Universidade Estadual Paulista

"Júlio de Mesquita Filho"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Planejamento, síntese e avaliação *in vitro* de derivados triazínicos úteis como filtros solares

Juliana Santana Reis

Araraquara

2018

Juliana Santana Reis

Planejamento, síntese e avaliação *in vitro* de derivados triazínicos úteis como filtros solares

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos
COORIENTADOR: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Araraquara
2018

Ficha Catalográfica
Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

R375p

Reis, Juliana Santana
Planejamento, síntese e avaliação *in vitro* de derivados triazínicos úteis como filtros solares / Juliana Santana Reis. – Araraquara, 2018.
164 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento em Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Jean Leandro dos Santos.
Coorientador: Marcos Antonio Corrêa.

1. Filtros solares. 2. Fotoproteção. 3. Resveratrol. I. Santos, Jean Leandro dos, orient. II. Corrêa, Marcos Antonio, coorient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Maria Irani Coito CRB-8/4.440.

CAPES: 40300005

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO IN VITRO DE NOVOS FILTROS SOLARES DERIVADOS DE RESVERATROL ÚTEIS NA PREVENÇÃO DO CÂNCER DE PELE

AUTORA: JULIANA SANTANA REIS

ORIENTADOR: JEAN LEANDRO DOS SANTOS

COORIENTADOR: MARCOS ANTONIO CORREA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: SEM ÁREA DE CONHECIMENTO pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JEAN LEANDRO DOS SANTOS
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Prof. Dr. JOSÉ RICARDO SOARES DE OLIVEIRA
Departamento de Ciênicas da Saúde / Centro Universitário de Araraquara / UNIARA

Profª Drª ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. VERA LUCIA BORGES ISAAC
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Profa. Dra. CHUNG MAN CHIN
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 26 de janeiro de 2018

Dedico este trabalho...

Aos meus pais Mauricio e Vera,
aos meus irmãos Mauricio Jr. e Rodrigo
e ao meu companheiro de todos os
momentos, Carlos, pelo amor, incentivo
e paciência ao longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que colaboraram na elaboração deste trabalho, particularmente:

a Deus, pela presença constante em minha vida, dando-me força, paz e sabedoria para a conclusão deste trabalho.

aos meus pais, Mauricio e Vera, pelo amor incondicional, pela compreensão nos momentos de tensão e ausência, pelas conversas e desabafos, pelo incentivo e participação em todos os momentos.

aos meus irmãos Mauricio Junior e Rodrigo, pela paciência, amor, compreensão, troca de idéias e colaboração.

à minha tia Fátima e à minha avó Júlia (in memorian)*, pelas incansáveis horas de desabafo, pela compreensão, por todo apoio, carinho, incentivo e paciência em mais esta etapa da minha vida.*

ao meu companheiro e melhor amigo, Carlos Tadeu Rosa, pela compreensão por cada momento que negligenciei em função da realização deste trabalho, pela paciência, pelo incentivo constante, por cuidar de mim com respeito e carinho, sempre dando-me idéias, acalmando-me, alegrando-me e me dando forças para seguir em frente.

aos meus amigos-irmãos: Andressa Fujimura, Camila Corsi, João Paulo Paulino, Karina Galbiatti, Karina Barbieri e Stella Freitas por estarem sempre ao meu lado ao longo do meu aprendizado, dando-me apoio e amizade.

à morena do meu coração, Juliana Frontarolli, pela paciência e acolhimento com carinho durante nossas conversas semanais. Nossa amizade vai muito além do seu consultório.

ao tio Luís Geraldo, por me incentivar e dar dicas valiosas para melhorar o trabalho.

ao meu orientador, Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, pela confiança, ensinamentos, orientação, amizade, apoio, atenção, respeito, incentivo e presença marcante em cada etapa deste trabalho. À você, meu mais sincero agradecimento pela oportunidade e por estar sempre ao meu lado.

ao meu coorientador, Prof Dr. Marcos Antonio Corrêa, pela confiança e colaboração durante a execução deste trabalho, por toda atenção, amizade e paciência.

aos profs. Dra. Chung Man Chin, Dra. Vera Lucia B. Isaac e Dr. André Gonzaga dos Santos pelos ensinamentos, paciência e compreensão.

a todos do grupo Lapdesf, ao aluno Jovan Duran Alonso e aos professores Dra. Maria Crespi e Dr. Clóvis Ribeiro (Instituto de Química-Termoanalítica), e aos funcionários Leidiane (Química Farmacêutica), Caio (Farmacognosia), Ilza (Cosmetologia), João Luiz (Instituto de Química-Espectrometria de Massas), Nivaldo e Lucinéia (Instituto de Química-RMN). A todos vocês agradeço a atenção, paciência, disponibilidade e toda a ajuda prestada sempre que necessário e solicitado.

à toda equipe da biblioteca da FCF (UNESP) e à seção de Pós-Graduação por todas as orientações no cumprimento das etapas deste trabalho.

à CAPES pela credibilidade no projeto e apoio financeiro.

e, por fim, a todos os que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e me acompanharam ao longo desses anos.

“Se pensar é o destino do ser humano, continuar sonhando é o seu grande desafio. E isto, é lógico, implica em trajetórias com riscos, em vitórias com muitas lutas, e incontáveis obstáculos pelo caminho. Apesar de tudo, seja ousado! Liberte sua criatividade! E nunca desista de seus sonhos, pois eles transformarão sua vida em uma grande aventura.”

Augusto Cury

RESUMO

REIS, J.S. **Planejamento, síntese e avaliação *in vitro* de derivados triazínicos úteis como filtros solares.** 2018. 164 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

O desenvolvimento do câncer de pele e o fotoenvelhecimento estão diretamente associados à exposição dos indivíduos à radiação ultravioleta (UV) de modo excessivo e sem a proteção adequada. Os filtros solares são conhecidamente capazes de proteger a pele contra os efeitos nocivos dessa radiação. Apesar disso, os filtros solares ainda apresentam limitações justificando a pesquisa de substâncias mais efetivas e seguras. Este trabalho teve como objetivo o planejamento, a síntese e a avaliação de novos filtros com capacidade ampliada de proteção contra as radiações UVA e UVB, associado a propriedades antioxidantes, obtidos através da estratégia de triplicação molecular tendo como protótipo as moléculas do resveratrol e *ethylhexyl triazone*. Foram sintetizados, isolados e caracterizados oito substâncias inéditas (FSN-1 a FSN-8). Todas as substâncias fundiram em temperaturas acima de 218°C, significativamente superior ao padrão *ethylhexyl triazone* (119,99°C), sendo FSN-2 e FSN-7 as substâncias que apresentaram menor e maior temperatura de decomposição, respectivamente (FSN-2: 236,25°C; FSN-7: 326,22°C). Todas as substâncias apresentaram atividade antioxidante, sendo a substância FSN-8 a mais ativa em relação às demais substâncias sintetizadas e aos padrões de resveratrol e *ethylhexyl triazone*. Embora todas as substâncias tenham comprimento de onda máximo na região espectral UVB, os resultados obtidos no ensaio *in vitro* de atividade fotoprotetora demonstraram capacidade protetora também contra radiação UVA para todas as substâncias sintetizadas. A substância mais ativa quanto a capacidade fotoprotetora foi a FSN-3, que exibiu valores de FPS de 17 e FPUVA de 13. As substâncias FSN-7 (FPS 14; FPUVA 7) e FSN-1 (FPS 9; FPUVA 5) também merecem destaque, apresentando capacidade fotoprotetora mais efetiva em relação aos padrões resveratrol (FPS 2; FPUVA 2) e *ethylhexyl triazone* (FPS 3; FPUVA 3). Estes resultados permitiram identificar novos filtros solares com espectro ampliado de proteção UV, úteis para prevenção do câncer de pele e fotoenvelhecimento.

Palavras-chave: Filtros solares. Fotoproteção. Resveratrol.

ABSTRACT

REIS, J.S. **Planning, synthesis and *in vitro* evaluation of triazine derivatives useful as sunscreens.** 2018. 164 f. Thesis (PhD in Pharmaceutical Sciences) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

The development of skin cancer and photoaging are directly associated with exposure to ultraviolet (UV) radiation without adequate protection. Sunscreens are known to be able to protect the skin against the harmful effects of such radiation. Despite this, sunscreen still exhibits limitations justifying the research for more effective and safe compounds. The aim of this work was design, synthesize and evaluate new sunscreens possessing wide protection against UVA and UVB, associated with antioxidant properties, obtained through molecular triplication strategy, using resveratrol and ethylhexyl triazone as prototype molecules. Eight novel substances (FSN-1 - FSN-8) were synthesized, isolated and characterized. All synthesized substances melted at temperatures above 218°C, significantly higher than ethylhexyl triazone (119.99°C). FSN-2 and FSN-7 presented, respectively, the lowest and the highest decomposition temperatures (FSN-2: 236,25°C; FSN-7: 326,22°C). All synthesized substances have exhibited antioxidant effect and FSN-8 has exhibited antioxidant effect superior than resveratrol, ethylhexyl triazone and the other substances. All synthesized substances exhibited maximum wavelength at UVB spectral region, and they also showed a protective activity against UVA radiation in photoprotection *in vitro* assay. FSN-3 was the most active susncreen (SPF 17; UVAPF 13). FSN-7 (SPF 14, UVAPF 7) and FSN-1 (SPF 9; UVAPF 5) also should be highlighted, presenting more photoprotection ability than resveratrol (SPF 2 and UVAPF 2) and ethylhexyltriazone (SPF 3 and UVAPF 3). All these results allowed the identification of new sunscreens with wide spectra against UV radiation useful to prevent skin cancer and photoaging.

Key-words: Sunscreen. Photoprotection. Resveratrol.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Sal de amônio do ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Cromatografia em camada delgada
COLIPA	*European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EHT	*Ethylhexyl triazone*
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	*Food and Drug Administration*
FPS	Fator de proteção solar
FPUVA	Fator de proteção UVA
GSH	Glutationa reduzida
GSH-Px	Glutationa peroxidase
GSH-Rd	Glutationa redutase
ICTAC	Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IV	Radiação infravermelha
LaCos	Laboratório de Cosmetologia – UNESP
MBBT	*Methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol*
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORAC	*Oxygen-radical absorbancy capacity*
PABA	Ácido *para*-aminobenzóico
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucléico
SOD	Superóxido dismutase
TEAC	*Trolox equivalent antioxidant capacity*
UV	Radiação ultravioleta
UVA	Radiação ultravioleta tipo A
UVB	Radiação ultravioleta tipo B
UVC	Radiação ultravioleta tipo C
Vis	Radiação visível

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1. Comparação entre as alterações promovidas pelos envelhecimentos intrínseco e extrínseco (Montagner *et al*., 2009). 14

Tabela 1. Resultados de RMN de ^{1}H (75 MHz, em DMSO-d_6), RMN de ^{13}C (300 MHz, em DMSO-d_6) e infravermelho do intermediário 1. 59

Tabela 2. Características visuais dos precipitados e rendimentos reacionais. 61

Tabela 3. Resultados de RMN de ^{1}H (δ_H, multiplicidade, *J* e integração; 600 MHz, em DMSO-d_6) das substâncias *N*-acil-hidrazônicas finais. 63

Tabela 4. Resultados de RMN de ^{13}C ($\delta_{C;}$ 150 MHz, em DMSO-d_6) das substâncias *N*-acil-hidrazônicas finais. 67

Tabela 5. Bandas de absorção na região do infravermelho (em KBr, pastilhas) das substâncias *N*-acil-hidrazônicas finais e suas atribuições, em cm^{-1}. 71

Tabela 6. Resultados de adutos de hidrogênio obtidos por espectrometria de massas *(m/z)* e desvios-padrão para as substâncias finais *FSN-1 a FSN-7*.... 75

Tabela 7. Resultados comparativos de absorvâncias, absortividades molar e comprimentos de onda máximo para as substâncias finais *N*-acil-hidrazônicas em relação aos protótipos sintetizados por Reis e colaboradores (2014). 77

Tabela 8. Resultados de análise térmica para as substâncias finais *N*-acil-hidrazônicas e padrões (resveratrol e EHT). 78

Tabela 9. Porcentagem de redução do DPPH (%) e desvios-padrão das substâncias finais em relação aos padrões (ácido ascórbico, resveratrol e EHT) em diferentes concentrações (µM). 80

Tabela 10. Médias ± desvios-padrão dos resultados obtidos no espectrofotômetro para as substâncias FSN-1 a FSN-8 em relação aos padrões resveratrol e EHT, e para os protótipos (moléculas I a VIII) (Reis *et al*., 2014), na concentração de 5% em emulsão. 82

Quadro 2. Representação relacionada à razão UVA/UVB *(*gradação de *Boots Star)* (Springsteen *et al*., 1999; Velasco *et al*., 2011). 95

Quadro 3. Intervalo de comprimentos de onda críticos (λ_c) e sua relação com a razão UVA/UVB (Velasco *et al*., 2011). 96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espectro eletromagnético de radiação emitida pelo Sol (Adaptado de Steiner, 2011). 6
Figura 2. Dano celular gerado pela ação da radiação UV e penetração nos estratos cutâneos. 7
Figura 3. Estrutura química do ácido urocânico. 10
Figura 4. Rota sintética de eumelanina e feomelanina em melanócitos de mamíferos (Oliveira *et al.*, 2004). 12
Figura 5. Estrutura química do *PABA* e do *ethylhexyl dimethyl PABA*. 23
Figura 6. Exemplos de salicilatos empregados como filtros solares. 24
Figura 7. Estrutura do metil-antranilato. 25
Figura 8. Exemplos de derivados cinâmicos. 25
Figura 9. Benzofenonas aprovadas pelo FDA. 27
Figura 10. Exemplos de dibenzoilmetanos empregados como filtros UVA. 29
Figura 11. Exemplos de fotoprotetores derivados de cânfora empregados no Brasil. 30
Figura 12. Estrutura dos compostos *ethylhexyl triazone* (EHT), *bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine* (bemotrizinol), *phenylbenzimidazole sulfonic acid* (ensulizole), *octocrylene* (octocrileno) e *methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol* (MBBT). 31
Figura 13. Interconversão do resveratrol nos isômeros *cis-trans*. 34
Figura 14. Estrutura química dos cinamatos disponíveis no Brasil. 36
Figura 15. Obtenção da *benzophenone-4* a partir da *benzophenone*. 37
Figura 16. Obtenção do *methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol* a partir do *phenylbenzimidazole sulfonic acid*. 37
Figura 17. Triplicação da subunidade etilhexil éster derivada do protótipo *ethylhexyl salicylate*. 38
Figura 18. Planejamento estrutural das novas substâncias derivadas de resveratrol e EHT. 45
Figura 19. Esquema reacional utilizado para obtenção do intermediário 1. 46
Figura 20. Esquema reacional utilizado para obtenção dos derivados hidrazônicos finais FSN-1 a FSN-8. 49

Figura 21. Mecanismo geral de formação do intermediário aldeídico funcionalizado. 84
Figura 22. Mecanismo geral para obtenção de hidrazonas (Mcmurry, 2011).. 86
Figura 23. Reação do radical DPPH na presença de um agente antioxidante (Molyneux, 2004)..... 92
Figura 24. Representação estrutural dos ácidos caféico, ferúlico e clorogênico. 93

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1. Espectro de RMN de ^{1}H (300 MHz, em DMSO-d_6) do intermediário 1. 131

Apêndice 2. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em DMSO-d_6) do intermediário 1. 131

Apêndice 3. Espectro de absorção na região do infravermelho (em KBr) do intermediário 1. 132

Apêndice 4. Espectro de massas (MicroTOF, infusão direta) do intermediário 1. 132

Apêndice 5. Espectro de RMN ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-1. 133

Apêndice 6. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-1. 133

Apêndice 7. Espectro de RMN por HSQC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-1. 134

Apêndice 8. Espectro de absorção na região do infravermelho (em KBr) do produto FSN-1. 134

Apêndice 9. Espectro de absorção na região do ultravioleta (em DMSO/metanol) do produto FSN-1. 135

Apêndice 10. Curva térmica do produto FSN-1. 135

Apêndice 11. Espectro de massas (MicroTOF, infusão direta) do produto FSN-1. 136

Apêndice 12. Espectro de RMN ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-2. 136

Apêndice 13. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-2. 137

Apêndice 14. Espectro de RMN por HSQC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-2. 137

Apêndice 15. Espectro de absorção na região do infravermelho (em KBr) do produto FSN-2. 138

Apêndice 16. Espectro de absorção na região do ultravioleta (em DMSO/metanol) do produto FSN-2. 138
Apêndice 17. Curva térmica do produto FSN-2..... 139
Apêndice 18. Espectro de massas (MicroTOF, infusão direta) do produto FSN-2. 139
Apêndice 19. Espectro de RMN ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-3. 140
Apêndice 20. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-3. 140
Apêndice 21. Espectro de RMN por HSQC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-3..... 141
Apêndice 22. Espectro de RMN por HMBC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-3..... 141
Apêndice 23. Espectro de absorção na região do infravermelho (em KBr) do produto FSN-3..... 142
Apêndice 24. Espectro de absorção na região do ultravioleta (em DMSO/metanol) do produto FSN-3. 142
Apêndice 25. Curva térmica do produto FSN-3..... 143
Apêndice 26. Espectro de massas (MicroTOF, infusão direta) do produto FSN-3. 143
Apêndice 27. Espectro de RMN ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-4. 144
Apêndice 28. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-4. 144
Apêndice 29. Espectro de RMN por HSQC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-4..... 145
Apêndice 30. Espectro de RMN por HMBC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-4..... 145
Apêndice 31. Espectro de absorção na região do infravermelho (em KBr) do produto FSN-4..... 146
Apêndice 32. Espectro de absorção na região do ultravioleta (em DMSO/metanol) do produto FSN-4. 146

Apêndice 33. Curva térmica do produto FSN-4..... 147
Apêndice 34. Espectro de massas (MicroTOF, infusão direta) do produto FSN-4. 147
Apêndice 35. Espectro de RMN ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-5. 148
Apêndice 36. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-5. 148
Apêndice 37. Espectro de RMN por HSQC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-5..... 149
Apêndice 38. Espectro de RMN por HMBC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-5..... 149
Apêndice 39. Espectro de absorção na região do infravermelho (em KBr) do produto FSN-5..... 150
Apêndice 40. Espectro de absorção na região do ultravioleta (em DMSO/metanol) do produto FSN-5. 150
Apêndice 41. Curva térmica do produto FSN-5..... 151
Apêndice 42. Espectro de massas (MicroTOF, infusão direta) do produto FSN-5. 151
Apêndice 43. Espectro de RMN ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-6. 152
Apêndice 44. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-6. 152
Apêndice 45. Espectro de RMN por HSQC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-6..... 153
Apêndice 46. Espectro de RMN por HMBC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-6..... 153
Apêndice 47. Espectro de absorção na região do infravermelho (em KBr) do produto FSN-6..... 154
Apêndice 48. Espectro de absorção na região do ultravioleta (em DMSO/metanol) do produto FSN-6. 154
Apêndice 49. Curva térmica do produto FSN-6..... 155

Apêndice 50. Espectro de massas (MicroTOF, infusão direta) do produto FSN-6. 155
Apêndice 51. Espectro de RMN ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-7. 156
Apêndice 52. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-7. 156
Apêndice 53. Espectro de RMN por HSQC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-7. 157
Apêndice 54. Espectro de RMN por HMBC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-7. 157
Apêndice 55. Espectro de absorção na região do infravermelho (em KBr) do produto FSN-7. 158
Apêndice 56. Espectro de absorção na região do ultravioleta (em DMSO/metanol) do produto FSN-7. 158
Apêndice 57. Curva térmica do produto FSN-7. 159
Apêndice 58. Espectro de massas (MicroTOF, infusão direta) do produto FSN-7. 159
Apêndice 59. Espectro de RMN ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-8. 160
Apêndice 60. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-8. 160
Apêndice 61. Espectro de RMN por HSQC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-8. 161
Apêndice 62. Espectro de RMN por HMBC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-8. 161
Apêndice 63. Espectro de absorção na região do infravermelho (em KBr) do produto FSN-8. 162
Apêndice 64. Espectro de absorção na região do ultravioleta (em DMSO/metanol) do produto FSN-8. 162
Apêndice 65. Curva térmica do produto FSN-8. 163
Apêndice 66. Curva térmica do padrão de Resveratrol. 163
Apêndice 67. Curva térmica do padrão de EHT. 164

SUMÁRIO

1. Introdução 1

2. Revisão da Literatura 5

2.1. Radiação solar 5

2.2. A Pele 8

2.2.1. A fisiologia da pele versus a radiação UV 10

2.3. Fotoenvelhecimento 12

2.4. Câncer de Pele 15

2.4.1. Carcinogênese 17

2.5. Fotoprotetores 18

2.5.1. Filtros inorgânicos 18

2.5.2. Filtros orgânicos 21

2.5.3. Resveratrol 33

2.6. Modificações moleculares na obtenção de filtros solares 36

3. Objetivos 39

3.1. Objetivo geral 39

3.2. Objetivos específicos 39

4. Material e Métodos 40

4.1. Reagentes e Solventes 40

4.2. Equipamentos 41

4.3. Correlatos 43

4.4. Planejamento estrutural 44

4.5. Metodologias sintéticas 46

4.5.1. Síntese do 4,4',4"-((1,3,5-triazina-2,4,6-triil)tri(oxi))tribenzaldeído (intermediário 1) 46

4.5.2. Síntese geral para obtenção dos derivados finais hidrazônicos FSN-1 a FSN-8..... 48

4.6. Metodologias analíticas 50

4.6.1. Cromatografia em camada delgada (CCD) 50

4.6.2. Espectroscopia de RMN ^{1}H e RMN ^{13}C 51

4.6.3. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV) 51

4.6.4. Espectrometria de massas 51

4.6.5. Análise de varredura por espectrofotometria de UV 52

4.6.6. Faixa de Fusão 53

4.6.7. Estudo de Estabilidade Térmica 53

4.6.7.1. Termogravimetria (TG) 53

4.6.7.2. Calorimetria diferencial de varredura (DSC) 53

4.7. Ensaios in vitro 54

4.7.1. Estudo da atividade antioxidante 54

4.7.2. Análise estatística para o estudo da atividade antioxidante 55

4.7.3. Estudo da atividade fotoprotetora 55

4.7.4. Análise estatística para o estudo da atividade fotoprotetora 57

5. Resultados 58

5.1. Caracterização Estrutural 58

5.1.1. Intermediário 1: 4,4',4"-((1,3,5-triazina-2,4,6-triil)tri(oxi))tribenzaldeído .. 58

5.1.2. Síntese da 2-hidroxibenzidrazida 60

5.1.3. Síntese do metil 2,4-diidroxibenzoato 60

5.1.4. Síntese da 2,4-diidroxibenzidrazida 61

5.1.5. Síntese das substâncias N-*acil-hidrazônicas* 61

5.2. Estudo de Estabilidade Térmica 78

5.3. Ensaios in vitro 79

5.3.1. Estudo da atividade antioxidante 79

5.3.2. Estudo da atividade fotoprotetora 81

6. Discussão 84

6.1. Síntese do 4,4',4"-((1,3,5-triazina-2,4,6-tril)tri(oxi))tribenzaldeído (intermediário 1)..... 84

6.2. Síntese das substâncias N-acil-hidrazônicas finais 86

6.3. Estudo de Estabilidade Térmica 87

6.4. Ensaios in vitro 89

6.4.1. Estudo da atividade antioxidante 89

6.4.2. Estudo da atividade fotoprotetora 94

7. Conclusões 100

Referências 102

Apêndices 130

1. Introdução

A luz solar é diretamente responsável pela energia fundamental que permite a existência de vida na Terra, sobretudo em processos fotossintéticos. Entretanto, a exposição à radiação ultravioleta (UV) de maneira excessiva e desprovida de proteção adequada pode apresentar efeito lesivo e resultar no aparecimento de diversas alterações fisiopatológicas cutâneas, tais como fotoenvelhecimento e câncer.

