

SÍNTESE E AVALIAÇÕES FOTOPROTETORA, ANTIOXIDANTE, CLAREADORA E DE ESTABILIDADE TÉRMICA DE HIDRAZONAS DERIVADAS DE PRODUTOS NATURAIS ÚTEIS NA PREVENÇÃO DO CÂNCER DE PELE

Juliana Santana Reis^{1,2}, Leonardo Miziara Barboza Ferreira¹, Bruna Galdorfini Chiari¹, Mauricio Alexandre Reis Jr¹, Marcos Antônio Corrêa¹, Jean Leandro dos Santos¹

¹ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Campus Araraquara

² julianasantanareis@yahoo.com.br

RESUMO

A exposição excessiva à radiação ultravioleta (UV) consiste em um dos principais fatores que contribuem para o surgimento e desenvolvimento de melanomas e fotoenvelhecimento. O objetivo principal deste trabalho foi obter novos filtros solares com capacidade ampliada de proteção contra radiação UVA e UVB associada à capacidade antioxidante, obtidos por meio de hibridação molecular entre as subunidades farmacofóricas de filtros comerciais (avobenzona e metoxicinamato de octila) e produtos naturais (resveratrol e ácido ferúlico). Foram sintetizados, isolados e caracterizados oito compostos inéditos (**I-VIII**). Os resultados obtidos na avaliação de estabilidade térmica indicaram que o composto **VIII** foi o termoestável, decompondo-se acima de 295°C. À exceção do composto **VI**, todos os demais apresentaram capacidade antioxidante, sendo **I**, **VII** e **VIII** os compostos mais potencialmente ativos. Os compostos **I**, **IV**, **V**, **VI**, **VII** e **VIII** demonstraram melhor atividade protetora frente à radiação UVA e, dentre estes, o composto **VI** apresentou melhor resultado. Os compostos **II** e **III** foram classificados como potenciais filtros UVB, com resultados superiores ao padrão *t*-resveratrol. Em relação à capacidade inibitória para a enzima tirosinase, os resultados obtidos pelos compostos **I**, **III**, **V** e **VII** foram de, respectivamente, 12,66%, 89,50%, 6,41% e 28,91%.

Palavras-chave: Filtros solares, Fotoproteção, Resveratrol.

INTRODUÇÃO

A luz solar é indispensável em uma série de processos bioquímicos, como por exemplo, a síntese de vitamina D e as reações de fotossíntese¹. Entretanto, a exposição constante e excessiva à radiação solar pode resultar no surgimento de diversas patologias². Particularmente, a radiação ultravioleta (UV) é responsável direta pelos danos promovidos na pele, e pode ser dividida de acordo com seu comprimento de onda em: UVA (320-400nm), UVB (290-320nm) e UVC (180-290nm)³.

A radiação UVC apresenta efeito germicida, é prejudicial ao tecido cutâneo, mas é absorvida na estratosfera pela camada de ozônio⁴. A radiação UVB apresenta baixo poder de penetração nas camadas da pele em relação à radiação UVA, entretanto, atua diretamente nas bases nitrogenadas induzindo dano nas estruturas do DNA e RNA. É responsável direta pelo aparecimento de queimaduras e bolhas, danos oculares, eritemas (inflamação), edema e vesiculação. A radiação UVB encontra-se, além disso, diretamente envolvida na mutação do gene p53 e exacerbação do surgimento de radicais livres^{4,5,6}. A radiação UVA promove o aumento da degradação e diminuição da síntese de colágeno, acelerando o fotoenvelhecimento, podendo atingir o material genético e provocar mutações que podem contribuir para desenvolvimento de câncer de pele. Além disso, potencializa os efeitos biológicos do UVB à medida que estimula reações de fotoalergia e fototoxicidade^{4,6}. A radiação UVA *per se* pode alterar a expressão de genes e causar a mutação no gene p53, responsável pelo controle do ciclo celular e apoptose^{7,8}. Ainda, a radiação UVA aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), culminando no estresse oxidativo^{9,10,11}. As EROs são formadas endogenamente em consequência do metabolismo de O₂ e em situações não fisiológicas, como é o caso da exposição à radiação. Tais substâncias estão implicadas em alterações do DNA, na ativação de receptores de membrana para mediadores pró-inflamatórios e da cascata intracelular de sinalização dos fatores de transcrição dos genes que regulam inflamação, ciclo celular, proliferação e apoptose, e podem ser relacionados a mutações e desenvolvimento de diversas patologias, dentre elas, o câncer¹². Os radicais livres são neutralizados pelas moléculas antioxidantes endógenos e exógenos. Neste contexto, a incidência das radiações UVs contribui de forma negativa ao organismo, uma vez que exacerbam a formação de EROs e diminui a concentração de antioxidantes endógenos¹³.

Na tentativa de minimizar os efeitos prejudiciais promovidos pela exposição à radiação UV, o sistema fisiológico dispõe de alguns mecanismos de proteção que incluem secreção sudorípara,

pigmentação (melanina) e camada córnea. A camada córnea protege o indivíduo da radiação através do um espessamento epidérmico para absorver a radiação incidente. A secreção sudorípara apresenta o ácido urocânico, substância de alta absorção na região UVB; porém é transitória devido à sua hidrossolubilidade e evaporação no suor¹⁴. A melanina é o pigmento produzido por melanossomas nos melanócitos encontrados na epiderme, através do mecanismo denominado melanogênese. É regulada por fatores genéticos, pela radiação UV e hormônios, e consiste do mecanismo mais eficaz de que o organismo dispõe para proteger-se da incidência de radiação UV^{15,16,17}. A melanogênese se inicia pela ação da enzima tirosinase melanocitária, que catalisa a conversão de tirosina em L-DOPA e esta, em dopaquinona. Uma vez que a tirosinase é o fator limitante deste processo, pode-se inferir que esta enzima está diretamente relacionada à pigmentação cutânea. Portanto, inibidores de tirosinase são promissores agentes que minimizam a pigmentação cutânea¹⁸.

