARA JANAÍNA PAULA DA SILVA

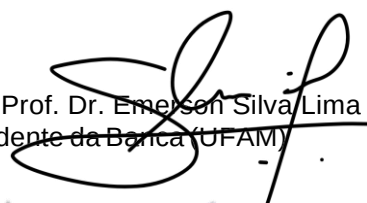
PARECER:

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

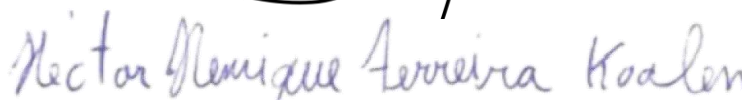
Manaus, AM, 29/10/2020.



A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:



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



Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen Membro
(UEA)



Profa. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos
Membro (UFAM)

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).

S586o Silva, Bárbara Janaína Paula da
Obtenção de um novo derivado da rutina e sua avaliação
para aplicação cosmética / Bárbara Janaína Paula da Silva.
2020
91 f.: il. color; 31 cm.

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

1. Rutina. 2. Derivado. 3. Benzilado. 4. Envelhecimento.
5. Cosmético. I. Lima, Emerson Silva. II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, agradeço pela força, saúde, sustento e sabedoria para superar as dificuldades e por me proporcionar a conclusão deste mestrado.

Aos meus pais, Arlene e Arnour, meus maiores incentivadores, agradeço pelo amor, paciência, e por todo investimento que fizeram na minha educação, obrigada por acreditarem em mim.

Aos meus demais familiares, agradeço pelo apoio, torcida e incentivo, obrigada por compreenderem minha ausência em muitos churrascos da família.

Ao Junior, agradeço pelo amor, amizade, paciência, cumplicidade e parceria, por me incentivar a ir além daquilo que eu sonho, obrigada por me acalmar nos meus momentos de desespero e por não me deixar desistir.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa Biophar, sou imensamente grata por toda ajuda, apoio, conselhos, brincadeiras, risadas e guloseimas, vocês trouxeram boas energias durante esses anos. Em especial aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado e me ajudaram: Leilane, Kríscia, Giovana, Elenn e Bianca.

Ao meu orientador Prof. Dr. Emerson Lima, agradeço pela oportunidade e confiança a mim atribuída ao ingressar-me em seu grupo de pesquisa, obrigada pela orientação, contribuição e paciência na realização deste trabalho, sua paixão pela pesquisa é inspiradora.

À Prof. Dra. Ana Cristina, agradeço por toda ajuda na síntese, sua contribuição foi fundamental neste projeto.

À Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da UFAM, em especial Msc. Edinilze que nos auxiliou na parte química.

Às minhas amigas Camila, Rose, Stephanny, obrigada pela amizade, incentivo e companheirismo.

Aos demais professores do programa de pós-graduação que de forma direta e indireta contribuíram para a minha formação, meu muito obrigada.

À Universidade Federal do Amazonas, agradeço pela infraestrutura dos laboratórios para o desenvolvimento deste projeto.

À FAPEAM, agradeço pela bolsa de estudos a mim concedida.

À todos que torceram por mim, muito obrigada.

RESUMO

O aumento da expectativa de vida e os fatores ambientais tornam-se fontes precursoras do envelhecimento cutâneo, este tem sido o alvo de inúmeros estudos na indústria cosmética e farmacêutica, buscando aumentar a produção de dermocosméticos provenientes de produtos naturais, pois o reino vegetal possui uma ampla biodiversidade de matéria-prima. A rutina é um flavonoide, de origem vegetal, que possui muitas propriedades de interesse para aplicação cosmética auxiliando na prevenção do envelhecimento, mesmo com inúmeras atividades farmacológicas, seus efeitos são limitados devido sua baixa lipossolubilidade e biodisponibilidade variável, limitando sua penetração em uma membrana biológica. Diante disto, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção de um novo derivado da rutina, com atividades biológicas destinada à aplicação cosmética e auxiliando na melhoria da biodisponibilidade desta molécula. O derivado benzilado da rutina foi preparado por reação de substituição dos hidrogênios e dos anéis aromáticos da rutina por benzilação com brometo de benzila e o produto desta síntese foi codificado como ACD32F2. A elucidação estrutural do composto foi realizada por meio de RMN. Utilizando os ensaios de DPPH, ABTS e antioxidante celular, o derivado apresentou uma moderada atividade antioxidante apenas no sistema biológico. No ensaio de glicação *in vitro*, a ACD32F2 inibiu a formação de produtos finais de glicação avançada em colágeno pela via do glioxal, com CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) igual a $2,45 \pm 0,47$. Com relação a atividade proliferativa a ACD32F2 estimulou a proliferação e migração celular e aumentou a síntese de colágeno em fibroblastos, desenvolvendo atividade superior a rutina em ambos ensaios. Por meio do estudo *in silico*, o derivado mostrou um aumento na permeação cutânea, apresentando valores superiores ao da rutina. Com relação às análises de segurança, a ACD32F2 não apresentou citotoxicidade em linhagens celulares de fibroblastos e queratinócitos humano, na concentração de $200\mu\text{g/mL}$. No ensaio de genotoxicidade a mesma não induziu dano genotóxico em fibroblastos. Na avaliação de irritação em modelo de pele reconstruída a ACD32F2 não induziu efeito irritativo. O nosso estudo apresentou a obtenção de um novo derivado benzilado da rutina e aspectos da sua eficácia e segurança para aplicação como um novo bioativo cosmético, porém, mais estudos devem ser realizados para elucidar o mecanismo de ação envolvido com as suas potenciais atividades biológicas.

Palavras-chave: rutina, derivado, benzilado, envelhecimento, cosmético.

ABSTRACT

The increase in life expectancy and environmental factors become precursor sources of skin aging, this has been the target of numerous studies in the cosmetic and pharmaceutical industry, seeking to increase the production of dermocosmetics from natural products, as the plant kingdom has a wide biodiversity of raw materials. Rutin is a flavonoid, of plant origin, which has many properties of interest for cosmetic application helping to prevent aging, even with numerous pharmacological activities, its effects are limited due to its low liposolubility and variable bioavailability, limiting its penetration into a biological membrane. . In view of this, the present work aimed to obtain a new derivative of rutin, with biological activities intended for cosmetic application and helping to improve the bioavailability of this molecule. The benzylated derivative of rutin was prepared by replacing the hydrogens and aromatic rings of rutin by benzylation with benzyl bromide and the product of this synthesis was coded as ACD32F2. Structural elucidation of the compound was carried out by NMR. Using the DPPH, ABTS and cellular antioxidant assays, the derivative showed a moderate antioxidant activity only in the biological system. In the in vitro glycation assay, ACD32F2 inhibited the formation of advanced glycation end products in collagen via the glyoxal pathway, with IC₅₀ (µg / mL) equal to 2.45 ± 0.47 . Regarding the proliferative activity, ACD32F2 stimulated cell proliferation and migration and increased the synthesis of collagen in fibroblasts, developing activity superior to rutin in both tests. Through the in silico study, the derivative showed an increase in skin permeation, presenting values higher than that of rutin. With regard to safety analyzes, ACD32F2 did not show cytotoxicity in human fibroblast and keratinocyte cell lines, at a concentration of 200µg / mL. In the genotoxicity assay, it did not induce genotoxic damage in fibroblasts. In the evaluation of irritation in a reconstructed skin model, ACD32F2 did not induce an irritant effect. Our study presented the obtaining of a new benzylated derivative of rutin and aspects of its efficacy and safety for application as a new cosmetic bioactive, however, further studies must be carried out to elucidate the mechanism of action involved with its potential biological activities.

Keywords: rutin, derivative, benzylated, aging, cosmetic.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAPH - dihidrocloro de 2,2'-azobis (2metilpropionamidina)

AcOEt - Acetato de etila

Abs – Absorbância

AH – Ácido hialurônico

BnBr - Brometo de benzila

CAM - Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar

CCD – Cromatografia de camada delgada

CCPD – Cromatografia de camada delgada preparativa

CI₅₀ – Concentração inibitória média

cm - Centímetros

CoA – Coenzima A

CO₂ –Dióxido de carbono

DAD - Detector de arranjo de diodos

DCFH-DA - 2,7-diclorofluoresceína-diacetato

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMF - Dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DOPA – 3,4-diidroxifenilalanina

DPPH - 2,2-difenil1-picril-hidrazila

DPM – Desvio padrão da média

FCF – Faculdade de Ciências Farmacêuticas

g - Gramas

GAGS – Glicosaminoglicanos

h – Hora

HACAT – Linhagem de queratinócitos

HCL – Ácido clorídrico

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

Hz - Hertz

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

K₂CO₃ - Carbonato de potássio

LMP – Baixo ponto de fusão

M – Molar

Ma – Miliamper

MEC – Membrana extracelular

mg - Miligrama

min – Minutos

mL – Mililitro

mol - Molaridade

mM – Milimolar

MMP – Metaloproteinases de matriz

MRC-5 – Linhagem de fibroblasto humano

MS - Espectrometria de massas

MTT – (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoliobrometo

m/z – razão massa sobre a carga

NaOH - Hidróxido de sódio

Na₂SO₄ - Sulfato de sódio

nm – Nanômetro

NMP – Ponto de fusão normal

OH - Radical hidroxil

O₂⁻ - Ânion superóxido

PBS – Tampão fosfato-salino

pH – Potencial hidrogeniônico

ppm – Partes por milhão

RMN – ressonância magnética nuclear

RPM – Rotações por minuto

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SFB – Soro fetal bovino

TIMPS – Inibidores tecidual de metaloproteinases

TMS - Sinal do tetrametilsilano

TPSA - Área de superfície polar topológica

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

UV – Ultravioleta

V – Voltagem

v – Volume

X – Vezes

μg – Micrograma

μL – Microlitros

μM - Micromolar

% – Porcentagem

°C – Graus Celsius

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem das camadas da pele.....	22
Figura 2. Estrutura química da quercetina.....	36
Figura 3. Estrutura química da rutina.....	38
Figura 4. CCD da ACD32F2 (RBn – rutina benzilada) comparada com a rutina (RUT), a qual foi utilizada como produto de partida.....	52
Figura 5. Derivado benzilado da rutina - 7-(benziloxi)-2-(4-(benziloxi)-3-hidroxifenil)-3,5-dihidroxi-4H-cromen-4-ona, C ₂₉ H ₂₂ O ₅	53
Figura 6. Espectro de RMN ¹ H da amostra ACD32F2 (11,74 T, CDCl ₃ , TMS).....	55
Figura 7. Expansão da região do espectro de RMN ¹ H de 5.0 ppm a 8.0 ppm da amostra ACD32F2 (11,74 T, CDCl ₃ , TMS).....	56
Figura 8. Ampliação do mapa de Correlação COSY da amostra ACD32F2 (11,74 T, CDCl ₃ , TMS).....	57
Figura 9. Ampliação do mapa de Correlação HSQC da amostra ACD32F2 (11,74 T, CDCl ₃ , TMS).....	57
Figura 10. Ampliação do mapa de Correlação HMBC da amostra ACD32F2 (11,74 T, CDCl ₃ , TMS).....	58
Figura 11. Avaliação da citotoxicidade do derivado ACD32F2 e rutina. As células testadas foram MRC-5 e HACAT, com 200µg/mL das substâncias testes, no tempo de tratamento de 24, 48 e 72 horas. Os dados estão expressos em porcentagem de viabilidade celular com média ± desvio padrão (em relação ao controle de DMSO) e analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. *p < 0,05.....	59
Figura 12. Avaliação da atividade antioxidante celular em linhagem de fibroblasto tratada com ACD32F2 e rutina, na concentração de 50, 100 e 200 µg/mL. Os dados estão expressos em porcentagem de inibição de ROS com média ± desvio padrão e analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. *p < 0,05, foi considerado estatisticamente significativo ao comparar a ACD32F2 com a rutina.....	62
Figura 13. Inibição da glicação de colágeno através da formação dos AGEs pela via glioxal. As substâncias testes, foram a ACD32F2, Rutina e a Aminoguanidina (controle positivo), nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781 µg/mL. Dados são expressos em porcentagem de inibição da glicação de colágeno com média ± desvio padrão, analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett *p < 0,05, foi considerado estatisticamente significativo ao comparar ACD32F2 com a rutina.....	64
Figura 14. Avaliação da proliferação celular da ACD32F2, rutina e o padrão de vitamina C em células MRC-5. O gráfico indica a proliferação das células após exposição com amostras por 24, 48 e 72 h. Na imagem A temos a fotomicrografia da proliferação nos três tempos. A	

imagem B representa quantitativamente a proliferação com Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett, *p < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo ao comparar a ACD32F2 com a rutina.....66

Figura 15. Avaliação da migração celular de fibroblastos expostos ao derivado ACD32A, rutina e a vitamina C (padrão). A fotomicrografia indica a migração das células para o fechamento de um risco, mimetizando um dano tecidual, em uma monocamada de células após tratamento com as amostras testes pelo tempo de 24, 48 e 72 h.....69

Figura 16. Curva de colágeno utilizada como controle para o cálculo da dosagem de colágeno da ACD32F2, rutina e ácido ascórbico.....70

Figura 17. Avaliação da síntese de colágeno em fibroblastos estimulados com 100 μ g/ mL de ACD32F2, rutina e vitamina C. Os dados estão expressos em concentração de colágeno em μ g/ mL, com média $\pm$ desvio padrão, analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett *p < 0,05, foi considerado estatisticamente significativo ao comparar ACD32F2 com a rutina.....71

Figura 18. Avaliação do efeito genotóxico em fibroblastos após tratamento de 3 horas com ACD32F2, rutina e EMS. A) Fotomicrografias dos danos em fibroblastos induzido pelas substâncias testes. B) Gráfico referente ao índice de dano obtido pelo ensaio cometa em pH alcalino após tratamento com as substâncias. Dados estão apresentados com média $\pm$ desvio padrão, analisados por one-way ANOVA seguido do teste de teste de Dunnett *p < 0,05, foi considerado estatisticamente significativo ao comparar ACD32F2 e Rutina com o controle positivo EMS.....72

Figura 19. Frequência do dano causado ao DNA pelo ensaio cometa em pH alcalino. A frequência do dano é expressa em porcentagem (%), sendo a variação do grau 0 a 4 de fragmentação do DNA. *p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo ao comparar ACD32F2 com EMS. Os dados foram analisados por two-way ANOVA seguido do teste de teste de Dunnett.....73

Figura 20. Avaliação da irritação cutânea em modelo de pele reconstruída, tratada com ACD32F2, SDS (controle positivo) e meio de cultura (controle negativo). A) Imagem da pele reconstruída tratada com o controle negativo e com a ACD32F2. B) Dados da porcentagem de viabilidade celular, estão expressos em média $\pm$ desvio padrão, onde foram analisados por one-way ANOVA seguido do teste de teste de Dunnett *p < 0,05, foi considerado estatisticamente significativo ao comparar ACD32F2 com o controle positivo.....75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: subclasse, estrutura e diferentes tipos de polifenóis.....	35
Tabela 2. Dados de RMN em CDCl ₃ (11,74 T). Os dados de ¹³ C foram atribuídos com auxílio dos experimentos de HSQC, HMBC DEPT.....	54
Tabela 3. Resultado da avaliação da atividade antioxidante através dos ensaios de DPPH e ABTS. A ACD32F2, Rutina, Ácido gálico (padrão), encontram-se na concentração única de 100 µg/mL e os dados estão expressos em porcentagem de inibição com D.P.M.....	61
Tabela 4. Avaliação in silico do coeficiente de partição e permeação cutânea da ACD32F2 e rutina por SwissADME.....	76

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 Pele.....	21
2.1.1 Epiderme	22
2.1.2 Derme	25
2.1.3 Hipoderme.....	26
2.2 Envelhecimento cutâneo	27
2.2.1 Metaloproteinases (MMPs).....	28
2.2.2 Ácido Hialurônico (glicosaminoglicano)	30
2.2.3 Tirosinase	31
2.2.4 Elastina	32
2.3 Flavonoides	33
2.3.1 Quercetina	35
2.3.2 Rutina	37
3. OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo Geral.....	40
3.2 Objetivos específicos	40
4. METODOLOGIA.....	41
4.1 Síntese.....	41
4.2 Caracterização química.....	41
4.2.1 Análises espectrométricas/espectroscópicas	41
4.3 Cultivo celular.....	42
4.4 Viabilidade celular	42
4.5 Ensaio antioxidantes.....	43
4.5.1 Atividade sequestrante do radical DPPH	43
4.5.2 Ensaio de varredura do radical ABTS.....	44
4.5.3 Atividade Antioxidante Celular.....	44
4.6 Atividade inibitória sobre a glicação de colágeno	45
4.7 Avaliação sobre a proliferação celular.....	45
4.8 Ensaio de migração in vitro	46
4.9 Quantificação de colágeno da cultura celular de fibroblastos	47
4.10 Avaliação da genotoxicidade através do teste do cometa.....	48
4.11 Ensaio de avaliação de irritação cutânea in vitro em modelo de pele reconstruída.....	49

4.11.1 Geração da pele humana reconstruída.....	49
4.11.2 Ensaio de avaliação de irritação cutânea in vitro	50
4.12 Avaliação do coeficiente de partição e permeação cutânea in silico.....	50
4.13 Análise estatística	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1 Análises químicas da ACD32F2.....	52
5.1.1 Análise do Espectro de RMN da ACD32F2	52
5.2 Citotoxicidade.....	58
5.3 Atividade Antioxidante.....	60
5.4 Atividade inibitória sobre a glicação de colágeno	63
5.5 Avaliação sobre a proliferação celular.....	65
5.6 Ensaio da migração in vitro	67
5.7 Quantificação de colágeno da cultura celular de fibroblastos	69
5.8 Avaliação da genotoxicidade através do teste do cometa.....	71
5.9 Ensaio de avaliação de irritação cutânea in vitro em modelo de pele reconstruída.....	74
5.10 Avaliação do coeficiente de partição e permeação cutânea in silico.....	76
6. CONCLUSÃO.....	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1. INTRODUÇÃO

A pele é o órgão de revestimento da parte externa do corpo e é conhecida como o maior órgão do corpo humano, constituída por um arranjo complexo de células e tecidos que fornece suporte estrutural, físico e biológico, desenvolvendo função de barreira, sendo essencial para a proteção do organismo. Além desta função, a pele apresenta ações voltadas na nutrição, absorção, cicatrização de feridas e regeneração tecidual, termorregulação, controle hemodinâmico, informação sensorial, síntese de vitaminas, pigmentação e atividades contra agentes infecciosos e radiações ultravioletas (HWA; BAUER; COHEN, 2011; WONG et al., 2016).

Com a exposição tecidual a fatores extrínsecos e intrínsecos, há um desequilíbrio celular danificando as propriedades morfológicas e biológicas da pele. Essas alterações nos padrões funcionais dos tecidos, quando não revertido, pode desencadear inúmeras complicações levando a quadro patológicos graves, como melasma, dermatite, melanoma e vitiligo, decorrentes da redução da síntese dos componentes da matriz extracelular (MEC), do acúmulo de radicais livres, da delimitação da função imunológica e do fotoenvelhecimento (ALDAG; TEIXEIRA; LEVENTHAL, 2016).

O envelhecimento cutâneo se desenvolve por fontes biológicas e ambientais, ocorrendo de forma gradativa e contínua através do encolhimento e diminuição da espessura dos tecidos e da junção dermo-epidérmica, redução da produção das células constituintes da pele (fibroblastos e queratinócitos) afetando a síntese de colágeno e elastina, responsáveis pela sustentação e elasticidade dos tecidos (LANGTON et al., 2019). Com a exposição a radiações ultravioletas, há um aumento exacerbado na expressão de enzimas primordiais na degradação das proteínas e fibras celulares, que desencadeiam o enrugamento da pele, através da metaloproteinase (MMP), elastase, tirosinase e os glicosaminoglicano, como o ácido hialurônico (RODRIGUEZ; FOLGUERAS; ÓTIN, 2017).

O aumento da expectativa de vida e os fatores ambientais tornam-se fontes precursoras do envelhecimento cutâneo, este tem sido o alvo de inúmeros estudos na indústria cosmética e farmacêutica, onde se busca aumentar a produção de dermocosméticos provenientes de produtos naturais, pois o reino vegetal possui uma ampla biodiversidade de matéria-prima com diversas estruturas químicas, a fim de elevar a segurança destes produtos no mercado com baixas toxicidades, sem dado tecidual.

Os flavonoides, por exemplo, são produtos naturais classificados como polifenóis, sendo encontrado de forma abundante no reino vegetal. Na literatura há indícios de que os flavonoides, por serem de origem natural, possuem baixa toxicidade e são conhecidos por suas ações terapêuticas, atuando, como agentes antioxidantes e anti-inflamatórios, apresentando atividades anticancerígenas, antivirais, antimicrobianas e outras atividades biológicas favoráveis à saúde (AMALESH; GOURANGA; SANJOY, 2011; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

A família dos flavonoides se subdivide em classes, onde encontra-se a rutina (3, 3', 4', 5,7-penta-hidroxiflavona-3-ramnoglucósido), pertencente à subclasse dos flavonóis. É conhecida como um derivado da quercetina (quercitin-3-rutinosídeo) e por suas inúmeras propriedades farmacoterapêuticas (GANESHPURKAR; SALUJA, 2017). Na pele, a rutina apresenta efeito sobre inflamações como dermatite e auxilia na proteção contra raios ultravioletas, consequentemente atuando na eliminação das causas e efeitos do envelhecimento cutâneo, fortalecendo a elasticidade e densidade dérmica por meio da regulação de enzimas da matriz extracelular (CHOI et al., 2016; TOMAZELLI et al., 2018).