A radiação UV emitida pela luz solar constitui o carcinógeno físico mais proeminente e ubíquo terrestre e pode ser dividida de acordo com seu comprimento de onda em: UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) e UVC (100-290 nm). A radiação UVA penetra mais profundamente na derme e epiderme (cerca de 1000 µm) e está diretamente relacionada ao surgimento de doenças de pele desencadeadas pela luz solar (fotodermatoses). É responsável, ainda, pelo aparecimento de mutações, promoção do fotoenvelhecimento e formação de espécies reativas. A radiação UVB, cujo poder de penetração na derme e epiderme alcança 160-180 µm, causa danos imediatos na pele, como queimaduras, eritemas, edemas e bolhas. Além disso, essa radiação contribui para o aparecimento de espécies reativas, fotoenvelhecimento e depleção do sistema imunológico. Já a radiação UVC, embora altamente prejudicial, é absorvida quase totalmente pela camada de ozônio (Gruijl, 1999; Ichihashi *et al.*, 2003; Kawanishi *et al.*, 2001; Matheus *et al.*, 2002; Nichols *et al.*, 2010; Sasson, 2006; Scotti *et al.*, 2003; Yaar *et al.*, 2007).

O mecanismo de aparecimento e desenvolvimento de neoplasias cutâneas decorrentes da exposição à radiação UV apresenta inúmeras causas, tais como: a)

danos diretos ao DNA por meio de mutações induzidas pela radiação, ou indiretos promovidos pelo aumento dos níveis de radicais livres; b) maior resistência dos queratinócitos à apoptose, favorecendo o acúmulo de alterações no DNA e proteínas; e c) exacerbação de processos apoptóticos, os quais prejudicam a arquitetura e integridade tecidual e culminam em respostas inflamatórias intensas com subsequentes ulcerações e perdas na barreira epidérmica de proteção (Hildesheim *et al.*, 2004; Wulf *et al.*, 2004).

O aumento dos níveis das espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio formadas endogenamente após exposição à radiação UV pode ser neutralizado por moléculas antioxidantes endógenas e exógenas. Entretanto, essa mesma radiação UV pode provocar diminuição dos níveis de agentes antioxidantes endógenos, reduzindo seu sistema de proteção ao organismo (Cruz, 2008; Rosenstein *et al.*, 1987; Yasui *et al.*, 2000).

A fotoproteção pode ser definida como um conjunto de estratégias químicas e físicas empregadas na tentativa de minimizar os efeitos lesivos decorrentes da exposição à radiação solar (Velasco *et al.*, 2011; Matheus *et al.*, 2002; Sasson, 2006; Scotti *et al.*, 2003). Neste contexto, o uso de preparações fotoprotetoras constitui uma das estratégias químicas mais simples e efetivas utilizadas na prevenção e redução das alterações fisiopatológicas decorrentes da exposição à radiação UV. Este efeito promovido pelas preparações fotoprotetoras é possível devido à incorporação de filtros solares em sua composição (Cruz, 2008).

Os filtros solares podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação em: filtros inorgânicos, que atuam por difusão e reflexão da radiação; e filtros orgânicos, que atuam por absorção da radiação através de delocalização eletrônica.

Historicamente, os produtos de origem natural constituem importantes fontes de inspiração na descoberta de novas substâncias bioativas. Na indústria cosmética, o uso de produtos naturais apresenta forte apelo comercial tornando os compostos desta origem interessantes protótipos no desenvolvimento de produtos cosméticos. Na área de filtros solares, estudos têm destacado a importância dos produtos naturais atuarem como filtro solar (Araujo *et al.*, 2014; Reis *et al.*, 2014; Saraf *et al.*, 2010; Yamasaki, 2012).

Dentre os produtos de origem natural com propriedades fotoprotetoras pode-se destacar o emprego endógeno dos seguintes compostos: flavonas, carotenos, xantinas, retinil palmitatos, ácido ascórbico, ácidos hidroxicinâmicos e polifenóis. Estes compostos estão presentes em alimentos ou bebidas como chá-verde, café, tomate, frutas cítricas, açafrão, cenoura, manga, cacau, maçãs, uvas e vinho tinto (Antille *et al.*, 2003; Aust *et al.*, 2005; Böhm *et al.*, 1998; Darr *et al.*, 1992; Koo *et al.*, 2007; Kootstra, 1994; Mitani *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2017; Solovchenko *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007).

O resveratrol é considerado um polifenol da classe dos estilbenos que apresenta capacidade antioxidante e anti-proliferativa, inibindo a geração de radicais livres e reduzindo o processo inflamatório (Afaq *et al.*, 2011; Aggarwal *et al.*, 2005; Berman *et al.*, 2017). Tem sido relatado que o resveratrol, quando utilizado endogenamente, apresenta efeitos benéficos na prevenção e tratamento do câncer de pele (Horn *et al.*, 2017; Reagan-Shaw *et al.*, 2008), tornando este produto natural interessante no desenvolvimento de filtros solares.

Estudos prévios desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa permitiram a identificação de novas substâncias inspiradas na estrutura do resveratrol, sintetizadas a partir da estratégia de hibridação molecular. Estas substâncias

apresentaram, simultaneamente, ampliada faixa de absorção no espectro UV e atividade antioxidante, podendo ser úteis na prevenção do fotoenvelhecimento e câncer de pele. Apesar da ampliada faixa de proteção na região espectral do UV e atividade antioxidante, apenas uma das substâncias sintetizadas apresentou-se mais ativa que o resveratrol (Reis *et al.*, 2014). Por isso, foram necessárias estratégias de otimização molecular a fim de se obter substâncias mais efetivas como filtros solares.

Neste trabalho, novas substâncias foram obtidas pela estratégia de triplicação molecular. A partir desta, pretendeu-se potencializar as atividades fotoprotetora e antioxidante dos novos derivados na tentativa de se constituir uma alternativa aos filtros solares disponíveis.

2. Revisão da Literatura

2.1. Radiação solar

O Sol permite a existência de vida na Terra e quase todos os processos biológicos, direta ou indiretamente, dependem de sua energia, sobretudo das radiações emitidas (Rodrigo *et al.*, 2011).

A incidência regular da radiação solar sobre a pele pode promover efeitos benéficos, como a síntese de vitamina D a partir do 7-dehidrocolesterol. A vitamina D, por sua vez, atua na prevenção do diabetes, raquitismo e diversos tipos de câncer (próstata, mama, pulmão e intestino); liberação de hormônios; absorção de nutrientes; manutenção do ritmo cardíaco e regulação da pressão arterial; fortalecimento do sistema imunológico; ação antidepressiva; secreção do paratormônio; e regulação do metabolismo osteoblástico (Castro, 2007; Heaney, 2008; Schuch *et al.*, 2009; Moan *et al.*, 2005).

Apesar de benéfica, a exposição à radiação solar de modo constante, demasiado e sem o emprego de proteção adequada pode resultar no surgimento de alterações fisiológicas e doenças, a exemplo, do envelhecimento cutâneo extrínseco e aparecimento de tumores (Cruz, 2008).

O espectro de radiação eletromagnético solar é divido em ionizante e não ionizante. Este, por sua vez, é subdividido em infravermelho (IV), visível (Vis) e ultravioleta (UV) (Santos, 2007; Steiner, 2011) (Figura 1). A radiação na região do IV atinge intimamente a pele (derme e hipoderme), sendo menos energética que a radiação UV, e promove o aumento de temperatura local (Matheus *et al.*, 2002; Scotti *et al.*, 2003).

Descoberta em 1801 pelo físico alemão Johann Wilhelm Ritter, a radiação ultravioleta constitui cerca de 7% da energia emitida pelo Sol. Apenas 4% desta radiação atinge a superfície terrestre. Situada entre 100 e 400 nm, a radiação UV pode ser dividida para estudos fotobiológicos de acordo com seu comprimento de onda em: UVA (320-400nm), UVB (290-320nm) e UVC (100-290nm) (Figura 1) (Hu *et al.*, 2010; Matheus *et al.*, 2002; Robinson, 1966).

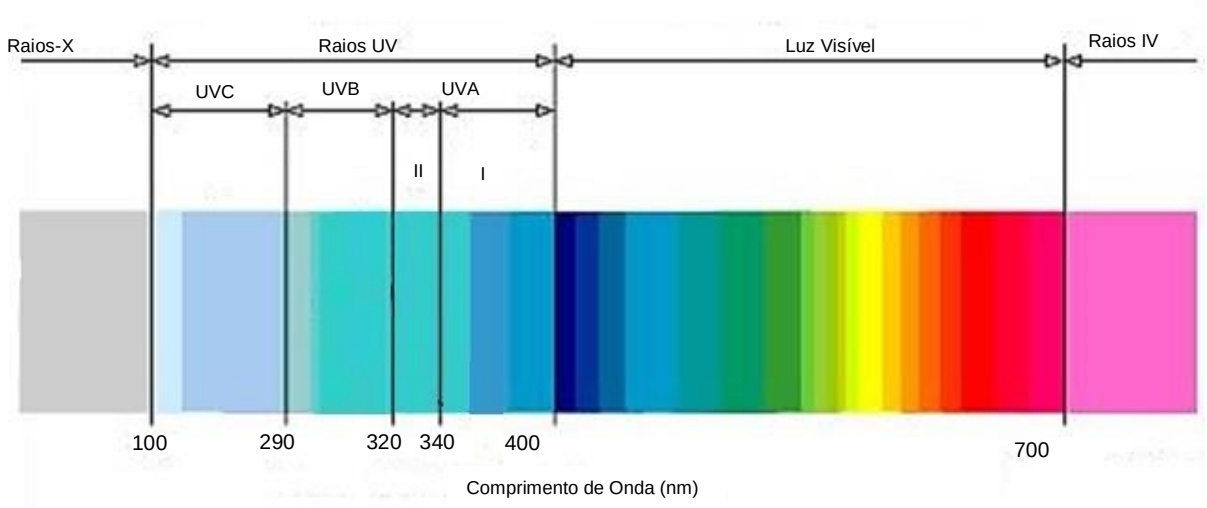


Figura 1. Espectro eletromagnético de radiação emitida pelo Sol (Adaptado de Steiner, 2011).

A radiação UVC apresenta efeito germicida e é empregada na redução da microbiota em superfícies diversas, sobretudo na esterilização de embalagens. Por possuir elevada energia associada ao menor comprimento de onda, é altamente lesiva aos tecidos humanos, sobretudo ao tecido cutâneo, com efeitos mutagênicos e carcinogênicos. Entretanto, é absorvida, quase em sua totalidade, pela camada de ozônio da estratosfera, de tal forma que a quantidade dessa radiação que atinge a esfera terrestre seja praticamente inexistente (Figura 2) (Scotti *et al.*, 2003; Yousef *et al.*, 1988).

A radiação UVB é capaz de atuar diretamente nas bases nitrogenadas induzindo dano à estrutura do DNA. Altamente energética e intensamente absorvida pela epiderme (Figura 2), a radiação UVB é responsável direta por lesões cutâneas agudas e crônicas, promovendo o aparecimento de queimaduras, manchas, eritemas, edema e, em casos mais intensos, vesiculação e bolhas. Esta radiação também está envolvida em lesões oculares, mutação do gene p53 (responsável pelo controle do ciclo celular e apoptose) e indução do eritema associado ao processo inflamatório. Além disso, contribui para o aparecimento de radicais livres e promove alterações no DNA e RNA, levando à lise das membranas celulares (Figura 2) (Martinez *et al.*, 2006; Scotti *et al.*, 2003; Sasson, 2006).

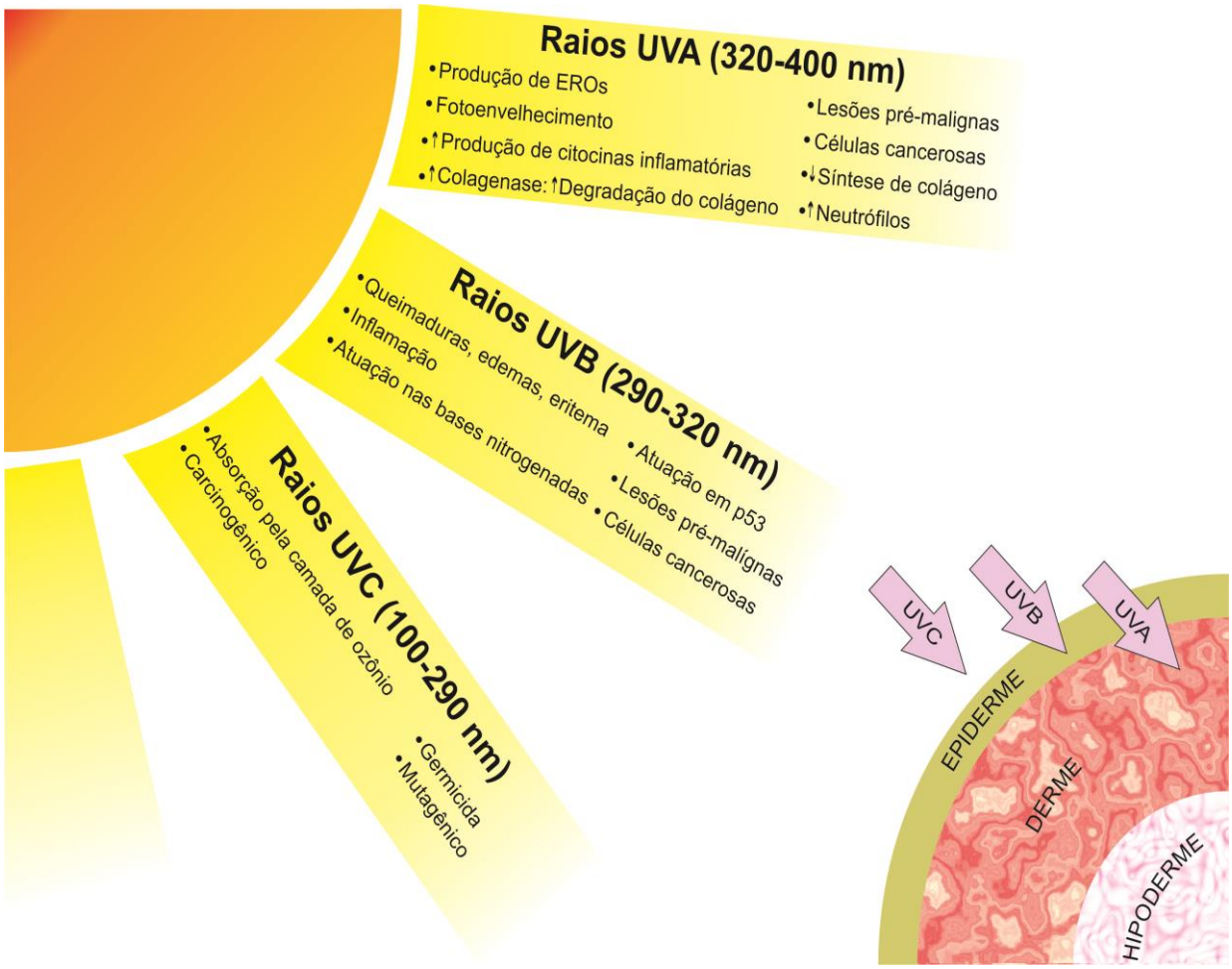


Figura 2. Dano celular gerado pela ação da radiação UV e penetração nos estratos cutâneos.

A radiação UVA atinge majoritariamente a superfície terrestre em relação às demais radiações ultravioletas, sendo a menos energética e de maior comprimento de onda entre estas radiações UV. Pode ser subdividida em UVA II (longo), cujo comprimento de onda encontra-se entre 320 e 340 nm, e UVA I (curto), situada entre 340 e 400 nm. Seus efeitos podem atingir a epiderme e a derme (Figura 2), promovendo o envelhecimento dos tecidos cutâneos, aparecimento de dermatoses e de erupções cutâneas. Além disso, esta radiação pode potencializar os efeitos biológicos do UVB e induzir reações de fototoxicidade (Figura 2) (Scotti *et al.*, 2003; Sasson, 2006).

A radiação UVA *per se* pode causar a mutação no gene p53, alterar a expressão de genes e atingir o material genético, ocasionando o aparecimento e desenvolvimento de mutações de diversas ordens, e promovendo o surgimento de câncer de pele. Ainda, a radiação UVA aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) culminando no estresse oxidativo (Figura 2) (Afaq *et al.*, 2005; Atoui *et al.*, 2005; Chun *et al.*, 2005; Percival, 1998).

As EROs são ativadores de receptores de membrana pró-inflamatórios e, assim, atuam na ativação da cascata intracelular de sinalização dos fatores de transcrição dos genes que regulam inflamação, ciclo celular, proliferação e apoptose. Além disso, aumentam a degradação e promovem a diminuição da síntese de colágeno, acelerando o processo de fotoenvelhecimento (Khury *et al.*, 2011; Strickland *et al.*, 2004).

2.2. A Pele

Ao sistema tegumentar compete a responsabilidade de revestir o corpo, protegendo-o contra o atrito, a perda de água, a invasão de patógenos e contra os

efeitos nocivos da radiação ultravioleta. Este sistema é constituído pela pele e seus anexos, como pêlos, unhas e glândulas. Apresenta importante função na percepção sensorial, termorregulação, excreção de íons e secreção de lipídeos (Ham *et al.*, 1983; Junqueira *et al.*, 2013; Lowe *et al.*, 2015; Ovalle *et al.*, 2008; Ross *et al.*, 2012).

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano representando de 15 a 20% de massa corporal total. É multifuncional, resistente e flexível e apresenta duas camadas teciduais distintas: a epiderme, segmento epitelial de origem ectodérmica, e a derme, segmento conjuntivo de origem mesodérmica. A hipoderme, tecido adjacente à derme, une a pele aos órgãos subjacentes (Cunha *et al.*, 2004; Junqueira *et al.*, 2011; Ross *et al.*, 2008).

Devido à presença da epiderme queratinizada, a pele é capaz de proteger o organismo contra a desidratação e atrito e, em virtude, principalmente, da presença do pigmento epidérmico denominado melanina, este órgão tem função protetora frente à radiação ultravioleta. Vasos sanguíneos, glândulas e tecido adiposo localizados na pele são responsáveis por manter constante a temperatura corpórea, bem como de permitir a secreção e excreção de inúmeras substâncias metabólicas. As terminações nervosas deste órgão permitem a percepção do meio e transmissão dessas informações sensitivas ao SNC. Além disso, a proteção do organismo contra a entrada de agentes patogênicos é possível devido à presença de células do sistema imunológico que atuam localmente (Cunha *et al.*, 2004; Hernandez *et al.*, 1999; Junqueira *et al.*, 2011).

2.2.1. A fisiologia da pele versus a radiação UV

A pele é capaz de proteger o organismo contra a incidência da radiação UV por meio de três mecanismos fisiológicos: secreção sudorípara, pigmentação (melanina) e a camada córnea (Correa, 2012; Junqueira *et al.*, 2011; Sampaio *et al.*, 2008; Poirier *et al.*, 2003).

A camada córnea, que corresponde ao estrato epitelial mais externo, é composta por células pavimentosas, mortas, anucleadas e queratinizadas, que protegem o indivíduo da radiação por meio de espessamento epidérmico, na tentativa de absorver parte da radiação incidente (Correa, 2012; Junqueira *et al.*, 2011; Sampaio *et al.*, 2008; Poirier *et al.*, 2003).

A secreção sudorípara também é considerada um mecanismo de defesa contra a radiação UV, uma vez que é constituída por ácido urocânico (Figura 3), substância de alta absorção na região UVB. Ainda, o ácido urocânico é passível de isomerização: o ácido *trans*-urocânico, originado a partir dos resíduos de histidina presentes na proteína filagrina, é associado aos efeitos de hidratação da camada córnea e proteção solar; e o ácido *cis*-urocânico, resultante da fotoisomerização do seu isômero *trans*, é relacionado a processos de imunossupressão e carcinogênese (Addor *et al.*, 2010; Correa, 2012; Junqueira *et al.*, 2011; Kullavanijaya *et al.*, 2005; Poirier *et al.*, 2003; Sampaio *et al.*, 2008; Sandilands *et al.*, 2009; Teixeira, 2013).

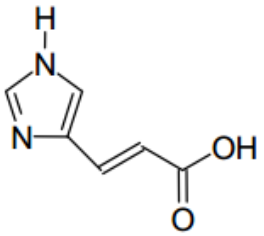


Figura 3. Estrutura química do ácido urocânico.

A melanina é um pigmento epidérmico produzido por uma organela denominada melanossoma que se encontra no interior de células epidérmicas, chamadas melanócitos, e constitui o principal mecanismo de defesa frente à exposição à radiação UV. Quimicamente, a melanina pode ser descrita como um polímero de alto peso molecular, baixa reatividade química e insolubilidade em água e na maioria dos solventes. Este pigmento constitui-se como principal responsável pela policromia de pêlos em mamíferos, sendo classificada em dois tipos básicos: as eumelaninas, responsáveis por tons de coloração preta e marrom, e as feomelaninas, responsáveis por cores claras, de amarelo a marrom-avermelhado. Esta classificação é suportada por um padrão genético que sugere a existência de dois caminhos distintos, possivelmente inter-relacionados, para a formação destes pigmentos. Em 1976, Smith & Swan evidenciaram que a melanogênese se inicia pela ação da enzima tirosinase, presente nos melanócitos de mamíferos, e responsável por catalisar a conversão de tirosina em L-DOPA e esta, em dopaquinona (Figura 4). Porque esta enzima constitui-se como fator limitante na biossíntese da melanina, pode-se inferir que a tirosinase está diretamente relacionada à pigmentação cutânea (Ohguchi *et al.*, 2003; Prota, 1980).

Além da pigmentação da pele, a melanina tem papel fundamental na fotoproteção endógena, tendo efeito cumulativo na região perinuclear de células epidérmicas (melanócitos e queratinócitos) a fim de proteger o DNA destas células contra prováveis danos promovidos pela incidência de radiação UV na pele, atuando por meio de absorção ou reflexão desta radiação (Correa, 2012; Eller *et al.*, 1996; Matheus *et al.*, 2002).