Como estratégia química de proteção, o uso de formulações fotoprotetoras consiste no método preventivo mais simples e eficaz na redução de um grande número de doenças relacionadas à exposição excessiva à radiação UV. Filtros solares são as moléculas constituintes destas formulações e são responsáveis por minimizar e prevenir os danos resultantes da exposição da pele a esta radiação. Os filtros solares podem ser classificados como químicos ou físicos, sendo que filtros físicos atuam por difusão e reflexão da radiação e filtros químicos atuam por delocalização eletrônica e absorção da radiação incidente².

Cinamatos e resveratrol constituem moléculas potencialmente interessantes na síntese de filtros solares derivados de produtos naturais, uma vez que vários trabalhos relatam as atividades anticarcinogênicas, antimutagênicas e antioxidantes destes compostos^{19,20,21,22}. Assim, o desenvolvimento de filtros solares associados à capacidade antioxidante é uma estratégia interessante na busca de novos fotoprotetores, pois minimizam os efeitos cutâneos resultantes da exposição à radiação UV e, simultaneamente, reduzem os danos decorrentes da formação de radicais livres. Portanto, durante o planejamento dos novos compostos, buscou-se o sinergismo de ação para ampliar a faixa de proteção do espectro, conferir atividade antioxidante, prevenir o fotoenvelhecimento e minimizar o desenvolvimento de câncer induzido por radiação UV.

Estudos demonstraram que compostos hidroxiestilbênicos são potentes inibidores de tirosinase, podendo ser promissores na busca por agentes despigmentantes^{18,23}. Para agregar valores aos compostos sintetizados neste trabalho, os mesmos foram submetidos à análise da capacidade de inibir a enzima tirosinase, na tentativa de se obter uma possível aplicação destes promissores filtros solares como compostos que minimizem a hiperpigmentação cutânea.

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo a síntese, purificação e caracterização estrutural das moléculas das séries 1 e 2 (**moléculas I-VIII**) planejadas como filtro solares pelo processo de hibridação molecular. Estas moléculas foram avaliadas quanto à atividade fotoprotetora e antioxidante *in vitro* e quanto à capacidade de inibição da enzima tirosinase e estabilidade térmica.

PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

A hibridação é um processo de modificação molecular caracterizado pela conjugação de características estruturais de dois compostos distintos em uma única molécula²⁴. Utilizando esta estratégia, foram planejadas oito novas estruturas químicas (**moléculas I-VIII**) desenhadas como filtros solares contendo as sub-unidades farmacofóricas das moléculas protótipos: avobenzona, resveratrol e metoxicinamato de octila (Esquema 1).

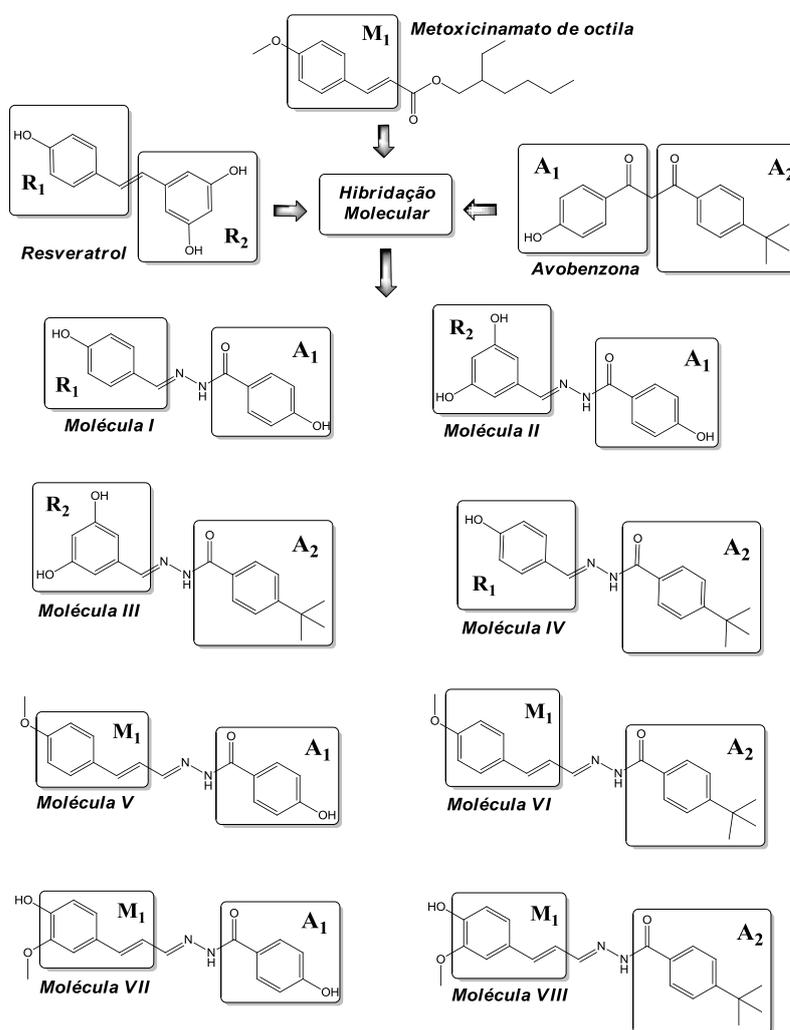
A avobenzona é um derivado dibenzoilmetano, de largo emprego como filtro UVA, geralmente, em associação a outros filtros solares⁶. Entretanto, a molécula apresenta uma série de inconvenientes tais como: fotoinstabilidade – isolado ou associado a outros filtros; tingimento de tecidos; incompatibilidade com outros filtros²⁵; e fotoalergenicidade devido aos metabólitos imunogênicos decorrentes da fotodegradação²⁶. Considerando sua grande importância como filtro solar, a avobenzona tornou-se um excelente candidato à modificação estrutural, na tentativa de se obter derivados mais estáveis e compatíveis com os demais componentes da formulação.

Os produtos naturais sempre foram inspiração para o planejamento de novas moléculas bioativas. Muitos estudos têm destacado a importância do produto natural atuar de maneira dual, a saber: antioxidante e filtro solar. Entre os objetivos para a utilização de produtos naturais podemos citar: a) absorção da radiação na região UV espectral; b) melhor aceitação pelo usuário devido ao aspecto mercadológico apelativo associado ao uso de um “fotoprotetor natural”; e c) possibilidade de combinação de efeito fotoprotetor associado à capacidade antioxidante²⁷. Diversos trabalhos têm demonstrado o efeito

do resveratrol como filtro UVB^{28,29}. Além disso, estudos demonstraram que a aplicação tópica de resveratrol inibe a indução de melanomas em camundongos CD-1 sem observação de efeitos tóxicos associados³⁰. O resveratrol, ainda, é considerado o responsável pela proteção contra a indução de tumor por radiação UVB, contribuindo, adicionalmente, como antioxidante³¹.