Mesmo com todas as evidências dos diversos benefícios no uso de compostos fenólicos, a rutina apresenta como principal desvantagem, em seu uso, a baixa lipossolubilidade e biodisponibilidade variável, limitando sua penetração em uma membrana biológica prejudicando seu potencial farmacológico (SINGH et al., 2012). Para aumentar a

eficácia desta classe de polifenóis, são desenvolvidas diversas pesquisas com diferentes estratégias de formulações para auxiliar nesta problemática, através de manipulações com nanoemulsões, nanopartículas, microemulsões, mudanças químicas e estruturais para melhorar sua biodisponibilidade e lipossolubilidade potencializando seus efeitos terapêuticos (NAGULA; WAIRKAR, 2019; KHAN et al., 2019).

Em nosso estudo, a rutina foi modificada estruturalmente para a criação de um derivado semissintético, com características químicas destinadas a uma molécula com propriedades farmacoterapêuticas superior à da molécula de origem, no intuito de melhorar a sua lipossolubilidade, biodisponibilidade e seus efeitos sobre o envelhecimento cutâneo. Diante disto, avaliamos a eficácia e segurança deste derivado através de ensaios in vitro buscando novas alternativas para o não uso de animais, a fim de oferecer a indústria farmacêutica e cosmética um produto, desenvolvido através de um ativo natural, com uma maior taxa de liberação do princípio ativo, aumentando assim sua distribuição em uma possível formulação tópica para a fabricação de um dermocosmético, com ações bloqueadoras dos eventos que desencadeiam o envelhecimento e doenças voltadas aos tecidos da pele.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Pele

A pele, dada como o maior órgão do corpo humano, é também conhecida como excelente barreira contra agentes agressores, impedindo a invasão de substâncias estranhas e protegendo contra danos químicos, físicos, e biológicos como o calor, radiações e infecções. Esse importante órgão faz parte do sistema tegumentar, auxiliando na regulação da temperatura corporal, além da produção de pigmentação, excreção de sais, barreira contra perda excessiva de água e fornece habilidades sensoriais abrangendo sistemas assistenciais que são bases ao corpo, como o sangue, músculos e nervos (BARONI et al., 2012; WONG et al., 2016).

A pele possui diversas características histológicas, diferenciando-a no aspecto liso, fino, grosso, seco, macio, envelhecido, hiper e hipopigmentado, onde é constituída por inúmeros tecidos e diferentes células formando camadas distintas responsáveis pela preservação e manutenção de sua forma estrutural. Este órgão é dividido anatomicamente em uma serie de camadas (figura 1), onde o estrato córneo é a mais externa, atuando como barreira principal de proteção, sendo este produzido na epiderme que é a primeira camada da pele. Localizada de forma adjacente à epiderme tem-se a derme, cuja função está direcionada ao suporte mecânico ou componente conectivo de nutrição da pele (GANCEVICIENE et al., 2012; DESMOND, 2017).

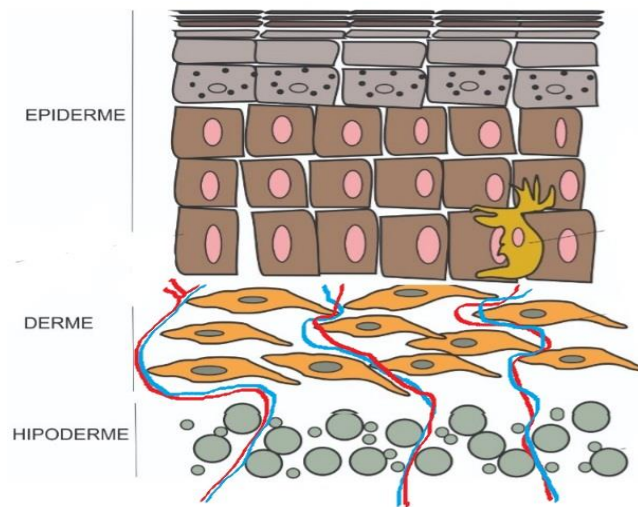


Figura 1. Imagem das camadas da pele.

Fonte: Autor.

2.1.1 Epiderme

A epiderme é a camada mais externa da pele, sendo conhecida como um epitélio renovável devido as características do seu tecido, onde fornece o primeiro contato do corpo humano com o ambiente externo, abrangendo a característica de camada protetora criando uma barreira que impede a exposição do organismo à invasão de patógenos, produtos químicos, radiações e atua no controle da perda excessiva de água transepidérmica (HWA; BAUER; COHEN, 2011; GALLAGHER et al., 2012).

A origem da epiderme se dá na ectoderme, onde é constituída por tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado e escamoso, sendo uma camada avascularizada nutrida por processo de difusão com a derme. A epiderme é formada por diversas camadas, categorizadas como estrato córneo, estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinhoso e o estrato basal ou germinativo. É composta por quatro tipos de células, os queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (BREITKREUTZ; MIRANCEA; NISCHT, 2009).

O estrato córneo é a parte mais externa da epiderme, é um tecido formado por diversas camadas compostas por células cornificadas (corneócitos) e interpostas por lipídios. Suas células são conhecidas por apresentarem características pavimentosas, anucleadas, queratinizadas e escamosas que sofrem o processo de descamação quando ocorre a ação de fricção (MATSUI; AMAGAI, 2015). A queratina é um componente do estrato córneo que confere ao tecido uma resistência físico-química, fornecendo proteção sobre forças mecânicas externas e preservando a saúde do tecido (MENON; CLEARY; LANE, 2012).

O estrato lúcido é a camada intermediária entre o estrato córneo e o granuloso, apresentando células achatadas, sem núcleos e transluzentes, possui eleidina em sua composição, sendo esta uma barreira impermeável. Esse estrato é encontrado em regiões onde a pele é mais espessa, como nas áreas palmar, plantar e nos lábios (JAMES; MILLE, 2019). O estrato granuloso é formado por camadas de células achatadas e losangulares, de coloração mais escura, possuem uma grande quantidade de lipídios e proteínas. No interior de suas células há a presença de grânulos querato-hialinos e de grânulos lamelares, um age como precursor da queratina e a outra forma uma barreira impermeável controlando o fluxo de água (BIDAUX, et al., 2015).

O estrato espinhoso, localiza-se posteriormente ao estrato granuloso, sendo a camada mais espessa da epiderme, possui desmossomos que auxiliam na aderência intercelular junto aos queratinócitos, exibindo também células de Langerhans em sua composição. As células aparentam-se de forma espiculada devido as pontes intercelulares formadas pelos desmossomos, conferindo o aspecto espinhoso, cuja principal função é criar uma maior resistência para a epiderme auxiliando contra os atritos mecânicos externos (GALLO; HOOPER, 2012).

O estrato basal é encontrado junto a ligação dermo-epidermica, conhecido como a camada mais interna da epiderme, exibindo a presença de melanócitos, queratinócitos,

células-tronco e células de Merkel em sua composição. Essa camada também é chamada de estrato germinativo, possui células que estão em constante dinamismo mitótico, sendo conhecidas por queratinócitos basais, necessário para a contínua renovação da epiderme. Suas células apresentam formato cilíndricos, com citoplasma basófilo e núcleos grandes, alongados, ovais e hipercromáticos (CAMPO; MERCÚRIO, 2009; JAMES; MILLE, 2019).

Os queratinócitos são células que estão em constante renovação na epiderme, participam de forma essencial na síntese de queratina e auxiliam na formação dos estratos que compõem a epiderme, sua proliferação se dá no estrato basal, exercendo a atividade de barreira contra a invasão de patógenos e corpúsculos estranhos (SHIRAKATA, 2010). Os melanócitos possuem formato arredondado com prolongamentos ramificados, citoplasma de cor clara e o núcleo com aparência ovoide, estão presentes na junção dermo-epidérmica, localizada no estrato basal da epiderme. Essas células são produtoras de melanina que dão origem a pigmentação da pele, desenvolvendo ação de proteção contra radiações, além disso exercem atividade no sistema imunológico. (BANDYOPADHYAY, 2009).

As células de Langerhans estão presentes, em sua maioria, no estrato espinhoso da epiderme, são provenientes da medula óssea apresentando em sua morfologia inúmeras ramificações, desempenhando função essencial no sistema imunológico da pele, atuando como células apresentadoras de antígenos, identificando, processando e apresentando para os linfócitos T, liberando citocinas pró-inflamatórias ativando a reação imunológica sobre o antígeno (SANTOS et al, 2010). As células de Merkel localizam-se no estrato basal da epiderme onde estão entrelaçadas nos queratinócitos através dos desmossomos em comunicação com fibras nervosas, formando ligações sinápticas junto com as terminações nervosas sensitivas, dando a essas células a função de mecanorreceptores, relacionadas a atividade sensorial da pele (XUE; THAKURIA, 2019).

2.1.2 Derme

A derme é conhecida por ser uma camada vascularizada, rica em tecido conjuntivo, considerada a camada mais consistente da pele, onde encontra-se localizada entre a epiderme e a hipoderme (tecido subcutâneo), sendo responsável pelo suporte de sustentação da epiderme, além de desempenhar algumas atividades fisiológicas na pele, como a elasticidade, resistência, nutrição, oxigenação, manutenção, regulação da temperatura corporal e etc. Em relação a composição da derme, as células primordiais nesta camada são os fibroblastos onde sua ação biológica está voltada na produção de substâncias essenciais na formação da pele, como o colágeno, que dá resistência, e a elastina, responsável pela elasticidade. Outros componentes encontrados nesta camada são as fibras proteicas, glândulas sudoríparas e sebáceas, terminações nervosas e órgão sensoriais que atuam no reconhecimento de ações provenientes do meio externo como o frio, calor, umidade, viscosidade e etc. (WATT; FUJIWARA, 2011; KOROSEC et al., 2019).

A derme possui em sua formação estrutural três camadas identificadas por derme papilar, reticular e perianexial. A derme papilar é conhecida como camada superficial estando diretamente ligada com o estrato basal da epiderme através de numerosas papilas que estão presentes na porção dermoepidérmica, é a camada mais delgada e demasiadamente vascularizada, composta abundantemente por fibroblastos e tecido conjuntivo frouxo, contando também com a presença de fibras finas de colágeno tipo III e elastina em sua composição. A camada reticular é a fração mais interna da derme, sendo a mais condensada por conter tecido conjuntivo denso, com fibras espessas de colágeno tipo I e elastina. A camada perianexial da derme, é encontrada nas proximidades dos anexos cutâneos, de forma estrutural, é semelhante camada papilar (MENDONÇA; RODRIGUES, 2011).

O componente principal que desencadeia as funções fisiológicas da derme é o tecido conjuntivo, nele está presente a matriz extracelular, na qual exerce atividades de comunicação

celular, divisão, crescimento e cicatrização tecidual. A MEC é formada por fibras de colágeno e elastina, emergidas em uma solução viscosa constituída por um gel hidrofílico com polissacarídeos, juntamente com as glicosaminoglicanas e proteoglicanas e as glicoproteínas multiadesivas (laminina e fibronectina) fornecendo resistência à matriz, auxiliando na sustentação dérmica através do envoltório com as proteínas fibrosas (KULAR; BASU; SHARMA, 2014; NARGISA; ALDREDGEA; GUYB, 2018).

A célula mais presente na derme são os fibroblastos, sendo o componente celular essencial do tecido conjuntivo conferindo a conservação do tecido, sintetizando macromoléculas e proteínas, através da MEC, responsáveis no processo de cicatrização, elasticidade, resistência e sustentação da pele, como as fibronectinas, glicosaminoglicanas, proteoglicanas, elastina e o colágeno. São diversos os tipos existentes de colágeno, cada um com sua respectiva função, na qual colágeno é uma proteína presente de forma numerosa na camada dérmica e no organismo humano, o mais constante na derme é o tipo I representando mais de 80% do colágeno nesta camada, atuando na construção de fibras encarregadas em dar suporte à pele, tornando-a resistente ao atrito e forças mecânicas e atuando como uma ancoragem estrutural a inúmeros tecidos (ZHANG et al., 2019).

2.1.3 Hipoderme

A camada da pele mais interna intitulada como um tecido subcutâneo é a hipoderme, localizada posteriormente a derme, é uma camada vascularizada, composta, em sua maior parte, por tecidos adiposos, tecido conjuntivo frouxo com fibras proteicas de elastina e colágeno, vasos linfáticos e terminações nervosas. Esse tecido confere a ação de isolante térmico, reservatório energético, desenvolve uma camada protetora e amortecedora contra choques físicos, atua como fixador da pele a estruturas e anexos vizinhos, exerce também o papel essencial de modelagem corporal (MURPHREE, 2017). A hipoderme pode ser

encontrada de duas formas distintas, a camada areolar formada por adipócitos globulares e volumosos sendo irrigada de forma exacerbada por vasos sanguíneos, é considerada a porção mais superficial da hipoderme auxiliando nas funções biológicas deste tecido através da presença de vasos e terminações nervosas. A camada lamelar é a fração mais interna, constituída por células adiposas pequenas e alongadas com as extremidades mais estreitas que o centro e sobrepostas em lâminas fibrosas, responsáveis pelo armazenamento de gorduras, desencadeando alterações na espessura do tecido, atuando como isolante térmico e contra forças mecânicas (SILVA, 2010; CUNHA; CUNHA; MACHADO, 2014).

2.2 Envelhecimento cutâneo

O envelhecimento cutâneo deriva de processos multifatoriais sendo desencadeado por diversas fontes, sendo elas biológicas (intrínsecas) e ambientais (extrínsecas), onde se desenvolvem de forma gradativa e contínua, expondo a pele a mudanças em sua morfologia e na sua atividade biológica, promovendo inflamação dos tecidos, delimitação da função imune, redução da síntese de proteínas, vitaminas e fluxo sanguíneo, encolhimento e diminuição da espessura da junção dermo-epidérmica, alterações na permeabilidade, fotoenvelhecimento e outras complicações (LANGTON et al., 2019).

O envelhecimento biológico também conhecido como cronológico ou intrínseco ocorre de forma lenta, nos quais são expressados em indivíduos com a idade mais avançada, conferindo aspecto tecidual mais seco, liso e enrugado. Essas características são provenientes de fatores genéticos e hormonais, onde ocorre a redução da produção e da ação das células constituintes da pele, como os fibroblastos e queratinócitos, há uma restrição, também, na síntese de colágeno e elastina apresentando uma redução da síntese de matriz na camada da derme (DESMOND, 2017; SUNDER, 2019).

Em contraposição ao envelhecimento intrínseco temos o extrínseco ou fotoenvelhecimento que é considerado o desenvolvimento rápido do envelhecimento cutâneo, devido a fatores ambientais, como hábitos alimentares, uso de drogas, ingestão de álcool, consumo de cigarro, e o fator primordial é a exposição à radiação ultravioleta (UV), sendo estas consideradas fontes que desencadeiam na pele uma pigmentação desordenada, aspecto áspero e rugas mais grosseiras (VENKATESH; MAYMONE; VASHI, 2019; WANG, WU, 2019).

A pele, no processo de envelhecimento extrínseco, desenvolve alterações rápidas na composição das camadas que a constituem, afetando de forma contínua o tecido conjuntivo, as fibras de colágeno, a elastina e os glicosaminoglicanos que são os elementos primordiais na formação da pele, e são os mais afetados pela irradiação da luz UV, diminuindo a regulação térmica, vascularização e o suprimento nutricionais dos tecidos cutâneos (CHUNG; EUN, 2007). A matriz extracelular também é afetada com os raios UV, expressando um grande número de enzimas nos tecidos envelhecidos, como as metaloproteinases (MMP), elastase, tirosinase e o ácido hialurônico (glicosaminoglicanos), contribuindo para a degradação das proteínas, fibras e vasos sanguíneos, fornecendo a perda das propriedades mecânicas, caracterizando a diminuição da elasticidade e o enrugamento da pele (QUAN; FISHER, 2015).

2.2.1 Metaloproteinases (MMPs)

Como dito anteriormente, a matriz extracelular, através da exposição excessiva do tecido da pele aos raios UV, pode desregular a produção das metaloproteinases, onde essas MMPs são um grupo de enzimas conhecidas como endopeptidases dependentes de zinco e cálcio, que deterioram as proteínas da MEC, como colágenos, elastinas, fibronectinas e proteoglicanos, desencadeando a perda de algumas funções biológicas da pele, levando ao

envelhecimento cutâneo (RODRIGUEZ; FOLGUERAS; ÓTIN, 2017). As metaloproteinases encarregam-se de diversas ações no sistema biológico e o desequilíbrio de sua síntese, além do envelhecimento, pode acarretar no despertar de outras disfunções celulares, sendo precursor de algumas patologias, como artrites, cânceres, inflamações, infarto e neurodegeneração (MIEKUS et al., 2019).

As MMPs são geradas por diferentes modelos celulares, como fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, mastócitos, eosinófilos e macrófagos, onde são categorizadas através da estrutura e particularidade de cada uma, formando subgrupos distintos, sendo eles conhecidos por collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas e MMP de membrana do tipo I. As MMPs pertencentes ao grupo das collagenases são as MMP – 1, 8 e 13 cuja função é clivar especificamente o colágeno fibrilar (tipos I, II, III, VII, VIII, X), as do grupo das gelatinases são as MMP-2 e 9 as quais processam enzimaticamente vários substratos da MEC, sendo estes o colágeno I e IV, no grupo das estromelisinases são encontradas as MMP-3, 10, 11 onde possuem a capacidade de hidrolisar o colágeno IV, sem clivar o colágeno I, as matrilisinas são representadas pelas MMP-7 e 26 que são capacitadas a processar apenas o colágeno IV e o grupo das MMP de membrana do tipo I é representado pelas MMP do tipo 14, 15, 16, 17, 24 e 25 onde apenas as MMP-14 e MMP-16 são capazes de clivar colágeno I (ARAÚJO et al, 2011; QUIN; VOORHEES; QUAN, 2014; PITTAYAPRUEK et al., 2016).

As MMPs estão presentes de forma positiva no crescimento embrionário, na estruturação da matriz extracelular, no desenvolvimento do sistema nervoso, na ovulação, angiogênese, cicatrização entre outros processos biológicos. Quando essas enzimas são expostas a fatores que influenciam sua expressão, de forma exacerbada e descontrolada, ocorre uma desordem metabólica afetando danos em diversas partes do organismo celular. Para minimizar o efeito dessa desestruturação, são produzidas as TIMPs que são os inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz, sendo peça fundamental para a obtenção

do equilíbrio metabólico, a fim de reestabelecer um bom funcionamento da MEC impedindo e mantendo a integridade tecidual (RANSON et al., 2019).

2.2.2 Ácido Hialurônico (glicosaminoglicano)

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são constituintes primordiais da MEC, onde são formados por cadeias longas de polissacarídeos lineares unidos por ligações glicosídicas, os quais são encontrados em células teciduais sofrendo modificações estruturais devido as alterações metabólicas e enzimáticas provenientes dos fatores internos e externos que são responsáveis pelas causas do envelhecimento cutâneo (ANILKUMAR et al., 2011). Os GAGs, sem alterações em suas cadeias, atuam no processo de retenção e suporte do fluxo de água nos tecidos, além de participar da ancoragem estrutural, sendo enxertado em meio do emaranhado de células e fibras que compõem a estrutura da pele. São seis os principais GAGS envolvidos nos processos biológicos da pele, são eles conhecidos por, sulfato de dermatano, sulfato de condroitina, sulfato de queratano, sulfato de heparano, heparina e ácido hialurônico (FELDNER et al., 2008).

O ácido hialurônico (AH) é o glicosaminoglicano essencial da MEC, sendo sintetizado primordialmente por fibroblastos e queratinócitos, quimicamente é conhecido como um polímero de alta massa molecular, linear, onde é composto estruturalmente por inúmeras unidades de ácido *d*-glucurônico e *N*-acetil-*d*-glucosamina, unidos por ligações β (GALLO et al., 2019). As funções do AH está voltada no suporte e manutenção da umidade, arquitetura, elasticidade, lubrificação, nutrição dos tecidos da pele, facilitando o processo de cicatrização e atuando na regulação da inflamação (VÁZQUEZ et al., 2010; LEE; OH; CHUNG, 2016).

No sistema dos glicosaminoglicanos é encontrada a hialuronidase, apresentando-se como uma proteína solúvel estando associada com o processo de degradação enzimática desta classe de polissacarídeos, na qual age hidrolisando o ácido hialurônico, quebrando a ligação

β -1 residual do ácido *D*-glucurônico e *N*-acetil-*D*-glucosamina, onde altera a permeabilidade da pele e reduz a viscosidade da junção intercelular (WOHLRAB et al., 2012). A redução da síntese do AH está relacionado também com os fatores intrínsecos como o estresse oxidativo, hormônios desregulados e a fatores cronológicos, referente a idade e a questão genética. Fontes extrínsecas como o fotoenvelhecimento, através da exposição à radiação ultravioleta, aceleram a produção dessa enzima, o que também é prejudicial, interferindo na composição estrutural e química do ácido hialurônico afetando o desenvolvimento de suas atividades biológicas nos tecidos desencadeando as características de uma pele envelhecida, com aspecto seco, sem elasticidade e com o surgimento de rugas (SCHANTÉ et al., 2011; QUAN; FISHER, 2015).

2.2.3 Tirosinase

A tirosinase é uma enzima essencial na síntese de melanina, onde se faz presente no interior dos melanócitos, que são células constituintes da epiderme, responsáveis pela proteção do tecido contra radiações e são células responsáveis pelo processo de pigmentação da pele, onde atua sobre a tirosina convertendo-a em DOPA em seguida em DOPA-quinona, sendo esta responsável pelo surgimento de pigmentos provenientes a partir da produção de melanina, como a eumelanina (pigmentos mais escuros) e a feomelanina (pigmentos mais claros) (BANDYOPADHYAY, 2009; ZANG; NIU; AISA, 2019).