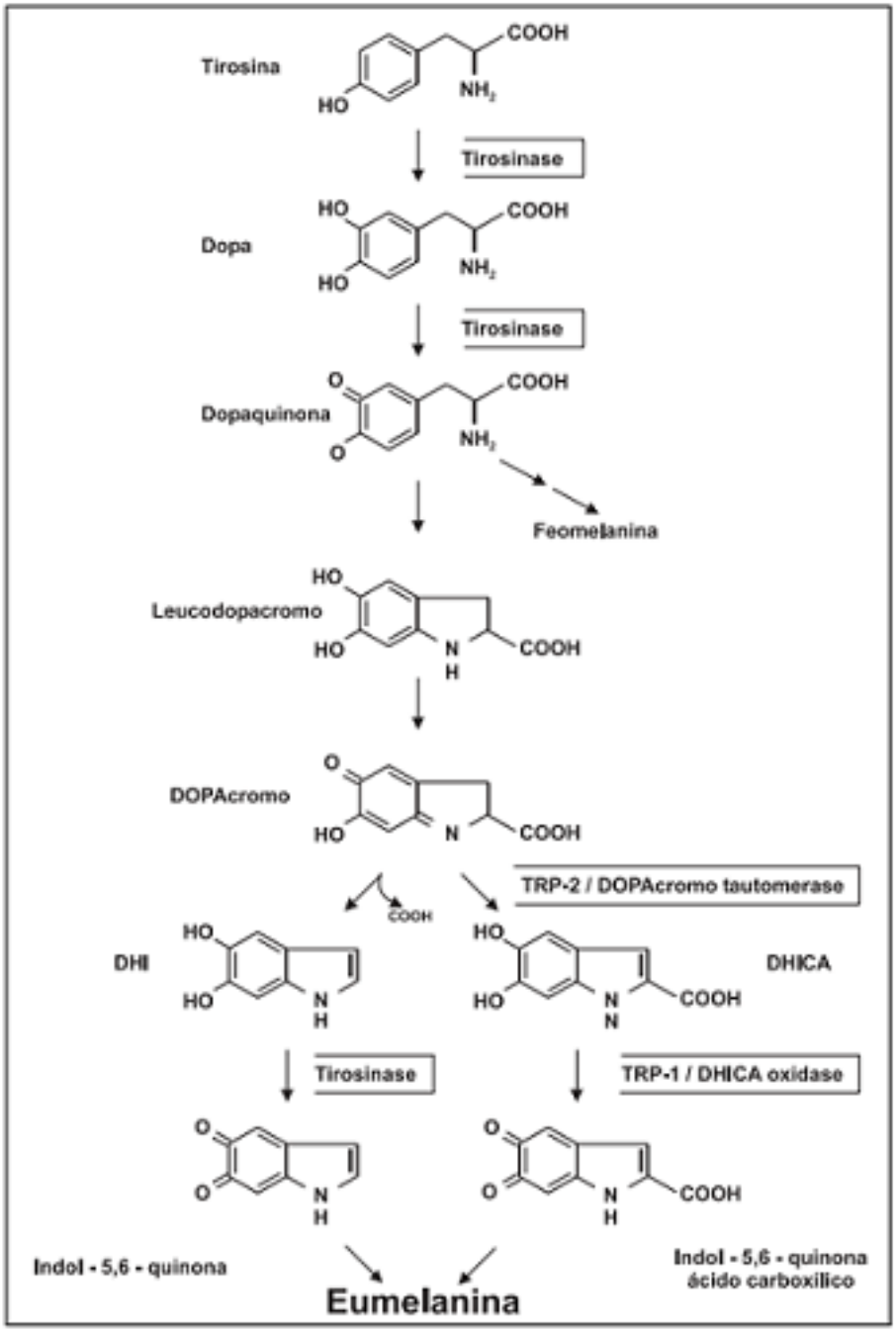


Figura 4. Rota sintética de eumelanina e feomelanina em melanócitos de mamíferos (Oliveira *et al.*, 2004).

2.3. Fotoenvelhecimento

Fotoenvelhecimento é o processo de aceleração do envelhecimento, decorrente da exposição frequente e sem proteção adequada da pele ao sol (Yaar *et al.*, 2007; Matheus *et al.*, 2002). Estima-se que 90% dos casos de

fotoenvelhecimento sejam causados pela exposição exacerbada e contínua à radiação UV (Taylor *et al.*, 1990). Estes dados são confirmados pelo estudo realizado por Hughes e colaboladores (2013) que demonstraram que o uso diário de fotoprotetor com FPS superior ou igual a 15 reduz em 24% o envelhecimento extrínseco da pele.

O fotoenvelhecimento é caracterizado por inúmeras alterações histopatológicas (Quadro 1). A hiperpigmentação cutânea é o efeito reversível imediato sobre a pele. Entretanto, exposições prolongadas resultam em alterações definitivas na quantidade e distribuição de melanina na pele causando máculas hipercrômicas locais conhecidas como melasmas (Landau, 2007).

Uma das causas principais do fotoenvelhecimento está relacionada ao aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) promovido pela exposição crônica à radiação. Histologicamente, as EROs promovem na pele danos ao estrato córneo, desordem na distribuição de melanina, alterações na regeneração do tecido conectivo e desnaturação de fibras elásticas dérmicas com subsequente enrugamento. Fisiologicamente, as EROs podem ocasionar processos inflamatórios em diversos níveis, mutações genéticas, imunossupressão e hiperpigmentação. Em situações mais graves, o aumento na formação de EROs pode culminar em processos carcinogênicos por promoverem a formação de adutos nas bases nucleotídicas de DNA, resultando em pareamentos errôneos ou rearranjos cromossômicos indevidos (Castro, 2007; Martinez *et al.*, 2006; Matheus *et al.*, 2002).

Ao incidirem na pele, as radiações ultravioletas (UVA e UVB) exacerbam a formação de EROs. A radiação UVA produz EROs que ativam fatores transcricionais e induzem mutações no DNA mitocondrial. Já a radiação UVB é diretamente

absorvida pelo DNA, danificando-o por meio da produção de fotoprodutos diméricos de bases pirimídicas (Rosenstein *et al.*, 1987).

Quadro 1. Comparação entre as alterações promovidas pelos envelhecimentos intrínseco e extrínseco (Montagner *et al*., 2009).

PARÂMETROS	ENVELHECIMENTO INTRÍNSECO (CRONOLÓGICO)	ENVELHECIMENTO EXTRÍNSECO (FOTOENVELHECIMENTO)
Rugas	Finas	Profundas
Camada córnea	Inalterada	Afilada
Células displásicas	Poucas	Muitas
Fibras de colágeno	Pequena alteração no tamanho e organização	Grande alteração no tamanho e organização
Fibras elásticas	Reorganizadas	Diminuição da produção e aumento da degeneração
Folículo capilar	Diminui em número e afilamento	Diminui em número e estrutura: perda capilar
Melanócitos	Normal	Diminui em número e em quantidade de melanina
Glândulas sebáceas e sudoríparas	Diminui em número	Diminui em número: pele seca
Junção dermoepidérmica	Leve achatamento	Achatamento significativo
Microvasculatura	Área reduzida	Telangiectasias, equimoses, infiltrado inflamatório perivascular
Alterações benigmas	Queratose seborréica	Queratose seborréica
Alterações pré-malignas	-	Queratose actínica
Alterações malignas	-	Carcinoma basocelular, carcinoma espinocelular

2.4. Câncer de Pele

Anualmente, inúmeros estudos demonstram uma relação direta entre a exposição solar prolongada e o desenvolvimento de câncer de pele (Afaq *et al.*, 2005; Sgarbi *et al.*, 2007; Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2016; Brasil, 2017). Esta exposição solar exacerbada e contínua pode ser atribuída aos hábitos sociais que associam a saúde a uma pele bronzeada (Brasil, 2017).

No ano de 2008, em uma tentativa de minimizar os danos promovidos pela radiação UV, a *International Agency for Research on Cancer,* afiliada da *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde-OMS), incluiu a radiação UV no Grupo 1 de uma lista de agentes causadores de câncer, ao lado de agentes como plutônio e substâncias presentes no cigarro. Em seguida, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu em todo o território brasileiro o uso de equipamentos para bronzeamento artificial com finalidade estética baseada na emissão de radiação UV (Brasil, 2009; Grosse *et al.*, 2009). Em 2014, a agência de regulação norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) elevou o *ranking* de Classe I (produtos isentos de notificação pré-comercial) para Classe II (produtos sujeitos à notificação pré-comercial) em produtos destinados ao uso para proteção solar e lâmpadas UV (Food and Drug Administration, 2014).

Apesar dos cuidados das agências de regulação na comercialização de produtos, a prevenção individual com o uso de filtros solares ainda é a melhor forma de diminuir a incidência de câncer de pele. Anualmente, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) diagnostica 135 mil novos casos de câncer de pele no Brasil, tornando essa doença um sério problema de Saúde Pública (Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2016).

Os cânceres de pele podem ser subdivididos em dois tipos: melanomas e não-melanomas. O melanoma é o mais maligno dos tumores cutâneos. Atinge os melanócitos e, apesar de apresentar alta taxa de letalidade devido à sua possibilidade de metástase, representa apenas 3% das neoplasias que acometem este órgão. Embora esta neoplasia cutânea esteja relacionada à exposição à radiação ultravioleta, também podem precipitar seu aparecimento o histórico familiar e condições fisiológicas intrínsecas (Brasil, 2017; Sampaio *et al.*, 2008).

O câncer de pele não-melanoma corresponde ao tipo de câncer de maior incidência no Brasil, representando 30% de todos os tumores de pele registrados no país. Sua etiologia é igualmente multifatorial, sendo a exposição excessiva e prolongada ao sol o principal fator de risco. Pré-disposição genética e presença de lesões pré-neoplásicas também podem ser citadas como causas para o aparecimento e desenvolvimento desta doença. O câncer de pele do tipo não-melanoma apresenta altos percentuais de cura se detectado precocemente e, apesar da maior incidência, apresenta baixa mortalidade por ser menos invasivo e de progressão mais lenta. Como a pele é constituída de diversos estratos, esta neoplasia pode apresentar tumores de diferentes linhagens, sendo os mais frequentes o carcinoma basocelular e o carcinoma epidermóide (espinocelular) (Brasil, 2017; Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2016).

O carcinoma basocelular é proveniente de alterações neoplásicas de células epidérmicas da camada basal que, ainda imaturas, perderam sua capacidade de diferenciação e queratinização normais devido à interferência de vários fatores, como a exposição à radiação UV. Embora raramente evolua para metástases, é localmente invasivo e apto a invadir e destruir tecidos adjacentes, atingindo ossos e cartilagens. O carcinoma espinocelular consiste na proliferação atípica de células

escamosas. Apresenta maior facilidade de disseminação e é potencialmente metastático. Frequentemente origina-se de queratose solar, úlceras crônicas, cicatrizes de queimadura e xeroderma pigmentoso (Hunter *et al.*, 2002; Sampaio *et al.*, 2008; Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2016).

Em virtude da exposição excessiva à radiação UV, anualmente são registrados milhares de novos casos de câncer de pele no Brasil, sendo este o tipo de câncer mais prevalente em ambos os sexos. O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimou, para o ano de 2017, a incidência de 596.070 novos casos de câncer (de todo os tipos) no Brasil, dos quais 5.670 dos novos casos seriam de câncer de pele melanoma (sendo 3.000 homens e 2.670 mulheres) e 175.760 dos novos casos serão de câncer de pele não-melanoma (sendo 80.850 homens e 94.910 mulheres).

2.4.1. Carcinogênese

Acredita-se que o principal fator no aparecimento e desenvolvimento da carcinogênese esteja relacionado à mutação resultante dos efeitos nocivos da radiação UV. Dentre as mutações conhecidas, as principais promovidas pela exposição à radiação UV são: a) substituição das bases nucleotídicas formando dímeros de pirimidinas; b) apoptose exacerbada, inflamação e necrose; c) rompimento da dupla hélice do DNA; d) defeitos no mecanismo de reparo do DNA; e) mutações no DNA mitocondrial alterando a síntese de EROs; f) mutação no gene TP53 (gene supressor de tumor); g) estimulação da quinase ativadora de mitose p38; h) indução da proteína p53 (codificada pelo gene TP53 e ativada pela quinase p38), causando inflamação e interferindo no ciclo celular; i) alteração na capacidade de células de Langerhans, presentes na epiderme, apresentarem antígenos aos linfócitos T; j) aumento na produção de citocinas pelos queratinócitos, induzindo a

liberação de fatores imunossupressores, conduzindo ao desenvolvimento de infecções e/ou neoplasias malignas cutâneas (Bernerd *et al.*, 1997; Ming *et al.*, 2010; Olsen *et al.*, 1989; Sgarbi *et al.*, 2007; Ravanat *et al.*, 2001; Setlow *et al.*, 1966). Além disso, o aparecimento de radicais livres, sobretudo de espécies reativas de oxigênio, contribui para a peroxidação lipídica, a ativação de fatores de transcrição e danos (quebras) de fragmentos do DNA (Berneburg *et al.*, 2000; Correa, 2012; Sampaio *et al.*, 2008).

2.5. Fotoprotetores

Desde a pré-história, o homem busca alternativas para se prevenir da incidência de radiação sobre a pele. Esta busca impulsionou a produção de roupas e acessórios como tentativa para reduzir este efeito. Entretanto, tais cuidados não foram suficientes para minimizar os efeitos da radiação e, aliado às descobertas e estudos sobre a radiação e seus efeitos sobre a pele, surgiram as preparações fotoprotetoras com a finalidade de prevenir o câncer de pele, eritema e queimadura associado à exposição solar, além de contribuir com a diminuição do fotoenvelhecimento (Cruz, 2008; Encyclopaedia Britannica, 2013; Home, 1820; Polonini *et al.*, 2011; Rates, 2001; Saraf *et al.*, 2010; Urbach, 2001).

Fotoprotetores são produtos cosméticos em cuja composição encontram-se os filtros solares. Estes, por sua vez, podem ser inorgânicos ou orgânicos, dependendo do seu mecanismo de ação (Cruz, 2008).

2.5.1. Filtros inorgânicos

Filtros inorgânicos são constituídos por partículas que promovem absorção e reflexão ou espalhamento da radiação UV. São representados por dois óxidos

semicondutores, óxido de zinco e dióxido de titânio, os quais atuam por mecanismo de absorção e desativação envolvendo transição entre bandas de valência. Óxido de zinco e dióxido de titânio apresentam características semelhantes e exercem maior proteção frente à radiação UVA, sendo ZnO mais eficiente para esta proteção. Geralmente, estes filtros inorgânicos são caracterizados como substâncias fotoestáveis que apresentam mínimas reações de fotoalergenicidade e fototoxicidade. Especificamente, o TiO_2 apresenta incompatibilidade com alguns filtros orgânicos amplamente utilizados, como por exemplo, a avobenzona (Flor *et al.*, 2007; Shnyder, 2011; Velasco *et al.*, 2011).

Por apresentarem baixo potencial alergênico, os filtros inorgânicos são frequentemente empregados na preparação de fotoprotetores para uso infantil ou em peles sensíveis (Palm *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2011).

De modo geral, a eficácia dos filtros inorgânicos sobre a pele depende do equilíbrio de suas dispersões em contato com outros componentes da formulação, uma vez que diferentes pHs, presença de eletrólitos e de alguns componentes, como por exemplo, conservantes antimicrobianos, podem modificar seu potencial protetor frente à radiação UV (Cruz, 2008; Flor *et al.*, 2007; Khoury *et al.*, 1995; Sasson, 2006).

Além disso, o diâmetro da partícula é diretamente proporcional à atuação da substância inorgânica como filtro solar, sendo que partículas com diâmetro acima de 0,1 µm são eficazes para refletir a radiação UV, mas cosmeticamente inaceitáveis pelo fato de formarem uma película esbranquiçada sobre a pele (opacidade). Neste contexto, o uso de nanopartículas (partículas com diâmetro inferior a 0,1 µm) minimizou o efeito esbranquiçado dos fotoprotetores tradicionais e possibilitou a obtenção de um veículo mais transparente, menos viscoso e com melhor

espalhabilidade sobre a pele, melhorando a aceitabilidade pelos consumidores (Cruz, 2008; Hexsel *et al.*, 2008; Mayrink *et al.*, 2014; Velasco *et al.*, 2011).

Uma revisão bibliográfica realizada por Silva e Monteiro (2016) listou diversos estudos (a partir de 2006) de permeação cutânea e segurança realizados em nanopartículas de ZnO e TiO_2 com o objetivo de avaliar se a micronização destas substâncias pode minimizar sua ação como filtro solar e ocasionar danos tópicos e/ou sistêmicos ao organismo. Os estudos de permeação cutânea *in vitro* e *in vivo* foram avaliados em pele humana, de porco e de rato (sem pêlos) com tamanhos de partículas que variaram entre 4 e 90 nm. Em 87% dos estudos, a presença de nanopartículas de ZnO e TiO_2 não foi verificada em camadas viáveis da pele, concluindo-se que estas nanopartículas permaneceram nas camadas mais externas do estrato córneo. Nos mesmos estudos, foi observado que, mesmo em pele comprometida ou isenta de pêlos, tais nanopartículas foram incapazes de atingir a derme. Uma vez que a atuação da substância como filtro inorgânico é inversamente proporcional à permeação cutânea do mesmo, estes estudos garantiram que as nanopartículas podem ser empregadas em formulações fotoprotetoras sem prejuízos à ação de ZnO e TiO_2 como filtros solares.

Silva e Monteiro (2016) expuseram, ainda, diversos estudos de viabilidade e funções celulares e verificaram que as nanopartículas de ZnO e TiO_2 foram citotóxicas acima de 48 h de exposição, sendo que as nanopartículas de ZnO promoveram inflamação severa acima de 4 semanas de exposição quando em altas concentrações. Além disso, a citotoxicidade das nanopartículas de TiO_2 sobre células pulmonares, renais e hepatócitos foi diretamente associada ao tempo de exposição, ao tamanho das nanopartículas, às características do revestimento e à cristalinidade, sendo a forma anatase potencialmente mais oxidativa e fotocatalítica,

e consequentemente mais tóxica, que a forma rutilo. As pesquisas relacionadas ao potencial oxidativo das nanopartículas apresentadas por Silva e Monteiro (2016) demonstraram que as nanopartículas de ZnO e TiO_2 foram incapazes de produzir concentrações significativas de radicais livres antes de 24 h de exposição. Uma vez que a toxicidade destas nanopartículas ocorre apenas quando as mesmas são capazes de penetrar a epiderme e atingir camadas viáveis da pele, pode-se atribuir a baixa toxicidade das nanopartículas de ZnO e TiO_2 ao baixo potencial de permeação cutânea. No entanto, a falta da padronização universal dos ensaios, assim como a ausência de informações sobre as condições experimentais dos estudos, validações e correlações dos ensaios *in vitro* e *in vivo*, dificultam a conclusão precisa sobre os riscos reais de ZnO e TiO_2 micronizados (Silva & Monteiro, 2016).

2.5.2. Filtros orgânicos

Os filtros solares desta ordem são substâncias orgânicas que absorvem a radiação UV e a transformam em radiações menos prejudiciais à saúde, atuando por mecanismo de transição de pares de elétrons livres. Esta transição é possível devido à presença de sistemas aromáticos ou conjugados capazes de promover alterações nos subníveis eletrônicos entre os orbitais de maior e menor energia (Cruz, 2008; Flor *et al.*, 2007; Shaat, 1997).

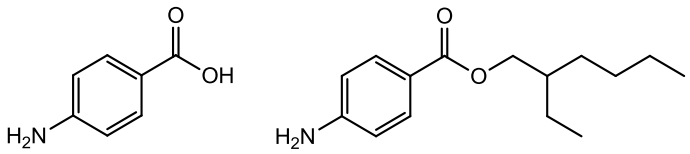
O mecanismo de ação de filtros orgânicos por meio da transição eletrônica é favorecido porque a energia contida nas radiações UVA e UVB corresponde à energia necessária à excitação fotoquímica dos elétrons situados no orbital π HOMO (orbital molecular preenchido de mais alta energia) para o orbital π* LUMO (orbital molecular vazio de mais baixa energia). Após a excitação molecular decorrente da incidência de radiação UV, a molécula retorna ao seu estado fundamental liberando

uma energia menor que a original; se a perda de energia for grande o suficiente, o comprimento de onda recai na região do infravermelho e será percebida como calor (na pele), imperceptível diante do calor recebido pela exposição ao sol. Se a energia recair na região do visível, poderá ser percebida através do efeito fluorescente ou fosforescente, esteticamente indesejável (Cruz, 2008; Flor *et al.*, 2007; Sasson, 2006).

Em geral, o desenvolvimento de preparações fotoprotetoras é crítico e requer cuidados a fim de minimizar a reatividade do filtro solar orgânico frente à radiação ou a alguns componentes da formulação. Em ambos os casos, pode ocorrer a formação de produtos de degradação da molécula de filtro solar, levando à diminuição da capacidade de proteção da pele, ou originar produtos com potenciais efeitos tóxicos (Flor *et al.*, 2007; Barth, 2000; Milesi *et al.*, 2002; Rieger, 1997).

Os filtros solares orgânicos podem ser divididos em várias classes químicas, a saber: derivados de ácido *p*-aminobenzóico, salicilatos, cinamatos, benzofenonas, antranilatos, canforados, dibenzoilmetanos entre outros (Cabral *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2001).

O *PABA* (ácido 4-aminobenzóico) (Figura 5), um dos primeiros filtros solares a ser patenteado, apresenta $\lambda_{máx}$ em 296 nm e sua estrutura química revela a presença de um grupamento doador de elétrons ($-NH_2$) e de um grupamento aceptor de elétrons (-COOH), ambos orientados na posição *para* do anel aromático contribuindo para a delocalização eletrônica (Bodla *et al.*, 2017; Cabral *et al.*, 2011; Godinho *et al.*, 2017; Ribeiro, 2010; Shaat, 2010).



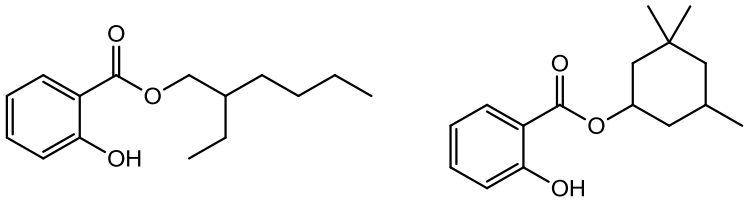
PABA *Ethylhexyl dimethyl PABA*

Figura 5. Estrutura química do *PABA* e do *ethylhexyl dimethyl PABA*.

Em contato com a pele, o *PABA* pode causar dermatites de contato, fotodermatites e sensibilização cruzada com outros derivados aminados (anestésicos, anti-histamínicos, tinturas capilares, dentre outros) (Cabral *et al.*, 2011; Ribeiro, 2010; Shaat, 2010). Na tentativa de minimizar estes problemas, foram realizadas modificações moleculares na molécula do *PABA*, e identificou-se um derivado promissor denominado *ethylhexyl dimethyl PABA* (4-dimetil-aminobenzoato de 2-etilhexila ou Padimato O) (Figura 5), que apresentou reduzida reatividade e alergenicidade em relação ao seu protótipo *PABA*, sendo comercializado até hoje (Velasco *et al.*, 2011).