Os metoxicinamatos são filtros químicos UVB, contendo ligações duplas conjugadas que permitem maior deslocamento eletrônico, e máximo de absorção próximo a 308 nm. O *p*-metoxicinamato de octila, porém, sofre fotoisomerização e seu máximo de absorção atinge 265 nm, contribuindo para a diminuição de sua eficácia como filtro UVB³². Estruturalmente, os metoxicinamatos são análogos ao aldeído cinâmico, presente na canela, e ácido ferúlico, presente no farelo de arroz e milho. O aldeído cinâmico apresenta capacidade fotoprotetora UVB; entretanto a instabilidade e reatividade aldeídica inviabiliza seu emprego como filtro solar. O ácido ferúlico, por sua vez, é um potente antioxidante com capacidade de proteger lipossomas de fosfatidilcolina da peroxidação induzida pela radiação UV *in vitro* e inibição da formação de eritema *in vivo*³³.

Esquema 1: Planejamento estrutural dos novos compostos híbridos (moléculas **I-VIII**) derivados da avobenzona, resveratrol e metoxicinamato de octila.

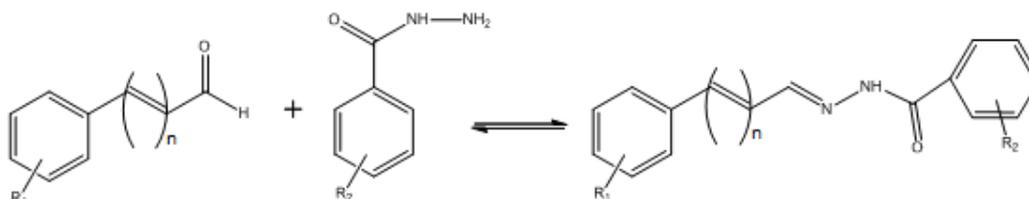


Nesse contexto, o planejamento dos compostos híbridos teve como objetivos: ampliar o espectro de proteção à ação UV, por hibridação molecular entre os farmacóforos da avobenzona, resveratrol e metoxicinamato de octila; associar, em uma mesma estrutura, propriedades antioxidantes e de filtro solar úteis à prevenção do câncer de pele; e minimizar a instabilidade e reatividade da avobenzona e do cinamato.

MATERIAIS E MÉTODOS

O planejamento sintético para obtenção dos compostos híbridos hidrazônicos **I** a **VIII** foi baseado na metodologia que emprega condensação de compostos aldeídicos e hidrazídicos em meio etanólico catalisada por ácido^{34,35}. As hidrazidas e os aldeídos correspondentes foram adquiridos comercialmente para a obtenção e subsequente funcionalização destes compostos.

Figura 1: Método sintético utilizado para obtenção dos compostos híbridos finais.



R₁ = OH, OCH₃
R₂ = OH, t-butyl
n = 0, 1

Para a obtenção das moléculas **I** a **VIII**, 1,64 mmols do aldeído em 20 mL de etanol foram adicionados em balão de fundo redondo de 125 mL, ao abrigo de luz e sob agitação constante. O pH foi ajustado para a faixa de 4-5 com emprego de ácido acético glacial. Em seguida, foram adicionados 1,64 mmols da respectiva hidrazida e a reação foi monitorada por análise cromatográfica em camada delgada (C.C.D., fase móvel composta por uma mistura de acetato de etila e hexano nas proporções 4:6), e as placas cromatográficas foram visualizadas utilizando lâmpada ultravioleta. Ao término reacional, foi realizada a recristalização em gelo. Após a filtração e sucessivas lavagens com etanol gelado, o precipitado foi seco e armazenado sob temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os reagentes empregados, as temperaturas durante as análises e os tempos de reacionais necessários à obtenção dos híbridos finais são descritos a seguir:

- composto **I**: 4-hidroxibenzaldeído (aldeído) e 4-hidroxibenzidrazida (hidrazida), 24 horas, temperatura ambiente.
- composto **II**: 3,5-diidroxibenzaldeído (aldeído) e 4-hidroxibenzidrazida (hidrazida), 48 horas, temperatura ambiente.
- composto **III**: 3,5-diidroxibenzaldeído (aldeído) e hidrazida 4-terc-butilbenzóica (hidrazida), 24 horas, 50°C.
- composto **IV**: 4-diidroxibenzaldeído (aldeído) e hidrazida 4-terc-butilbenzóica (hidrazida), 30 horas, temperatura ambiente.
- composto **V**: *t-p*-metoxicinamaldeído (aldeído) e 4-hidroxibenzidrazida (hidrazida), 48 horas, 50°C.
- composto **VI**: *t-p*-metoxicinamaldeído (aldeído) e hidrazida 4-terc-butilbenzóica (hidrazida), 24 horas, temperatura ambiente.
- composto **VII**: 4-hidroxi-3-metoxicinamaldeído (aldeído) e 4-hidroxibenzidrazida (hidrazida), 48 horas, temperatura ambiente.
- composto **VIII**: 4-hidroxi-3-metoxicinamaldeído (aldeído) e hidrazida 4-terc-butilbenzóica (hidrazida), 24 horas, temperatura ambiente.

Identificação: O progresso das reações foi monitorada por análise cromatográfica em camada delgada (cromatofolhas de alumínio 20x20 cm Sílica gel 60 F254 0,2 mm de espessura). A visualização das substâncias foi realizada utilizando lâmpada ultravioleta (254 ou 365 nm). Os espectros de absorção no infravermelho, na região de 4.000 a 400 cm⁻¹, foram obtidos em pastilhas de KBr no espectrofotômetro de infravermelho (FTIR-8300). Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) ¹H e ¹³C foram obtidos no Espectrômetro de 300 MHz (Fourier, Dual probe ¹³C/¹H) empregando DMSO_{d6} como solvente.