Qualquer irregularidade referente a estrutura e função dos melanócitos afeta a biossíntese de melanina ocasionando distúrbios pigmentares, reduzindo ou aumentando a produção de pigmentação, casos esses chamados de hipomelanose (redução de melanina) adquirida, como o vitiligo, ou congênita, como por exemplo o albinismo e piebaldismo e a hiper melanose (aumento de melanina) na qual associa-se ao melanoma maligno e a respostas inflamatórias na pele (VILLAREAL, et al, 2010). Quando a MEC sofre danos em sua

estrutura através dos raios UV e fatores biológicos, há um aumento na expressão da tirosinase, levando ao surgimento de desordens metabólicas em sua síntese, desencadeando o processo de hiperpigmentação e o envelhecimento tecidual, afetando as funções que a mesma exerce no organismo (QUAN; FISHER, 2015; KYOUNGSEON et al., 2019).

2.2.4 Elastina

A elastina são proteínas que compõe a matriz extracelular, é constituída por glicina, alanina, valina, prolina, e por outras proteínas estruturais, como fibrilinas, fibulinas e glicoproteínas associadas a microfibrilas formando uma arranjo complexo de fibras de elastina, onde são mais delgadas que as fibras de colágenos, conferindo elasticidade e resistência aos tecidos do organismo humano, como os pulmões, vasos e a pele. É uma proteína bastante abundante no tecido envelhecido após danos da MEC (PAGE et al., 2019).

De acordo com a exposição tecidual aos fatores internos e externos que desencadeiam o envelhecimento, a elastina sofre mudança em sua estrutura química, alterando as características das fibras elástica, apresentando-se com o aspecto poroso, perdendo sua função elástica. Com a exposição a raios UV a mutação sobre essas enzimas é mais severa, reduzindo a espessura dos tecidos e estratos que compõe a pele, sendo este, responsável pelo surgimento das rugas (HALABI; MECHAM, 2018). A enzima cuja função primordial é clivar a elastina, é conhecida como elastase, pertencente a família das proteases de quimiotripsinas, onde possui, também, ação sobre o colágeno e fibronectina, sendo essencial no reparo do dano tecidual, auxiliando na degradação de proteínas anormais na MEC (TAMSYN; THRING; DECLAN, 2009).

2.3 Flavonoides

Os flavonoides são classificados como metabólitos secundários de origem natural provenientes do reino vegetal, onde estão presentes em frutas, casca de árvores, flores, raízes, folhas e sementes, na qual são encontrados em grande escala na alimentação, através da ingestão de sucos, chás, verduras e outros alimentos e bebidas. A biossíntese desse composto acontece na via acetato e na do chiquimato, através da condensação do movimento e da direção do ácido chiquímico e da acetil-CoA, onde ocorre a conjugação da molécula de 4-cumaril-CoA junto de três moléculas de malonil-CoA, formando a substancia intermediária essencial da síntese dos flavanoides, a chalcona (TRIPOLI et al., 2007; KUMAR; PANDEY, 2013).

A estrutura química dos flavanoides é formada por 15 átomos de carbonos, unidos por três anéis, sendo dois benzênicos e um heterocíclico, onde podem sofrer modificações químicas, estruturais e funcionais conhecidas por hidroxilação, hidrogenação, acilação, metilação, malonilações, sulfonação e glicosilações, sendo precursores para a formação de diferentes tipos e subclasses de flavonoides (tabela 1), as mais conhecidas são as antocianidina (delfinidina e cianidina), isoflavonas (genisteína e daidzeína), chalconas (floreína e chalconaringenina), flavonas (apigenina e luteolina), flavonóis (quercetina e kaempferol) e flavanonas (naringenina e hesperetina) (SINGH; KUMAR.; MALIK, 2017; MALEKI; CRESPO; CABANILLAS, 2019).

Os flavonoides possuem inúmeras propriedades farmacológicas, como atividade antioxidante, antiinflamatória, antimutagênicas, anticarcinogênicas, antinociceptiva, anticonvulsivante, atuam contra agentes microbianos e virais, possuem efeitos protetores contra doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (ONTIVEROS et al., 2019). A habilidade dos flavonoides de operar como antioxidantes se dá pela ancoragem dos grupos funcionais na estrutura nuclear, onde a modificação, conformação e a quantidade de grupos

hidroxilas induz a eliminação das espécies reativas de oxigênio (ROS), através da atividade quelante de íons metálicos, bloqueando as reações em cadeia da auto-oxidação, e pela quebra da ação de algumas enzimas responsáveis pela formação dos ROS, como a mono-oxigenase, NADH oxidase, glutathione S-transferase entre outras (SOTO; FALQUÉ; DOMÍNGUEZ, 2015).

A propriedade antiinflamatória dos flavonoides está presente em diversas classes deste composto secundário, inibindo a síntese de prostaglandinas, a expressão dos mediadores do processo inflamatório como o óxido nítrico, a ciclooxigenase, lipooxigenase, citocinas, quimiocinas. A eficácia desta atividade antiinflamatória está associada com a biossíntese das citoquinonas proteicas que aderem os leucócitos circulantes no local lesionado (MALEKI; CRESPO; CABANILLAS, 2019). Em relação a ação dos flavonoides contra agente microbianos, os mesmos agem formando grupos proteicos mediante a ligações como pontes de hidrogênio e através de ligações covalentes, onde o alvo antimicrobiano está voltado no rompimento das membranas celulares microbianas, atuando na inativação das enzimas, adesinas e proteínas transportadoras de envelope celular (KUMAR; PANDEY, 2013).

Os polifenóis de acordo com suas estruturas e alvos terapêuticos, percorridos acima, tornam-se eficazes na eliminação das espécies reativas de oxigênio, reduzindo o estresse oxidativo, inflamação e imunossupressão, podendo ser essencial na fabricação de produtos para aplicações tópicas afim de ser utilizado como agente fotoprotetor e com designo ao antienvelhecimento, inibindo a ação de enzimas responsáveis pelo envelhecimento cutâneo e aumentando a síntese de colágeno e ação antioxidantes através dos flavonóis (kaempferol, quercetina, rutina) (AGATI; TATTINI, 2010; ZHENG et al., 2017).

Os flavonóides por serem compostos com lipofilicidade elevada, são de difícil absorção por via oral, dificultando sua biodisponibilidade oral. A via tópica, é uma alternativa de administração medicamentosa que auxilia na melhora da absorção, através da liberação

controlada do fármaco sem interferências de fluidos fisiológicos (SHELKE; SHINKAR; SAUDAGAR, 2013). Com isso, inúmeras novas estratégias, como nanoemulsão, nanocápsulas, nanopartículas, etc., são estudadas para aumentar a solubilidade e permeabilidade dos flavonóides em formulações tópicas (MENAA et al., 2014).

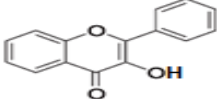
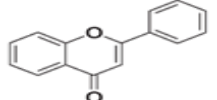
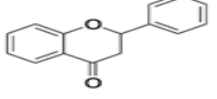
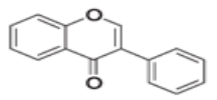
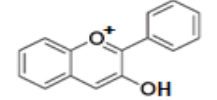
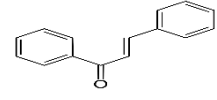
Subclasse	Estrutura	Tipos
Flavonol		Quercetina/ Rutina / Kaempferol
Flavona		Luteolina/ Apigenina/ Crisina
Flavonona		Naringenina/ Hesperetina
Isoflavona		Genisteína/ Daidzeína
Antocianidina		Delfinidina/ Cianidina
Chalconas		Floretina/ Chalconaringenina

Tabela 1: subclasse, estrutura e diferentes tipos de polifenóis.

2.3.1 Quercetina

A quercetina (3, 5, 7,3'- 4'-pentahidroxiflavona) (figura 2) é um flavonoide pertencente à subclasse dos flavonóis (3-hidroxiflavona), sendo comumente encontrada e extraída a partir de frutas (maçãs, mirtilo, morango, amora) vegetais (cebola, aspargo, pimentão e tomate) e algumas bebidas como chás e vinhos. Assim como os demais compostos pertencentes a família dos flavonoides, a quercetina possui inúmeras propriedades farmacológicas, desempenhando ações antiinflamatórias, anticancerígenas, neuroprotetora, hipoglicemiantes, hepatoprotetora, anti-histamínica, antioxidante, antiviral, antibacteriana,

atua também na melhora do sistema imunológico e auxilia na proteção cardiovascular (MASSI et al., 2017; CARULLO et al., 2017).

Quimicamente a fórmula molecular da quercetina é $C_{15}H_{10}O_7$, sendo seu peso molecular de 302,24 g/mol, em sua forma in natura encontra-se um açúcar ligado na posição C-3 de sua molécula apresentando-se na forma glicosilada, sua forma aglicona (livre) é a base para diversos derivados desta molécula. A quercetina é absorvida na microflora intestinal e metabolizada em glucoronidato ou sulfato conjugado, sendo excretados através da bile e urina. Este flavonol é sensível a luz, possui baixa solubilidade o que acaba limitando o seu potencial terapêutico. (MLCEK et al., 2016; CHATZIATHANASIADOU et al., 2018).

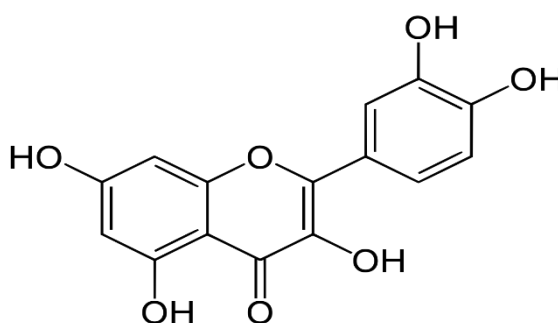


Figura 2. Estrutura química da quercetina.

Fonte: Autor.

Sua atividade antioxidante está direcionada com a eliminação dos radicais livres e a quelatação de íons de metais, na qual são associadas com a presença do catecol e do grupo OH na posição C3 da molécula de quercetina, onde estabelece a redução da produção de ROS, sendo assim, este efeito antioxidante atua sobre o radical hidroxil (OH) e o ânion superóxido (O_2^-), sequestrando o radical de oxigênio, inibindo a peroxidação lipídica e a xantina oxidase (SKOWRON; KRAWCZYK; ZGOLA, 2015; MLCEK et al., 2016).

Além de possuir alta especificidade na atividade antioxidante sequestrando radicais livres, a quercetina atua na inibição de enzimas como as ciclooxigenase e lipooxigenase, presentes no metabolismo do ácido araquidônico, diminuindo a síntese dos mediadores

inflamatórios conhecidos por prostaglandinas, leucotrienos, e inibe a síntese do óxido nítrico sintase induzível (iNOS), este flavonol bloqueia a produção de histamina, sendo essencial em casos alérgicos, onde estabiliza os basófilos e mastócitos (CHIRUMBOLO, 2010; MARZOCHELLA et al., 2011; KUMAZAWA et al., 2014).

Devido às limitações da quercetina na penetração da pele, diversas estratégias estão sendo desenvolvidas para melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade dessa substância e de seus derivados. Dentre essas alternativas estão a complexação com ciclodextrinas, encapsulação de lipossomas, e a nanoemulsão, que pode ser definida como um sistema heterogêneo, onde é composto por uma fase aquosa e uma oleosa, na qual a fase interna é dispersa na fase externa na forma de gotículas nanométricas e na presença de um agente emulsionante, aumentando a interação das substâncias pouco hidrossolúveis na pele promovendo a penetração de ativos, desempenhando ação na superfície ou efeito sistêmico (KARAGAG et al., 2013; DAJAS et al., 2015).

2.3.2 Rutina

A rutina (figura 3) é um flavonoide da subclasse dos flavonóis, é conhecido como um derivado da quercetina, onde no seu arranjo químico possui uma molécula de quercetina, unida a duas moléculas de glicose (uma glicose e uma ramnose) substituintes na posição 3 do anel pirano. Quimicamente a rutina é conhecida como 3, 3', 4', 5, 7-penta-hidroxiflavona-3-ramnoglicósido, também é chamada de vitamina P e quercetina-3-O-rutinosídeo, sua fórmula molecular é representada por átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio $C_{27}H_{30}O_{16}$ (HOSSEINZADEH.; NASSIRI-ASL, 2014; RASHIDINEJAD et al., 2019).

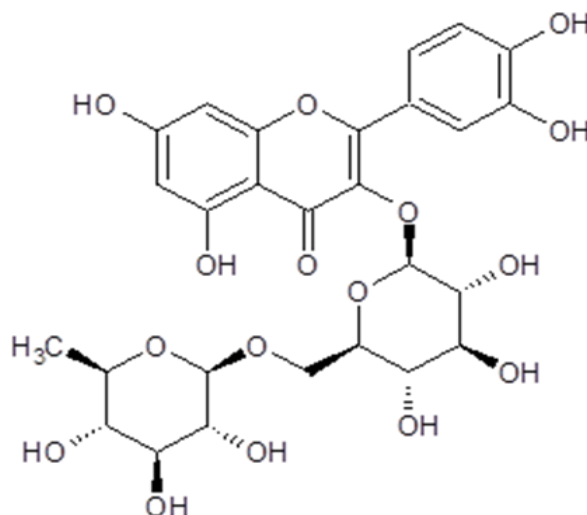


Figura 3. Estrutura química da Rutina

Fonte: Autor.

Por pertencer a família dos flavonoides a rutina também é um polifenol comumente encontrada no reino vegetal onde se deriva em diversas fontes alimentares como cebola, maçã, tomate, trigo mourisco, feijão vermelho, assim como chás e outras bebidas (GANESHPURKAR; SALUJA, 2017). Sua biossíntese inicia-se pela junção da via do shiquimato e a via do acetato onde se faz contínua através de algumas modificações enzimáticas responsáveis pela produção da rutina (FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012).

A rutina por ser um derivado da quercetina apresenta propriedades terapêuticas semelhantes, exibindo potencial antioxidante, atuando na redução da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, inibindo a formação de radicais livres, agindo sobre o íon superóxido e radicais peroxil lipídicos, atuando na diminuição do estresse oxidativo, desencadeando um efeito benéfico a patologias que são oriundas do desequilíbrio antioxidante, como doenças neurodegenerativas e até mesmo o câncer (GANESHPURKAR; SALUJA 2017; KIRSCHWENG et al., 2018).

GANESHPURKAR & SALUJA (2017) apresentam em sua literatura uma revisão do potencial farmacológico da rutina demonstrando que a mesma possui ação no sistema nervoso central com atividade sedativa, anticonvulsivante, anti- Alzheimer, antidepressiva, desenvolve

também atividades analgésicas e antiartríticas, atua no sistema endócrino demonstrando efeitos antidiabéticos, anti-hipercolesterolêmico, no sistema cardiovascular ela desenvolve efeito na hipertensão, coagulação sanguínea, no sistema gastrointestinal exerce ação antiulcerosa, no sistema respiratório apresenta atividade anti-histamínica, na pele age como fotoprotetor contra os efeitos induzidos por UV nas células da pele, e apresenta efeitos benéficos sobre a dermatite atópica.

Assim como quercetina, a rutina apresenta baixa solubilidade, sendo esta uma característica comum da família dos flavonoides, onde são altamente lipofílicos e de difícil absorção por via oral e cutânea (SINGH et al., 2012). NAGULA & WAIRKAR (2019) realizaram em seu estudo um levantamento de diversos flavonoides associados a diferentes estratégias de formulações para sua utilização tópica com fins terapêuticos, auxiliando na problemática desses compostos através de manipulações com nanoemulsões e mudanças estruturais que influenciam na eficácia para a utilização dos flavonoides tanto para fins farmacoterapêuticos como estéticos. Essas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de produzir novos derivados que não só aumentará sua solubilidade, mas também melhorará sua permeabilidade na pele (RASHIDINEJAD et al., 2019).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Obter um novo derivado da rutina e avaliar aspectos da sua eficácia e segurança para aplicação cosmética.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar o derivado da rutina.
- Avaliar as propriedades antioxidante e antiglicante do derivado.
- Estudar os efeitos do derivado sobre a viabilidade, migração, proliferação celular e síntese de colágeno em linhagens de fibroblastos humano.
- Avaliar por meio de ensaio in silico o coeficiente de partição e de permeação cutânea do derivado.
- Avaliar o potencial genotóxico do derivado em fibroblastos humanos.
- Analisar o efeito irritativo do derivado em modelo de pele reconstruída.

4. METODOLOGIA

4.1 Síntese

O derivado rutina benzilada foi sintetizado no Laboratório de Produtos Naturais e Semi-síntese – Fitophar/UFAM. A substância foi sintetizada a partir a metodologia proposta por ZHANG e colaboradores (2011), onde a rutina sofreu uma reação de benzilação, formando a rutina benzilada.

A rutina (1500,7 mg; 2,46 mmol) foi colocada em balão de reação de 50 mL e adicionou-se dimetilformamida (DMF) (3,0 mL), carbonato de potássio (K_2CO_3) (2eq-g; 4,92 mmol) e brometo de benzila (BnBr) (2,0 mL), deixou-se sob agitação e aquecimento ($\Delta=60-80^\circ C$) por 24h. Após esse tempo o produto da reação foi acompanhado por CCD (cromatografia em camada delgada) e a reação foi finalizada pela lavagem da solução com hidróxido de sódio ($NaOH_{(aq)}$) a 1% (2x5 mL), em seguida com água destilada (2x10 mL) e ambas extraídas com acetato de etila ($AcOEt$). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro e filtrado em papel de filtro. Deixou-se evaporar e o produto bruto foi isolado por CCPD (cromatografia em camada delgada preparativa) em Hex: $AcOEt$ (8:2) e por cromatografia em coluna aberta ($\phi=2,0cm$; $h=12cm$) de sílica gel 60 (70-230 mesh) com Hex: $AcOEt$ (8:2) rendendo o derivado ACD32F2 (41,0 mg).

4.2 Caracterização química

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

4.2.1 Análises espectroscópicas

Os espectros das análises de ressonância magnética nuclear (RMN) de uma e duas dimensões (1D e 2D) foram realizados 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 SmartProbeTM) com gradiente de campo na direção Z. A substância foi solubilizada em clorofórmio 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).

4.3 Cultivo celular

As células utilizadas neste estudo foram as linhagens de fibroblastos humano (MRC-5), e queratinócitos humano (HaCat), todas as linhagens foram obtidas do banco de células do Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas. Os fibroblastos foram cultivados em garrafas estéreis de cultura celular e os queratinócitos em garrafas estéreis revestidas com colágeno do tipo IV a fim de favorecer o crescimento e a morfologia própria dessas células.

O meio de cultura utilizado foi o *Dulbeco's Modified Eagle Medium* (DMEM), contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico Penicilina/Estreptomicina, e as células foram mantidas em incubadora com atmosfera umidificada a 37°C com injeção de 5% de CO₂. Para observação do crescimento celular a cada 24 horas, utilizando o microscópio óptico invertido (Zeiss).

4.4 Viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado pelo teste do Alamar Blue, seguindo a metodologia de AHMED e colaboradores (1994) com o intuito de analisar a viabilidade celular em células da linhagem MRC-5 e HACAT após exposição por 24, 48 e 72h ao derivado da rutina. 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).

Em placa de 96 poços, as células de MRC-5 e HacaT 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 o derivado da rutina na concentração de 200 µg/mL, nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

Passados os tempos de tratamento, foram adicionados 10µL da solução de uso de Alamar Blue (solução estoque 0,4% 1:20 em meio de cultura), ou seja, solução de resazurina. Após o tempo de metabolização da resazurina (3h), foi realizada a leitura da fluorescência no leitor de placas ELISA. A viabilidade foi calculada conforme a fórmula abaixo:

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

4.5 Ensaios antioxidantes

4.5.1 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 absorbância de $1,00 \pm 0,1$ nm. Para conhecer a absorbância dos brancos, em uma placa de 96 poços foram adicionados 30 µL do derivado da rutina (1 mg/mL) e 270 µL de álcool etílico. Para o teste, foram adicionados 30 µL do derivado 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:

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

4.5.2 Ensaio de varredura do radical ABTS

A atividade antirradical foi realizada mediante a descoloração da solução de ABTS de acordo com o método descrito por Re, et al. (1999), com modificações. A solução de ABTS foi realizada pela reação de 0,7mM do radical dissolvido em água deionizada 2,4mM de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) e a mistura reacional foi incubada em temperatura ambiente na ausência de luz por 16 horas. Para conhecer a absorbância dos brancos, em uma placa de 96 poços foram adicionados 30 μ L dos derivados da quercetina (1 mg/mL) e 270 μ L de água. Para o teste, foram adicionados 30 μ L do derivado da rutina e 270 μ L 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 utilizou-se ácido gálico. Em seguida, foram efetuados os cálculos de inibição por meio da seguinte fórmula:

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

4.5.3 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 (células/poço), em 100 μ L 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, na microplaca, 100 μ L de uma solução de 2,7-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) à 25 μ M, dissolvida em tampão Hank's, contendo o derivado da rutina (50, 100 e 200 μ g/mL), e incubados durante 60 minutos a 37°C e 5 % CO_2 . Após o período de incubação, os poços foram novamente lavados com PBS. Em seguida, tratou-se com 600 μ M de dihidrocloreto 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 – 100 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:

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

4.6 Atividade inibitória sobre a glicação de colágeno

Para a análise da atividade inibitória sobre a glicação de colágeno, foi utilizado a metodologia descrita por KIHIO e colaboradores (2004), com algumas modificações. Primeiramente foi preparada 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. No poço referente ao branco, colocou-se 30 µL do derivado da rutina 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 do derivado da rutina (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 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 aminoguanidina (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:

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

4.7 Avaliação sobre a proliferação celular

O ensaio avaliou a proliferação celular pelo método Azul de Tripán, segundo metodologia descrita por FRESHNEY (1994), com modificações. As células MRC-5 foram

plaqueadas na concentração de 1×10^4 de células/mL, 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 de 100 µg/mL do derivado da rutina. Como padrão e controle negativo, utilizou-se vitamina C e DMSO, respectivamente.