Outra classe de filtros solares orgânicos é constituída pelos salicilatos (Figura 6). Para serem empregados como filtros solares, os salicilatos devem apresentar-se como substâncias *orto*-substituídas, única configuração que permite interações intramoleculares (ligações de hidrogênio) as quais promovem a absorvância espectral entre 300 e 310 nm (UVB). Os salicilatos são muito empregados como solubilizantes de outros ingredientes cosméticos, como por exemplo, das benzofenonas, cuja apresentação em estado sólido requer prévia solubilização (Bahia, 2003; Bodla *et al.*, 2017; Cabral *et al.*, 2011; Godinho *et al.*, 2017; Shaat, 1997).

Um dos salicilatos mais empregados em fotoproteção é o *ethylhexyl salicylate* (salicilato de 2-etilhexila ou octisalato) (Figura 6), cuja presença da subunidade contendo oito carbonos garante a insolubilidade em água (Shnyder, 2011). Outro exemplo de fotoprotetor desta classe é o *homosalate* (éster de 2-hidroxi-3,3,5-trimetilciclohexilbenzóico ou salicilato de homomentila) (Figura 6) em que a presença da subunidade cíclica também favorece a baixa solubilidade em água (Bahia, 2003; Bodla *et al.*, 2017; Cabral *et al.*, 2011; Godinho *et al.*, 2017; Shaat, 1997; Shnyder, 2011).



Ethylhexyl salicylate *Homosalate*

Figura 6. Exemplos de salicilatos empregados como filtros solares.

A maior inconveniência no uso de salicilatos como fotoprotetores reside na fotoinstabilidade, baixa *performance* e possível permeação destas substâncias, uma vez que foram encontradas em camadas mais profundas do estrato córneo 30 minutos após a aplicação, bem como em amostras de leite materno dos voluntários (Bahia, 2003; Hany *et al.*, 1995; Sarveiya *et al.*, 2004; Shaat, 1997; Shnyder, 2011).

Analogamente, os antranilatos, outra classe de filtros solares, são *orto*-substituídos, porém contendo uma subunidade amina em sua estrutura. Tal qual ocorre nos salicilatos, os antranilatos caracterizam-se por sua segurança, resistência à água e a presença do efeito *orto* a qual possibilita as ligações intramoleculares de

hidrogênio. Sua estrutura resulta em $\lambda_{máx}$ de 346 nm sendo, portanto, classificado como filtro UVA (Bahia, 2003; Cabral *et al.*, 2011; Shaat, 1997).

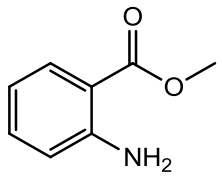
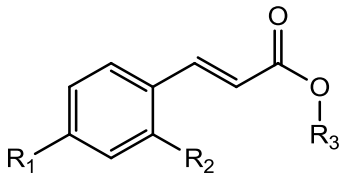


Figura 7. Estrutura do metil-antranilato.

Os antranilatos exibem os mesmos inconvenientes presentes nos salicilatos: baixa *performance* como filtro solar e fotoinstabilidade. O *methyl anthranilate* (antranilato de metila) (Figura 7) é o principal representante desta classe empregado em preparações no Brasil (Bahia, 2003; Bodla *et al.*, 2017; Cabral *et al.*, 2011; Godinho *et al.*, 2017; Shaat, 1997).

Os cinamatos ($\lambda_{máx}$ aproximadamente 305 nm) constituem uma classe largamente empregada como filtros solares, com 17 derivados listados pela European COLIPA (*European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association*). Estruturalmente são caracterizados por apresentarem uma carbonila e uma α,β-insaturação conjugando esta subunidade ao anel aromático, permitindo melhor delocalização eletrônica ao longo da molécula, contribuindo para um aumento de sua absortividade molar (acima de 23000 $M^{-1}.L^{-1}.cm^{-1}$) (Bahia, 2003; Shaat, 1997).



Ethylhexyl methoxycinnamate: $R_1 = OCH_3$; $R_2 = H$; $R_3 = C_8H_{17}$ *(iso)*
Ethyl diisopropylcinnamate: $R_1 = CH(CH_3)_2$; $R_2 = CH(CH_3)_2$; $R_3 = C_2H_5$

Figura 8. Exemplos de derivados cinâmicos.

O *ethylhexyl methoxycinnamate* (4-metoxicinamato de 2-etilhexila ou *p*-metoxicinamato de octila ou octinoxate) (Figura 8) é um dos representantes mais importantes desta classe, com excelente *performance* como filtro UVB. Entretanto, a presença de oito carbonos na subunidade éster diminui consideravelmente a solubilidade em água. Outro inconveniente do *p*-metoxicinamato de octila reside na fotoinstabilidade: quando submetido à radiação UV, interconverte-se no isômero *Z* que possui valores de absorção mais baixos (265 nm), o que diminui sua eficácia como filtro, sendo necessária a associação com outros filtros solares, na tentativa de ampliar o espectro de ação. Além disso, apresenta instabilidade quando associado ao *butyl methoxydibenzoylmethane*, um dos filtros UVA mais empregados no mundo (Bahia, 2003; Bodla *et al.*, 2017; Cabral *et al.*, 2011; Godinho *et al.*, 2017; Salgado *et al.*, 2004; Shaat, 1997; Shnyder, 2011).

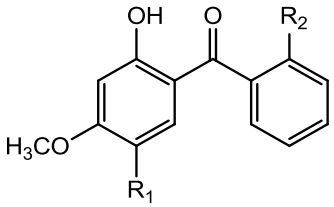
Além do *p*-metoxicinamato de octila, o *ethyl diisopropylcinnamate* (acrilato de etil 3-[2,4-bis(1-metiletil)fenila] ou diisopropilcinamato de etila) também é empregado como filtro UVB (Figura 8). Neste, a presença do grupamento isopropil em posições *orto* e *para*-aromáticas, por efeito indutivo, confere maior estabilidade ao sistema por fornecer carga ao anel benzênico. Assim, este grupamento contribui com a delocalização eletrônica desta molécula, permitindo seu uso como filtro solar (Shaat, 1997).

As benzofenonas caracterizam-se pela presença da subunidade difenilcetona. Assim como ocorre nas demais classes de filtros solares, a delocalização eletrônica é imprescindível à atividade fotoprotetora e a presença de grupamentos doadores de elétrons (*orto* ou *para*-aromáticos) aumentam essa atividade. Especificamente no caso das benzofenonas, a presença da cetona ligada a ambos anéis aromáticos contribui para o efeito de ressonância, amplificando a capacidade fotoprotetora de

substâncias dessa natureza. Além disso, uma vez que a cetona aromática diminui a energia requerida para a delocalização eletrônica e esta, por sua vez, é inversamente proporcional ao comprimento de onda, o $\lambda_{máx}$ de benzofenonas pode ser observado em 320 nm, λ mais alto que a maioria dos compostos (Bahia, 2003; Bodla *et al.*, 2017; Godinho *et al.*, 2017; Shaat, 1997; Shnyder, 2011).

Foram listados 12 derivados desta classe pela COLIPA, das quais apenas 3 são aprovadas pelo FDA: *benzophenone-3* (2-hidroxi 4-metoxibenzofenona ou oxibenzona), *benzophenone-4* (ácido 5-benzoil-4-hidroxi-2-metoxibenzenosulfônico ou sulisobenzona) e *benzophenone-8* (2,2-hidroxi 4-metoxibenzofenona ou dioxibenzona) (Figura 9) (Bodla *et al.*, 2017; Godinho *et al.*, 2017; Shaat, 1997).

Apesar de sua atividade como filtro solar, as benzofenonas são sólidos potencialmente alergênicos e de difícil incorporação em preparações cosméticas (Shaat, 1997).



Benzophenone-3: R_1 = R_2 = H
Benzophenone-4: R_1 = SO_3 H ; R_2 = H
Benzophenone-8: R_1 = H ; R_2 = OH

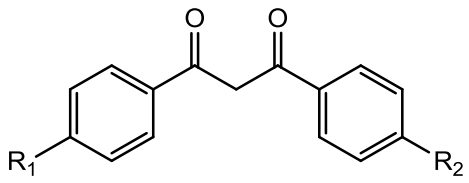
Figura 9. Benzofenonas aprovadas pelo FDA.

Os dibenzoilmetanos (Figura 10) são uma classe de filtros solares orgânicos caracterizados pela presença de 2 anéis aromáticos *para*-substituídos e ligados por um grupamento dicetona. Estes filtros UV exibem tautomerismo ceto-enólico, sendo o fotoisômero *enol* responsável pela atividade como filtro UVA ($\lambda_{máx}$ entre 345 e 373

nm). Entretanto, a fotoisomerização leva a perda de atividade fotoprotetora, uma vez que o isômero *ceto* apresenta $\lambda_{máx}$ abaixo de 280 nm (Bahia, 2003; Bodla *et al.*, 2017; Godinho *et al.*, 2017; Shaat, 1997).

Os dibenzoilmetanos apresentam efeito *orto*, tal qual ocorre em salicilatos e antranilatos, o que possibilita a ocorrência das ligações intramoleculares de hidrogênio. Uma vez que o comprimento de onda é inversamente proporcional à quantidade de energia requerida para o deslocamento eletrônico, e o efeito *orto* minimiza esta energia, os dibenzoilmetanos apresentarão $\lambda_{máx}$ acima de 370 nm, inviabilizando a proteção em comprimentos de onda UVA I (320-340 nm) (Figura 1) (Bahia, 2003; Shaat, 1997).

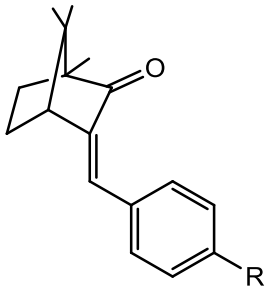
Dentre os dibenzoilmetanos, o *butyl methoxydibenzoylmethane* (1-[4-(1,1-dimetiletilfenil)]-3-(4-metoxifenilpropano)-1,3-diona ou avobenzona) constitui o filtro UVA mais utilizado no mundo (Figura 10). A despeito da alta *performance* como filtro UVA, a avobenzona apresenta alguns inconvenientes relacionados à estabilidade, levando à diminuição na eficácia dos produtos cosméticos (Sasson, 2006). Os principais problemas desta substância são: a) fotoinstabilidade – isolado ou associado a outros filtros; b) tingimento de tecidos; c) descoloração em presença de íons metálicos; d) incompatibilidade com outros filtros (Shnyder, 2011; Steinberg, 2011). Além disso, tem sido relatado que a avobenzona possui atividade fotoalergênica devido a metabólitos com propriedades imunogênicas resultantes da fotodegradação (Karlsson *et al.*, 2009; Shnyder, 2011). Ainda, por apresentar efeito *orto*, sua capacidade de filtrar a radiação UVA restringe-se à região espectral de UVA II (acima de 370 nm) (Bahia, 2003; Godinho *et al.*, 2017; Shaat, 1997; Shnyder, 2011).



Butyl metoxydibenzoylmethane: R_1 = t-butil; R_2 = OCH_3
Isopropyl dibenzoylmethane: R_1 = C_3H_7 ; R_2 = H

Figura 10. Exemplos de dibenzoilmetanos empregados como filtros UVA.

Derivados de cânfora (Figura 11) compreendem substâncias de estrutura bicíclica, estáveis, não alergênicos, com máximo de absorbância entre 290 e 300 nm, sendo, portanto, classificados como filtros UVB. São resistentes à fotodegradação e sua estrutura conjugada favorece a delocalização eletrônica e a alta absortividade molar (acima de 20000 $M^{-1}.L^{-1}.cm^{-1}$) (Bahia, 2003; Milesi *et al.*, 2002; Shaat, 1997). Dois são os derivados canforados empregados no Brasil: *3-(4'-methylbenzylidene) camphor* (4-metil-benzilideno de cânfora ou enzacamene) e *3-benzylidene camphor* (1,7,7-trimetil-3-fenilmetilenobiciclo de 2,2,1-heptano-2-ona ou 3-benzilideno de cânfora). Apesar do efeito fotoprotetor, foi relatado que ambos os derivados são extremamente nocivos à fauna aquática. Além disso, estes canforados frequentemente afetam órgãos reprodutivos e do sistema nervoso central, sendo capazes, por exemplo, de se associar a receptores endógenos de estrogênio em vertebrados e ativar mecanismos de sinalização da expressão gênica (Bodla *et al.*, 2017; Godinho *et al.*, 2017; Klann *et al.*, 2005; Schlumpf *et al.*, 2001; Schlumpf *et al.*, 2008).



3-(4'-methylbenzylidene) camphor: R = CH_3
3-benzylidene camphor: R = H

Figura 11. Exemplos de fotoprotetores derivados de cânfora empregados no Brasil.

Com o avanço no desenvolvimento de novas moléculas com ação fotoprotetora, substâncias químicas diversas foram reconhecidas e, apesar de algumas limitações, são atualmente empregadas como filtros solares: *ethylhexyl triazone* (tribenzoato de tri(2-etilhexil) 4,4',4''-(1,3,5-triazina-2,4,6-triiltriimino) ou EHT), *bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine* (di-[5-(2-etil-hexil-oxifenol)] de 2,2'-[6-(4-metoxifenil)-1,3,5-triazina-2,4-diil]) ou bemotrizinol), *phenylbenzimidazole sulfonic acid* (ácido 2-fenil-5-benzimidazol sulfônico ou ensulizole), *octocrylene* (2-ciano-3,3-difenilacrilato de 2-etilhexila ou octocrileno) e *methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol* (4-(1,1,3,3-tetrametilbutilfenol de 2,2-metileno-di(6-(2H-benzotriazol-2-ila) ou bisoctrizol ou MBBT) são alguns exemplos (Figura 12) (Bodla *et al.*, 2017; Godinho *et al.*, 2017; Shnyder, 2011).

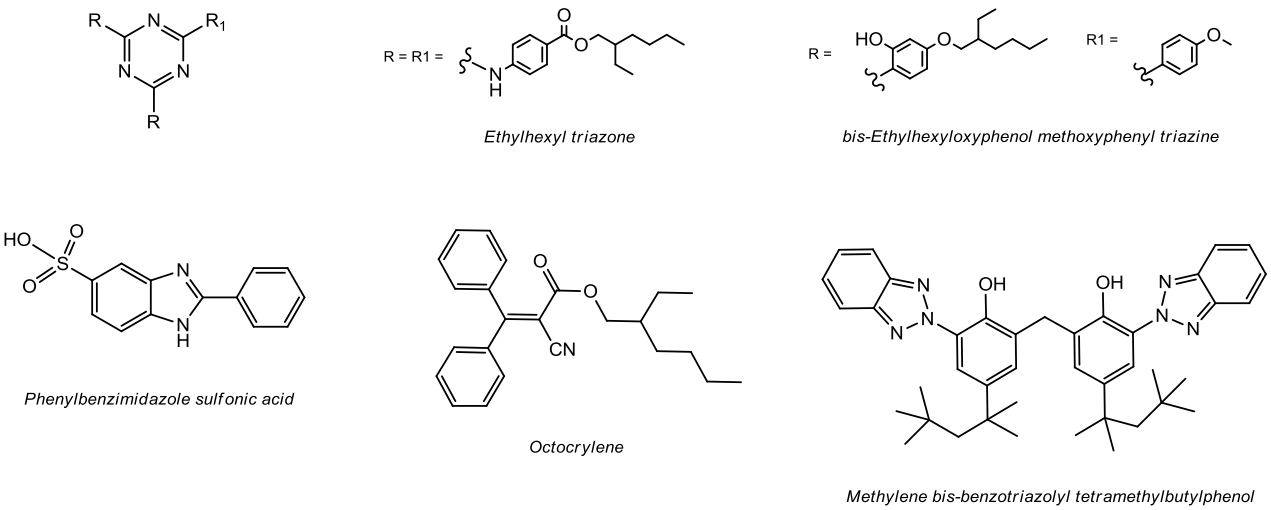


Figura 12. Estrutura dos compostos *ethylhexyl triazone* (EHT)*, bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine* (bemotrizinol)*, phenylbenzimidazole sulfonic acid* (ensulizole), *octocrylene* (octocrileno) e *methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol* (MBBT)*.*

O EHT (Figura 12) se caracteriza por ser um bom filtro solar UVB e possuir alta absortividade molar. Suas maiores limitações são: baixa solubilidade em diversos tipos de veículos (oleosos e aquosos) quando em altas concentrações e incompatibilidade com alguns filtros solares, como o octocrileno e homosalato (Bodla *et al.*, 2017; Godinho *et al.*, 2017; Shnyder, 2011).

O bemotrizinol (Figura 12) apresenta-se como um filtro solar de amplo espectro (UVA e UVB) de alta absortividade molar e compatível com a maioria dos filtros empregados nas preparações atuais. Entretanto, sua baixa solubilidade em veículos oleosos e aquosos e o tingimento de tecidos representam os principais problemas no uso desta substância em preparações fotoprotetoras (Bodla *et al.*, 2017; Godinho *et al.*, 2017; Shnyder, 2011).

O ensulizole (Figura 12) pode ser caracterizado como um filtro UVB de sensorial leve, mas que requer prévia neutralização antes de ser incorporado às

preparações fotoprotetoras. Além disso, esta substância apresenta baixa contribuição na região do UVA II, baixa resistência à água e incompatibilidade com a avobenzona, filtro UVA largamente empregado em fotoprotetores (Bodla *et al.*, 2017; Godinho *et al.*, 2017; Shnyder, 2011).

Além da capacidade de absorver na região UVA II (filtro UVA), o octocrileno (Figura 12) pode atuar como solubilizante para filtros cristalinos pouco solúveis. Porém, sua incorporação em preparações fotoprotetoras promove coloração da mesma e contribui para um sensorial pouco agradável. Outra limitação desta substância reside na baixa absortividade, contribuindo para sua baixa atividade como filtro solar (Bodla *et al.*, 2017; Godinho *et al.*, 2017; Shnyder, 2011).

O MBBT (Figura 12) é um filtro solar de amplo espectro (UVA e UVB) que, frequentemente, possui efeito sinérgico quando associado a outros filtros solares lipossolúveis. Além disso, esta substância minimiza o efeito de tingimento de tecidos promovido por outros filtros solares, como a avobenzona e o bemotrizinol. Contudo, suas partículas são de difícil dispersão e podem promover um aspecto esbranquiçado na pele, semelhante aos filtros solares inorgânicos (Bodla *et al.*, 2017; Godinho *et al.*, 2017; Shnyder, 2011).

A despeito dos efeitos benéficos associados ao uso de filtros solares, diversos estudos têm demonstrado que os filtros UV podem penetrar além do estrato córneo da pele, gerando espécies reativas de oxigênio no citoplasma de queratinócitos nucleados na epiderme, levando paradoxalmente aos efeitos deletérios associados ao aumento dos radicais livres, sobretudo de EROs (Afaq *et al*., 2005; Sgarbi *et al*., 2007). Entretanto, a célula dispõe de dois mecanismos principais de defesa perante o estresse oxidativo: a) detoxificação pela ação de algumas substâncias como a glutationa reduzida (GSH), superóxido-dismutase

(SOD), catalase, glutationa-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E; e b) reparação da lesão por ação de substâncias como o ácido ascórbico, glutationa-redutase (GSH-Rd) e GSH-Px. Com exceção da vitamina E (α-tocoferol), um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular (Hebbel, 1986). Quando a disponibilidade de antioxidantes encontra-se limitada, o dano por espécies reativas pode resultar no estresse oxidativo (Sasson, 2006).

Portanto, o planejamento de filtros solares com atividade antioxidante atuando de modo sinérgico parece ser uma premissa importante, conforme demonstrado em um estudo realizado por Sasson (2006) que comprovou que a associação de antioxidantes – como vitamina E e derivados – pode aumentar a estabilidade dos filtros solares além de promover a redução na geração de radicais livres (Sasson, 2006; Vellosa *et al.*, 2007).

2.5.3. Resveratrol

A aplicabilidade do vinho para fins medicinais como combate a doenças crônicas e agudas remonta à Idade Antiga. Apesar de ter sua aplicação associada a propriedades curativas e rejuvenescedoras na Idade Média, apenas a partir do século XVII este produto foi aceito como promotor do bem-estar físico e mental. O avanço nos estudos das propriedades medicinais do vinho relacionaram o consumo moderado de vinho a menor incidência de doenças cardiovasculares a partir do século XX (Béliveau *et al.*, 2007) devido à presença de alguns compostos polifenólicos contidos no vinho, dentre eles o resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno) (Afaq *et al.*, 2011; Aggarwal *et al.*, 2005).

O resveratrol é considerado uma fitoalexina, substância antimicrobiana de baixo peso molecular, cuja síntese vegetal é desencadeada em resposta ao ataque fúngico, dano mecânico ou irradiação ultravioleta (Jeandet *et al.*, 2002).

Sua estrutura consiste de dois anéis aromáticos conjugados por um dupla ligação, podendo, assim, apresentar os isômeros geométricos *cis* (3,4',5-*cis*-trihidroxiestilbeno) e *trans* (3,4',5-*trans*-trihidroxiestilbeno), ambos naturalmente encontrados nas plantas. O *trans*-resveratrol constitui o isômero biologicamente ativo e exibe comprimento de onda máximo em 306 nm (Allan *et al.*, 2009; Amri *et al.*, 2012; Vian *et al.*, 2005).

Caracterizado como lipossolúvel, o *trans*-resveratrol se apresenta como um pó branco, de fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_3$, peso molecular 228,25 g.mol^{-1} e faixa de fusão de 253-255ºC. Pode sofrer isomerização frente à exposição à luz visível e aos meios cujos valores de pH encontram-se acima de 8,0 e, neste caso, se interconverte no isômero *cis* (Figura 13) e reduz drasticamente sua atividade biológica (Allan *et al.*, 2009; Amri *et al.*, 2012).

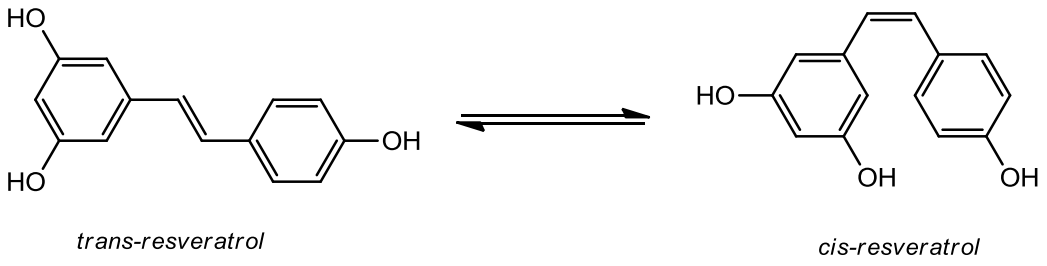


Figura 13. Interconversão do resveratrol nos isômeros *cis-trans*.

A configuração *trans* do resveratrol está intimamente relacionada aos diversos efeitos benéficos promovidos por esta substância (Leonard *et al.*, 2003). Além de inibir a agregação plaquetária (Olas *et al.*, 2002) e conferir proteção do endotélio

vascular (Chaves *et al.*, 2009), atua como fitoestrogênio (Berman *et al.*, 2017; Gehm *et al.*, 1997) e apresenta atividade neuroprotetora *in vivo* (Jin *et al.*, 2008; Vingtdeux *et al.*, 2008).