Estabilidade térmica: foi determinada pelas análises termogravimétrica (TGA) e de calorimetria diferencial de varredura (DSC). TGA: 2,0 ± 0,5 mg de cada composto (moléculas **I-VIII**) foi analisado sob atmosfera de nitrogênio, taxa de fluxo de 100 mL/min, taxa de aquecimento de 10°C/min, sendo as curvas registradas a partir da temperatura ambiente até 600°C. DSC: 2,0 ± 0,5 mg de cada composto (moléculas **I-VIII**) foi analisado sob purga de nitrogênio (50 mL/min), sendo as curvas

registradas na faixa de aquecimento compreendida entre 0°C e 350°C a uma velocidade de aquecimento de 10°C/min. Um recipiente DSC de alumínio vazio (40 mL) foi utilizado como referência.

Atividade antioxidante: ácido ascórbico, ácido ferúlico, *t*-resveratrol (controles positivos) e os compostos híbridos (**I-VIII**) foram avaliados empregando-se a metodologia adaptada de DPPH• em microplaca^{36,37,38}. Uma solução-estoque do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) foi preparada em metanol na concentração de 105,3 µM. O controle negativo foi preparado utilizando 150 µL de DMSO e 1350 µL em metanol. Os compostos (**I-VIII**) e os controles positivos foram diluídos em DMSO na concentração de 10 mM e, em seguida, diluídos em metanol na concentração de 1 mM. As amostras e os padrões foram preparados nas concentrações de 400, 200, 100 e 50 µM, em triplicata. Em seguida, 50 µL de cada solução e 100 µL da solução estoque de DPPH• foram dispensados, em triplicata, em cada cavidade de uma microplaca de 96 poços, incluindo o controle negativo. A microplaca foi incubada na estufa a 37°C por 30 minutos e as absorvâncias foram obtidas em espectrofotômetro a 519 nm. A concentração de inibição foi calculada de acordo com a equação $\{[(Abs_b - Abs_a) / Abs_b] \times 100\}$, onde Abs_b corresponde à absorvância do controle negativo (sem antioxidante) e Abs_a corresponde à absorvância da solução contendo compostos antioxidantes (controles positivos e amostras). Os resultados foram obtidos em médias \pm desvio-padrão e, a partir destes, foi aplicado um teste de Análise de Variância (ANOVA). Nos casos em que $p < 0,05$, as médias de concentrações foram comparadas pelo método de Tukey, para $\alpha = 0,05$.

Atividade fotoprotetora: avobenzona, metoxicinamato de octila e *t*-resveratrol (padrões positivos) e os compostos híbridos (**I-VIII**) foram incorporados, individualmente, a um creme base na concentração de 5%. O creme base apresentou a seguinte composição: adipato de dibutila (4%), C12-C15 alquil benzoato (8%), triglicerídeo do ácido cáprico-caprílico (6%), emulsão base adquirida comercialmente (oleato de semente de girassol, ácido poliacrílico, xilitil sesquicaprilato, gliceril-estearato, cera de *Eurphobia cerifera* e hidróxido de sódio: 4%) e água deionizada (quantidade suficiente para 100%). O ensaio de fotoproteção *in vitro* foi realizado no espectrofotômetro com detecção via esfera de integração. Uma seringa foi empregada para espalhar 0,11g de amostra (creme base – controle negativo – e formulações fotoprotetoras – contendo os compostos **I-VIII** e os padrões positivos, individualmente) sob uma fita transparente médica (70,7 x 70,7 mm) na razão de 2 µL/cm². Os resultados individuais obtidos correspondem à média de 25 leituras realizadas em 17 pontos diferentes da fita transparente contendo as formulações. As leituras foram efetuadas no intervalo de 290 a 400 nm, em triplicata, sendo os dados acumulados a intervalos de 2 nm. Foram obtidos resultados de fator de proteção solar (FPS), razão UVA/UVB e comprimento de onda crítico (λ_c). Os resultados foram expressos em médias \pm desvio-padrão. A partir desses resultados foi aplicado um teste de Análise de Variância (ANOVA). Nos casos em que $p < 0,05$, as médias de concentrações foram comparadas pelo método de Tukey, para $\alpha = 0,05$.

Atividade inibitória para a enzima tirosinase³⁹: cada composto híbrido (**I a VIII**), foi submetido a diluições em tampão fosfato 50 mM (pH 6,8) nas concentrações 0 (branco), 199,99 µg/mL, 399,99 µg/mL, 466,66 µg/mL e 533,33 µg/mL, em triplicata. O volume final das soluções foi de 80 µL. Em seguida, foram adicionados 45 µL de L-DOPA (4,5 mM) e 25 µL de tirosinase (80 U/mL) a cada uma das soluções, ao abrigo de luz. Após incubação à temperatura ambiente por 10 minutos ao abrigo de luz, as absorvâncias foram obtidas a 492 nm em espectrofotômetro. Como padrões positivos, foram empregados ácido kójico e *t*-resveratrol^{40,41,42}. A concentração de inibição foi calculada de acordo com a equação $\{[(Abs_b - Abs_a) / Abs_b] \times 100\}$, onde Abs_b corresponde à absorvância do controle negativo (absorvância referente à concentração máxima de dopaquinona formada) e Abs_a corresponde à absorvância das amostras e padrões positivos (inibição da formação de dopaquinona). Os resultados foram expressos em médias \pm desvio-padrão. A partir desses resultados foi aplicado um teste de Análise de Variância (ANOVA). Nos casos em que $p < 0,05$, as médias de concentrações foram comparadas pelo método de Tukey, para $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os compostos propostos (hidrazonas **I-VIII**) foram obtidos a partir de reações de hibridização entre compostos aldeídicos e hidrazídicos⁴³ contendo as subunidades farmacofóricas de *t*-resveratrol, avobenzona e metoxicinamento de octila, sendo sua obtenção confirmada por ensaios espectrofotométricos de infravermelho e espectrométricos de RMN de ¹H e ¹³C, com rendimentos reacionais acima de 70%.