O estudo teve intervalos medidos em três tempos experimentais: 24, 48 e 72h de tratamento com a substância. Após o período de incubação/tratamento, ocorreu a 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).

4.8 Ensaio de migração in vitro

O teste de migração in vitro foi baseado na metodologia descrita por ASCIONE e colaboradores (2016). Neste ensaio as células de MRC-5 foram plaqueadas em placa de 12 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 riscada manualmente com uma pipeta de 200 µL, removendo células de uma área com desvio entre 380 e 580 mm. As células foram lavadas com PBS e tratadas com o derivado da rutina na concentração de 100 µg/mL, juntamente com meio DMEM. Como padrão foi utilizado a vitamina C e como controle negativo o DMSO. A placa foi analisada por microscopia óptica após os tempos de tratamento de 24h, 48h e 72h.

4.9 Quantificação de colágeno da cultura celular de fibroblastos

Para quantificar a produção de colágeno solúvel no sobrenadante do cultivo celular, foi utilizado o ensaio colorimétrico Picrosirius (Sirius-Red), método descrito por JONES e colaboradores (2013), com modificações. As células de fibroblastos MRC-5 foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 células/mL em placas de 24 poços e incubadas com o derivado da rutina (100 $\mu\text{g/mL}$), em triplicada por 24 horas. Como controle foi utilizada a rutina e ácido ascórbico, na mesma concentração que a substância teste.

Após o tratamento das células, o sobrenadante do cultivo celular foi removido para avaliação do colágeno solúvel, onde foi adicionado em uma placa de 96 poços sendo esta placa incubada, sem tampa, em estufa a 37°C “*overnight*” para a secagem do meio de cultivo. Em seguida, foram adicionados 200 μL da solução de Bouim saturada e incubadas por uma hora. O fixador foi removido e adicionado 300 μL de água destilada em cada poço. A placa foi seca em temperatura ambiente por aproximadamente duas horas. Após este período, foram acrescentados 200 μL do corante Picrosirius 0,1% por uma hora, sob leve agitação e proteção da luz. O corante foi removido cuidadosamente e em seguida foi adicionado 250 μL de HCl 0,01 M para a remoção do corante não aderido. A solução de HCl foi removida, onde em seguida foi adicionado 150 μL de NaOH 0,1 M por 30 minutos sob leve agitação.

O conteúdo da placa foi lido em espectrofotômetro com comprimento de onda de 490 nm. A curva padrão de colágeno foi preparada a partir de uma solução de colágeno tipo I from “*rat-tail*” (Sigma®) diluída em PBS e meio de cultura DMEM sem soro, nas concentrações finais de (12,5, 6,25, 3,12, 1,5, 0,78, 0,39, 0,19, 0,09 $\mu\text{g/mL}$). Os valores médios foram plotados em gráfico de dispersão com as concentrações conhecidas de colágeno, com os valores do eixo X e as absorbâncias correspondentes a cada concentração com os valores do eixo Y e calculado a equação da reta e o coeficiente de correlação R. Os dados foram analisados através do programa GraphPad Prism® (Two way /ANOVA/ post-test Bonferroni).

4.10 Avaliação da genotoxicidade através do teste do cometa

A avaliação da genotoxicidade pelo teste do cometa, em pH alcalino, foi realizado conforme metodologia descrita por SINGH e colaboradores (1988), com modificações. As células MRC-5 foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de 6×10^4 células em 1 mL para cada poço, sendo incubada em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação as células foram tratadas com o derivado da rutina, na concentração de 200 µg/mL no tempo de 3h. Como controle positivo foi utilizado o EMS (etil-metanosulfonato).

Ao final do tempo de tratamento, o sobrenadante celular foi transferido para um eppendorf e os poços foram lavados com 200 µL PBS, em seguida foram adicionados 200 µL de tripsina, e a mesma ficou agindo por 5 minutos, após esse tempo a ação da tripsina foi inativada com DMEM (que contém SFB). A suspensão celular foi transferida para o mesmo eppendorf utilizado anteriormente, onde foi centrifugado a 37°C, durante 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e 40 µL do concentrado celular foi coletado e incorporado a uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (LMP). Em seguida, o conteúdo foi transferido para lâminas de microscopia previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (NMP).

Após solidificação em temperatura ambiente, as lâminas ficaram em uma solução de lise por 24 horas, para a desnaturação da parede celular e nuclear, restando o DNA da célula. As lâminas foram, então, removidas da solução de lise e dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese preenchida com solução de eletroforese por 20 minutos onde permitiu o desempacotamento do DNA.

A eletroforese foi conduzida na ausência de luz por 20 minutos, a 20 Volts e com corrente de 300 mA. Posteriormente, as lâminas foram dispostas em recipientes contendo solução de neutralização por 15 minutos. Por fim, as lâminas secas, foram fixadas em etanol

absoluto e armazenadas para posterior leitura. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência, utilizando 40 µL da solução de Syber Green (1:10000).

Foram contados 50 cometas por lâmina, sendo classificados de acordo com a quantidade de DNA fragmentado na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA (0 – sem dano, 1 – cauda menor que o diâmetro do nucleóide, 2 – cauda do mesmo tamanho que o diâmetro do nucleóide, 3 – cauda maior que o diâmetro do nucleóide, e 4 – cauda 2 ou mais vezes maior que o diâmetro do nucleóide). Os resultados foram expressos como índice de dano e frequência de dano usando os seguintes cálculos:

Índice de Dano Total = $0 \times (\text{n}^\circ \text{ de cometas grau } 0) + 1 \times (\text{n}^\circ \text{ de cometas grau } 1) + 2 \times (\text{n}^\circ \text{ de cometas grau } 2) + 3 \times (\text{n}^\circ \text{ de cometas grau } 3) + 4 \times (\text{n}^\circ \text{ de cometas grau } 4)$

Frequência de dano = $100 - (50 - \text{n}^\circ \text{ de cometas do grau}) \times 100/50$

4.11 Ensaio de avaliação de irritação cutânea in vitro em modelo de pele reconstruída

4.11.1 Geração da pele humana reconstruída

O modelo de pele reconstruída foi baseado no trabalho de SOUSA (2018), que foi desenvolvido no Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas. Este modelo é feito através do cultivo de linhagens celulares de queratinócitos e fibroblasto humano.

A MRC-5 é utilizada para a confecção da derme, onde as células foram ressuspensas em uma solução contendo colágeno, tampão de reconstituição e alguns nutrientes, em seguida essa mistura é transferida em uma placa de 12 poços enquadrando insertos com membrana de poro 0,4 µm (Corning®). Essa placa é mantida em estufa a 37°C com injeção de 5% de CO₂ para o processo de gelificação do colágeno e estabilização do pH.

Os queratinócitos foram utilizados para a reconstrução da epiderme, onde foram plaqueados sobre a derme em meio específico para sua adesão na derme, após 24 horas esse meio foi removido e a pele foi mantida em estufa a 37°C com injeção de 5% de CO₂, durante esse período foi realizada a troca do meio da parte externa ao inserto a cada dois dias, durante os 15 dias de incubação.

4.11.2 Ensaio de avaliação de irritação cutânea in vitro

Para avaliar a aplicabilidade do modelo de pele reconstruída na avaliação de irritação cutânea com o derivado da rutina, utilizou-se o protocolo utilizado para o modelo EpiSkinTM (OECD 439) com pequenas modificações. Após a formação do modelo de pele, os tecidos foram expostos ao derivado da rutina (1 mg/mL) e ao SDS 5% (dodecil sulfato de sódio). Foram adicionados 10 µL de cada substância, sendo estas aplicadas diretamente na superfície do tecido, durante 15 minutos de exposição. Após esse período de tempo, os tecidos foram lavados com PBS e mantidos na estufa por mais 42 horas. Após este período, os tecidos foram transferidos para placas de 24 poços e incubados com MTT (1 mg/mL) por 3 h a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, os tecidos foram novamente lavados com PBS e transferidos para uma nova placa contendo 2 mL de isopropanol para a extração do formazan reduzido, onde permaneceram à temperatura ambiente por 2 h. Após esse intervalo, coletou-se 200 µL da solução de extração e transferiu-se para placa de 96 poços. A densidade óptica do corante púrpura resultante foi medida a 570 nm utilizando um leitor de placas de ELISA. (OECD, 2015).

4.12 Avaliação do coeficiente de partição e permeação cutânea in silico

A avaliação do coeficiente de partição e da permeação cutânea do composto sintetizado foi realizada através da ferramenta online SwissADME do Swiss Institute of

Bioinformatics (<http://www.sib.swiss>) (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). No servidor SwissADME as estruturas foram desenhadas e depois convertidas para modelo SMILES, que permite a análise do logP e da área de superfície polar topológica (TPSA), que através da equação $\%ABS = 109 - (0.345 \times TPSA)$ foi possível determinar o percentual de absorção teórico do derivado.

4.13 Análise estatística

Os resultados foram expressos como Média $\pm$ D.P.M. (Desvio Padrão da Média). Todos os ensaios in vitro foram realizados em triplicata biológica, e analisados estatisticamente, usando o software GraphPad Prism 6. Os ensaios foram analisados pelo teste de comparações múltiplas e a análise de variância (ANOVA) para comparação entre os grupos. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises químicas da ACD32F2

A amostra obtida a partir da reação de benzilação da rutina, codificada como ACD32F2, apresentou-se como um sólido de coloração amarela, cujo rendimento foi de 1,0981mg e a porcentagem da fração isolada do mesmo foi de 49%. O derivado apresenta ponto de fusão de PF= 158-161 °C.

A reação de substituição entre a rutina e brometo de benzila foi avaliada por CCD (Figura 4), onde foi observada a formação do produto benzilado com $R_f = 0,65$. Esse produto apresentou menor polaridade que a rutina e maior afinidade pelo sistema de eluição Hex:AcOEt (8:2).

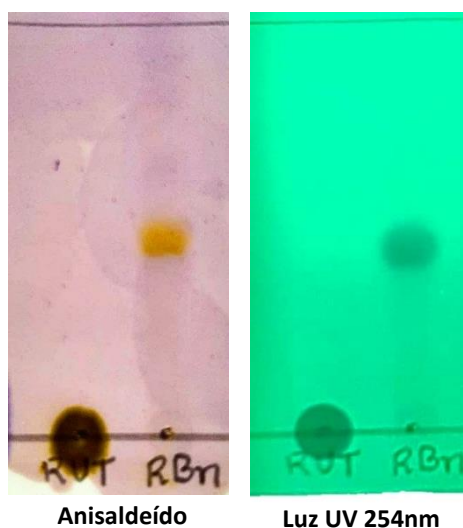


Figura 4. CCD da ACD32F2 (RBn – rutina benzilada) comparada com a rutina (RUT), a qual foi utilizada como produto de partida.

5.1.1 Análise do Espectro de RMN da ACD32F2

A substância foi identificada por RMN 1D (^1H , ^{13}C e DEPT135) e mapas de correlação COSY, HSQC e HMBC. A tabela 2 apresenta os dados de ^1H e ^{13}C e dos mapas de correlações COSY e HMBC, com os dados da literatura (KAJJOUT; ZEMMOURI; ROLANDO, 2011).

O espectro de RMN de ^1H apresentou 2 sinais correspondentes a hidrogênios metilênicos, em δ 5,15 (s) e δ 5,21 (s). Além de sinais característicos de H aromáticos de grupos benzila de δ 7,28 a 7,43 ppm. Também, foram observados dupletos de H aromáticos com acoplamento em meta, δ 6,45 ($d=2,1$ Hz) e δ 6,56 ($d=2,1$ Hz), que correspondem a sinais característicos de H do anel A flavonoídico, nas posições H-6 e H-8, respectivamente. Em adição, observou-se acoplamento orto e meta do anel B, em δ 7,80 (*m*), δ 6,64 ($d=8,3$ Hz) e δ 7,01 ($d=8,3, 2,3$ Hz), que foram atribuídos aos H-2', H-5' e H-6', respectivamente.

O HMBC apresentou as correlações dos hidrogênios metilênicos em δ 5,15 (s, H-1'''), e confirma sua posição no C-7 do anel A correspondente ao ^{13}C em 164,7 ppm, além de apresentar suas correlações com os carbonos δ 127,9 e δ 135,8 do anel benzênico. Também, foi observado para o H-1'' em δ 5,21 (s), sua correlação com o C-4' em 147,3 ppm, confirmando a substituição, como também, as correlações com o C-2'' em δ 135,8 ppm e com os carbonos em δ 127,9. Portanto, a partir da confirmação da benzilação nos carbonos 7 e 4', a substância proposta é 7-(benziloxi)-2-(4-(benziloxi)-3-hidroxifenil)-3,5-di-hidroxi-4H-cromen-4-ona, $\text{C}_{29}\text{H}_{22}\text{O}_5$, (Figura 5).

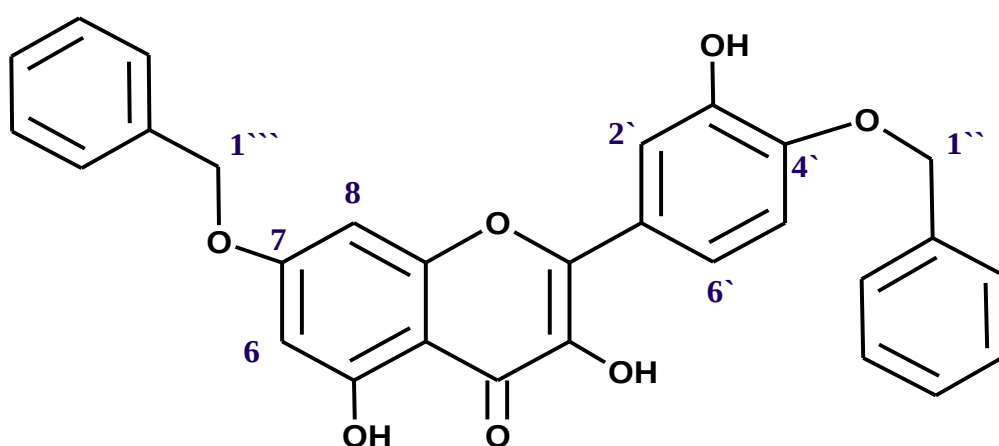


Figura 5. Derivado benzilado da rutina - 7-(benziloxi)-2-(4-(benziloxi)-3-hidroxifenil)-3,5-di-hidroxi-4H-cromen-4-ona, $\text{C}_{29}\text{H}_{22}\text{O}_5$.

Posição	^1H δ (mult., J em Hz)	^{13}C (ppm)	COSY (^1H – ^1H)	HMBC (^1H – ^{13}C)	Kajjout, Zemmouri, e Rolando, 2011	Kajjout, Zemmouri, e Rolando, 2011
2		151,6				150,1
3		134,4				135,6
6	6,45 (<i>d</i> , 2,1, 1H)	98,6		93,0/ 104,2/161,0/164,7	6,45 (<i>d</i> , 1,9, 1H)	97,5
7		164,7				163,2
8	6,56 (<i>d</i> , 2,1, 1H)	93,0		98,6/104,2/156,7/164,7	6,55 (<i>d</i> , 1,9, 1H)	93,6
9		156,7				158,7
1'		119,1				121,2
2'	7,80 (<i>m</i> , 1H)	113,8	7,01	145,8/147,3	7,75 (<i>d</i> , 1,9, 1H)	114,1
3'		145,8				148,6
4'		147,3				141,9
5'	6,64 (<i>d</i> , 8,3, 1H)	117,0	7,01	134,4/151,6	7,01 (<i>d</i> , 8,5, 1H)	114,0
6'	7,01 (<i>dd</i> , 8,3 e 2,3, 1H)	126,2	6,64	151,6	7,59 (1H, <i>dd</i> , 8,5 e 1,9)	124,3
1''	5,21 (<i>s</i> , 2H)	71,2		127,9/135,8/147,3	5,20 (<i>s</i> , 2H)	70,6
2''		135,8				137,1
3'' e 7''						
4'' e 6''	7,28 - 7,43 (<i>m</i>)	127,6 – 128,6			7,19–7,47 (<i>m</i>)	127,2 – 128,9
5''						
1'''	5,15 (<i>s</i> , 2H)	70,3		127,9/135,8/164,7	5,08 (<i>s</i> , 2H)	70,4
2'''		135,8				137,7
3''' e 7'''						
4''' e 6'''	7,28 - 7,43 (<i>m</i>)	127,6 – 128,6			7,19–7,47 (<i>m</i>)	127,2 – 128,9
5'''						

Tabela 2. Dados de RMN em CDCl_3 (11,74 T). Os dados de ^{13}C foram atribuídos com auxílio dos experimentos de HSQC, HMBC e DEPT.

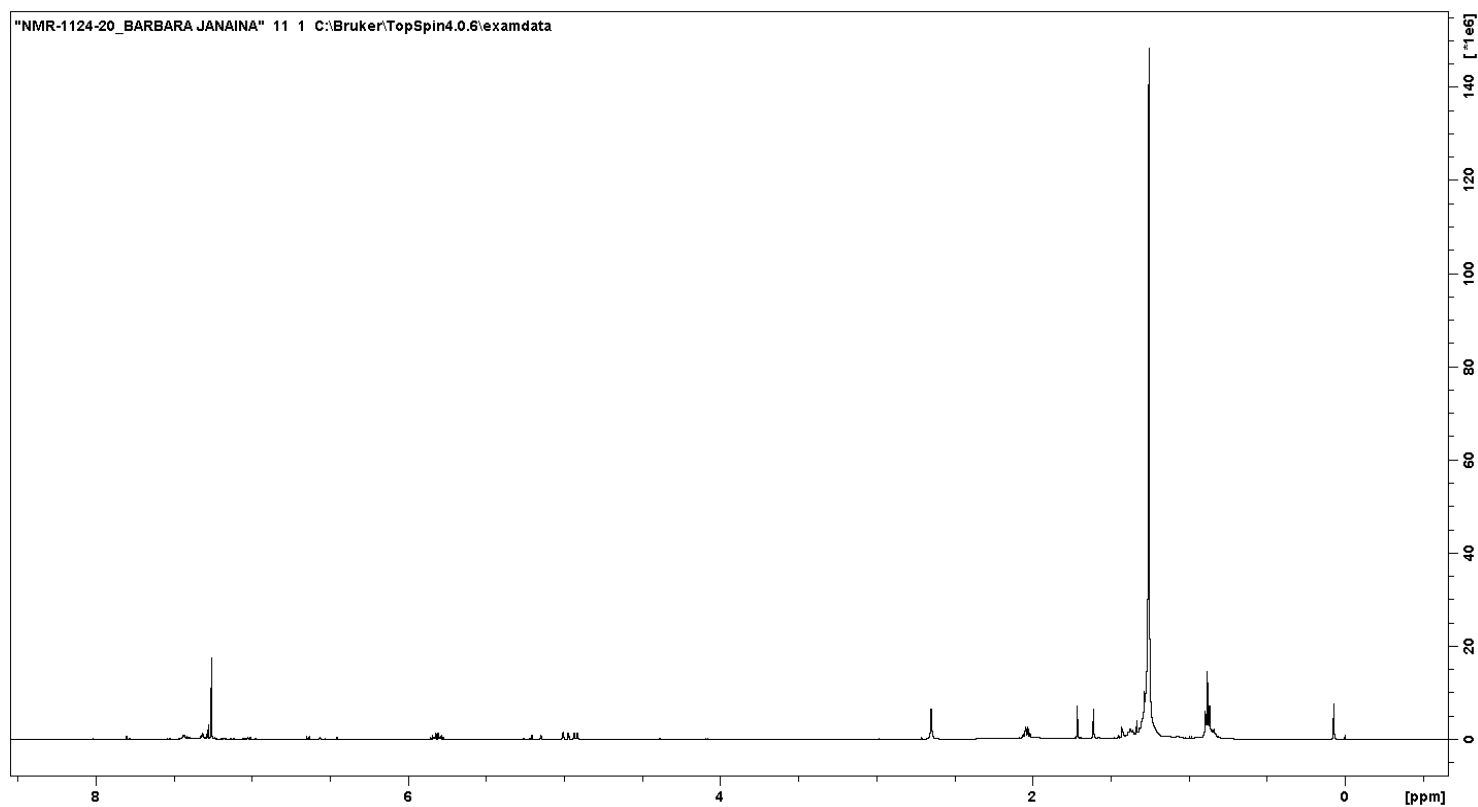


Figura 6. Espectro de RMN ^1H da amostra ACD32F2 (11,74 T, CDCl_3 , TMS).