A capacidade de neutralizar radicais livres *in vivo* (agente antioxidante) associada à absorção na região espectral de UVB (filtro UVB), permite ao *trans*-resveratrol atuar na prevenção de lipoperoxidação das membranas celulares e de danos potenciais ao DNA, além de inibir processos inflamatórios e os três estágios da carcinogênese (iniciação, promoção e progressão) (Afaq *et al.*, 2003; Berman *et al.*, 2017; Castro *et al.*, 2007; F'guyer *et al.*, 2003; Leonard *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 1995; Ndiaye *et al.*, 2011; Olas *et al.*, 2002; Reagan-Shaw *et al.*, 2008; Etten *et al.*, 1994).

Jang e colaboradores (1997) demonstraram que a aplicação tópica de *trans*-resveratrol inibiu a indução de tumor de pele em camundongos CD-1, sem manifestação de efeitos tóxicos associados à molécula.

O comprovado efeito antioxidante, anti-envelhecimento, atividade antiinflamatória e anticarcinogênese associado ao resveratrol torna esta molécula um atraente protótipo no planejamento de novas substâncias com atividade de filtro solar. Neste contexto, Reis e colaboradores (2014) usaram o *trans*-resveratrol como protótipo no planejamento e síntese de oito substâncias híbridas, associando os farmacóforos do *trans*-resveratrol aos grupamentos farmacofóricos presentes no *butyl methoxydibenzoylmethane* (filtro UVA) e no *ethylhexyl methoxycinnamate* (filtro UVB). O objetivo deste trabalho foi promover o aumento do espectro de proteção contra a radiação UV associado ao efeito antioxidante proveniente da fitoalexina parental. Embora a atividade antioxidante destas substâncias híbridas tenha sido significativa (algumas foram comparáveis ao ácido ascórbico), a atividade

fotoprotetora das mesmas não apresentou resultados expressivos e os valores de FPS encontrados variaram de 2 a 3 e FPUVA de 2 a 4. Por este motivo, tornou-se necessário realizar a otimização molecular destas substâncias na tentativa de aumentar o efeito fotoprotetor.

2.6. Modificações moleculares na obtenção de filtros solares

A modificação molecular se mostra como uma das estratégias mais promissoras na descoberta de moléculas bioativas, permitindo alterar propriedades físico-químicas, com o objetivo de otimizar o perfil de atividade biológica em relação à molécula matriz. Dentre os processos de modificação molecular destacam-se: hibridação, latenciação, bioisosterismo entre outros (Barreiro *et al.*, 2001; Barreiro *et al.*, 2015; Chin *et al.*, 1999; Santos, 2009).

Um exemplo de modificação molecular pode ser observado na síntese do *ethylhexyl methoxycinnamate* e do *isoamyl p-methoxycinnamate* (Figura 14), dois cinamatos disponíveis como filtro solar no Brasil. Estruturalmente, a diferença entre eles está presente no grupo éster e visa conferir à molécula diferenças de lipofilicidade (Shaat, 1997).

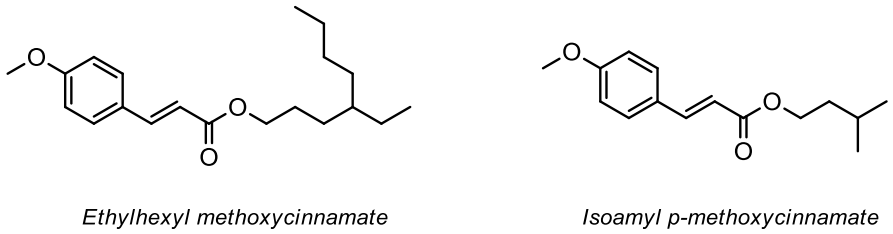


Figura 14. Estrutura química dos cinamatos disponíveis no Brasil.

Na classe das benzofenonas, a *orto*-hidroxilação e a *para*-metoxilação modificaram o efeito eletrônico e as propriedades físico-químicas da *benzophenone-*

4 em relação ao seu precursor (*benzophenone*). Além disso, o ácido sulfônico presente na estrutura visa aumentar a solubilidade em água, característica que facilita a manipulação e desenvolvimento de formulações (Figura 15) (Shaat, 1997).

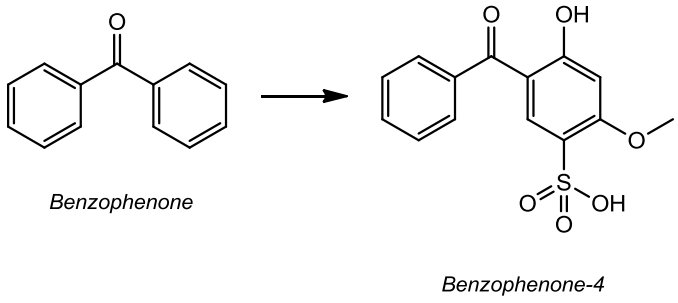


Figura 15. Obtenção da *benzophenone-4* a partir da *benzophenone*.

Uma estratégia muito empregada para ativos cosméticos é a duplicação molecular de filtros solares. Um exemplo de aplicação dessa estratégia está na obtenção do filtro *methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol* (MBBT). Para obtenção dessa substância foram aplicadas duas estratégias de modificação: a primeira explora isosterismo entre o sistema fenilimidazol com o sistema feniltriazol; a segunda utiliza a duplicação molecular (Figura 16) (Shaat, 1997).

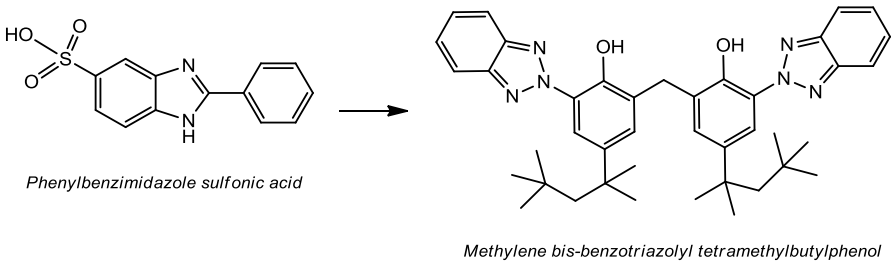


Figura 16. Obtenção do *methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol* a partir do *phenylbenzimidazole sulfonic acid*.

A triplicação molecular foi a estratégia utilizada para obtenção da etilhexiltriazona (EHT). Este filtro solar foi obtido a partir da triplicação da subunidade etilhexil éster presente no 2-etilhexil salicilato, com o objetivo de aumentar a absortividade molar e ampliar o espectro de proteção UV (Figura 17) (Shnyder, 2011).

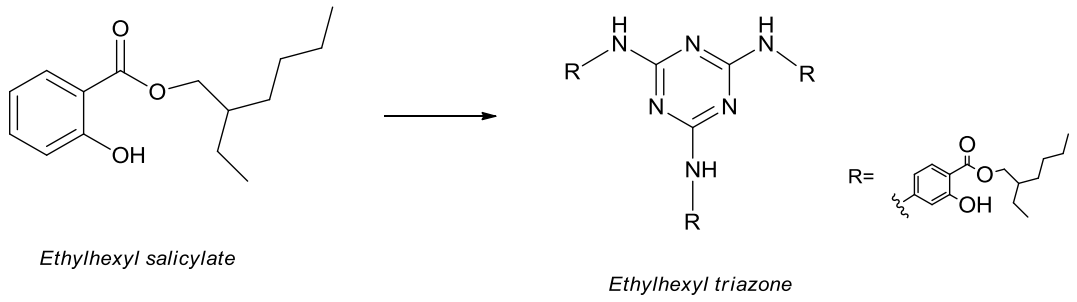


Figura 17. Triplicação da subunidade etilhexil éster derivada do protótipo *ethylhexyl salicylate*.

Desta forma, o uso de estratégias de modificação molecular torna-se uma importante ferramenta para obtenção de substâncias mais ativas, seguras e com melhores características para fins de formulação. Neste trabalho, esta ferramenta foi explorada para obter substâncias com maior efeito fotoprotetor comparado aos análogos do resveratrol identificados durante trabalhos prévios (Reis *et al.*, 2014).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo a síntese e avaliação das atividades antioxidante e fotoprotetora *in vitro* de novos filtros solares planejados pelo processo de replicação molecular.

3.2. Objetivos específicos

- Síntese, purificação e caracterização estrutural dos novas planejadas como filtros solares.
- Avaliação da atividade fotoprotetora *in vitro* das substâncias sintetizadas.
- Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* das substâncias sintetizadas.
- Estudo de estabilidade térmica de todas as substâncias sintetizadas.

4. Material e Métodos

4.1. Reagentes e Solventes

2,2-difenil-1-picrilhidrazil 100% (Sigma Aldrich®);

3-hidroxibenzidrazida 98% (Sigma Aldrich®);

4-hidroxibenzaldeído 98% (Sigma Aldrich®);

4-hidroxibenzidrazida 97% (Sigma Aldrich®);

Acetato de etila 99,8% (Chemis®);

Ácido 2,4-diidroxibenzóico 97% (Sigma Aldrich®)

Ácido acético glacial 100% (Synth®);

Ácido clorídrico 37% (Synth®);

Ácido salicílico 100% (Synth®);

Ácido sulfúrico 95% (Synth®);

Água ultrapurificada em sistema de purificação de água Milli-Q Plus – Millipore®;

Álcool etílico 95% (Synth®);

Benzidrazida 99% (Acros Organics®);

Bicarbonato de sódio 99% (Synth®);

Brometo de potássio 99,5% (Synth®);

C12-15 alkyl benzoate 98% (Croda®);

Caprylic/capric triglyceride 99% (Crodamoll GTCC®).

Carbonato de potássio 99% (Synth®);

Carbonato de sódio 99,5% (Vetec®);

Cloreto cianúrico 98% (Sigma Aldrich®);

Dibutyl adipate 99% (Polytechno/Brasil®);

Diclorometano 100% (Synth®);

Dimetilsulfóxido 99% (Vetec®);

Dimetilsulfóxido deuterado 99,9% (Merck®);

Ethylhexyl triazone 98% (Basf®);

Mineral oil (and) cetearyl alcohol (and) ceteth-20 (and) glyceryl stearate (and) PEG-40 hydrogenated castor oil (and) polyacrylic acid (and) sodium hydroxide (and) xylitol (and) caprylic acid (Chemyunion®);

Hidrato de hidrazina 64% (Merck®);

Hidrazida 4-nitrobenzóica 98% (Sigma Aldrich®);

Hidrazida 4-*terc*-butilbenzóica 97% (Sigma Aldrich®);

Isoniazida 99% (Henrifarma®);

Metanol 100% (Synth®);

Metanol grau HPLC 99,9% (Merck®);

n-Hexano 100% (Synth®);

Polysorbate 80 100% (Synth®);

Sulfato de sódio anidro 100% (Êxodo Científica®);

trans-resveratrol 99% (Sigma Aldrich®);

Tetrahidrofurano 100% (Synth®);

Tetrakis(trifenilfosfina)paládio(0) 99% (Sigma Aldrich®);

4.2. Equipamentos

Agitador magnético com aquecimento Biovera® modelo IKA C-Mag HS4, Rio de Janeiro-Brasil;

Aparelho de ponto de fusão capilar Bibby Stuart Scientific® - modelo SMP3, Staffordshire-UK;

Balança analítica Shimadzu® - modelo AUW220D, Kyoto-Japão;

Balança semi-analítica Gehaka® - modelo BG 200, São Paulo-Brasil;

Cromatógrafo líquido de *performance* média (MPLC) Biotage® - modelo Isolera One, Uppsala-Suécia;

Espectrômetro de massas de baixa resolução Thermo Fisher Scientific® - modelo LCQ-Fleet, São Paulo-Brasil;

Espectrômetro de massas de alta resolução Bruker Daltonics® - modelo Maxis HD, Bremen-Alemanha;

Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker® - modelo Fourier 300 (7,1 T), operando a 300 MHz para ^{1}H e 75 MHz para ^{13}C, Bremen-Alemanha;

Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker® - modelo Advance III HD 600 (14,1 T), operando a 600 MHz para ^{1}H e 150 MHz para ^{13}C, Bremen-Alemanha;

Espectrofotômetro UV Shimadzu® - modelo 1800, Kyoto-Japão;

Espectrofotômetro com esfera de integração Optometrics Corporation® - modelo SPF-290S Analyser System, Colorado-EUA;

Espectrofotômetro no infravermelho Shimadzu® - modelo IR Prestige-21, Kyoto-Japão;

Estufa com circulação por convecção natural Nova Ética® - modelo 220W, São Paulo-Brasil;

Equipamento Mettler Toledo-1 para análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC), São Paulo-Brasil;

Equipamento Mettler Toledo para análise termogravimétrica (TGA) - modelo 2960 SDT, São Paulo-Brasil;

Forno mufla Bravac® - modelo Contemp TCM77, São Paulo-Brasil;

Leitor de microplacas Biotek® – modelo Epoch 2, Vermont-EUA;

Rotaevaporador Buchi® - modelo F108, Heerbrugg-Suíça.

4.3. Correlatos

Coluna Snap Ultra 25, contendo 25g de sílica HP-Sphere®, tamanho do poro 25 µm com altura 8 cm e diâmetro 3 cm (Biotage®), Uppsala-Suécia;

Cromatofolhas de alumínio para CCD, com matriz de sílica gel, espessura 200 µm, tamanho de poro 60 Å e tamanho de partícula entre 8 e 12 µm, com dimensões de 5x4 cm (Merck®), São Paulo-Brasil;

Detector do tipo dinodo multiplicador de partículas contínuo para espectrometria de massas de baixa resolução (Thermo Fisher Scientific®), São Paulo-Brasil;

Detector MICROTOF® para espectrometria de massas de alta resolução (Bruker®), Bremen-Alemanha;

Fita cirúrgica transparente Transpore™ (3M™), São Paulo-Brasil;

Software estatístico Targetware Graph Pad Prism® 5.01, São Paulo-Brasil;

Software Gen5 2.09® para leitor de microplacas (Biotech®), Vermont-EUA;

Software IRsolution® 1.50 para obtenção dos espectros IV (Shimadzu®), Kyoto-Japão;

Software termoanalítico STAR® para registro das curvas de TGA e cálculos de temperatura de fusão e entalpia (Mettler Toledo®), São Paulo-Brasil;

Software UV Probe® 2.42 para obtenção dos espectros UV (Shimadzu®), Kyoto-Japão;

Software WinSPF® 1.1 para obtenção dos espectros UV e cálculo dos resultados do ensaio de fotoproteção (Optometrics Corporation ®), Colorado-EUA;

Sonda de 5 mm para espectrômetro Bruker® modelo Fourier, com detecção inversa e dual para núcleos de ^{1}H e ^{13}C, Bremen-Alemanha;

Sonda criogênica para espectrômetro Bruker® modelo Advance III HD 600 com detecção inversa e três canais para os núcleos ^{1}H, ^{13}C e ^{15}N, Bremen-Alemanha.

4.4. Planejamento estrutural

Explorando a relação bioisostérica entre a dupla ligação do resveratrol e a subunidade *N*-acil-hidrazona foram sintetizadas substâncias que demonstraram capacidade de absorção na região UV associada ao efeito antioxidante (Reis *et al.*, 2014) (Figura 18). Apesar da eficácia antioxidante das substâncias sintetizadas, os valores de FPS e FPUVA, importantes parâmetros para determinação do potencial fotoprotetor de uma substância, foram considerados baixos e, por isso, no presente trabalho, as substâncias foram otimizadas a fim de melhorar estes resultados. Utilizando como protótipo o *ethylhexyl triazone* (EHT), empregou-se a estratégia de triplicação molecular, em que o núcleo 1,3,5-triazina, atuando como '*core*' central, foi ligado a três moléculas contendo a subunidade *N*-acil-hidrazona, isóstero da dupla ligação presente na estrutura do resveratrol.

A presença das três subunidades conferiu maior delocalização eletrônica à molécula planejada propiciando valores maiores de absortividade molar. Além disso, pretendeu-se manter as hidroxilas presentes no protótipo original (FSN-3, FSN-4, FSN-5 e FSN-8) e estudar a variação da sua posição nos diferentes regioisômeros. Ainda, a presença dos grupamentos 4-piridina (FSN-2) e 4-nitrobenzeno (FSN-6) visaram diminuir a lipossolubilidade dos novos filtros sintetizados.

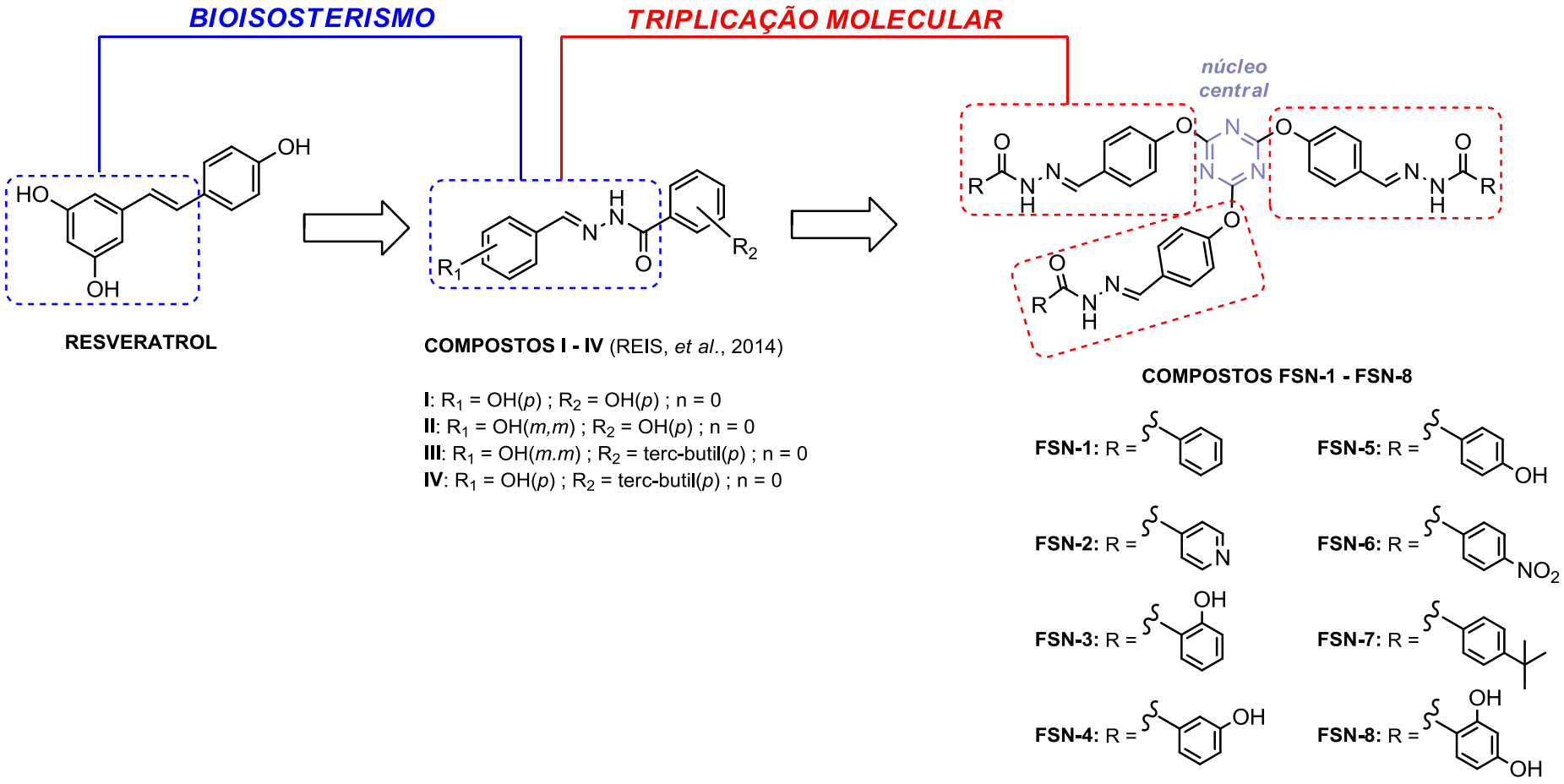


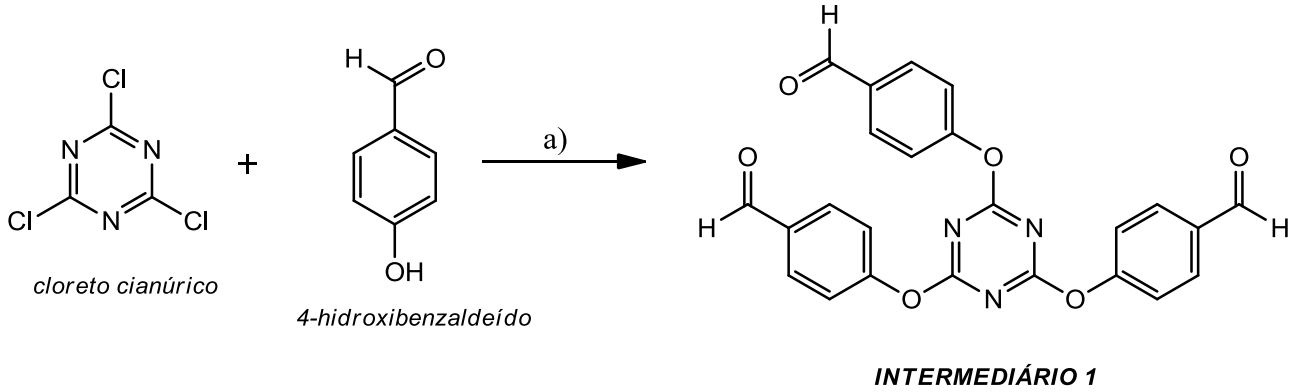
Figura 18. Planejamento estrutural das novas substâncias derivadas de resveratrol e EHT.

4.5. Metodologias sintéticas

O planejamento sintético para obtenção dos produtos finais desejados envolve duas etapas, a saber: a) síntese do intermediário 1; e b) reação de condensação com benzidrazidas funcionalizadas para obtenção dos derivados *N*-acil-hidrazônicos.

4.5.1. Síntese do 4,4',4"-((1,3,5-triazina-2,4,6-triil)tri(oxi))tribenzaldeído (intermediário 1)

O intermediário aldeídico funcionalizado (intermediário 1) foi obtido através da reação de substituição nucleofílica aromática catalisada por paládio tetrakis trifenilfosfina ($Pd(PPh_3)_4$) em meio básico contendo tetrahidrofurano (THF) anidro (Figura 19) (Solomons *et al.*, 2009; Bruice, 2006; Zhou *et al.*, 2012).



a) K_2CO_3 , Na_2CO_3 , $Pd(PPh_3)_4$, THF anidro
Condições reacionais: 60°C, refluxo, escuro, N_2

Figura 19. Esquema reacional utilizado para obtenção do intermediário 1.