Em relação aos ensaios para determinação da estabilidade térmica, a análise termogravimétrica (TGA) possibilitou quantificar a desidratação de cada composto na forma sólida. Já a análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) permitiu submeter cada composto na forma sólida a um sistema linear de aquecimento, viabilizando a mensuração de temperatura e a energia a fim de associá-las

a uma variedade de eventos térmicos, como as reações de decomposição⁴⁴. As temperaturas de fusão e decomposição encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados de temperaturas de fusão e decomposição dos compostos I a VIII.

Composto	Temperatura de Decomposição (°C)	Temperatura de Fusão (°C)
I	274.62	270.72
II	261.31	-
III	239.59	237.56
IV	279.89	268.96
V	282.75	270.26
VI	290.24	189.62
VII	268.83	231.77
VIII	295.86	245.17

Os resultados de TGA obtidos para os compostos **I**, **II** e **III** evidenciaram um evento de perda de massa até 100°C, podendo ser atribuído à desidratação destas amostras. À exceção do composto **II** e **VI**, todas as curvas de DSC apresentaram temperatura de fusão acima de 200°C, sendo que o composto **II** apresenta apenas um evento de cristalização a frio, sugerindo uma possível transição sólido-sólido em sua rede cristalina. Todos os compostos se decomuseram em temperaturas acima de 230°C, sendo **III** o composto mais termolábil e **VIII** o composto mais termoestável, com temperaturas de decomposição de 239,59°C e 295,86°C, respectivamente. Apenas o composto **VI** apresentou temperatura de fusão inferior a 200°C (189,62°C), fato que pode ser explicado pela ausência de hidroxilas intramoleculares (confirmado pela baixa energia de entalpia resultante na análise deste composto: 75,58 J/g), inviabilizando o surgimento de ligações de hidrogênio intermoleculares.

A análise da capacidade antioxidante foi baseada na redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil pelo agente antioxidante (representado pelos compostos **I-VIII** e controles positivos), através do método de DPPH• adaptado para microplaca^{36,37,38}. O efeito eletrônico resultante da redução do DPPH em solução alcoólica na presença de um doador de hidrogênio (antioxidante) é observado pela mudança de coloração do meio (DPPH radicalar apresenta a coloração violeta, sendo convertido em um derivado amarelo após a reação com o agente antioxidante)⁴⁵. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Porcentagem de redução do DPPH e desvios padrão em relação aos compostos **I** a **VIII** para 30 minutos de análise.

Compostos	Porcentagem de redução do DPPH (em %) - 30 minutos de análise			
	400 (µM)	200 (µM)	100(µM)	50 (µM)
I	49,9 ± 8,6	43,3 ± 10,5 ^c	32,5 ± 9,2 ^c	19,7 ± 5,8 ^c
II	16,6 ± 6,4	12,7 ± 9,2	5,6 ± 7,7	4,7 ± 5,2
III	15,5 ± 1,6	11,3 ± 1,0	6,5 ± 1,3	4,6 ± 0,8
IV	22,8 ± 1,2	15,5 ± 1,2	9,5 ± 2,3	8,5 ± 1,1
V	1,9 ± 0,6	1,4 ± 2,5	0	0
VI	0	0	0	0
VII	79,0 ± 4,8 ^{a,b,c}	74,8 ± 2,5 ^{a,b,c}	51,7 ± 0,6 ^{a,b,c}	31,7 ± 5,3 ^{a,b,c}
VIII	77,0 ± 2,44 ^{a,b,c}	69,4 ± 3,54 ^{a,b,c}	42,6 ± 1,54 ^{a,b,c}	25,2 ± 4,64 ^{a,b,c}
AC FER	80,3 ± 1,3	76,6 ± 1,6	56,0 ± 4,2	32,7 ± 0,8
AC ASC	83,0 ± 2,6	82,1 ± 1,8	79,4 ± 2,6	37,7 ± 7,8
RESV	73,1 ± 0,5	61,6 ± 1,7	40,2 ± 0,9	20,9 ± 0,7

AC FER corresponde ao ácido ferúlico; AC ASC corresponde ao ácido ascórbico; RESV corresponde ao t-resveratrol. ^ap<0,05 em relação ao padrão ácido ferúlico. ^bp<0,05 em relação ao padrão ácido ascórbico. ^cp<0,05 em relação ao padrão t-resveratrol.

À exceção do composto **VI**, todos os híbridos apresentaram capacidade antioxidante, sendo **I** (IC₅₀ = 153,8 µM), **VII** (IC₅₀ = 96,7 µM) e **VIII** (IC₅₀ = 117,4 µM) os compostos mais ativos. Os compostos **VII** e **VIII** apresentaram-se mais potentes que o *t*-resveratrol (IC₅₀ = 124,4 µM), porém apresentaram atividade reduzida em relação ao ácido ascórbico (IC₅₀ = 63,0 µM) e ao ácido ferúlico (IC₅₀ = 89,3 µM). A hipótese que corrobora com os resultados obtidos reside na presença de anéis aromáticos cuja hidroxila apresenta-se na posição *para*, responsável pelo aumento na capacidade antioxidante das substâncias; além disso, o efeito de conjugação eletrônica dado pelo espaçador entre os anéis aromáticos (compostos **VII** e **VIII**), contribui para a delocalização eletrônica, facilitando a reação com EROs e conferindo maior atividade antioxidante.

Para avaliar a capacidade fotoprotetora *in vitro* dos compostos **I-VIII** incorporados, foi utilizado o método de transmitância difusa com esfera integradora por apresentar boa correlação com resultados *in vivo*, baixo custo e confiabilidade^{46,47}. Os parâmetros analíticos considerados para comprovar a eficácia *in vitro* dos fotoprotetores deste estudo compreendem: fator de proteção solar (FPS), razão UVA/UVB (*r*) e comprimento de onda crítico (λ_c). Avobenzona, *t*-resveratrol e metoxicinamato de octila foram utilizados como referência. Todos os resultados encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Média \pm desvio-padrão dos resultados obtidos por espectrofotometria dos compostos **I-VIII**, avobenzona, *t*-resveratrol e metoxicinamato de octila