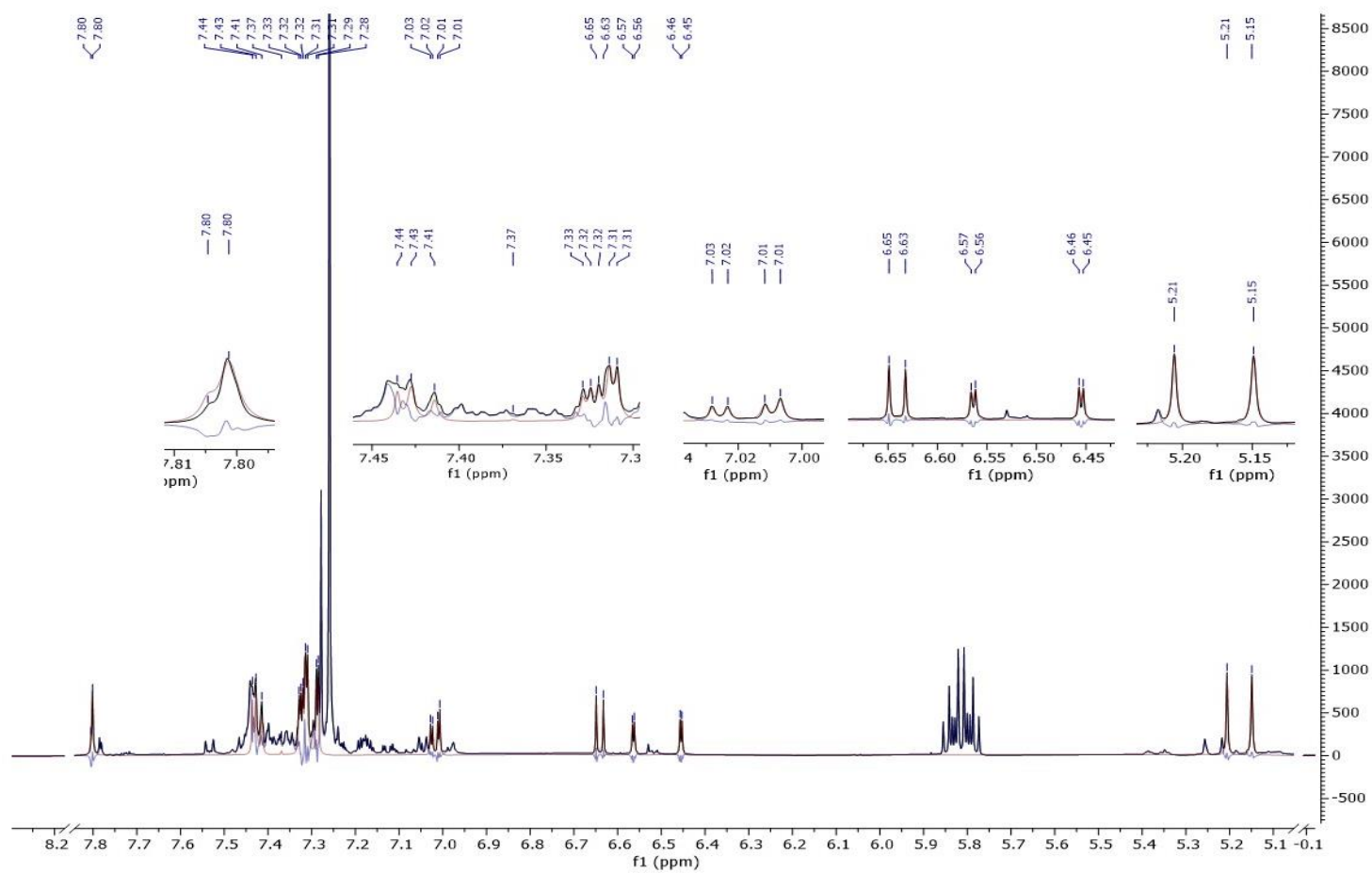


Figura 7. Expansão da região do espectro de RMN ^1H de 5.0 ppm a 8.0 ppm da amostra ACD32F2 (11,74 T, CDCl_3 , TMS).

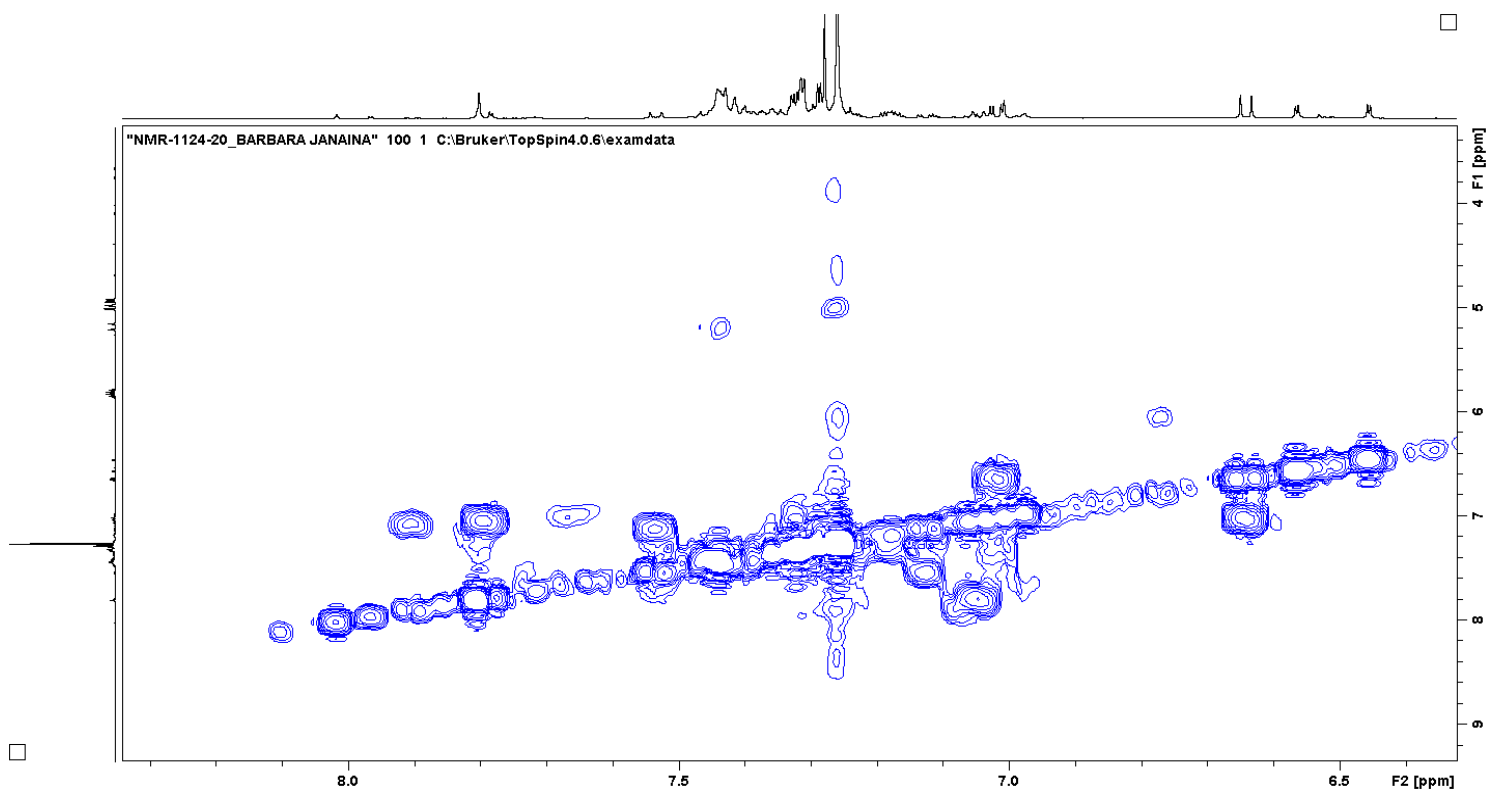


Figura 8. Ampliação do mapa de Correlação COSY da amostra ACD32F2 (11,74 T, CDCl₃, TMS).

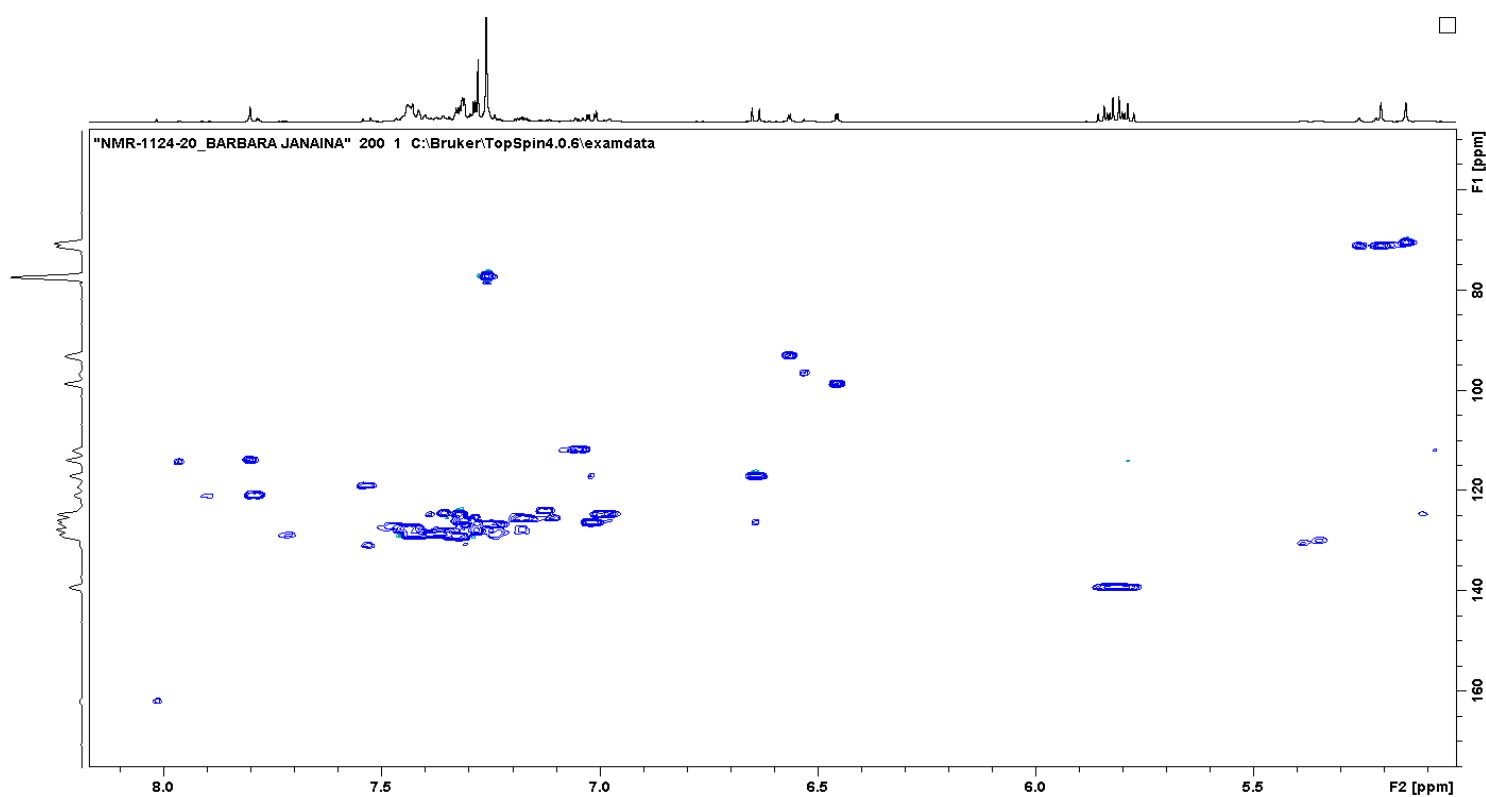


Figura 9. Ampliação do mapa de Correlação HSQC da amostra ACD32F2 (11,74 T, CDCl₃, TMS).

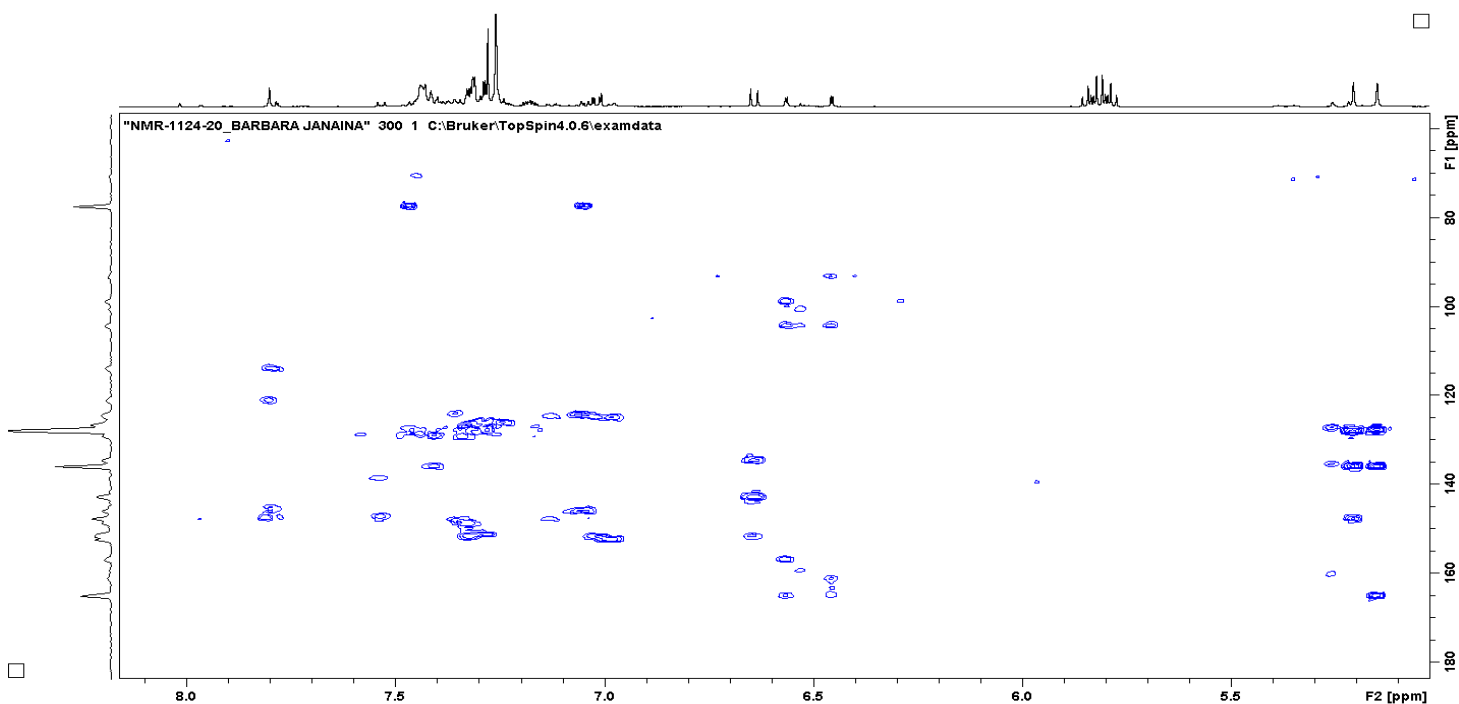


Figura 10. Ampliação do mapa de Correlação HMBC da amostra ACD32F2 (11,74 T, CDCl_3 , TMS).

5.2 Citotoxicidade

A análise da viabilidade celular foi realizada através do ensaio do Alamar blue (conforme descrito na metodologia), em que se baseia na coloração por resazurina, o qual exhibe a mudança colorimétrica e a fluorimétrica relacionada a atividade metabólica celular (NAKAYAMA, 1997).

Para a análise de uma possível citotoxicidade, as linhagens celulares MRC-5 e HACAT foram expostas no período de 24, 48 e 72 horas com a rutina e seu derivado ACD32F2 na concentração única de 200 $\mu\text{g/mL}$, a fim de averiguar a segurança do mesmo. Os resultados desta análise estão expressos em % de viabilidade celular.

Conforme a representação gráfica exibida na figura 11, observa-se que a linhagem celular de fibroblasto (gráfico A) tratada com ACD32F2 no tempo de 24 horas, exibiu percentual de $96,2 \pm 0,94$ de células viáveis, em 48 horas: $92,4 \pm 0,95$ e 72 horas: $88,8 \pm 0,91$. A linhagem celular de queratinócitos (gráfico B), em 24 horas, exibiu $96,5 \pm 1,39$; em 48 horas: $94,1 \pm 0,93$ e 72 horas: $92,1 \pm 1,19\%$. A rutina, quando testada nas mesmas condições

apresentou viabilidade celular superior a 70% em todos os tempos testados em ambas linhagens celulares.

A padronização internacional dos testes de citotoxicidade in vitro, de acordo com a ISO 10993-5 de 2009, estabelece parâmetros quantitativos e qualitativos referente a análise da citotoxicidade, com métodos biológicos apropriados. De acordo com esses parâmetros, quando a porcentagem de viabilidade celular encontra-se acima de 80% a substância teste não é considerada citotóxica, quando esta porcentagem está entre 80 e 60% é classificada como baixa citotoxicidade.

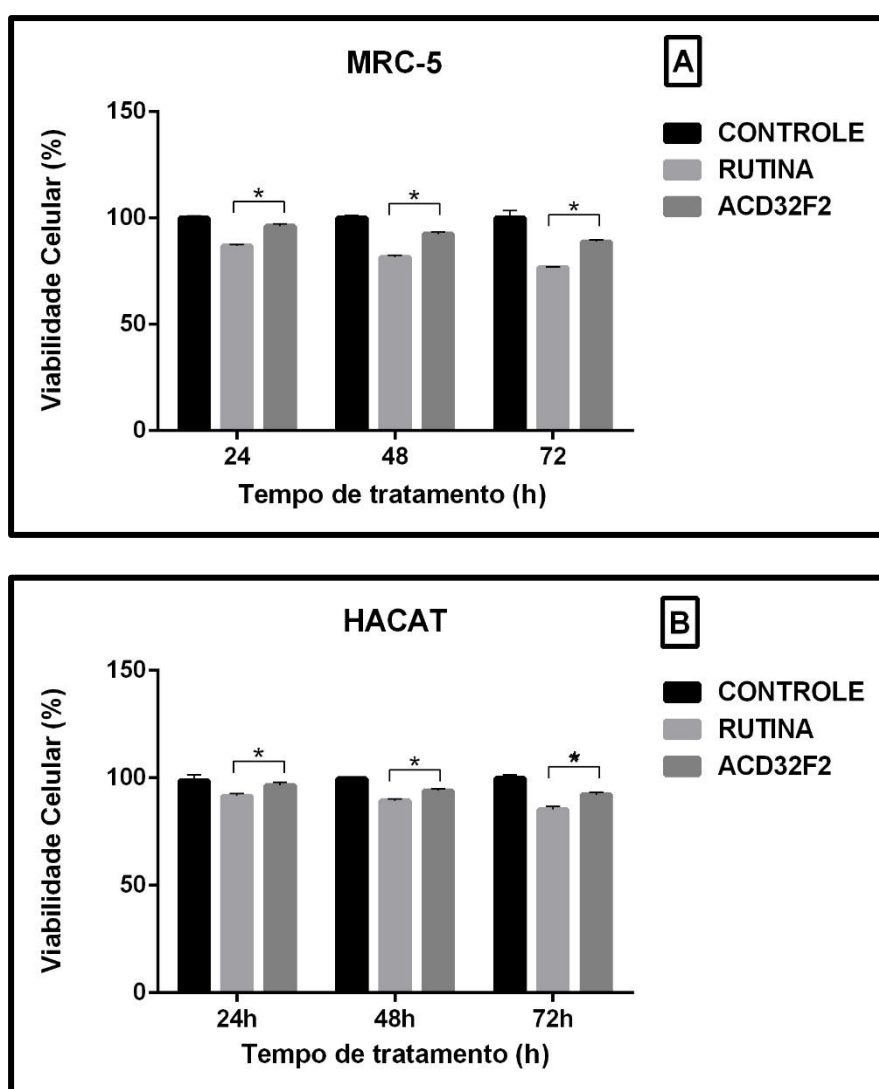


Figura 11. Avaliação da citotoxicidade do derivado ACD32F2 e rutina. As células testadas foram MRC-5 e HACAT, com 200ug/mL das substâncias testes, no tempo de tratamento de 24, 48 e 72 horas. Os dados estão expressos em porcentagem de viabilidade celular com média $\pm$ desvio padrão (em relação ao controle de DMSO) e analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. * $p < 0,05$.

Diante desta análise e dos dados obtidos, é possível concluir que a ACD32F2 não apresenta citotoxicidade, na concentração de 200 µg/mL para as linhagens de fibroblasto e queratinócito humano.

ARAÚJO e colaboradores (2013), realizaram a bioconversão de quercetina e rutina e avaliaram a citotoxicidade destes produtos modificados em linhagem celular HL-60 de leucemia humana, demonstrando que os derivados modificados não apresentaram atividade citotóxica, exceto a rutina, que demonstrou um efeito citotóxico significativo, os autores explicam que isso possa ocorrer devido alguns flavonoides exercerem importante atividade citotóxica em cultura de células humanas do tipo melanócitos e melanomas, por meio do aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio intracelular nestes modelos celulares (YÁÑEZ, 2004).

5.3 Atividade Antioxidante

Durante a atividade do sistema biológico, o metabolismo celular gera inúmeros radicais livres, muitos desses radicais são produzidos sob a forma de espécies reativas de oxigênio (ROS) (VALKO et. al., 2007). A produção excessiva de ROS estimula diversos processos inflamatórios, os tecidos da pele também são afetados, na qual levam à degradação do colágeno e da matriz extracelular da pele, impedindo a produção de fibras que sustentam esses tecidos, desencadeando assim o envelhecimento cutâneo (GEGOTEK et al., 2019).

Diante disto, o potencial antioxidante do novo derivado da rutina (ACD32F2), foi avaliado através do ensaio de captura dos radicais livres, onde, segundo SOUZA et al. (2007), a porcentagem de atividade antioxidante corresponde à quantidade de DPPH e ABTS consumida pela substância antioxidante (tabela 3). Também foi realizado o ensaio de avaliação da atividade antioxidante celular que é baseada na detecção da inibição da produção de ROS intracelular utilizando o composto fluorescente: 2'7'-dicloro-fluoresceína-diacetato

(DCFH-DA) em linhagens celulares de fibroblastos (figura 12). Os resultados destas análises estão expressos em % de inibição.