<u>*Procedimento experimental*</u>

Para a obtenção do intermediário 1, foram adicionados, a um balão de fundo redondo de 125 mL: 0,66 mmol (120 mg) de cloreto cianúrico, 1,98 mmol (241,8 mg)

de 4-hidroxibenzaldeído, 6,89 mmol (952,2 mg) de K_2CO_3, 9,5 mmol (700 mg) de Na_2CO_3, 50 mL do THF anidro e 1,75 mol (21 mg) de $Pd(PPh_3)_4$.

A reação foi mantida sob refluxo, em agitação constante, sob atmosfera de $N_{2(g)}$, à temperatura de 60°C e ao abrigo de luz. O monitoramento da reação foi realizado por cromatografia em camada delgada (CCD). A fase estacionária consistiu de sílica gel. A fase móvel consistiu de uma mistura de acetato de etila e hexano na proporção 33:66 e as placas cromatográficas foram visualizadas utilizando lâmpada ultravioleta (λ = 254 nm e 356 nm). Após 20 h de reação, o volume foi reduzido sob pressão e submetido à purificação para obtenção do produto desejado (intermediário 1, Rf = 0,22).

A purificação do produto desejado foi realizada por cromatografia líquida em coluna no cromatógrafo Biotage® em coluna de sílica (SNAP ULTRA 25, Biotage®), fase móvel composta por acetato de etila e hexano eluindo em modo gradiente iniciando a composição em 8:92 (v/v) e atingindo 33:66 (v/v) em 11 minutos, sob fluxo de 25 mL/min e limite de detecção inferior de 40 mV. O monitoramento da purificação foi acompanhado por meio de CCD, sob condições idênticas às descritas durante o acompanhamento da reação. Foram coletados 165 mL em frações de 15 mL, sendo que as frações 4 a 11 indicaram o produto puro. Após, a fase móvel foi evaporada à pressão reduzida para fornecer um sólido de cor branca (Zhou *et al.*, 2012).

4.5.2. Síntese geral para obtenção dos derivados finais hidrazônicos FSN-1 a FSN-8

Após sintetizado e purificado, o intermediário sintético aldeídico (intermediário 1) foi acoplado às hidrazidas selecionadas por meio da reação de condensação, em meio etanólico catalisada por ácido, para formação das substâncias hidrazônicas finais (Figura 20) (Barreiro *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2008; Mcmurry, 2011). À exceção da 2-hidroxibenzidrazida, que foi previamente preparada de acordo com o método descrito por Vizioli e colaboradores (2009), e da 2,4-diidroxibenzidrazida, sintetizada de acordo com as metolodologias descritas por Arshad e colaboradores (2012), Lima e colaboradores (2008) e Tangdenpaisal e colaboradores (2009), todas as demais hidrazidas foram adquiridas comercialmente para a obtenção e subsequente funcionalização das substâncias.

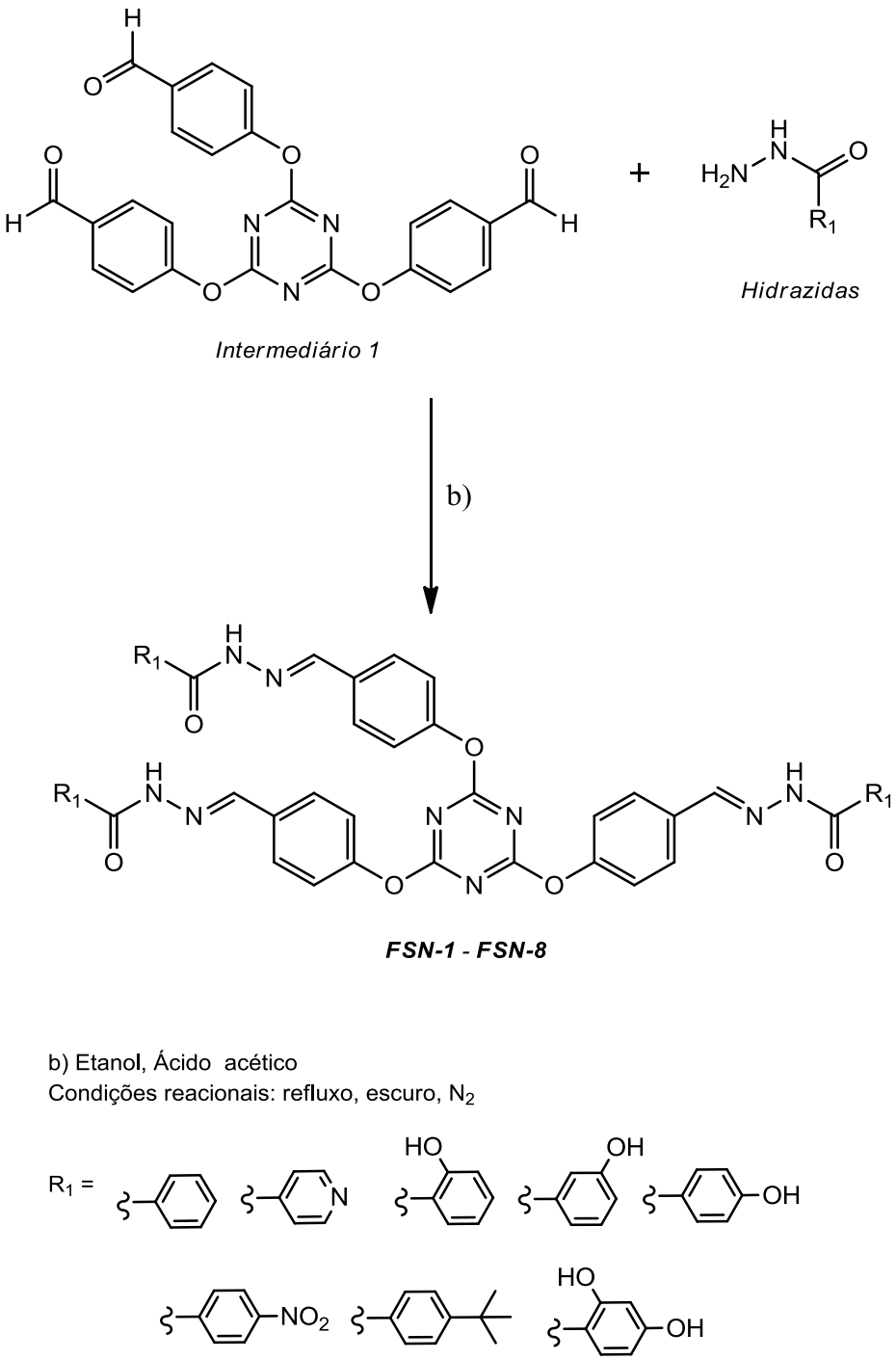


Figura 20. Esquema reacional utilizado para obtenção dos derivados hidrazônicos finais FSN-1 a FSN-8.

Procedimento experimental

Para a obtenção dos derivados finais hidrazônicos, foram adicionados a um balão de fundo redondo de 125 mL: 20 mL de etanol e 0,68 mmol (300 mg) do

intermediário 1 (4.5.1). Em seguida, o meio reacional foi submetido a um ajuste de pH na faixa de 4-5 com ácido acético glacial. Após, 2,04 mmol de cada uma das seguintes hidrazidas foi adicionada, individualmente, aos meios reacionais: benzidrazida (277,75 mg), isoniazida (279,77 mg), 4-hidroxibenzidrazida (310,39 mg), 3-hidroxibenzidrazida (310,39 mg), 2-hidroxibenzidrazida (310,39 mg), hidrazida 4-nitrobenzóica (369,55 mg), hidrazida 4-*terc*-butilbenzóica (392,21 mg) e 2,4-diidroxibenzidrazida (346,03 mg).

A reação foi mantida sob refluxo, agitação constante, atmosfera de $N_{2(g)}$ e ao abrigo de luz. O monitoramento da reação foi feita por análise empregando CCD, cuja fase estacionária foi composta por sílica gel e a fase móvel foi composta por acetato de etila. Ao término reacional (24 h, a exceção da reação com 3-hidroxibenzidrazida, cujo tempo reacional foi de 42 h), foi adicionado gelo ao meio a fim de promover a precipitação da substância desejada. Após a filtração e sucessivas lavagens com água gelada, o precipitado foi seco e armazenado à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

4.6. Metodologias analíticas

4.6.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para acompanhamento das reações, foi utilizada análise cromatográfica em camada delgada (CCD) empregando sílica gel como fase estacionária e uma mistura de acetato de etila e hexano como fase móvel, em proporções variadas, de acordo com o produto a ser avaliado (4.5.1 e 4.5.2). A visualização das substâncias foi realizada utilizando lâmpada ultravioleta (λ = 254 nm e 365 nm).

4.6.2. Espectroscopia de RMN ^{1}H e RMN ^{13}C

Os espectros de RMN ^{1}H e de ^{13}C mono e bidimensionais foram obtidos em espectrômetros Bruker®, disponíveis no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (IQ-UNESP), nos seguintes modelos e especificações:

a) Fourier 300 (7,1 Tesla) equipado com sonda de 5 mm, detecção inversa e dual para núcleos de ^{1}H e ^{13}C;

b) Advance III HD 600 (14,1 Tesla) equipado com sonda criogênica, com detecção inversa e três canais para os núcleos ^{1}H, ^{13}C e ^{15}N.

4.6.3. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV)

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 da SHIMADZU® Corporation, disponível no Laboratório de Controle Microbiológico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP.

4.6.4. Espectrometria de massas

Os íons referentes às substâncias intermediário 1 e *N*-acil-hidrazonas finais foram obtidos através de ionização das respectivas substâncias por *eletrospray*, sendo utilizado o nitrogênio como gás de nebulização, dessolvatação e de cone. A voltagem do capilar (voltagem na fonte de ionização) e, portanto, a energia de ionização, mantiveram-se constantes em 4,0 kV para a substância intermediária 1 e 4,5 kV para as substâncias hidrazônicas. Além destes, o fluxo do gás dessolvatação (8,0 L/min), temperatura de dessolvatação (275°C para o intermediário 1 e 200°C para as substâncias hidrazônicas) e pressão do gás nebulizador (4,0 bar) também

permaneceram constantes durante os experimentos. O intervalo *m/z* analisado encontrou-se compreendido entre 380 e 620 para o intermediário 1 e entre 790 e 976 para as substâncias *N*-acil-hidrazônicas.

O espectro referente ao aldeído trissubstituído (intermediário 1) foi obtido em espectrômetro de massas de baixa resolução com detector do tipo dinodo multiplicador de partículas contínuo, disponível no Laboratório Multiusuários do Instituto de Química da UNESP-Araraquara. A amostra foi solubilizada em metanol (grau HPLC) na concentração de 1,0 mg/mL.

Os espectros referentes às substâncias *N*-acil-hidrazônicas finais foram obtidos em espectrômetro de massas de alta resolução com detector do tipo MicroTOF, disponível no Centro Analítico de Instrumentação da USP-São Paulo (Central Analítica-USP). As amostras foram solubilizadas em DMSO (concentração de 1,0 g/mL), sonicadas por 40 minutos e, em seguida, solubilizadas em metanol (grau HPLC) na concentração de 1,0 mg/mL.

4.6.5. Análise de varredura por espectrofotometria de UV

Foi preparada uma solução-mãe de 10 mM de cada uma das substâncias diluídas em DMSO. Em seguida, estas soluções foram diluídas à concentração de 10 µM em metanol, e mantidas ao abrigo da luz. Do mesmo modo, foram preparadas soluções para os padrões de resveratrol e EHT. A análise foi realizada em triplicata, e as absorvâncias máximas foram obtidas em espectrofotômetro UV em comprimentos de onda que variaram entre 200 e 420 nm. Além disso, foi possível a determinação da absortividade molar das substâncias, de acordo com a seguinte equação:

$$\varepsilon = \frac{(M\ x\ A)}{(C\ x\ l)} \qquad (1)$$

Onde *ε* corresponde à absortividade molar ($M^{-1}.L^{-1}.cm^{-1}$), *M* representa a massa molar de cada substância (g/mol), *A* indica a absorvância resultante na leitura, *C* indica a concentração (g/L) e *l* representa o caminho óptico percorrido pela amostra (largura da cubeta do equipamento, em cm) (Field *et al.*, 2008).

4.6.6. Faixa de Fusão

As faixas de fusão das substâncias intermediárias foram determinadas, sem correção, em aparelho de fusão capilar disponível no Laboratório de Química Farmacêutica e Desenvolvimento de Fármacos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP.

4.6.7. Estudo de Estabilidade Térmica

4.6.7.1. Termogravimetria (TG)

As curvas de TG foram registradas no equipamento de TA, disponível no Laboratório de Termoanálises (Química Analítica) do Instituto de Química, UNESP, Araraquara. Para a análise, foram utilizados atmosfera de nitrogênio, taxa de fluxo de 100 mL/min e taxa de aquecimento de 10°C/min. Foram pesados 2,0 ± 0,5 mg de amostra em balança analítica e os termogramas foram registrados a partir da temperatura ambiente até 600°C.

4.6.7.2. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A análise de DSC foi realizada no equipamento DSC 1, disponível no Laboratório de Termoanálises (Química Analítica) do Instituto de Química, UNESP,

Araraquara. A temperatura de início de fusão foi calculada pelo software STAR®. O instrumento foi calibrado com índio e zinco e a análise foi realizada sob purga de nitrogênio (50 mL/min). Um recipiente DSC de alumínio vazio (40 mL) foi utilizado como referência. Para a análise, foram pesados 2,0 ± 0,5 mg de amostra em balança analítica. Os termogramas referentes à varredura de DSC das substâncias foram registrados a uma velocidade de aquecimento de 10°C/min. A faixa de aquecimento utilizada foi compreendida entre 0°C e 350°C.

4.7. Ensaios in vitro

4.7.1. Estudo da atividade antioxidante

A metodologia empregada para verificar o potencial antioxidante *in vitro* das substâncias *N*-acil-hidrazônicas foi baseada na avaliação da atividade sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) (Brand-William *et al.*, 1995; Török *et al.*, 2013).

Os padrões utilizados como controle positivo foram ácido ascórbico, EHT e resveratrol. Para o preparo do branco, tomou-se 150 µL de DMSO e 1350 µL de metanol. Para o preparo dos padrões e amostras, foram preparadas soluções de 1 mM em DMSO. Em seguida, estas soluções foram diluídas em metanol nas concentrações de 400, 300, 200, 100, 50, 25 e 10 µM. Após, 50 µL de cada uma destas diluições, bem como do branco, e 100 µL de uma solução-estoque de DPPH• de concentração 0,04 g/L diluída em metanol foram dispensados em cada cavidade de uma microplaca de 96 poços, em triplicata. A microplaca foi incubada a 37ºC por 30 minutos e as absorvâncias foram obtidas em 519 nm no leitor de microplacas Biotek®. A porcentagem de inibição do radical DPPH• pelas substâncias foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(Abs_b \; x \; Abs_a)}{Abs_b} \qquad (2)$$

Onde Abs_a corresponde à absorvância das amostras (padrões e substâncias sintetizadas) e Abs_b corresponde à absorvância do branco (isento de substâncias).

4.7.2. Análise estatística para o estudo da atividade antioxidante

Após a obtenção das absorvâncias, foram calculadas as porcentagens de inibição de cada uma das moléculas frente ao radical DPPH• (Equação 2). Em seguida, foram calculadas as médias e desvios-padrão de cada uma das substâncias para cada uma das concentrações. 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, com o cálculo da diferença mínima significativa para $\alpha=0,05$.

4.7.3. Estudo da atividade fotoprotetora

A fim de se avaliar a atividade fotoprotetora, foi necessária a incorporação das substâncias *N*-acil-hidrazônicas em uma base cosmética. Esta base foi desenvolvida após estudos prévios realizados no Laboratório de Cosmetologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara – SP (LaCos) e demonstrou possibilidade de manipulação a frio e ausência de interferência na avaliação do efeito fotoprotetor. A composição dessa formulação usada no experimento foi:

Dibutyl adipate.....6%

C12-15 alkyl benzoate…….....10%

Mineral oil (and) cetearyl alcohol (and) ceteth-20 (and) glyceryl stearate (and) PEG-40 hydrogenated castor oil (and) polyacrylic acid (and) sodium hydroxide (and) xylitol (and) caprylic acid……..…*7%*

Caprylic/capric triglyceride.....8%

Polysorbate 80.....1%

Água deionizada.....qsp 100%

Cada substância sintetizada foi individualmente incorporada a uma formulação, na concentração de 5%, concentração máxima permitida para incorporação do padrão EHT, conforme legislação vigente em território nacional (Brasil, 2016). Como padrões positivos, foram utilizadas preparações na mesma concentração (5%) contendo os protótipos, ou seja, resveratrol e EHT.

Cada emulsão foi preparada pela incorporação da substância (amostra ou padrão) na fase oleosa sob agitação manual constante. Após a solubilização da substância, a fase aquosa (contendo o emulsionante) foi vertida sobre a fase oleosa, sendo mantida a agitação manual. Do mesmo modo, uma emulsão base (branco, formulação isenta de qualquer substância ativa) foi preparada para que pudesse ser lida antes de cada emulsão fotoprotetora, a fim de se zerar o equipamento.

Para a leitura de cada uma das emulsões, uma fita Transpore™ foi posicionada a um suporte de metal e 0,11g de cada formulação (incluindo a formulação base) foi, individualmente, espalhada sob a superfície da fita. A emulsão finamente espalhada sobre a fita foi mantida por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz para secagem. Em seguida, cada uma das emulsões (branco, amostras e padrões) foi submetida, individualmente, a medições em

espectrofotômetro com detecção via esfera de integração. As leituras foram efetuadas no intervalo de 290 nm a 400 nm, em triplicata, sendo os dados acumulados a intervalos de 5 nm.

Após a leitura no espectrofotômetro, foram obtidos os valores de FPS (fator de proteção solar), FPUVA (fator de proteção UVA), a razão UVA/UVB e o comprimento de onda crítico (λ_c).

4.7.4. Análise estatística para o estudo da atividade fotoprotetora

Após a obtenção dos resultados do ensaio de atividade fotoprotetora (FPS, FPUVA, razão UVA/UVB e λ_c), foram calculados as médias e os desvios-padrão de cada uma das substâncias. A partir desses resultados foi aplicado um teste de análise de variância (ANOVA) para os resultados de FPS e FPUVA. Nos casos em que $p<0,05$, as médias de concentrações foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima significativa para $\alpha=0,05$.

5. Resultados

5.1. Caracterização Estrutural

A fim de confirmar a estrutura obtida, todas as substâncias (intermediário e finais) foram submetidos à caracterização estrutural por métodos analíticos, como espectroscopia de ressonância magnética nuclear, espectrofotometria de infravermelho e ultravioleta e espectrometria de massas. Para a interpretação dos resultados foram utilizadas as seguintes referências: Dyer (1969), Field e colaboradores (2008), Fulmer e colaboradores (2010), Pavia e colaboradores (2010), Silverstein e colaboradores (2000 e 2006).

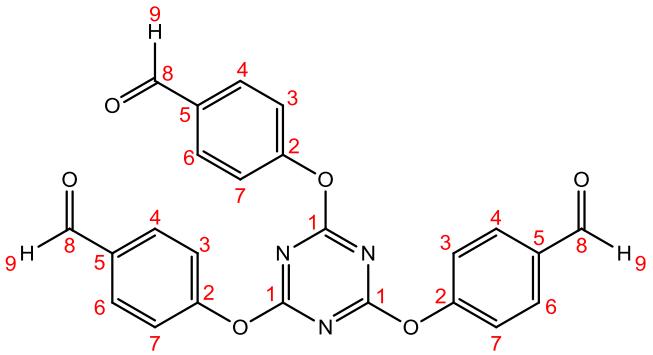
5.1.1. Intermediário 1: 4,4',4"-((1,3,5-triazina-2,4,6-triil)tri(oxi))tribenzaldeído

Inicialmente, foi obtido o intermediário aldeídico funcionalizado, através da reação de substituição nucleofílica aromática (Solomons *et al.*, 2009; Bruice, 2006; Zhou *et al.*, 2012). Após a purificação, a substância obtida apresentou-se como um sólido branco, cujo rendimento reacional foi de 81,5% e faixa de fusão de 174,5 a 176,0°C.

Os espectros de RMN de ^{1}H, RMN de ^{13}C, infravermelho e massas encontram-se, respectivamente, nos Apêndices 1 a 4.

A Tabela 1 apresenta os resultados de RMN de ^{1}H, RMN de ^{13}C e infravermelho referentes ao intermediário aldeídico funcionalizado (intermediário 1).

Tabela 1. Resultados de RMN de ^{1}H (75 MHz, em DMSO-d_6), RMN de ^{13}C (300 MHz, em DMSO-d_6) e infravermelho do intermediário 1.



RMN de ^{1}H (δ)	RMN de ^{13}C (δ)	Infravermelho (cm^{-1})
H3, H7 = 7,49 (d; 8,5 Hz; 6H)	**C1 =** 173,1	**√(C-H)$_{aromático}$ =** 3101,5 ; 3066,8 ; 3051,4
H4, H6 = 7,97 (d; 8,5 Hz; 6H)	**C2 =** 156,0	**√(C-H)$_{aldeído}$ =** 2837,3 ; 2740,9
H9 = 9,98 (s; 3H)	**C3, C7 =** 122,8	**√(C=O)$_{aldeído}$ =** 1703,1
	C4, C6 = 131,6	**√(C=C)$_{aromático}$ =** 1608,6 ; 1564,3 ; 1500,6
	C5 = 134,5	**Subst. Arom. =** 842,8
	C8 = 192,4	**δ(C-H)$_{aromático}$ =** 804,6

Subst. Arom.: Substituição nos anéis aromáticos

No intermediário aldeídico funcionalizado pode-se identificar o simpleto correspondente aos hidrogênios aldeídicos H9 em δ 9,98 (3H) e os hidrogênios aromáticos, representados pelos dupletos H3 e H7 (δ 7,49), e H4 e H6 (δ 7,97), com constantes de acoplamento de 8,5 Hz. Além disso, foi confirmada a presença do carbono carbonílico (C8) e dos carbonos triazínicos (C1) em δ 192,4 e δ 173,2, respectivamente. Os carbonos aromáticos C2 e C5 são representados pelos sinais em δ 156,0 e 134,5, respectivamente. Os carbonos aromáticos mais blindados da estrutura correspondem aos carbonos C3 e C7 (δ 122,8). Já os carbonos C4 e C6 podem ser visualizados no deslocamento de δ 131,6.

Ainda, foi possível caracterizar as vibrações características dos grupos funcionais presentes na estrutura através da espectrofotometria na região do infravermelho. Para a ligação C-H em anéis aromáticos podem ser observadas as

deformações axiais entre 3101,54 cm^{-1} e 3051,39 cm^{-1}, e angular em 804,59 cm^{-1}. As vibrações referente ao estiramento dos aldeídos são visualizadas em 2837,29 cm^{-1}, 2740,85 cm^{-1} (C-H) e 1703,14 cm^{-1} (C=O). Os estiramentos da ligação C=C de carbonos aromáticos são observados entre 1608,77 cm^{-1} e 1500,62 cm^{-1}. Ainda, as vibrações de desdobramento de anéis aromáticos 1,4-dissubstituídos são representadas pelos picos presentes em 842,77 cm^{-1}.