COMPOSTOS	FPS	RAZÃO UVA/UVB	COMPRIMENTO DE ONDA CRÍTICO λ_c (nm)
I	3,0 \pm 0,1	0,8 \pm 0,0	377,0 \pm 1,8
II	5,0 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	364,0 \pm 0,3
III	4,0 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	366,0 \pm 0,1
IV	2,0 \pm 0,0	0,8 \pm 0,0	379,0 \pm 0,2
V	2,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0	387,0 \pm 0,8
VI	4,0 \pm 0,0	1,1 \pm 0,0	385,0 \pm 0,2
VII	2,0 \pm 0,0	1,3 \pm 0,0	388,0 \pm 0,2
VIII	2,0 \pm 0,0	1,2 \pm 0,0	387,0 \pm 0,5
Metoxicinamato de Octila	12,0 \pm 0,5	-	332,0 \pm 0,1
<i>t</i> -Resveratrol	2,0 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	359,0 \pm 1,2
Avobenzona	-	1,8 \pm 0,1	383,0 \pm 0,9

Na concentração analisada, os compostos **I**, **II**, **III** e **VI** apresentaram atividade superior ao *t*-resveratrol. Além disso, o composto **II** (FPS = 3,0) é estruturalmente semelhante ao *t*-resveratrol (FPS = 2,0), apresentando a sub-unidade N-acil-hidrazônica que favorece a delocalização eletrônica (Esquema 1). Todos os compostos apresentaram atividade fotoprotetora inferior ao metoxicinamato de octila (FPS = 12,0), entretanto este composto não apresenta efeito antioxidante. Embora os compostos **IV**, **V**, **VII** e **VIII** tenham apresentado atividade protetora frente à radiação UVB semelhante ao *t*-resveratrol, é importante salientar que formulações fotoprotetoras apresentam múltiplos filtros na tentativa de ampliar o espectro de absorção UV. O comprimento de onda crítico (λ_c) constitui um parâmetro de classificação proposto pela United States Food and Drug Administration⁴⁸, que divide os compostos em 5 categorias, a saber: 0 ($\lambda_c < 325$ nm), 1 (λ_c entre 325 e 335 nm), 2 (λ_c entre 335 e 350 nm), 3 (λ_c entre 350 e 370) e 4 ($\lambda_c > 370$ nm). De acordo com esta classificação, os compostos **II** e **III** apresentam-se como “3”, mesma classificação do *t*-resveratrol. Os compostos **I**, **IV-VIII** apresentam classificação “4”, mesma categoria em que se encontra a avobenzona. O metoxicinamato de octila apresentou-se na categoria “1”, confirmando seu perfil de absorção na região UVB³². Uma vez que a razão UVA/UVB é obtida pela razão das áreas sobre a curva UVA em relação à UVB obtida para cada composto, este parâmetro determina a proteção frente à radiação UVA⁴⁶. De acordo com a classificação *Boot's Star Rating*^{46,47}, os filtros foram subdivididos quanto ao seu nível de proteção UVA de acordo com a razão UVA/UVB (*r*). Empregando esta classificação, os compostos **II** e **III** foram categorizados como “3 estrelas” ($0,6 \leq r < 0,8$), bem como o *t*-resveratrol e, portanto, sua proteção UVA é descrita como “superior”; do mesmo modo, os compostos **I** e **IV** foram categorizados como “4 estrelas” ($0,8 \leq r < 0,9$) e, por este motivo, sua proteção UVA é descrita como “máxima”. Bem como a avobenzona, os compostos **V-VIII** apresentaram “ultra” proteção frente à radiação UVA, uma vez que foram classificados com “5 estrelas” ($r \geq 0,9$). Assim sendo, análise de todos os resultados indica que os compostos **I**, **IV-VIII** apresentam atividade como filtros UVA; os compostos **II** e **III**, por sua vez, apresentaram-se como promissores filtros UVB.

A principal limitação na avaliação do potencial inibidor da enzima tirosinase consiste na solubilização das amostras de caráter lipofílico, uma vez que a enzima tirosinase é sensível aos solventes orgânicos empregados na solubilização de compostos com este perfil. A fim de maximizar a solubilização, sem desnaturar a enzima, o ensaio proposto recomenda a utilização de tampão fosfato pH 6,8 e baixas concentrações de DMSO, se necessário^{39,49}. Ácido kójico e *t*-resveratrol foram utilizados como controles positivos^{18,23,42}. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados de média \pm desvio padrão de inibição da enzima tirosinase frente aos compostos **I** a **VIII** em diferentes concentrações (%).

CONCENTR. ($\mu\text{g/mL}$)	MOLÉCULAS							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
0	0	0	0	0	0	0	0	0
199,99	5,44 \pm 3,50	0	39,82 \pm 4,56	0	11,43 \pm 2,30	0	23,83 \pm 20,03	81,62 \pm 64,66
399,99	10,95 \pm 2,94	0	72,38 \pm 3,07	0	11,01 \pm 8,16	0	27,22 \pm 26,72	0
466,66	9,90 \pm 3,27	0	88,28 \pm 0,31	0	9,70 \pm 0,90	0	0	0
533,33	12,66 \pm 3,68	1,53 \pm 1,01	89,50 \pm 0,50	0	6,41 \pm 4,75	0	28,91 \pm 27,44	0

Devido à dificuldade de solubilização, os compostos **VII** e **VIII** não puderam ser avaliados uma vez que a concentração de solvente utilizada no ensaio promoveu inibição enzimática por si só, não sendo possível afirmar se a inibição enzimática foi promovida pela alta concentração de solvente empregado (DMSO) ou pelos compostos analisados. Os compostos **I**, **III**, **V** e **VII** apresentaram capacidade inibitória enzimática, sendo o composto **III** o despigmentante mais promissor, com capacidade inibitória de 89,5% na concentração de 533,33 $\mu\text{g/mL}$. Todos os compostos com capacidade inibitória para a tirosinase apresentaram resultados inferiores ao ácido kójico. Os compostos **II** e **IV** não exibiram capacidade inibitória frente à enzima tirosinase nas concentrações avaliadas.

CONCLUSÃO

Oito compostos finais inéditos foram obtidos pela técnica de hibridização molecular, empregando como protótipos avobenzona, *t*-resveratrol e metoxicinamato de octila. As sínteses apresentaram rendimentos acima de 70%. Todos os produtos sintetizados foram isolados e caracterizados usando métodos analíticos (espectrometria de RMN de H^1 e C^{13} e espectrofotometria na região do infravermelho).