Nos ensaios de DPPH e ABTS, a ACD32F2 (derivado da rutina), testada na concentração de 100 µg/mL, apresentou inibição inferior a 50% em ambos os ensaios. No ensaio antioxidante celular, quando testada na concentração de 200 µg/mL, a ACD32F2 demonstrou uma inibição de 58,5% de ROS, podemos observar no gráfico uma inibição dose-dependente, pois houve um decaimento na inibição de acordo com a diminuição da concentração. A partir desta análise, entende-se que a ACD32F2, quando comparado com a rutina que possui inibição maior que 50% em todos os ensaios antioxidantes, não possui capacidade de inibir uma porcentagem significativa de espécies reativas de oxigênio, com isso não possui atividade antioxidante.

SUBSTÂNCIAS	DPPH	ABTS
Ácido gálico	90,1±1,43	99,6±0,08
Rutina	89,4±0,31	85,2±0,54
ACD32F2	11,6±1,32	12,7±0,61

Tabela 3. Avaliação da atividade antioxidante através dos ensaios de DPPH e ABTS. A ACD32F2, Rutina, Ácido gálico (padrão), encontram-se na concentração única de 100 µg/mL e os dados estão expressos em porcentagem de inibição com D.P.M.

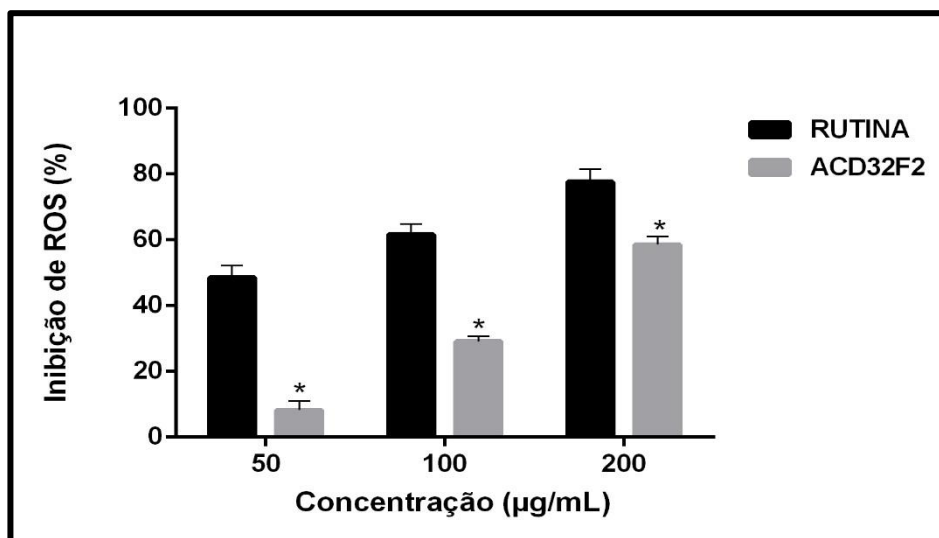


Figura 12. Avaliação da atividade antioxidante celular em linhagem de fibroblasto tratada com ACD32F2 e rutina, na concentração de 50, 100 e 200 µg/mL. Os dados estão expressos em porcentagem de inibição de ROS com média $\pm$ desvio padrão e analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. * $p < 0,05$, foi considerado estatisticamente significativo ao comparar a ACD32F2 com a rutina.

A estrutura química, o grau e posição de hidroxilação, presença de ligações duplas ou conjugação, tipo e posição de substituintes e glicosilação, são elementos que determinam a ação antioxidante de um flavonoide (GIL; COUTO, 2013). Se os compostos flavonoides apresentarem grupos hidroxilas na posição 3' e 4' do anel B ou na posição 7 e 8 do anel A, sua atividade antioxidante é elevada (AMIC et al., 2003). Um estudo da atividade antioxidante da rutina foi realizado por ZIELIŃSKA, SZAWARA-NOWAK e ZIELIŃSKI (2010) através dos ensaios de DPPH e ABTS, os autores afirmam que a atividade antioxidante desta molécula é referente à virtude do anel B ter uma maior facilidade de oxidação do que o anel A.

LUE e colaboradores (2010), realizaram uma modificação estrutural na rutina, através da adição de um grupo acil de cadeia crescente no anel de açúcar pertencente à molécula da rutina, o que ocasionou uma diminuição da atividade antioxidante. Os autores explicam que este fato está relacionado com a redução dos efeitos indutivos de elétrons dos grupos acila pela rutinose em sentido à porção 2-fenilcromen-4-ona da rutina.

A ACD32F2, nosso objeto de estudo, apresentou baixa atividade antioxidante, conclui-se que este resultado tenha sido afetado por sua modificação estrutural, onde algumas hidroxilas presentes na molécula da rutina foram substituídas por grupos benzil.

5.4 Atividade inibitória sobre a glicação de colágeno

A glicação é uma síntese não enzimática com açúcares redutores e grupos amino de proteínas, que sofrem rearranjos estruturais ocasionando a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs). O glioxal é uma espécie de carbonila reativa, formado durante o processo de peroxidação lipídica, auto-oxidação de glicose, contribuindo para a formação dos AGEs (CHEN et al., 2014).

O acúmulo dos AGEs é um fator primordial para o envelhecimento pois afetam diretamente proteínas de vida longa, como o colágeno, onde são formados e aglomerados ao longo da vida, provocando ligações cruzadas intermoleculares, levando ao aumento da rigidez e redução da flexibilidade da pele (SADOWSKA; BARTOSZ, 2016). A pele ao sofrer danos na matriz extracelular, através de fatores intrínsecos e extrínsecos, acelera a produção dos AGEs o que leva a uma maior degradação de colágeno, aumentando a expressão de rugas (GAUTIERI et al., 2017).

O gráfico representado na figura 13. refere-se a análise da atividade inibitória sobre a glicação de colágeno da ACD32F2 comparada com a rutina e aminoguanidina (controle positivo). Na formação dos AGEs na via do glioxal, a ACD32F2 apresentou melhor inibição na concentração de 100 µg/mL, exibindo $90,4 \pm 2,37\%$ de inibição da formação de AGEs, dado este superior a rutina ($74,1 \pm 2,25\%$) e ao controle positivo ($86,8 \pm 2,73\%$). A ACD32F2 apresentou inibição superior a 50% até em concentrações mais baixas como demonstrado na de 6,25 µg/mL ($53,1 \pm 2,41\%$).

Diante dos resultados expostos, o derivado obteve êxito na inibição da via do glioxal, impedindo a ligação do glioxal com o grupamento amina presente no colágeno, contribuindo para a não formação exacerbada de AGEs. É válido salientar que a ACD32F2 apresentou inibição superior quando comparado com a rutina e a aminoguanidina em todas as concentrações testadas apresentando CI_{50} de $2,45 \pm 0,47$, a rutina obteve CI_{50} de $4,633 \pm 0,64$ e a aminoguanidina, $50,7 \pm 3,45$.

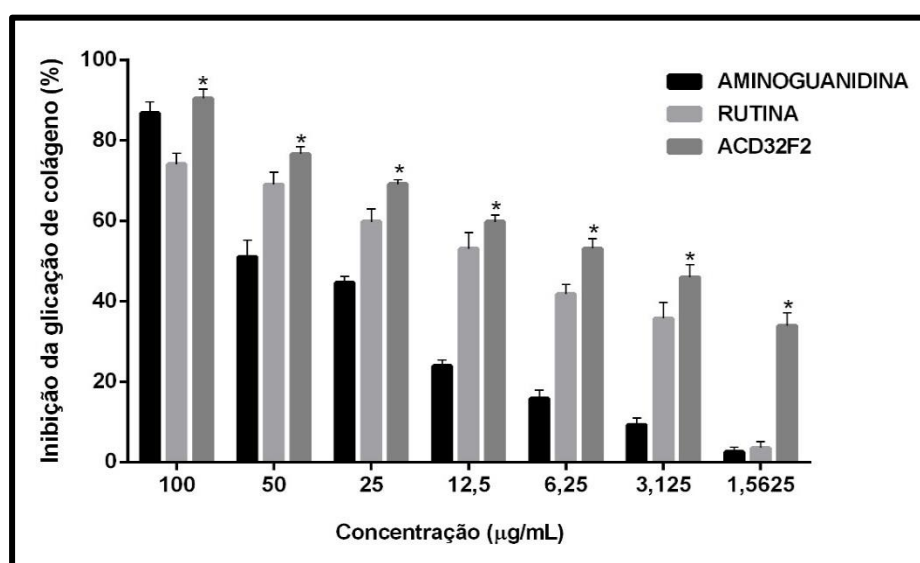


Figura 13. Inibição da glicação de colágeno através da formação dos AGEs pela via glioxal. As substâncias testes, foram a ACD32F2, Rutina e a Aminoguanidina (controle positivo), nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781 µg/mL. Dados são expressos em porcentagem de inibição da glicação de colágeno com média $\pm$ desvio padrão, analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett * $p < 0,05$, foi considerado estatisticamente significativo ao comparar ACD32F2 com a rutina.

PASHIKANTI e colaboradores (2010), realizaram um estudo avaliando o efeito inibitório de novos derivados da rutina sobre os produtos finais de glicação avançada não oxidativos. Os derivados de rutina foram testados como inibidores de AGE e apresentaram resultados eficazes quanto a aminoguanidina (padrão de inibição). CERVANTES-LAUREAN et al. (2006), avaliaram derivados da rutina na inibição da glicação de colágeno tipo I, e obtiveram resultados satisfatórios onde a rutina e seu derivados inibiram a formação

de AGEs fluorescentes e não fluorescentes induzidos pela glicação de glicose do colágeno tipo I.

Segundo KHAN e colaboradores (2020), a rutina é capaz de prevenir a síntese de AGEs, pois ela abrange um grupo vicinil dihidroxila que auxilia na eliminação de ROS, e previne a ligação entre essa espécie reativa de carbonila com o grupamento amina presente no colágeno tornando-a mais eficiente quando comparada com a aminoguanidina.

5.5 Avaliação sobre a proliferação celular

O envelhecimento é um processo natural que ocorre em todos os órgãos do corpo humano, processo este que pode ser acelerado devido a fatores intrínsecos e extrínsecos. A pele e seus componentes, estão mais sujeitos a danos extrínsecos devido sua grande exposição com o meio externo, podendo sofrer danos ambientais desencadeados pelos raios ultravioletas, ocasionando o fotoenvelhecimento, responsável pela degradação da síntese de fibroblastos. Essas células formam os constituintes da MEC, onde há produção de colágeno e elastina. A degradação destes constituintes promove a diminuição da elasticidade e consequentemente o enfraquecimento da estrutura dos tecidos da pele, levando a formação de rugas (BUENO, 2014).

Dessa forma, para avaliar um possível estímulo da ACD32F2 na proliferação celular de fibroblastos, utilizamos o ensaio Azul de tripan para analisar a quantidade de células viáveis em proliferação. Este método cora as células mortas, pois a membrana celular das células viáveis permanece intactas, impedindo a penetração do corante para o meio intracelular, com isso, as células viáveis são incolores e as células não viáveis (mortas) ficam de coloração azul (EISENBRAND et al., 2002).

No gráfico da figura 14, observa-se que no tempo de 24 horas o derivado ACD32F2 demonstrou o valor de 53×10^4 número de células, valor este superior ao da rutina ($37,5 \times 10^4$)

e da vitamina C ($47,5 \times 10^4$). Em 48 horas de tratamento, a ACD32F2 continuou demonstrando um aumento no número de células, exibindo $92,1 \times 10^4$. Em 72 horas houve um aumento significativo nas células expostas à ACD32F2, apresentando 145×10^4 número de células, quando comparado com a rotina (93×10^4) e a vitamina C ($137,2 \times 10^4$) a ACD32F2 apresenta um estímulo proliferativo à linhagem de fibroblastos.

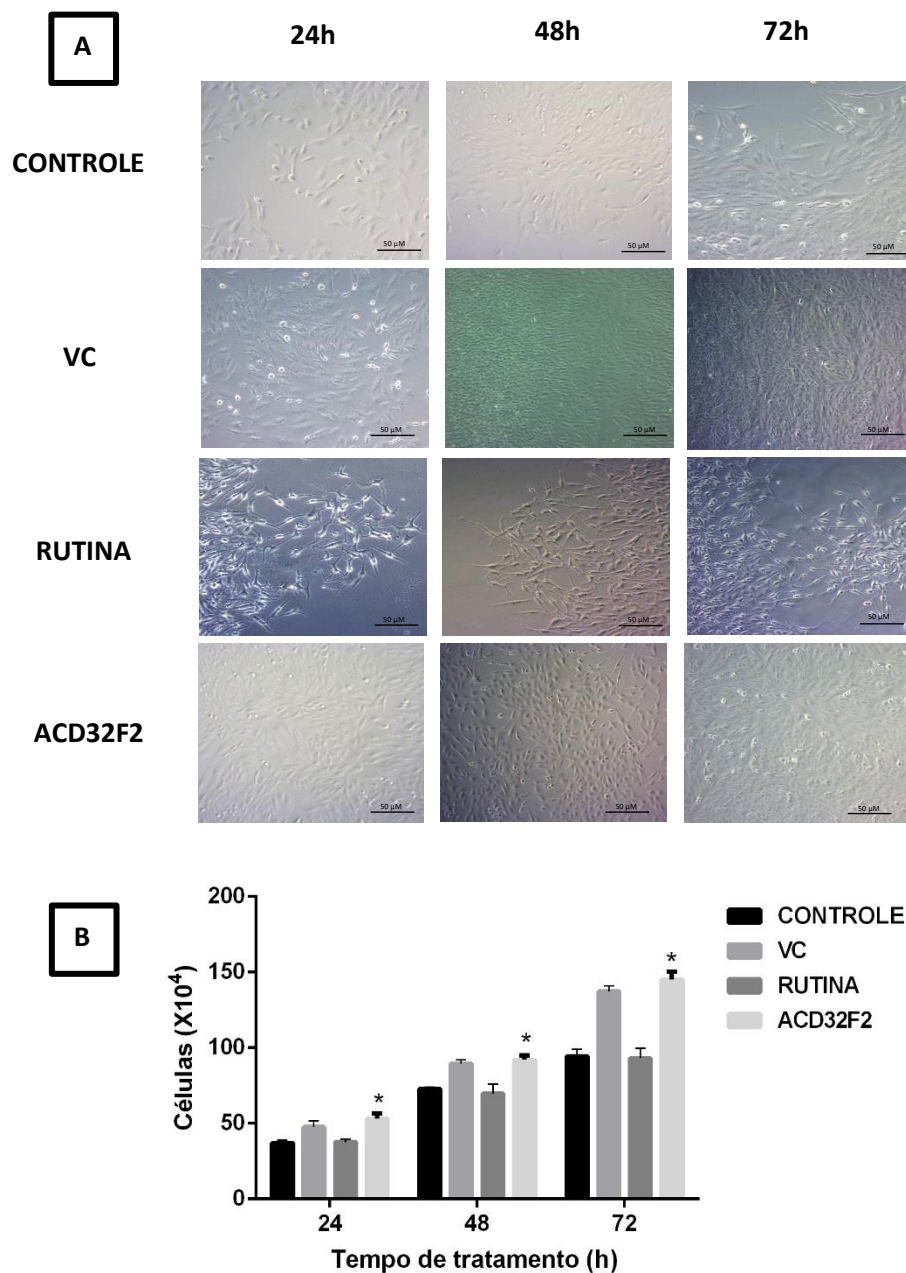


Figura 14. Avaliação da proliferação celular da ACD32F2, rutina e o padrão de vitamina C em células MRC-5. O gráfico indica a proliferação das células após exposição com amostras por 24, 48 e 72 h. Na imagem A temos a fotomicrografia da proliferação nos três tempos. A imagem B representa quantitativamente a proliferação com

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett, *p <0,05 foi considerado estatisticamente significativo ao comparar a ACD32F2 com a rutina.

GȨGOTEK e colaboradores (2019) estudaram o efeito combinado de ácido ascórbico e rutina sobre queratinócitos e fibroblastos humanos expostos à radiação UVA e UVB e observaram que o ácido ascórbico estimula a proliferação celular de fibroblastos e queratinócitos e a rutina demonstra instabilidade na proliferação, pois dependendo do local onde as células estão dispostas, a rutina torna-se capaz de estimular ou inibir a proliferação celular e as duas substâncias quando associadas potencializa a ação proliferativa. ABDEL-NAIM e colaboradores (2018) analisaram o efeito da rutina isolada de *Chrozophora tinctoria* sobre a proliferação de células ósseas e marcadores de ossificação e a rutina aumentou os marcadores de proliferação e ossificação nas células ósseas.

Na literatura há relatos de que a rutina tem ação antiproliferativa em células cancerígenas (SANTOS et al., 2011). Um estudo realizado por BHARATHI e colaboradores (2019) demonstraram que derivados da rutina exercem atividade antiproliferativa em linhagem de câncer de pulmão humano A549. CERQUEIRA e colaboradores (2003) avaliaram o efeito de alguns flavonoides sobre a proliferação de linfócitos, e observaram que a atividade antiproliferativa está associada com a estrutura química dos compostos, onde as flavonas foi a classe que apresentou uma elevada atividade antiproliferativa.

5.6 Ensaio da migração in vitro

Os reparos de danos teciduais são desenvolvidos através da cicatrização, onde há uma proliferação e migração das células fibroblásticas para o local da lesão. Os fibroblastos estão presentes no estágio inicial do processo de cicatrização, na qual é responsável por isolar e reparar o tecido lesado através da síntese de colágeno (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A motilidade é particularidade de células vivas, na qual se desenvolvem de forma proliferativa. O ensaio de migração *in vitro* é um complemento do teste de proliferação celular, que consiste na avaliação da atividade migratória de fibroblastos tratados com ACD32F2, rutina e vitamina C (padrão), após a formação de uma estria na monocamada de fibroblastos, mimetizando um dano tecidual. Diante disto, foi avaliada a capacidade das substâncias de estimularem a migração dessas células até a regeneração desse dano, pois com o aumento no número de fibroblastos, acontece a síntese de matriz extracelular e deposição de colágeno, produzindo a cicatriz. Esta análise foi realizada no período de 24, 48 e 72 horas com 100 µg/mL de cada substância.

Na figura 15, podemos observar que a partir do tempo de 24 horas as células que foram tratadas com a vitamina C e com a ACD32F2 começaram a estimular uma migração, pois suas bordas estão mais espessas, isso se confirma no tempo de 48 horas onde as células estão migrando para o centro do risco, promovendo um fechamento mais acentuado do que as células tratadas com a rutina. No tempo de 72 horas, a rutina e o controle negativo não apresentaram uma migração significativa, já a ACD32F2 e a vitamina C apresentaram fechamento de mais de 90% na área do risco.

GEÇOTEK e colaboradores (2019) afirmam que a rutina estimula a cicatrização de feridas através da proliferação de fibroblastos e consequentemente pela geração de matriz extracelular envolvendo a síntese de colágeno. TRAN e colaboradores (2011) realizaram um estudo utilizando um sistema de formação de gel composto por derivados de rutina associados com peróxido de hidrogênio e rábano, aplicados em feridas dérmicas, nesta pesquisa através de análises *in vitro*, observaram que ocorreu uma proliferação celular significativa em células tratadas com a rutina em comparação a células sem a substância. Os autores justificam este feito devido o fato de a rutina estimular a produção de fibroblastos e o acúmulo de colágeno no processo de cicatrização.