O espectro de massas apresentou picos relativos aos adutos de sódio $[M+Na]^+$ com valor de *m/z* de 464,17 e de hidrogênio $[M+H]^+$ com valor de *m/z* de 442,08, consistentes com o valor de massa monoisotópica teórico de 441,10 calculado com base na fórmula empírica $C_{24}H_{15}N_3O_6$.

5.1.2. Síntese da 2-hidroxibenzidrazida

Para a síntese da substância *N*-acil-hidrazônica FSN-3, foi necessária a síntese de 2-hidroxibenzidrazida, conforme descrito por Vizioli e colaboradores (2009). Após a purificação, a substância obtida apresentou-se como um sólido branco, cujo rendimento reacional foi de 39,5% e faixa de fusão de 146,1 a 147,7°C.

5.1.3. Síntese do metil 2,4-diidroxibenzoato

Para a síntese da substância *N*-acil-hidrazônica FSN-8, inicialmente foi necessária a síntese do ácido 2,4-diidroxibenzóico esterificado (Tangdenpaisal *et al.*, 2009). Após a purificação, a substância obtida apresentou-se como um sólido branco, cujo rendimento reacional foi de 94,3% e faixa de fusão de 74,0 a 75,1°C.

5.1.4. Síntese da 2,4-diidroxibenzidrazida

Após a síntese do metil 2,4-diidroxibenzoato (5.1.3), foi necessária a síntese da 2,4-diidroxibenzidrazida, conforme descrito por Arshad e colaboradores (2012), Lima e colaboradores (2008) e Tangdenpaisal e colaboradores (2009) para subsequente acoplamento ao aldeído funcionalizado (intermediário 1). Após a purificação, a substância obtida apresentou-se como um sólido amarelo, cujo rendimento reacional foi de 22,9% e faixa de fusão de 244,1 a 246,0°C.

5.1.5. Síntese das substâncias N-*acil-hidrazônicas*

A síntese das substâncias *N*-acil-hidrazônicas foi dada pela condensação de substâncias aldeídicas e hidrazídicas, sob catálise ácida. Após a purificação, os precipitados obtidos em cada reação foram secos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Em seguida, os produtos secos foram pesados e os rendimentos reacionais foram calculados. As características visuais dos precipitados, bem como os rendimentos reacionais obtidos, encontram-se descritos na Tabela 2.

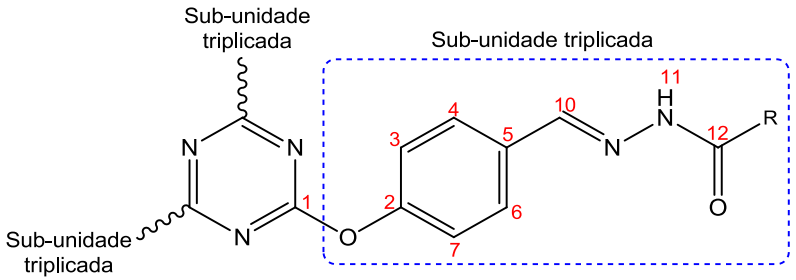
Tabela 2. Características visuais dos precipitados e rendimentos reacionais.

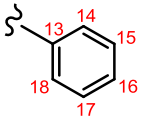
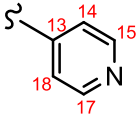
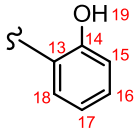
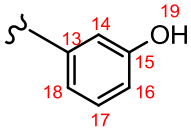
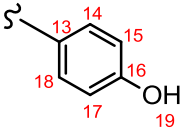
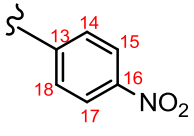
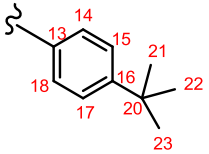
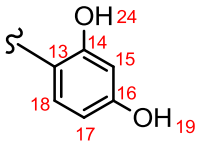
Molécula	Características Visuais do Precipitado	Rendimentos Reacionais (%)
FSN-1	Sólido de cor branca	88,4
FSN-2	Sólido de cor branca	83,7
FSN-3	Sólido de cor branca	65,4
FSN-4	Sólido de cor cinza	59,9
FSN-5	Sólido de cor branca	52,6
FSN-6	Sólido de cor branca	55,3
FSN-7	Sólido de cor branca	56,9
FSN-8	Sólido de cor amarela	83,1

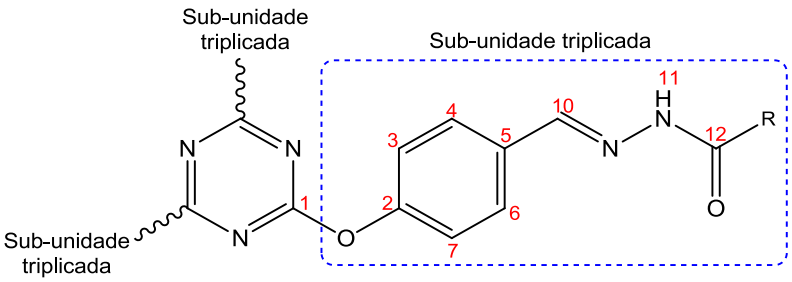
Os espectros de RMN de ^{1}H das substâncias hidrazônicas encontram-se representados nos Apêndices 5, 12, 19, 27, 35, 43, 51 e 59.

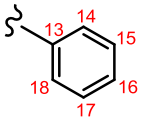
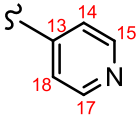
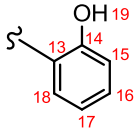
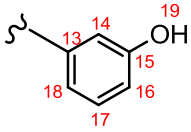
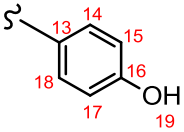
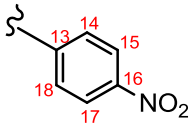
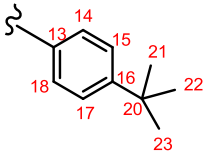
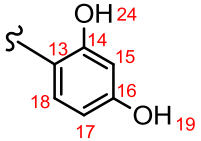
A Tabela 3 apresenta os deslocamentos químicos de ^{1}H para as substâncias hidrazônicas finais (FSN-1 a FSN-8).

Tabela 3. Resultados de RMN de ^{1}H (δ_H, multiplicidade, *J* e integração; 600 MHz, em DMSO-d_6) das substâncias *N*-acil-hidrazônicas finais.



	FSN-1	FSN-2	FSN-3	FSN-4	FSN-5	FSN-6	FSN-7	FSN-8
R =								
	H3, H7 = 7,36; d; 7,8 Hz; 6H	**H3, H7 =** 7,38; d; 8,0 Hz; 6H	**H3, H7 =** 7,39; d; 7,6 Hz; 6H	**H3, H7 =** 7,38; d; 7,6 Hz; 6H	**H3, H7 =** 7,36; d; 7,6 Hz; 6H	**H3, H7 =** 7,37; d; 7,6 Hz; 6H	**H3, H7 =** 7,36; d; 7,6 Hz; 6H	**H3, H7 =** 7,38; d; 7,0 Hz; 6H
	H4, H6 = 7,81; d; 7,8 Hz; 6H	**H4, H6 =** 7,82; d; 8,0 Hz; 6H	**H4, H6 =** 7,83; d; 7,6 Hz; 6H	**H4, H6 =** 7,80; d; 7,6 Hz; 6H	**H4, H6 =** 7,78; d; 7,6 Hz; 6H	**H4, H6 =** 7,82; d; 7,6 Hz; 6H	**H4, H6 =** 7,79; d; 7,6 Hz; 6H	**H4, H6, H18 =** 7,81; d; 7,0 Hz; 9H
	H10 = 8,47; s; 3H	**H10 =** 8,49; s; 3H	**H10 =** 8,49; s; 3H	**H10 =** 8,48; s; 3H	**H10 =** 8,46; s; 3H	**H10 =** 8,49; s; 3H	**H10 =** 8,48; s; 3H	**H10 =** 8,46; s; 3H
	H11 = 11,90; s; 3H	**H11 =** 12,11; s; 3H	**H11 =** 11,89; s; 3H	**H11 =** 11,82; s; 3H	**H11 =** 11,68; s; 3H	**H11 =** 12,15; s; 3H	**H11 =** 11,84; s; 3H	**H11 =** 11,74; s; 3H
	H14, H18 = 7,90; d; 7,5 Hz; 6H	**H14, H18 =** 7,81; d; 8,0 Hz; 6H	--------	**H14, H18 =** 7,31; d; 2,7 Hz; 6H	**H14, H18 =** 7,81; d; 7,0 Hz; 6H	**H14, H18 =** 8,12; d; 8,2 Hz; 6H	**H14, H18 =** 7,86; d; 7,7 Hz; 6H	--------
	H15, H17 = 7,51; t; 7,5 Hz; 6H	**H15, H17 =** 8,77; d; 8,0 Hz; 6H	**H15 =** 6,98; d; 7,4 Hz; 3H	--------	**H15, H17 =** 6,86; d; 7,0 Hz; 6H	**H15, H17 =** 8,33; d; 8,2 Hz; 6H	**H15, H17 =** 7,53; d; 7,7 Hz; 6H	**H15 =** 6,32; d; 2,3 Hz; 3H
	H16 = 7,59; t; 7,5 Hz; 3H	--------	**H16 =** 7,44; t; 7,4 Hz; 3H	**H16 =** 6,98; d; 2,7 Hz; 3H	--------	--------	--------	--------



	FSN-1	FSN-2	FSN-3	FSN-4	FSN-5	FSN-6	FSN-7	FSN-8
R =								
	--------	--------	**H17 =** 6,94; t; 7,4 Hz; 3H	**H17 =** 7,34; dd; 2,7 Hz; 3H	--------	--------	--------	**H17 =** 6,36; dd; 7,0 Hz; 3H
	--------	--------	**H18 =** 7,88; d; 7,4 Hz; 3H	--------	--------	--------	--------	--------
	--------	--------	--------	**H19 =** 9,79; s; 3H	**H19 =** 10,15; s; 3H	--------	--------	**H19 =** 10,26; s; 3H
	--------	--------	--------	--------	--------	--------	**H21, H22, H23 =** 1,32; s; 27H	--------

Nas substâncias *N*-acil-hidrazônicas, pode-se identificar os deslocamentos químicos dos simpletos correspondentes aos hidrogênios amídicos (H11) entre δ 11,68 e 12,15 e os hidrogênios imínicos (H10) entre δ 8,46 e 8,49. Os espectros de RMN de hidrogênio mostram um único sinal correspondente aos hidrogênios ilidênicos entre δ 8,46 e 8,49, referente ao diasteroisômero *E*.

Os hidrogênios H3 e H7 apresentam-se como dupletos, assim como os hidrogênios H4 e H6 e, por serem vicinais, apresentam mesmas constantes de acoplamento. Ainda, as constantes de acoplamento entre 7,0 e 8,0 Hz corroboram para que os hidrogênios H3 e H4, e H6 e H7 estejam em posição *orto*. Além disso, os hidrogênios H3 e H7 localizam-se entre δ 7,36 e 7,39 e os hidrogênios H4 e H6, entre δ 7,78 e 7,83 em todas as substâncias hidrazônicas sintetizadas.

Os hidrogênios H14 e H18 apresentam-se como dupletos e dependendo do substituinte *p*-aromático, podem ser observadas maior ou menor blindagem nas substâncias FSN-1, FSN-2, FSN-5, FSN-6, FSN-7 e FSN-8. Na substância FSN-1, isento de substituintes aromáticos, os hidrogênios H14 e H18 apresentam deslocamento em δ 7,90. O nitrogênio do anel piridínico em FSN-2, a hidroxila em FSN-5 e o grupamento *terc*-butila em FSN-7 conferem aos hidrogênios H14 e H18 deslocamentos químicos entre δ 7,81 e 7,86. Já o grupamento nitro, presente na substância FSN-6, atribui menor blindagem às posições 14 e 18 e, por este motivo, os hidrogênios destas posições apresentam deslocamento químico em δ 8,12.

Os deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios da posição 17 são diretamente associados aos substituintes *o* e *p*-aromáticos. Assim sendo, os hidrogênios H17 que se encontram em posição *orto* aos grupamentos contendo nitrogênio, como ocorre nas substâncias FSN-2 (nitrogênio *p*-aromático de anel piridínico) e FSN-7 (grupamento nitro *p*-aromático) são, portanto, dupletos menos

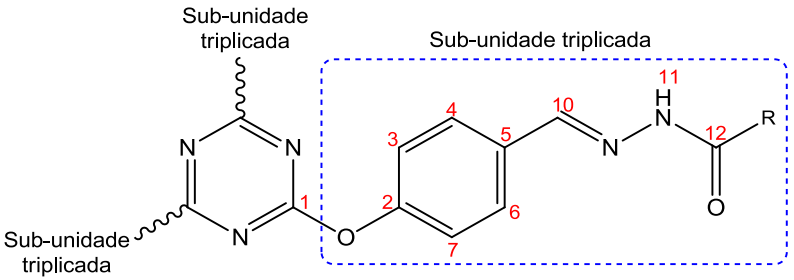
blindados e seus deslocamentos químicos podem ser observados em, respectivamente, δ 8,77 e 8,33. Por outro lado, as hidroxilas *o* e *p*-aromáticas blindam a posição 17 e, por este motivo, os deslocamentos químicos dos dupletos referentes aos hidrogênios H17 nas substâncias FSN-3, FSN-5 e FSN-8 apresentam deslocamento químico em, respectivamente, δ 6,94, δ 6,86 e δ 6,36. Neste contexto, hidroxilas *m*-aromáticas desprotegem a posição 17, fato que pode ser observado nos hidrogênios H17 da substância FSN-4 (δ 7,34).

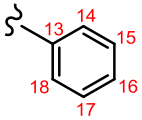
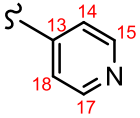
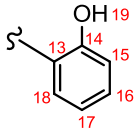
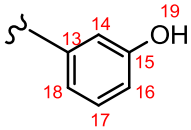
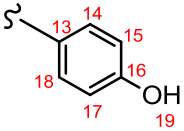
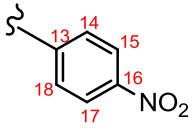
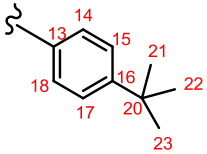
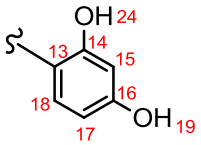
Corroboram com os deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H os ensaios de RMN por correlação – HSQC e HMBC –, representados nos Apêndices 7, 14, 21, 22, 29, 30, 37, 38, 45, 46, 53, 54, 61 e 62.

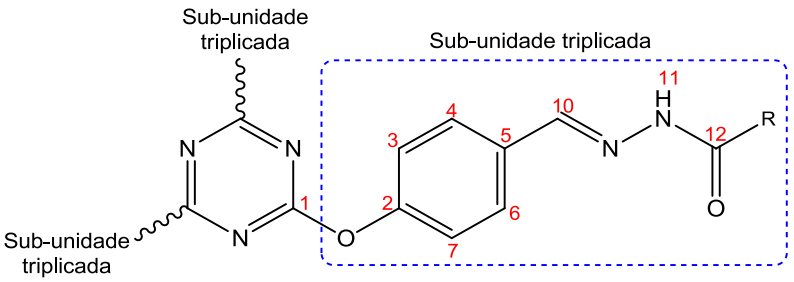
A Tabela 4 apresenta os deslocamentos químicos de ^{13}C para as substâncias hidrazônicas finais (FSN-1 a FSN-8).

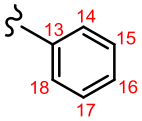
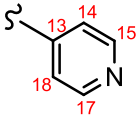
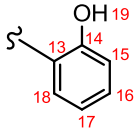
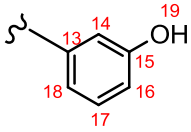
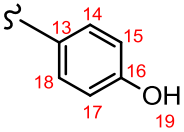
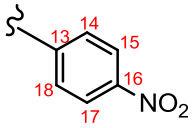
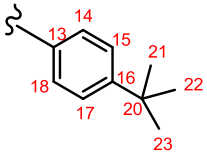
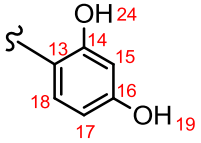
Os espectros de RMN de ^{13}C das substâncias hidrazônicas encontram-se representados nos Apêndices 6, 13, 20, 28, 36, 44, 52 e 60.

Tabela 4. Resultados de RMN de ^{13}C ($\delta_{C;}$ 150 MHz, em DMSO-d_6) das substâncias *N*-acil-hidrazônicas finais.



	FSN-1	FSN-2	FSN-3	FSN-4	FSN-5	FSN-6	FSN-7	FSN-8
R =								
C1 = 173,4	**C1 =** 173,3	**C1 =** 173,4	**C1 =** 173,4	**C1 =** 173,5	**C1 =** 173,4	**C1 =** 173,4	**C1 =** 173,4
C2 = 153,0	**C2 =** 152,8	**C2 =** 153,1	**C2 =** 152,9	**C2 =** 152,8	**C2 =** 153,1	**C2 =** 152,9	**C2 =** 153,0
C3, C7 = 122,2	**C3, C7 =** 122,6	**C3, C7 =** 122,5	**C3, C7 =** 122,5	**C3, C7 =** 122,5	**C3, C7 =** 122,6	**C3, C7 =** 122,5	**C3, C7 =** 122,5
C4, C6 = 128,9	**C4, C6 =** 128,9	**C4, C6 =** 129,0	**C4, C6 =** 128,8	**C4, C6 =** 128,6	**C4, C6 =** 129,0	**C4, C6 =** 128,8	**C4, C6 =** 128,9
C5 = 132,7	**C5 =** 132,3	**C5 =** 132,5	**C5 =** 132,8	**C5 =** 132,9	**C5 =** 132,5	**C5 =** 132,8	**C5 =** 132,7
C10 = 147,4	**C10 =** 148,5	**C10 =** 148,2	**C10 =** 147,1	**C10 =** 146,3	**C10 =** 148,4	**C10 =** 147,1	**C10 =** 147,4
C12 = 163,8	**C12 =** 162,2	**C12 =** 165,0	**C12 =** 163,6	**C12 =** 163,2	**C12 =** 161,7	**C12 =** 163,6	**C12 =** 165,9
C13 = 133,7	**C13 =** 140,7	**C13 =** 116,4	**C13 =** 135,2	**C13 =** 124,1	**C13 =** 139,4	**C13 =** 131,0	**C13 =** 106,7
C14, C18 = 127,9	**C14, C18 =** 121,9	**C14 =** 159,4	**C14 =** 115,0	**C14, C18 =** 130,2	**C14, C18 =** 129,6	**C14, C18 =** 128,0	**C14 =** 163,1
C15, C17 = 129,0	**C15, C17 =** 150,8	**C15 =** 117,7	**C15 =** 157,9	**C15, C17 =** 115,4	**C15, C17 =** 124,1	**C15, C17 =** 125,7	**C15 =** 103,3
C16 = 132,4	--------	**C16 =** 134,3	**C16 =** 119,2	**C16 =** 161,2	**C16 =** 149,7	**C16 =** 155,2	**C16 =** 162,8



	FSN-1	FSN-2	FSN-3	FSN-4	FSN-5	FSN-6	FSN-7	FSN-8
R =								
	--------	--------	**C17 =** 119,4	**C17 =** 118,6	--------	--------	--------	**C17 =** 107,8
	--------	--------	**C18 =** 129,1	**C18 =** 130,0	--------	--------	--------	**C18 =** 130,2
	--------	--------	--------	--------	--------	--------	**C20 =** 35,2	--------
	--------	--------	--------	--------	--------	--------	**C21, C22, C23 =** 31,4	--------

Na Tabela 4, pode-se identificar os carbonos C1 do anel triazina entre δ 173,3 e 173,5 e os carbonos carbonílicos C12 entre δ 161,7 e 165,9. Os deslocamentos químicos observados entre δ 152,8 e 153,1 correspondem aos carbonos C2, menos protegidos devido à proximidade aos átomos eletronegativos (O). Os carbonos imínicos são representados por C10 com deslocamentos químicos entre δ 146,3 e 148,5 e sugere a formação da ligação imina desejada.

Por meio do ensaio de RMN por correlação (HSQC e HMBC), os sinais entre δ 122,2 e 122,6 foram associados aos carbonos C3 e C7. Nos mesmos ensaios, foi possível relacionar os carbonos C4 e C6 aos sinais entre δ 128,6 e 129,0.

Os carbonos C5 e C13 puderam ser diferenciados por meio de análise de RMN por correlação (HSQC e HMBC). Além disso, estes carbonos foram estudados conforme os substituintes aromáticos: os carbonos C5 não apresentaram variação significativa entre as substâncias analisadas (sinais entre δ 132,3 e 132,9) por localizarem-se estruturalmente distantes dos grupamentos que promovem alteração nos deslocamentos químicos (hidroxilas, anel piridínico, nitro e *terc*-butila).

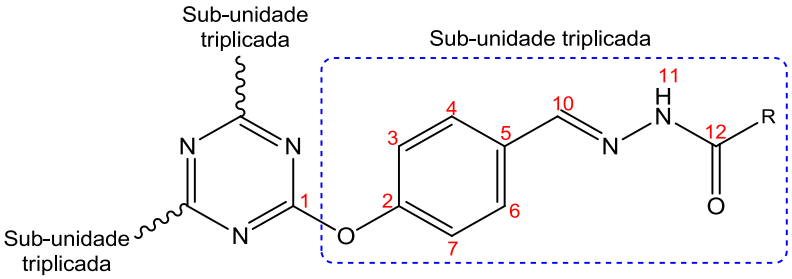
Além disso, os carbonos diretamente ligados a grupamentos ativantes como hidroxilas, nitrogênio (piridina), nitro e *terc*-butila apresentam δ entre 149,7 e 163,1 (C15 e C17 em FSN-2, C14 em FSN-3, C15 em FSN-4, C16 em FSN-5 a 7 e C14 e C18 em FSN-8).

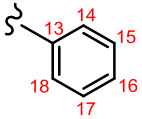
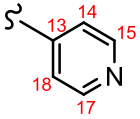
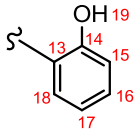
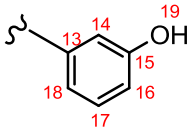
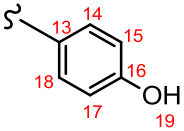
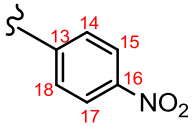
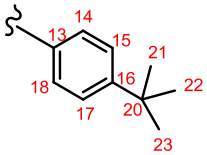
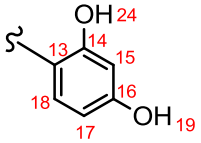
Os carbonos C15, C17 e C18 da substância FSN-8 puderam ser diferenciados por meio de análise de RMN por correlação (HSQC e HMBC). Além disso, estes carbonos foram estudados conforme os substituintes aromáticos, sendo que o carbono C18 não apresenta diferença significativa, se comparado ao mesmo padrão de substituição para as substâncias FSN-3 e FSN-5.