Em relação à estabilidade térmica, os resultados evidenciaram que os compostos **I**, **II** e **III** perderam massa até 100°C, possivelmente em virtude de desidratação das amostras. Os compostos **III** e **VIII** apresentaram-se, respectivamente, como o mais termolábil e o mais termoestável. O composto **VI** foi o único que apresentou temperaturas inferiores a 200°C possivelmente devido à ausência de hidroxilas em sua estrutura molecular.

Todos os compostos, exceto **VI**, apresentaram capacidade antioxidante. Os compostos **VII** e **VIII** apresentaram-se como os mais potentes devido à conjugação existente entre os anéis aromáticos e às hidroxilas na posição *para*. Embora menos ativo que estes, o composto **I** também apresentou efeito antioxidante devido às hidroxilas na posição *para*.

Considerando os resultados de FPS obtidos no ensaio de fotoproteção, foi possível observar que os compostos **I**, **II**, **III** e **VI** apresentaram atividade superior ao *t*-resveratrol (FPS = 2) e os demais compostos não apresentaram diferença significativa em relação ao parâmetro analisado, sendo os compostos **II** (FPS = 5) e **III** (FPS = 4) os mais promissores filtros UVB. Além disso, após a análise detalhada dos parâmetros que classificam o filtro como protetor frente à radiação UVA (razão UVA/UVB e comprimento de onda crítico), foi possível determinar que os filtros **I**, **IV-VIII** apresentaram capacidade de absorver a radiação UVA (máxima e ultra proteção UVA), sendo os compostos **V-VIII** (descritos como “ultra” proteção UVA) os mais potentes.

No que se refere à capacidade inibitória frente à enzima tirosinase, os compostos **VI** e **VIII** não puderam ser avaliados por este método, devido à limitação de solubilidade destes compostos no ensaio proposto. Os compostos **I**, **III**, **V** e **VII** inibiram a enzima tirosinase, sendo o composto **III** o mais potente despigmentante dentre todos os compostos sintetizados, apresentando inibição enzimática de 89,50% na concentração de 533,33 μM . Os compostos **II** e **IV** não foram capazes de inibir a enzima nas concentrações avaliadas.

REFERÊNCIAS

- 1- RODRIGO, F. G.; RODRIGO, M. J. The sun, the beach and children's skin. Essential concepts. **Acta Pediátr. Port.**, v. 42, n. 2, p. 71-77, 2011.
- 2- CRUZ, F. M. D. L. **Nanopartículas de sílica e ácido p-amino benzóico: um estudo de associação para protetores solares.** 67 f. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", São Paulo. 2008.
- 3- MATHEUS, L. G. M.; KUREBAYASHI, A. K. 2002. **Fotoproteção: a radiação ultravioleta e sua influência na pele e nos cabelos.** 1ª ed. São Paulo: Tecnopress. p. 19, 34-35, 43-46, 51-53, 57, 68-72. 2002.
- 4- SCOTTI, L.; VELASCO, M. V. R. **Envelhecimento cutâneo à luz da cosmetologia: estudo das alterações da pele no decorrer do tempo e da eficácia das substâncias ativas empregadas na preservação.** p. 11-13, 33-39, 49-67. 2003.
- 5- MARTINEZ, M. A. R. et al. Genética molecular aplicada ao câncer cutâneo não melanoma. **An. Bras. Dermatol.**, v. 81, n. 5, p. 405-419, 2006.
- 6- SASSON, C. S. **Influência dos veículos cosméticos na permeação cutânea da associação de filtros solares e acetato de tocoferol.** 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2006.
- 7- KHURY, E.; BORGES, E. Protetores solares. **Rev. Brás. Med.**, São Paulo, v. 68, n. 4, especial cosmiatria e dermatologia, p. 4-18, 2011.
- 8- STRICKLAND, F. M.; KUCHEL, J. M., HALLIDAY, G. M. Natural products as aids for protecting the skin's immune system against UV damage. **Cútitis**, v. 74, n. 5, Supl., p. 24-28, 2004.
- 9- AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutat. Res.**, v. 571, p. 153-173, 2005.
- 10- ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**. v. 89, p. 27-36, 2005.
- 11- CHUN, S. S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochem.**, v. 40, p. 809-816, 2005.
- 12- SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P. **Reparação de DNA em células eucarióticas.** In: João Antonio Pêgas; Bernardo Erdtmann; Juliana da Silva. (or.). Genét. Toxicol. Porto Alegre: Alcance. p. 271-305, 2003.
- 13- YASUI, H.; SAKURAI, H. Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. **Biochem.Biophys. Res.Comm.**, v. 269, p.131-136, 2000.
- 14- KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H.W. Cosmeceutical treatment of the aging face. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 52, p. 937-958, 2005.
- 15- CORRÊA, M. A. **Cosmetologia: ciência e técnica.** 1ª ed. São Paulo: Livraria e Editora Medfarma. p. 282-284, 413-420, 447-449, 2012.
- 16- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 66, 67, 80, 82, 91-113, 359-370, 2011.
- 17- SAMPAIO, S. A. P; RIVITTI, E. A. **Dermatologia.** 3ª ed. São Paulo: Editora Artes Médicas. p 1-37, 1237-1239, 2008.
- 18- OHGUCHI, K.; TANAKA, T.; IILYA, I.; ITO, M.; IINUMA, M.; MATSUMOTO, K.; AKAO, Y.; NOZAWA, Y. Gnetol as a potent tyrosinase inhibitor from Genus gnetum. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 67, p. 663-665, 2003.
- 19- DE, P.; BALTAS, M.; BEDOS-BELVAL, F. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents-a review. **Current Med. Chem.**, v. 18, p. 1672-170, 2011.
- 20- LEONARD, S. S.; XIA, C.; JIANG, B. H.; STINEFELT, B.; KLANDORF, H.; HARRIS, G. K.; SHI, X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular response. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 309, p. 1017-1026, 2003.
- 21- NIERO, E. L. O. **Efeito de ácido cinâmico sobre melanócitos e células derivadas de melanoma humanos: avaliação do seu potencial antitumoral e de proteção contra danos celulares causados por radiação ultravioleta.** 2010. 38f. Dissertação (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas Da Universidade de São Paulo), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. 2010.
- 22- OLAS, B.; WACHOWICZ, B.; SALUK-JUSZCZAK, J.; ZIELINSKI, T. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on platelet activation induced by endotoxin or thrombin. **Thromb. Res.**, v. 107, n. 3-4, p. 141-145, 2002.
- 23- KIM, Y. M.; YUN, J.; LEE, C. K.; LEE, H.; MIN, K. R. Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds. *J. Biol. Chem.*, v. 277, p. 16340-16344, 2002.