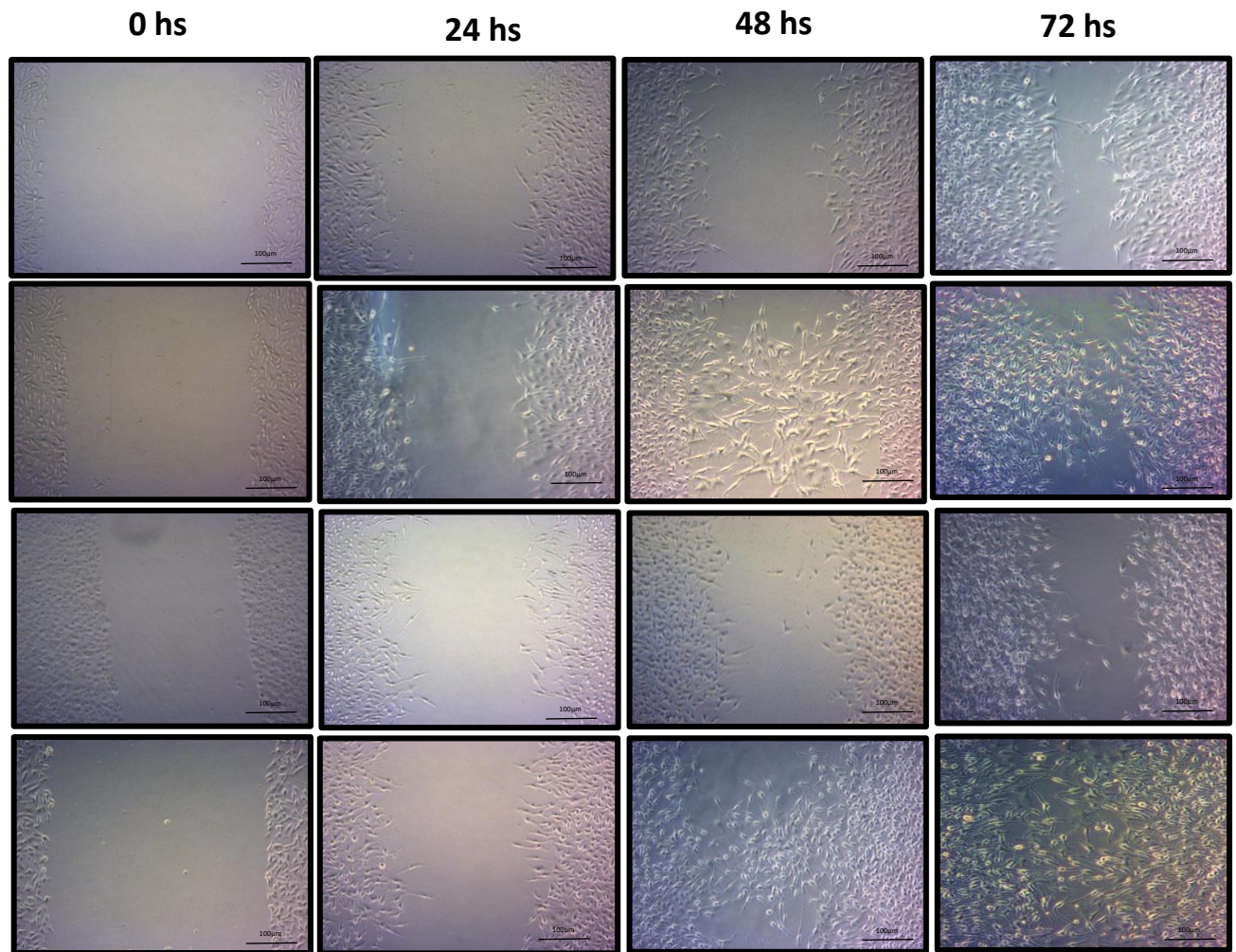


Figura 15. Avaliação da migração celular de fibroblastos expostos ao derivado ACD32A, rutina e a vitamina C (padrão). A fotomicrografia indica a migração das células para o fechamento de um risco, mimetizando um dano tecidual, em uma monocamada de células após tratamento com as amostras testes pelo tempo de 24, 48 e 72 h.

Diante dos resultados expostos, podemos dizer que o derivado da rutina ACD32F2 obteve um melhor estímulo na migração e proliferação de fibroblastos quando comparado com a rutina. Com isso o mesmo apresenta grande potencial no desenvolvimento de produtos que auxiliem no reparo de danos teciduais.

5.7 Quantificação de colágeno da cultura celular de fibroblastos

O colágeno é uma proteína estrutural encontrada na derme responsável por formar as principais fibras do tecido conjuntivo denso. É uma proteína de suma importância na manutenção da integridade estrutural dos tecidos da pele. O colágeno do tipo I e III são

responsáveis pela formação de fibras que dão sustentação e elasticidade aos tecidos. A redução da síntese desses colágenos leva ao enfraquecimento da pele e ao aumento de sua susceptibilidade a agressões do meio externo. Sendo assim, a inibição da síntese de colágeno ou uma perda na função do colágeno resulta no envelhecimento do tecido cutâneo (MARIONNET; TRICAUD; BERNERD, 2015).

A ACD32F2 foi avaliada para averiguar seu potencial na síntese de colágeno em cultura celular de fibroblastos, esta quantificação foi realizada através do método Sirius red. Para esta análise foi feita uma curva com colágeno tipo I para o cálculo da quantificação do colágeno sintetizado em fibroblastos (figura 16).

De acordo com a demonstração gráfica (figura 17), podemos observar que após o tratamento em fibroblastos com 100 µg/mL de ACD32F2, rutina e vitamina C (controle positivo), a síntese de colágeno foi quantificada em µg/mL, onde obtivemos $17,5 \pm 0,21$ no tratamento com ACD32F2, $2,6 \pm 0,05$ com rutina, $12,5 \pm 0,08$ com o tratamento de vitamina c e o controle negativo $1,3 \pm 0,01$ µg/mL.

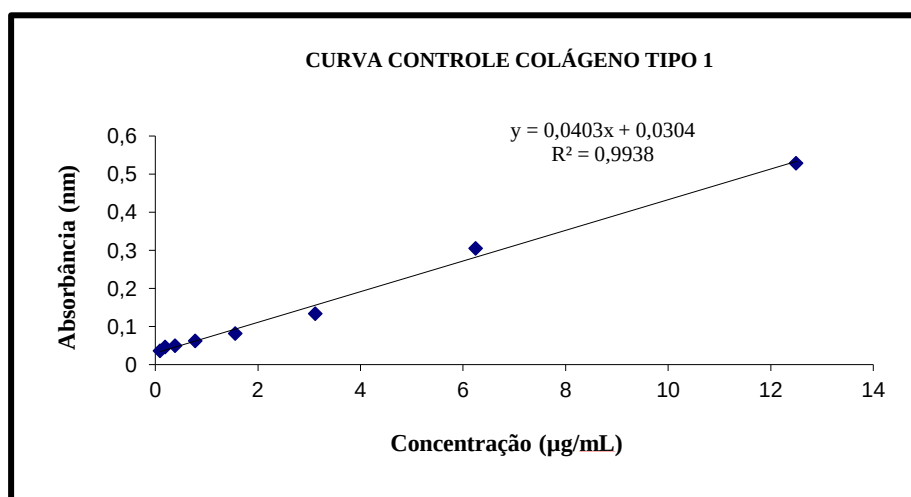


Figura 16. Curva de colágeno utilizada como controle para o cálculo da dosagem de colágeno da ACD32F2, rutina e ácido ascórbico.

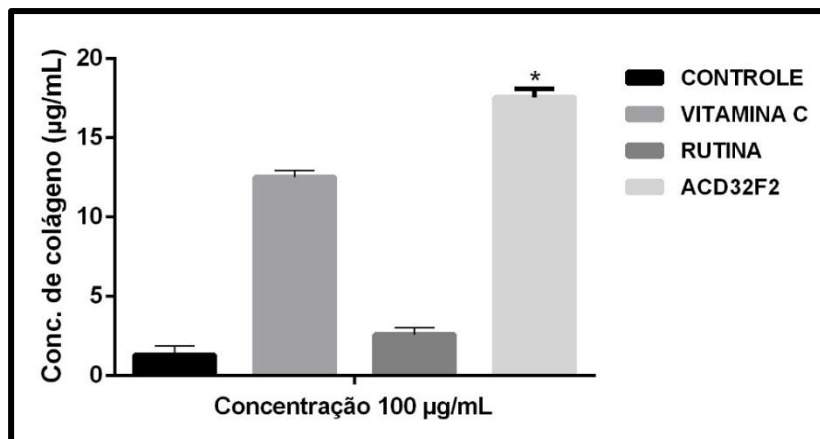


Figura 17. Avaliação da síntese de colágeno em fibroblastos estimulados com 100 µg/ mL de ACD32F2, rutina e vitamina C. Os dados estão expressos em concentração de colágeno em µg/ mL, com média ± desvio padrão, analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett *p < 0,05, foi considerado estatisticamente significativo ao comparar ACD32F2 com a rutina.

Os resultados indicam um aumento significativo na quantidade total de colágeno depositado por fibroblastos através do estímulo com a ACD32F2 em comparação com a rutina, sendo superior até mesmo que a vitamina C, controle positivo.

STIPCEVIC e colaboradores (2006) estudaram o efeito de diferentes flavonoides (flavanona, flavona e flavonol) na síntese de colágeno em fibroblastos humanos, dentre eles, apenas a rutina, morina, e crisina aumentaram a concentração de colágeno. A quercetina mostrou efeito citotóxico nos fibroblastos consequentemente diminuiu a concentração de colágeno total.

5.8 Avaliação da genotoxicidade através do teste do cometa

A área dermocosmética está buscando diferentes estratégias de ensaios in vitro para a substituição do uso animais, com isso o teste de cometa é uma alternativa de teste de segurança cosmética, pois sua técnica analisa diferentes níveis de dano ao DNA (KUMARAVEL; JHA, 2006).

A ACD32F2 foi testada na concentração de 200 µg/mL para avaliar a capacidade de causar danos ao DNA, em células de fibroblasto humano, utilizando a técnica de pH alcalino,

sendo utilizado para a análise comparativa do índice de dano (ID) e frequência de dano ao DNA.

Após o tratamento de 3 horas com a ACD32F2, rutina e EMS (etil-metanosulfonato - controle positivo de dano), os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão do índice de dano, conforme a figura 18. A concentração teste utilizada da ACD32F2 e da rutina foi de 200 μ g/mL e EMS 5mM, nesta concentração a ACD32F2 e a rutina não apresentaram atividade genotóxica quando comparada com o controle positivo, apresentando média de índice de dano de $1 \pm 0,5$, $10,5 \pm 2,38$, $86,8 \pm 4,47$, respectivamente.

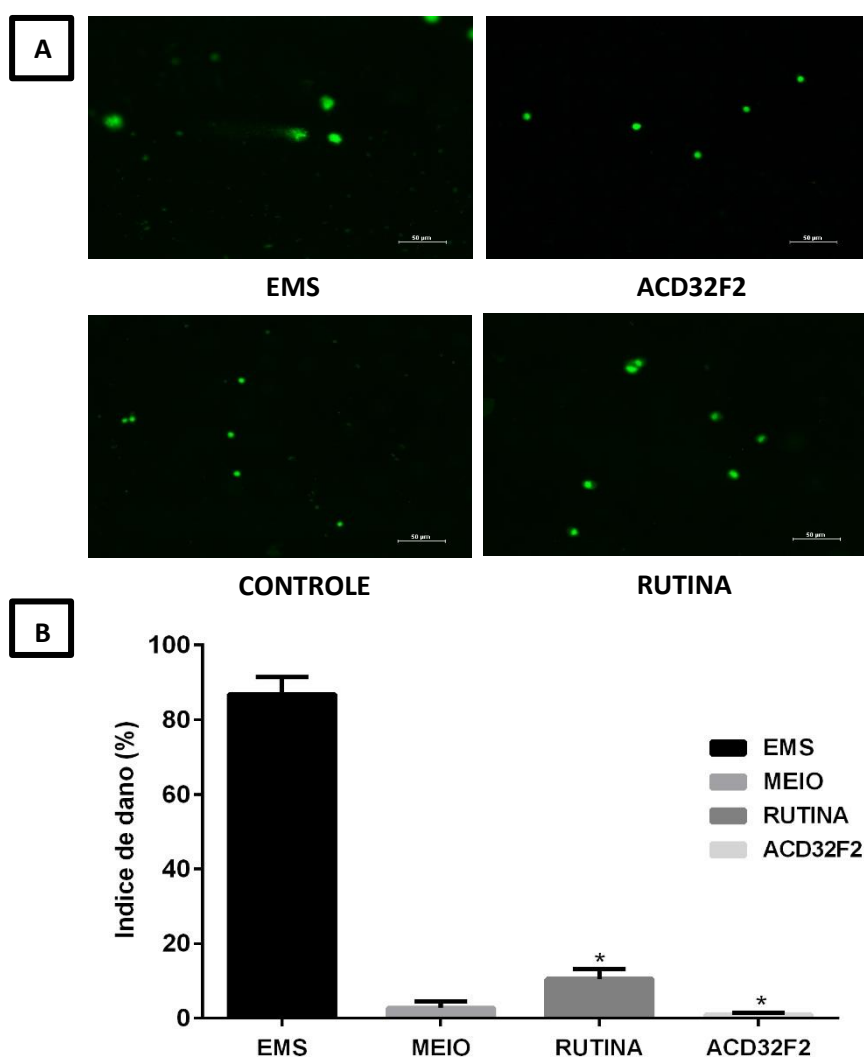


Figura 18. Avaliação do efeito genotóxico em fibroblastos após tratamento de 3 horas com ACD32F2, rutina e EMS. A) Fotomicrografias dos danos em fibroblastos induzido pelas substâncias testes. B) Gráfico referente ao índice de dano obtido pelo ensaio cometa em pH alcalino após tratamento com as substâncias. Dados estão apresentados com média $\pm$ desvio padrão, analisados por one-way ANOVA seguido do teste de teste de Dunnett * $p < 0,05$, foi considerado estatisticamente significativo ao comparar ACD32F2 e Rutina com o controle positivo EMS.

Com relação à frequência de dano, os fibroblastos apresentaram $99 \pm 1,29$ % de danos de grau zero e 0,5 % de grau 1 e 2 quando tratados com a ACD32F2, comparando estes dados com o controle positivo – EMS, o mesmo apresentou variação na frequência de dano, apresentando dano de grau 1 ($61 \pm 0,95\%$), 2 ($15,2 \pm 4,85\%$), 3 ($12 \pm 3,55\%$) e 4 ($1,3 \pm 2,75\%$), conforme representado na figura 19.

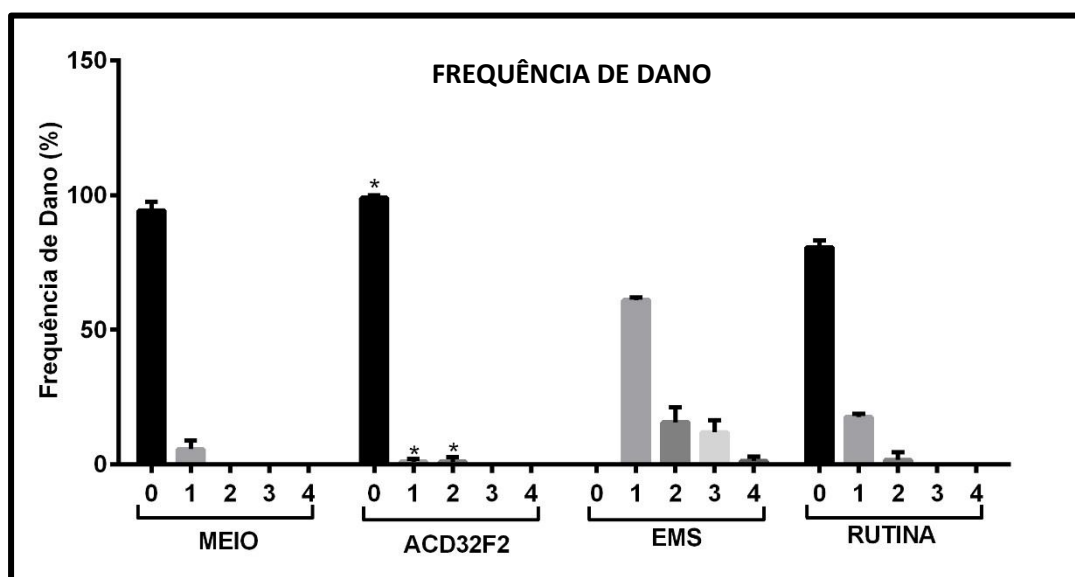


Figura 19. Frequência do dano causado ao DNA pelo ensaio cometa em pH alcalino. A frequência do dano é expressa em porcentagem (%), sendo a variação do grau 0 a 4 de fragmentação do DNA. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo ao comparar ACD32F2 com EMS. Os dados foram analisados por two-way ANOVA seguido do teste de teste de Dunnett.

RAPHAELLI e colaboradores (2019) desenvolveu uma pesquisa referente a bioatividade de extratos fenólicos de maçã, que é rica em compostos fenólicos. Nesse estudo realizaram o teste de genotoxicidade onde os extratos não induziram danos ao DNA. O extrato purificado reduziu até 34% a formação de danos ao material genético induzido pela radiação UV em cultura de fibroblastos humanos.

Um estudo realizado por BARCELOS e colaboradores (2011) avaliou os efeitos antigenotóxicos dos flavonóides, quercetina e rutina, em células HepG2 (hepatocarcinoma humano) os resultados demonstraram que a rutina quando testada na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ não induziu genotoxicidade nesta linhagem celular. MARCARINI e colaboradores

(2011) estudaram o efeito genotóxico da rutina em outra linhagem celular hepática- HTC, onde a maior concentração testada de 810 μ M, induziu dano ao DNA.

Os resultados referente ao dano e fragmentação do DNA em fibroblastos humanos após exposição com ACD32F2 não demonstrou dano genotóxico, se apresentando como uma substância segura para futuras aplicações cosméticas.

5.9 Ensaio de avaliação de irritação cutânea in vitro em modelo de pele reconstruída

O ensaio de avaliação e irritação cutânea em modelo de pele reconstruída também é um método alternativo para a substituição do uso de animais, pois neste ensaio é confeccionado um modelo de pele reconstruída através da cultura celular de fibroblastos e queratinócitos, na qual apresentam mecanismos objetivos e quantitativos para determinar o potencial de irritação cutânea de uma substância (JUNG et al., 2014).

O potencial de irritação cutânea da ACD32F2 foi realizado logo após a geração do modelo de pele reconstruída que foi baseado no trabalho de SOUSA (2018), conforme descrito na metodologia. Os tecidos foram expostos à ACD32F2 e ao SDS (dodecil sulfato de sódio), controle positivo de irritação. Após essa exposição, foi feito o ensaio de viabilidade pelo método de MTT, onde obtivemos os resultados representados no gráfico da figura 20.

De acordo com a representação gráfica podemos observar que a viabilidade celular dos tecidos do modelo de pele reconstruída quando exposta a ACD32F2 apresentou viabilidade acima de 100%, o que pode indicar uma proliferação celular, fato este observado nos ensaios anteriores, porém, outros testes devem ser executados a fim de analisar a histologia da pele após o tratamento com essa substância.

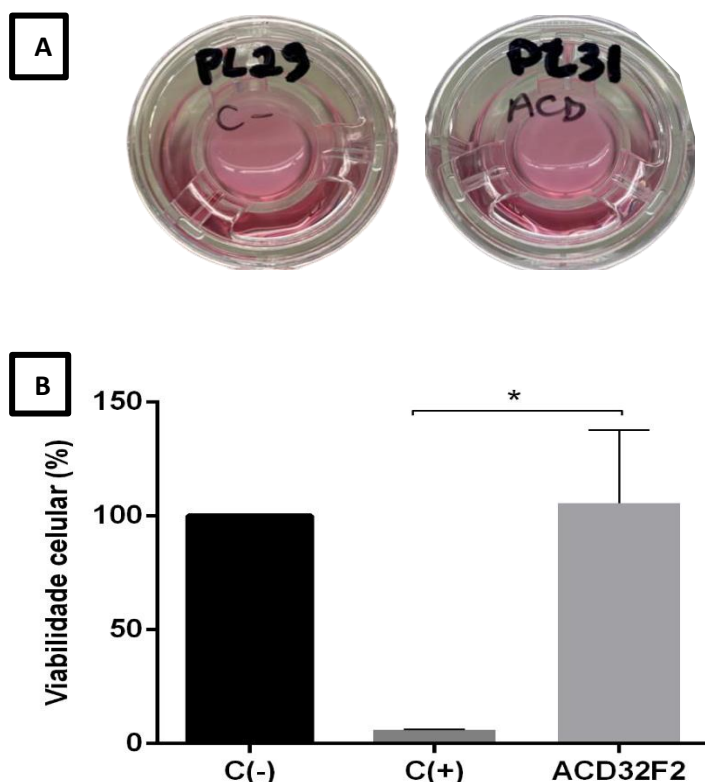


Figura 20. Avaliação da irritação cutânea em modelo de pele reconstruída, tratada com ACD32F2, SDS (controle positivo) e meio de cultura (controle negativo). A) Imagem da pele reconstruída tratada com o controle negativo e com a ACD32F2. B) Dados da porcentagem de viabilidade celular, estão expressos em média $\pm$ desvio padrão, onde foram analisados por one-way ANOVA seguido do teste de teste de Dunnett * $p < 0,05$, foi considerado estatisticamente significativo ao comparar ACD32F2 com o controle positivo.

Quando comparamos a ACD32F2 com o, controle positivo, SDS, notoriamente é possível observar o potencial irritante do SDS, pois a viabilidade celular é de $6 \pm 0,21\%$. Segundo a OECD (2015) uma substância é considerada irritante quando sua porcentagem de viabilidade celular está abaixo de 50%.

A maioria dos ensaios de irritação ainda é utilizando testes em animais, com isso torna-se escasso na literatura estudos da avaliação de irritação in vitro em modelo de pele reconstruída, pois em alguns locais, como no Brasil, ainda é permitido o uso de animais, devido as limitações geopolíticas. Mas diversos campos de pesquisas estão buscando a implementação deste modelo possibilitando a execução de diferentes métodos alternativos para abolir o uso de animais (DE WEVER et al, 2015; PEDROSA et al, 2017).

5.10 Avaliação do coeficiente de partição e permeação cutânea in silico

A avaliação do coeficiente de partição e permeação cutânea da ACD32F2 e rutina foi realizado através da ferramenta online SwissADME do Swiss Institute of Bioinformatics. De acordo com este programa, o derivado da rutina (ACD32F2) apresentou um valor de coeficiente de partição óleo/água (logP) de 4,9 (conforme tabela abaixo).

Substâncias	Log P (coeficiente de partição)	Log Kp (permeabilidade cutânea)
ACD32F2	4,9	- 4,82 cm/s
Rutina	1,63	-7,05 cm/s

Tabela 4. Avaliação in silico do coeficiente de partição e permeação cutânea da ACD32F2 e rutina por SwissADME.

Segundo BARREIRO e FRAGA (2014), se o valor de logP está normalmente compreendido entre 1 a 5, a substância é capaz de expressar requisitos farmacocinéticos e farmacodinâmicos ideais para um fármaco. Além disso, uma substância que apresenta um coeficiente de partição maior, tende a apresentar maior taxa de permeabilidade. Já a rutina, apresentou um coeficiente de partição com um valor de 1,63, sendo assim a ACD32F2 poderá apresentar uma maior taxa de permeabilidade quando comparada a rutina visto que seu logP é maior.