- 24- STRUPEZEWSKI, J.D.; ELLIS, D. B.; ALLEN, R. C.; Market to market-1990. **Annu. Rep. Med. Chem.** v. 26, p. 297-313, 1991.
- 25- STEINBERG, D. C. Preservation of sunscreens formulations. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FOTOPROTEÇÃO, 1 pen drive, **Anais...** 2011.
- 26- KARLSSON, I.; HILLERSTRÖM, L.; STENFELDT, A. L.; MARTENSSON, J.; BÖRJE, A. Photodegradation of dibenzoylmethanes: potential cause of photocontact allergy to sunscreens. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 22, n. 11, p. 1881-1892, 2009.
- 27- SARAF, S.; KAUR, C. D. Phytoconstituents as photoprotective novel cosmetic formulations. **Pharmacogn. Rev.**, v. 4, n. 7, p. 1-11, 2010.
- 28- AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; AHMAD, N. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 186, n. 1, p. 28-37, 2003.
- 29- F'GUYER, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.** **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v. 19, p. 56-72, 2003.
- 30- JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G. O.; SLOWING, K. V.; THOMAS, C. F.; BEECHER, C. W.; FONG, H. H.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; MOON, R. C.; PEZZUTO, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 275, p. 218-220, 1997.
- 31- REAGAN-SHAW, S.; MUKHTAR, H.; AHMAD, N. Resveratrol imparts photoprotection of normal cells and enhances the efficacy of radiation therapy in cancer cells. **Photochem. Photobiol.**, v. 84, n. 2, p. 415-421, 2008.
- 32- SALGADO, C.; GALANTE, M. C.; LEONARDI, G. R. Filtros solares: Mecanismos de ação e metodologias em preparações magistrais. **Int. J. Pharm. Compound**, Edição Brasileira, v. 6, n. 4, p. 224-236, 2004.
- 33- SAIJA, A.; TOMAINO, A.; LO CASCIO, R.; TROMBETTA, D.; PROTEGGENTE, A.; DE PASQUALE, A.; UCCELLA, N.; BONINA, F. Ferulic and caffeic acids as potential protective agents against photooxidative skin damage. **J. Sci. Food Agric.**, v. 79, n. 3, p. 476-480, 1999.
- 34- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; MIRANDA, A. L. P.; RODRIGUES, C. R. Química medicinal de n-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Quím. Nova**, v. 25, n.1, p.129-148, 2002.
- 35- LIMA, L.M.; FRATTANI, F. S.; DOS SANTOS, J. L.; CASTRO, H. C.; FRAGA, C. A.; ZINGALI, R. B.; BARREIRO, E. J. Synthesis and anti-platelet activity of novel arylsulfonate-acylhydrazone derivatives, designed as antithrombotic candidates. **Eur. J. Med. Chem.** v. 43, p. 348-356, 2008.
- 36- BRAND-WILLIAM, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v.28, p. 25-30, 1995.
- 37- KOLEVA, I. I.; VAN BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P.; DE GROOT, A.; EYSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochem. Anal.**, v. 13, p. 8-17, 2002.
- 38- TÖRÖK, B.; SOOD, A.; BAG, S.; TULSAN, R.; GHOSH, S.; BORKIN, D.; KENNEDY, A. R.; MELANSON, M.; MADDEN, R.; ZHOU, W.; LEVONE, H. 3rd; TÖRÖK, M. Diaryl hydrazones as multifunctional inhibitors of amyloid self-assembly. **Biochemistry**, v. 52, p. 1137-1148, 2013.
- 39- KHAZAEI, P.; GOLDOOZIAN, R.; SHARIFIFAR, F. An evaluation of extracts of five traditional medicinal plants from Iran on the inhibition of mushroom tyrosinase activity and scavenging of free radicals. **Intern. J. Cosmetic Sci.**, v.31, p.375-381, 2009.
- 40- CHEN, J.S.; WEI, C.I.; MARSHALL, M.R. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. **J. Agric. Food Chem.**, v.39, n.11, p.1897-1901, 1991.
- 41- CABANES, J.; CHAZARRA, S.; GARCIA-CARMONA, F. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. **J. Pharm. and Pharmacol.**, v.46, n. 12, p. 982-985, 1994.
- 42- SHIN, N. H.; RYU, S. Y.; CHOI, E. J.; KANG, S. H.; CHANG, I. M.; MIN, K. R.; KIM, R. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 243, p. 801-803, 1998.
- 43- MCMURRY, J. **Química orgânica**. 7ª ed. São Paulo: Cengage Learning. v. 2, p. 668-670, 2011.
- 44- CRAIG, D. Q. M.; READING, M. Thermal analysis of pharmaceuticals. 1ª ed. New York: CRC Press. p. 1-50, 139-188, 2007.
- 45- BLOIS, H. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v.181, p. 1199-1200, 1958.

- 46- SPRINGSTEEN, A.; YUREK, R.; FRAZIER, M.; CARR, K.F. *In vitro* measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. **Anal. Chem. Acta.**, v. 380, n. 2-3, p. 155-164, 1999.
- 47- VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; KANEKO, T. M.; PEDRIALI, C. A.; BABY, A. R. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **An. Bras. Dermatol.**, v. 86, n. 4, p. 732-742, 2011.
- 48- Food and Drug Administration. **Sunscreen monograph**. Disponível em: <<http://webprod.hc-sc.gc.ca/nhpid-bdipsn/atReq.do?atid=sunscreen-ecransolaire&lang=eng>>. Acesso: Janeiro, 2016.
- 49- YU, L. Inhibitory effects of (*S*)- and (*R*)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acids on tyrosinase activity. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 2344-2347, 2003.