O SwissADME também nos deu o valor de Kp (tabela 4). A ADC32F2 apresenta valor de Kp - 4,82 cm/s e a rutina -7,05 cm/s. Esse resultado nos indica que a ADC32F2 possui capacidade de permeabilidade maior do que a rutina, pois segundo DAINA; MICHIELIN e ZOETE (2017) quanto mais negativo o log Kp, menos permeável à pele é a molécula.

Em 1988, Brown e colaboradores estudaram o coeficiente de partição da rutina no sistema octanol/água e a mesma apresentou logP de 0,37. ARAUJO (2016) realizou um estudo através da modificação estrutural de alguns flavonoides pela reação de acilação, onde encontrou valores de logP superior aos os flavonoides de origem, justificando que a reação de acilação contribui significativamente para a melhoria da biodisponibilidade dos derivados.

6. CONCLUSÃO

Foi obtido um novo derivado da rutina preparado por reação de benzilação, ocorrendo a substituição dos hidrogênios e dos anéis aromáticos da rutina por brometo de benzila, formando assim um derivado benzilado da rutina, a ACD32F2 (7-(benziloxi)-2-(4-(benziloxi)-3-hidroxifenil)-3,5-di-hidroxi-4H-cromen-4-ona).

A análise de eficácia demonstra que a substância apresentou moderada atividade antioxidante apenas no sistema biológico. O novo derivado inibiu a produção de produtos de glicação avançada em colágeno pela via do glioxal. O novo derivado estimulou a proliferação e migração celular e aumentou a síntese de colágeno em fibroblastos, desenvolvendo atividade superior a rutina em ambos ensaios.

O novo derivado, quando avaliado por meio de teste *in silico*, provavelmente apresenta melhor permeação que a rutina.

O novo derivado da rutina não apresentou citotoxicidade em linhagens celulares de fibroblastos e queratinócitos humano, na concentração de 200µg/mL, e no ensaio de genotoxicidade o mesmo não induziu dano no DNA na linhagem de fibroblastos.

Na avaliação de irritação em modelo de pele reconstruída o derivado benzilado da rutina não demonstrou efeito irritativo, se apresentando como uma substância segura, neste ensaio.

Os resultados apresentados nesta pesquisa, apontam que o derivado benzilado da rutina, além de apresentar resultados satisfatórios com relação à permeação, o mesmo demonstra ser eficaz e seguro para futuras aplicações cosméticas destinada ao envelhecimento cutâneo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-NAIM A. B. et al. Rutina isolada de *Chrozophora tinctoria* aumenta a proliferação de células ósseas e os marcadores de ossificação. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2018.

AGATI, G.; TATTINI, M. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. **New Phytologist**, v. 186, n. 4, p. 786–793, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIO (ANVISA). **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. Brasília, 2003.

AHMED, S. A.; GOGAL J. R.; 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.

AMALESH, S.; GOURANGA, D.; SANJOY, K. D. Roles of flavonoids in plants. **Int J Pharm Sci Tech**, v. 6, p. 12–35, 2011.

AMIC, D. et al. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Croat. Chem. Acta.**, v. 76, n. 1, p. 55-61, 2003.

ANILKUMAR, T. V. et al., Advantages of hyaluronic acid as a component of fibrin sheet for care of acute wound. **Biologicals**, v. 39, p. 81-88, 2011.

ARAÚJO, R. V S. et al. Metalloproteinases: systemic physio-pathological aspects and its importance in the wound healing. **R. Ci. md. biol.**, v.10, n.1, p.82-88, 2011.

ARAÚJO, K. C. F. et al. Bioconversion of quercetin and rutin and the cytotoxicity activities of processed products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 93-96, 2013.

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.

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.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, p.27-51, 2005.

BANDYOPADHYAY, D. Topical Treatment of Melasma. **Indian Journal of Dermatology**, n. 04, v. 54, p. 303-309, 2009.

BARCELOS, G. R. et al. Evaluation of antigenotoxic effects of plant flavonoids quercetin and rutin on HepG2 cells. **Phytother Res.**, v. 25, n. 9, p. 1381-1388, 2011.

BARONI, A. et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clin Dermatol**, v. 30, n. 3, p. 257–262, 2012.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal:- As bases moleculares da ação dos fármacos**. Artmed Editora, 2014.

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.

BHARATHI, D. et al. Bio-inspired synthesis of chitosan/copper oxide nanocomposite using rutin and their anti-proliferative activity in human lung cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 141 p. 476–483, 2019.

BREITKREUTZ, D.; MIRANCEA, N.; NISCHT, R. Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions? **Histochem Cell Biol**, v. 132, p. 1-10, 2009.

BROWN, J. E. et al. A. Structural dependence of flavonoid interaction with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. **Biochemical Journal**, v. 330, n. 3, p. 1173-1178, 1998.

BUENO, F. G. Poincianella pluviosa: Estudo da viabilidade celular e proliferação de fibroblastos e queratinócitos in vitro, e avaliação da atividade cicatrizante em ratos diabéticos e normoglicêmicos. **Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá**, 2014.

CAMPO, P.; MERCÚRIO, D. Pharmacology and the skin. **RBM Rev. Bras. Med**, n. 66, p. 15–21, 2009.

CARULLO, G. et al. Quercetin and derivatives: useful tools in inflammation and pain management. **Future Med. Chem.**, v. 9, n. 1, p. 79–93, 2017.

CERQUEIRA, F. Inhibition of lymphocyte proliferation by prenylated flavones; Artelastin as a potent inhibitor. **Life Sciences**, v. 73, p. 2321 – 2334, 2003.

CHATZIATHANASIADOU, M. V. et al. Amplifying and broadening the cytotoxic profile of quercetin in cancer cell lines through bioconjugation. **Amino Acids**, v. 50, n. 2, p. 279-291, 2018.

CHEN, X. Y. et al. Anthocyanins in blackcurrant effectively prevent the formation of advanced glycation end products by trapping methylglyoxal. **Journal of Functional Foods**, v. 8, p. 259–268, 2014.

CHIRUMBOLO S. The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function. **Inflamm. Allergy Drug Targets**, v. 9, n. 4, p. 263–285, 2010.

CHOI, S. J. et al. Biological effects of rutin on skin aging. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 38, p. 357-363, 2016.

CHUNG, J. H.; EUN, H. C. Angiogenesis in skin aging and photoaging. **Journal of Dermatology**, n. 34, p. 593-600, 2007.

CUNHA, M. G.; CUNHA, A. L. G.; MACHADO, C. A. Hypodermis and subcutaneous adipose tissue two different structures, **Surg Cosmet Dermatol**, v. 6, n. 4, p. 355-359, 2014.

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.

DAJAS, F. et al. Quercetin in brain diseases: Potential and limits. **Neurochemistry International**, v. 89, p. 140-148, 2015.

DE WEVER, B. et al. “open source”-based engineered human tissue models: a new gold standard for Nonanimal testing through openness, transparency, and collaboration, promoted by the ALEXANDRA Association. **Appl. in Vitro Toxicol.**, v. 1, p.5-9, 2015.

DESMOND, J. T. Introduction to skin aging. **Journal of Tissue Viability**, n. 26, p. 37-46, 2017.

ESCOBEDO, M. E. R. et al. Synthesis and biological activity of chalcones. **Rev Mex Cienc Farm**, v. 43, n. 4, p. 7-14, 2012.

FELDNER, P. C. et al. Evaluation of glycosaminoglycans of periurethral tissue of patients with and without genital prolapse. **Rev Assoc Med Bras**, v. 54, n. 2, p. 173-177, 2008.

FERREYRA, M. L. F.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in plant science**, v. 3, p. 222, 2012.

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

GALLAGHER, A. J. et al. Dynamic Tensile Properties of Human Skin. **IRCOBI Conference**. Dublin, 2012.

GALLO, R. L.; HOOPER, L. V. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 7, p. 503–516, 2012.

GALLO, N. et al., Hyaluronic acid for advanced therapies: Promises and challenges. **European Polymer Journal**, n. 117, p. 134-147, 2019.

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

GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. K. The Pharmacological Potential of Rutin. **Saudi Pharmaceutical Journal**, n. 25, p. 149-164, 2017.

GAUTIERI, A. et al. Advanced glycation end-products: Mechanics of aged collagen from molecule to tissue. **Matrix Biol.**, v. 59, p. 95–108, 2017.

GEGOTEK, A. et al., Rutin and ascorbic acid cooperation in antioxidant and antiapoptotic effect on human skin keratinocytes and fibroblasts exposed to UVA and UVB radiation. **Archives of Dermatological Research.**, n. 311, p. 203–219, 2019.

GIL, E. S.; COUTO, R. O. Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 23, n.3. 2013.

HALABI, C. M.; MECHAM, R. P. Elastin purification and solubilization. **Methods Cell Biol.**, n. 143, p. 207–222, 2018.

HOSSEINZADEH, H.; NASSIRI-ASL, M. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 37, n. 9, p. 783–788, 2014.

HWA, C.; BAUER, E. A.; COHEN, D. E. Skin biology. **Dermatol Ther**, v. 24, n. 5, p. 464–470, 2011.

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

JAMES G.; MARKS, J. G.; MILLE, J. J. Structure and Function of the Skin. **Lookingbill and Marks' Principles of Dermatology**, n. 6, p. 2-10, 2019.

JONES, R. R. et al. The collagen stimulating effect of peptide amphiphile C16-KTTKS on human fibroblasts. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, p. 1063–1069, 2013.

JUNG, K. M. et al. KeraSkin TM -VM: um novo modelo de epiderme humana reconstruída para testes de irritação da pele. **Toxicology in vitro**, v. 28, p. 742-750 , 2014.

KAJJOUT, M.; ZEMMOURI, R.; ROLANDO, C. An expeditious synthesis of quercetin 3-O-b-D-glucuronide from rutin. **Tetrahedron Letters**, vol. 52, p. 4738–4740, 2011.

KARAGAG, A. et al. Optimization of preparation conditions for quercetin nanoemulsions using response surface methodology. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 61, n. 9, p. 2130–2139. 2013.

KHAN, H. et al. Flavonoids nanoparticles in cancer: Treatment, prevention and clinical prospects. **Seminars in Cancer Biology**, 2019.

KHAN, M. et al. Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advance glycation end products: A comprehensive review. **Food Research International**, v. 130, 2020.

KIHO, T. et al. Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 68, n. 1, p. 200-205, 2004.

KIRSCHWENG, B. et al. Melt stabilization of PE with natural antioxidants: Comparison of rutin and quercetin. **European Polymer Journal**, n. 103, p. 228–237, 2018.

KORESEC, A. et al. Lineage Identity and Location within the Dermis Determine the Function of Papillary and Reticular Fibroblasts in Human Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, n. 139, p. 342-351, 2019.

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.

KUMARAVEL, T. S.; JHA, A. N. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. **Mutation Research**, v. 605, p. 7–16, 2006.

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. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overvie. **The Scientific World Journal**, 2013.

KUMAZAWA, Y. et al Potential use of dietary natural products, especially polyphenols, for improving type-1 allergic symptoms. **Curr. Pharm. Design**, n. 20, p. 857 – 863, 2014.

KYOUNGSEON, M. et al. A perspective on the biotechnological applications of the versatile tyrosinase. **Bioresource Technology**, n. 289, 2019.

LANGTON, A. K. et al. Aging in Skin of Color: Disruption to Elastic Fiber Organization Is Detrimental to Skin's Biomechanical Function. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 139, p. 779-788, 2019.

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.

LOPES, T. F. et al. Anthocyanins: a brief review of structural characteristics and stability. **R. Bras. Agrocência**, v.13, n.3, p. 291-297, 2007.

LUE, B. M. et al. Antioxidant properties of modified rutin esters by DPPH, reducing power, iron chelation and human low density lipoprotein assays. **Food Chemistry**, v. 123, p. 221–230, 2010.

MALEKI, S. J.; CRESPO, J. F; CABANILLAS, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food Chemistry**, n. 299, p. 124-125, 2019.

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.

MARZOCHELLA, L. et al. Dietary flavonoids: Molecular mechanisms of action as anti-inflammatory agents. **Rec. Patents Inflamm. Allergy Drug Disc.**, n. 5, p. 200-220, 2011.

MASSI, A. et al. Research Progress in the Modification of Quercetin Leading to Anticancer Agents. **Molecules**, v. 22, n. 8, 2017.

MATSUI, T.; AMAGAI, M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. **Int Immunol**, v. 27, n. 6, p. 269-280, 2015.

MENAA, F. et al. Polyphenols Nano-formulations for Topical. **Elsevier Inc**, 2014.

MENDONÇA, R. S. C; RODRIGUES, G. B. O. Major dermatological changes in obese patients. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, v. 24, n. 1, p. 68-73, 2011.

MENON, G. K.; CLEARY, G. W.; LANE, M. E. The structure and function of the stratum corneum. **Int J Pharm**, v. 435, n. 1, p. 3-9, 2012.

MIEKUS, N. et al. MMP-14 degrades tropoelastin and elastin. **Biochimie**, n. 165, p. 32, 39, 2019.

MLCEK, J. et al. Quercetin and Its Anti-Allergic Immune Response. **Molecules**, v. 21, n. 5, 2016.

MOHAMAD, A. S. et al. Antinociceptive activity of a synthetic chalcone, flavokawin B on chemical and thermal models of nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 647, n. 103, p. 103-109, 2010.

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

MURPHREE, R. W. Impairments in Skin Integrity. **Nurs Clin N Am**, n.52, p. 405-417, 2017.

MYRPHY, K. J. et al. Estimation of daily intake of flavonoids and major food sources in middle-aged Australian men and women. **Nutrition Research**, v. 61, p. 64-8, 2019.

NAGULA, R. L.; WAIRKAR, S. Recent advances in topical delivery of flavonoids: A review. **Journal of Controlled Release**. v. 296, p. 190-201, 2019.

NAKAYAMA, G. R. Assessment of the alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal Immunology Methods**, v. 204, p. 205–208, 1997.

NARGISA, N. N.; ALDREDGEA, R. C.; GUYB, R. D. The influence of soluble fragments of extracellular matrix (ECM) on tumor growth and morphology. **Mathematical Biosciences**, n. 296, p. 1–16, 2018.

OECD TG 439. In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. **OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS**, 2015.

ONTIVEROS, M. et al. Natural flavonoids inhibit the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. **Biochemical Pharmacology**, n. 166, p. 1- 11, 2019.

PAGE, A. L. et al. The role of elastin-derived peptides in human physiology and diseases. **Matrix Biology**, In Press, 2019.

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

PEDROSA, T. N. et al. A new reconstructed human epidermis for in vitro skin irritation testing. **Toxicology in Vitro**, v. 42, p. 31–37, 2017.

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

QIN, Z.; VOORHEES, J. J.; QUAN, F. T. Age-associated reduction of cellular spreading/mechanical force up-regulates matrix metalloproteinase-1 expression and collagen fibril fragmentation via c-Jun/AP-1 in human dermal fibroblasts. **Aging Cell**, n. 13, p. 1028-1037, 2014.

QUAN, T.; FISHER, G. J. Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging: a minireview. **Gerontology**, v. 61, n. 5, p. 427-434, 2015.

RANSON, G. et al. Plasma matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs and aging and lifelong exercise adaptations in ventricular and arterial stiffness. **Experimental Gerontology**, n. 123, p. 36–44, 2019.

RAPHAELLI, C. O. et al. Bioactivity of phenolic extracts of apple (*Malus domestica* Borkh cv. Gala). **Pharmacogn Mag**, 2019.

RASHIDINEJAD, A. et al. Rutin-casein co-precipitates as potential delivery vehicles for flavonoid rutin. **Food Hydrocolloids**, n. 96, 451-462, 2019.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RODRIGUEZ, S. F.; FOLGUERAS, A. R.; OTÍN, C. L. The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and Beyond. **BBA - Molecular Cell Research**, n. 1864, p. 2015-2015, 2017.

SADOWSKA, I. B.; BARTOSZ; G. Effect of glycation inhibitors on aging and age-related diseases. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 160, p.1–18, 2016.

SANTOS, I. et al. Quantitative study of Langerhans cells in basal cell carcinoma with higher or lower potential of local aggressiveness. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 2, p. 165-171, 2010.

SANTOS, B. L. et al. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 404–11, 2011.

SCHANTE, C. E. et al. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 469-489, 2011.

SHELKE, S. J.; SHINKAR, D. M.; SAUDAGAR, R. B. Topical gel: a novel approach for development of topical drug delivery system, **Int. J. Pharm. Technol.**, v. 5, p. 2739-2763, 2013.

SHIRAKATA, Y. Regulation of epidermal keratinocytes by growth factors. **Journal of Dermatological Science**, v. 59, p. 73-80, 2010.

SILVA, S. L. Anatomic variations of the subcutaneous tissue after ponderal weight lost. **Rev. Bras. Cir. Plást.**, v. 25, n. 4, p. 675-678, 2010.

SINGH, N. P. et al. Technique for Quantitation Damage in Individual of Low Levels of DNA Cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184–191, 1988.

SINGH, D. et al. Rutin-phospholipid complex: An innovative technique in novel drug delivery system-NDDS. **Current Drug Delivery**, v. 9, n.3, p. 305–314, 2012.

SINGH, B.; KUMAR, A.; MALIK, A. K. Flavonoids biosynthesis in plants and its further analysis by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, n. 38, p. 820–832, 2017.

SKOWRON, J. M.; KRAWCZYK, M; ZGOLA, G. S. A. Determination of antioxidant activity, rutin, quercetin, phenolic acids and trace elements in tea infusions: Influence of citric acid addition on extraction of metals. **J. Food Comp. Anal**, n. 40, p. 70-77, 2015.

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.

SOUSA, L. B. Desenvolvimento e aplicação de modelo de pele humana reconstruída in vitro para estudos de citotoxicidade e genotoxicidade. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018.

SUNDER, S. Relevant Topical Skin Care Products for Prevention and Treatment of Aging Skin. **Facial Plast Surg Clin N Am** n. 27, p. 413–418, 2019.

TAMSYN, A. S.; THRING, P. H.; DECLAN, P. N. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2009.

TOMAZELLI, C. L. et al. SPF enhancement provided by rutin in a multifunctional sunscreen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 552, p. 401-406, 2018.

TRAN, N. Q. et al. In situ forming and rutin-releasing chitosan hydrogels as injectable dressings for dermal wound healing. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 8, p. 2872-2880, 2011.

TRIPOLI, E. et al. Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: a review. **Food Chemistry**, v. 2014, n. 2, p. 466-479, 2007.

VALLEJO, F. et al. Concentration and solubility of flavanones in orange beverages affect their bioavailability in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 6516-6524, 2010.

VÁZQUEZ, J. A. et al. Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera. **Microbial Cell Factories**, v.9, n.46, p.1-10, 2010.

VENKATESH, S.; MAYMONE, M. B. C.; VASHI, N. A. Aging in skin of color. **Clinics in Dermatology**, In Press, 2019.

VILLAREAL, M. O. et al. Hirseins inhibit melanogenesis by regulating the gene expressions of Mitf and melanogenesis enzymes. **Experimental Dermatology**, v. 19, p. 450–457, 2010.

WANG, H. et al. Self-assembled amphiphilic chitosan nanomicelles to enhance the solubility of quercetin for efficient delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 179, p. 519-526, 2019.

WANG, X.; WU, J. Modulating effect of fatty acids and sterols on skin aging. **Journal of Functional Foods**, n. 57, p. 135-140, 2019.

WANG, T. Y.; LI, Q.; BI, K. S. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 13, p. 12–23, 2018.

WATT, F. M.; FUJIWARA, H. Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 4, 2011.

WOLFE K. L.; LIU R. H. Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Departament of Food Science and institute of Comparative and Environmental Toxicology, Cornnel University, Ithaca, New York, v. 55 , p. 8896-8907, 2007.

WOHLRAB, J. et al. A. Clinical trial for safety evaluation of hyaluronidase as diffusion enhancing adjuvant for infiltration analgesia of skin with lidocaine. **Dermatol Surg**., v. 38, n. 1, p. 91-96, 2012.

WONG, R. et al. The dynamic anatomy and patterning of skin. **Experimental Dermatology**, n. 25, p. 92–98, 2016.

XUE, Y.; THAKURIA, M. Merkel Cell Carcinoma Review. **Hematol Oncol Clin N Am**, n. 33, p. 39–52, 2019.

YÁÑEZ, J. et al. Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocyte cell lines: relationship between structure and activity. **Nutr. Cancer**, v. 49, n. 2, p. 191-199, 2004.

ZAKIR, M. M.; FREITAS, I. R. Human health benefits of consuming isoflavones in soy products. **J. Bioen. Food Sci**, v. 02, n. 3, p. 107-116, 2015.

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

ZANG, D.; NIU, C.; AISA, H. A. Amine derivatives of furocoumarin induce melanogenesis by activating Akt/GSK-3 β / β -catenin signal pathway. **Drug Design, Development and Therapy**, n. 13, p. 623-632, 2019.

ZHANG, H. et al. Transdermal permeation effect of collagen hydrolysates of deer sinew on mouse skin, ex vitro, and antioxidant activity, increased type I collagen secretion of percutaneous proteins in NIH/3T3 cells. **J Cosmet Dermatol**, p. 1-10, 2019.

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.

ZIELIŃSKA, D.; SZAWARA-NOWAK, D.; ZIELIŃSKI, H. Determination of the antioxidant activity of rutin and its contribution to the antioxidant capacity of diversified buckwheat origin material by updated analytical strategies. **Pol. J. Food Nutr. Sci.**, v. 60, n. 4, p. 315-321, 2010.

ZONGRU G. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 2, p. 119-136, 2017.