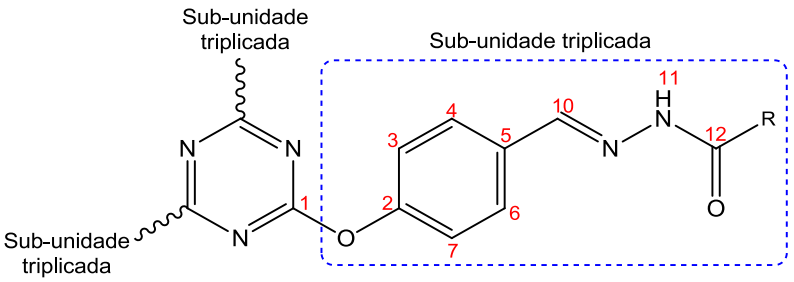
A Tabela 5 apresenta as principais vibrações características que podem ser observadas no espectro de absorção na região do infravermelho.

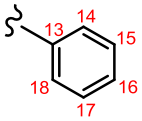
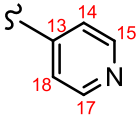
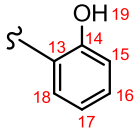
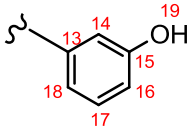
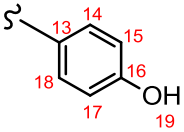
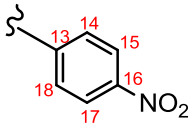
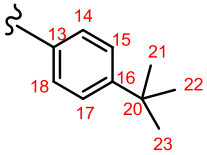
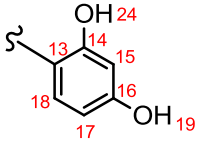
Os espectros de infravermelho das substâncias hidrazônicas encontram-se representados nos Apêndices 8, 15, 23, 31, 39, 47, 55 e 63.

Tabela 5. Bandas de absorção na região do infravermelho (em KBr, pastilhas) das substâncias *N*-acil-hidrazônicas finais e suas atribuições, em cm^{-1}.



R =	FSN-1 	FSN-2 	FSN-3 	FSN-4 	FSN-5 	FSN-6 	FSN-7 	FSN-8 
	√**(N-H)**$_{amida}$ = 3474,6 ; 3230,8	√**(N-H)**$_{amida}$ = 3492,2 ; 3213,1	--------	--------	√**(N-H)**$_{amida}$ = 3465,8 ; 3216,1	√**(N-H)**$_{amida}$ = 3448,1 ; 3219,1	√**(N-H)**$_{amida}$ = 3233,7	√**(N-H)**$_{amida}$ = 3469,3 ; 3219,0
	--------	--------	√**(O-H)**$_{fenol}$ = 3327,7	√**(O-H)**$_{fenol}$ = 3245,5	√**(O-H)**$_{fenol}$ = 3345,3	--------	--------	√**(O-H)**$_{fenol}$ = 3348,3
	√**(C-H)**$_{aromático}$ = 3060,4 ; 3031,0	√**(C-H)**$_{aromático}$ = 3045,7	√**(C-H)**$_{aromático}$ = 3060,4	√**(C-H)**$_{aromático}$ = 3066,3	√**(C-H)**$_{aromático}$ = 3034,0	√**(C-H)**$_{aromático}$ = 3075,1	√**(C-H)**$_{aromático}$ = 3069,2 ; 2904,7 ; 2869,5	√**(C-H)**$_{aromático}$ = 3000,5
	--------	--------	--------	--------	--------	--------	√**(C-H)**$_{terc\text{-}butil}$ = 2963,4	--------
	--------	--------	--------	--------	--------	--------	√**(C-H)**$_{sim,assim}$ = 2904,7 ; 2869,5	--------
	√**(C=O)**$_{amida}$ = 1656,4	√**(C=O)**$_{amida}$ = 1665,2	√**(C=O)**$_{amida}$ = 1650,5	√**(C=O)**$_{amida}$ = 1659,3	√**(C=O)**$_{amida}$ = 1653,4	√**(C=O)**$_{amida}$ = 1659,3	√**(C=O)**$_{amida}$ = 1650,5	√**(C=O)**$_{amida}$ = 1651,2
	√**(C=N)**$_{imina}$ = 1606,4	√**(C=N)**$_{imina}$ = 1612,3	--------	--------	√**(C=N)**$_{imina}$ = 1603,5	√**(C=N)**$_{imina}$ = 1603,5	√**(C=N)**$_{imina}$ = 1609,4	√**(C=N)**$_{imina}$ = 1608,1



	FSN-1	FSN-2	FSN-3	FSN-4	FSN-5	FSN-6	FSN-7	FSN-8
R =								
	√(C=C)$_{aromático}$ = 1571,2 ; 1503,6	**√(C=C)$_{aromático}$ =** 1574,1 ; 1503,6	**√(C=C)$_{aromático}$ =** 1571,2 ; 1500,7 ; 1444,8	**√(C=C)$_{aromático}$ =** 1568,2 ; 1503,6 ; 1447,8	**√(C=C)$_{aromático}$ =** 1568,2 ; 1500,7	**√(C=C)$_{aromático}$ =** 1568,2 ; 1524,2 ; 1503,6	**√(C=C)$_{aromático}$ =** 1571,2 ; 1503,6	**√(C=C)$_{aromático}$ =** 1562,4 ; 1498,9
	--------	--------	--------	--------	--------	**√(C-N)$_{nitro}$ =** 869,2	--------	--------
	δ(C-H)$_{aromático}$ = 842,8	**δ(C-H)$_{aromático}$ =** 842,8	**δ(C-H)$_{aromático}$ =** 845,7 ; 804,6	--------	--------	--------	--------	--------
	--------	--------	**Subst. arom. =** 748,8	**Subst. arom. =** 831,0 ; 742,9	**Subst. arom. =** 849,8	**Subst. arom. =** 848,7	**Subst. arom. =** 845,7	**Subst. arom. =** 836,9 ; 750,8

Subst. Arom.: substituição nos anéis aromáticos; sim.: deformação axial simétrica; assim.: deformação axial assimétrica.

A partir dos espectros de absorção obtidos na região do infravermelho, foi possível relacionar as vibrações características aos grupos funcionais presentes em cada uma das substâncias hidrazônicas, conforme representado na Tabela 5. Assim, em relação ao grupamento amida, foi possível identificar dois estiramentos associados às ligações N-H para as substâncias FSN-1, FSN-2, FSN-5, FSN-6 e FSN-8, sendo a primeira banda espectral observada entre 3448,1 e 3492,2 cm^{-1} e a segunda, localizada entre 3216,1 e 3230,8 cm^{-1}. Para a substância FSN-7, foi observado apenas um estiramento referente às ligações N-H dos grupamentos amida, situado em 3233,7 cm^{-1}. Ainda, as vibrações axiais observadas entre 1650,5 e 1659,3 cm^{-1} caracterizam as ligações carbonílicas C=O de amidas secundárias presentes nas estruturas.

Referente aos anéis aromáticos (benzênicos ou piridínicos) as deformações axiais pertinentes às ligações C-H são verificadas entre 2869,5 e 3075,1 cm^{-1}; os desdobramentos são observados apenas para as substâncias FSN-1, FSN-2 e FSN-3, entre 804,6 e 845,7 cm^{-1}. Além disso, as ligações C=C encontram-se representadas entre 1447,8 e 1574,1 cm^{-1}, podendo apresentar 2 ou 3 bandas características nesta região.

Os estiramentos que caracterizam as iminas (C=N) situam-se entre 1603,5 e 1612,3 cm^{-1} e podem ser observadas nos espectros referentes às substâncias FSN-1, FSN-2, FSN-5, FSN-6, FSN-7 e FSN-8, sugerindo a formação da substância planejada.

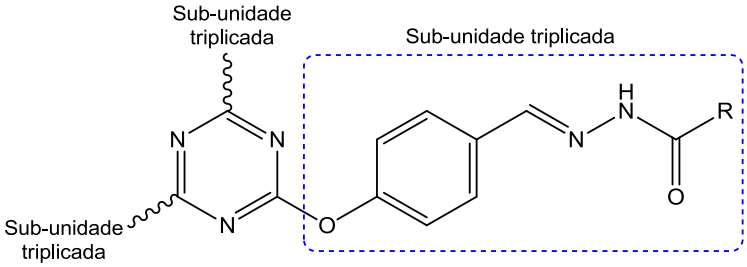
O estiramento intramolecular promovido pelas hidroxilas fenólicas presentes nas estruturas FSN-3, FSN-4, FSN-5 e FSN-8 podem ser observadas entre 3245,5 e 3348,3 cm^{-1} e a deformação axial referente aos carbonos sp^3 do grupamento *terc*-butila (C-H) na estrutura FSN-7 apresentam estiramentos em 2963,4 cm^{-1}. Além

disso, nesta estrutura, foi possível identificar as deformações axiais simétricas e assimétricas características dos grupamentos metilênicos em 2904,7 cm^{-1} e 2869,5 cm^{-1}. As vibrações axiais referentes às ligações C-N características de substâncias nitro-aromáticas (FSN-6) foram observadas em 869,2 cm^{-1}.

Ainda, foi possível identificar os desdobramentos decorrentes dos padrões de substituição aromática tipos 1,2 *(orto)*, representada pela vibração em 748,8 cm^{-1} (FSN-3) e 750,8 cm^{-1} (FSN-8); 1,3 *(meta),* cujas deformações situam-se em 831,0 e 742,9 cm^{-1} (FSN-4); e 1,4 *(para)*, pelas vibrações que estão localizadas entre 836,9 e 845,1 cm^{-1} (FSN-5, FSN-6, FSN-7 e FSN-8).

O espectro de massas de alta resolução foi obtido no modo positivo por infusão direta para cada uma das substâncias hidrazônicas finais (moléculas FSN-1 a FSN-7) e encontram-se representados nos Apêndices 11, 18, 26, 34, 42, 50 e 58. A Tabela 6 apresenta os resultados da relação *m/z* e os desvios-padrão obtidos neste experimento.

Tabela 6. Resultados de adutos de hidrogênio obtidos por espectrometria de massas *(m/z)* e desvios-padrão para as substâncias finais *FSN-1 a FSN-7*.



MOLÉCULA: R	Fórmula estrutural	Massa monoisotópica teórica *(m/z)*	Aduto de hidrogênio $[M+H]^+$ *(m/z)*	Desvio-padrão
FSN-1: R = benzeno	$C_{45}H_{33}N_9O_6$	795,2554	796,2638	0,7130
FSN-2: R = 4-piridina	$C_{42}H_{30}N_{12}O_6$	798,2411	799,2495	0,7130
FSN-3: R = 2-hidroxibenzeno	$C_{45}H_{33}N_9O_9$	843,2401	844,2485	0,7130
FSN-4: R = 3-hidroxibenzeno	$C_{45}H_{33}N_9O_9$	843,2401	844,2490	0,7134
FSN-5: R = 4-hidroxibenzeno	$C_{45}H_{33}N_9O_9$	843,2401	844,2482	0,7128
FSN-6: R = 4-nitrobenzeno	$C_{45}H_{30}N_{12}O_{12}$	930,2106	931,2186	0,7128
FSN-7: R = 4-*t*-butilbenzeno	$C_{57}H_{57}N_9O_6$	963,4432	964,4511	0,7127

O espectro de massas obtido para cada uma das substâncias apresentou picos relativos aos adutos de hidrogênio consistentes com o valor de massa monoisotópica teórico com base nas fórmulas empíricas descritas na Tabela 6.

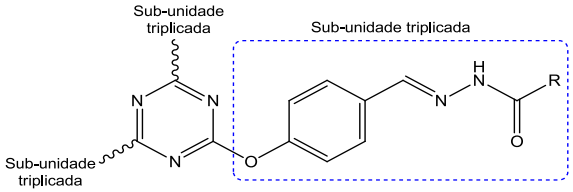
A análise por espectrofotometria na região do UV permitiu determinar a absortividade molar e obter os comprimentos de onda máximos de cada uma das substâncias. Os resultados encontram-se na Tabela 7 e os espectros obtidos encontram-se nos Apêndices 9, 16, 24, 32, 40, 48 e 56 e 64.

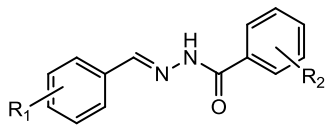
Para fins comparativos, realizou-se a análise por espectrofotometria na região do UV para as hidrazonas parentais das substâncias sintetizadas, submetendo-as às mesmas condições empregadas para as substâncias FSN-1 a FSN-8 (Tabela 7). Os comprimentos de onda máximo obtidos neste ensaio para os padrões resveratrol e

EHT foram de 267 e 326 nm, respectivamente. As hidrazonas sintetizados por Reis e colaboradores (2014) e usadas como protótipos (moléculas I, II e IV), bem como os derivados sintetizados resultantes da otimização molecular (FSN-1 a FSN-8) apresentaram comprimento de onda máximo entre 290 e 321 nm, indicando absorção máxima na região do UVB.

Ainda, sabe-se que a absortividade molar é uma característica intrínseca das substâncias sendo diretamente relacionada à concentração em solução (em g/L), massa molar, absorvância máxima obtida e caminho óptico percorrido (de 1 cm correspondente à largura da cubeta do equipamento) (Field *et al.*, 2008). Referente à absortividade molar, todas as substâncias sintetizadas neste trabalho (FSN-1 a FSN-8) apresentaram absortividade molar superior as hidrazonas parentais (moléculas I, II e IV).

Tabela 7. Resultados comparativos de absorvâncias, absortividades molar e comprimentos de onda máximo para as substâncias finais *N*-acil-hidrazônicas em relação aos protótipos sintetizados por Reis e colaboradores (2014).





MOLÉCULA: R	M (M)	$\lambda_{máx}$ (nm)	Abs (cm^{-1})	ε ($M^{-1}.L^{-1}.cm^{-1}$)	MOLÉCULA: R	M (M)	$\lambda_{máx}$ (nm)	Abs (cm^{-1})	ε ($M^{-1}.L^{-1}.cm^{-1}$)
FSN-1: R = benzeno	795,800	303,000	0,650	65,000	***Molécula I:** R1 = R2 = OH (*p*)	256,257	315,200	0,280	28,000
FSN-2: R = 4-piridina	798,760	306,200	0,563	56,300	***Molécula II:** R1 = OH (*m*, *m*), R2 = OH (*p*)	272,256	305,200	0,216	21,600
FSN-3: R = 2-hidroxibenzeno	843,800	316,200	0,790	79,000	***Molécula IV:** R1 = OH (*p*), R2 = *t*-butil (*p*)	296,364	316,600	0,314	31,400
FSN-4: R = 3-hidroxibenzeno	843,800	302,200	0,736	73,600	--------	--------	--------	--------	--------
FSN-5: R = 4-hidroxibenzeno	843,800	307,500	0,921	92,100	--------	--------	--------	--------	--------
FSN-6: R = 4-nitrobenzeno	930,790	308,800	0,574	57,400	--------	--------	--------	--------	--------
FSN-7: R = 4-*t*-butil benzeno	964,120	304,400	0,908	90,800	--------	--------	--------	--------	--------
FSN-8: R = 2,4-diidroxibenzeno	891,800	321,200	0,435	43,500	--------	--------	--------	--------	--------

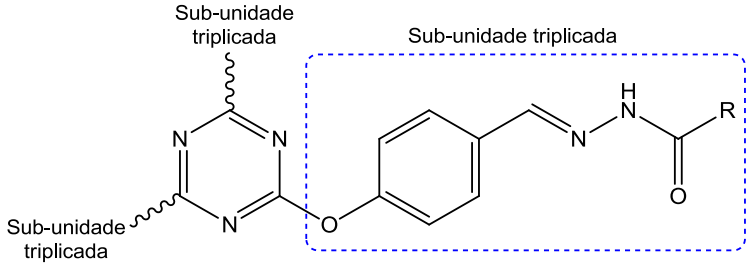
M: massa molar; Abs: absorvância no comprimento de onda máximo; ε: absortividade molar. *: protótipos sintetizados por Reis e colaboradores (2014).

5.2. Estudo de Estabilidade Térmica

O estudo de estabilidade térmica buscou analisar as substâncias FSN-1 a FSN-8 em relação aos padrões de resveratrol e EHT quanto à temperatura de fusão e decomposição, além da perda de água do sistema. Para a interpretação dos espectros de TG e DSC das substâncias analisadas foi utilizada a seguinte referência: Craig et al, 2007.

A Tabela 8 expressa os resultados obtidos para as substâncias FSN-1 a FSN-8 e padrões de resveratrol e EHT. Os gráficos que representam as curvas térmicas destas substâncias encontram-se representados nos Apêndices 10, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 66 e 67.

Tabela 8. Resultados de análise térmica para as substâncias finais *N*-acil-hidrazônicas e padrões (resveratrol e EHT).



MOLÉCULA: R	TEMPERATURA DE DECOMPOSIÇÃO (°C)	PERDA DE MASSA (%)	TEMPERATURA DE FUSÃO (°C)
FSN-1: R = benzeno	294,21	36,67	275,89
FSN-2: R = 4-piridina	236,25	36,76	235,60
FSN-3: R = 2-hidroxibenzeno	269,71	19,61	264,89
FSN-4: R = 3-hidroxibenzeno	297,87	18,66	248,22
FSN-5: R = 4-hidroxibenzeno	272,15	11,62	267,35
FSN-6: R = 4-nitrobenzeno	304,87	37,32	291,80
FSN-7: R = 4-*terc*-butilbenzeno	326,22	41,22	324,37
FSN-8: R = 2,4-diidroxibenzeno	309,94	39,81	218,88
RESVERATROL	266,95	32,85	263,46
EHT	232,29	68,72	119,99

As temperaturas de fusão das substâncias sintetizadas podem ser observadas entre 218 e 325°C e foram significativamente superiores ao padrão EHT (119,99°C). Além disso, todas as substâncias apresentaram perda de massa entre 11,62 e 41,22%, significativamente menor em relação ao padrão EHT (68,72%). Ainda, a temperatura de decomposição das substâncias sintetizadas foi observada entre 236,25°C (FSN-2) e 326,22°C (FSN-7), indicando estabilidade das mesmas quando submetidas a altas temperaturas.

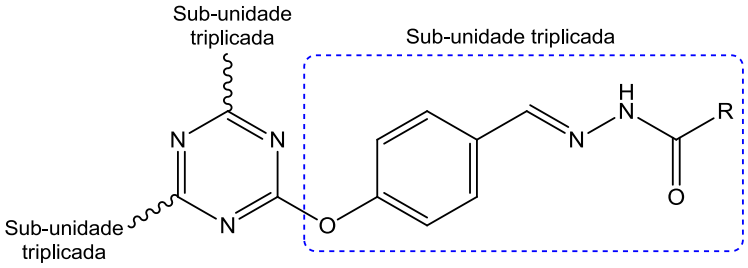
5.3. Ensaios in vitro

5.3.1. Estudo da atividade antioxidante

A capacidade antioxidante promovida pelas substâncias *N*-acil-hidrazônicas (FSN-1 a FSN-8) por meio da porcentagem de redução radicalar (porcentagem inibitória) do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), bem como os resultados de desvios-padrão após 30 minutos de reação encontram-se expressos na Tabela 9. Como controle negativo foi utilizada uma solução composta pelos solventes empregados nas diluições das substâncias ensaiadas e a solução alcoólica de DPPH nas mesmas quantidades dispensadas no ensaio. Como controle positivo foram utilizados ácido ascórbico, resveratrol e EHT (Brand-William *et al.*, 1995; Koleva *et al.*, 2002; Török *et al.*, 2013).

A substância FSN-8 apresentou atividade antioxidante superior a todas as substâncias sintetizadas e aos padrões de resveratrol e EHT em todas as concentrações analisadas. À exceção da substância FSN-8, as substâncias FSN-2, FSN-4 e FSN-5 apresentaram maior atividade antioxidante em relação às demais substâncias e não apresentaram diferença estatística relevante entre si (Tabela 9).

Tabela 9. Porcentagem de redução do DPPH (%) e desvios-padrão das substâncias finais em relação aos padrões (ácido ascórbico, resveratrol e EHT) em diferentes concentrações (µM).



Substâncias	Redução de DPPH (em %)						
	400 µM	300 µM	200 µM	100 µM	50 µM	25 µM	10 µM
FSN-1: R = benzeno	2,4 ± 0,7[a,r]	2,0 ± 0,5[a,r]	1,3 ± 0,2[a,r]	0,9 ± 0,2[a,r]	0,8 ± 0,4[a,r]	0,5 ± 0,3[a,r]	0,3 ± 0,4
FSN-2: R = 4-piridina	6,1 ± 0,5[a,e,r]	2,4 ± 0,6[a,r]	0,5 ± 0,2[a,r]	0,0[a,r]	0,0[a,r]	0,0[a,r]	0,0
FSN-3: R = 2-hidroxibenzeno	0,8 ± 0,5[a,e,r]	0,3 ± 0,1[a,e,r]	0,0[a,r]	0,0[a,r]	0,0[a,r]	0,0[a,r]	0,0
FSN-4: R = 3-hidroxibenzeno	6,3 ± 0,7[a,e,r]	5,8 ± 0,5[a,e,r]	4,4 ± 1,2[a,e,r]	4,2 ± 0,7[a,e,r]	3,7 ± 0,8[a,e,r]	2,6 ± 1,3[a,e,r]	1,1 ± 1,0
FSN-5: R = 4-hidroxibenzeno	8,2 ± 1,9[a,e,r]	6,7 ± 0,9[a,e,r]	5,6 ± 0,8 [a,e,r]	4,4 ± 1,3[a,e,r]	4,1 ± 1,2[a,e,r]	2,8 ± 0,8[a,e,r]	2,2 ± 1,0[a,e,r]
FSN-6: R = 4-nitrobenzeno	3,5 ± 0,4[a,r]	2,7 ± 0,7[a,r]	2,2 ± 0,4[a,r]	0,5 ± 0,4[a,r]	0,1 ± 0,2[a,r]	0,0[a,r]	0,0
FSN-7: R = 4-*t*-butilbenzeno	5,9 ± 0,6[a,e,r]	4,8 ± 0,4[a,e,r]	4,3 ± 0,6[a,e,r]	4,0 ± 0,5[a,e,r]	2,8 ± 0,3[a,e,r]	2,5 ± 0,3[a,e,r]	2,3 ± 0,2[a,e,r]
FSN-8: R = 2,4-diidroxibenzeno	75,6 ± 0,2[a,e,r]	75,3 ± 0,2[a,e,r]	74,2 ± 0,4[a,e,r]	55,3 ± 1,1[a,e,r]	31,8 ± 1,8[a,e,r]	18,5 ± 0,2[a,e,r]	8,9 ± 0,9[a,e,r]
AC ASC	82,1 ± 0,7	81,7 ± 0,4	81,5 ± 0,7	77,8 ± 0,3	44,2 ± 1,6	8,4 ± 0,9	0,0
RESV	62,2 ± 0,4	56,2 ± 0,4	55,9 ± 0,2	46,8 ± 0,2	24,1 ± 0,5	8,4 ± 0,9	0,0
EHT	3,5 ± 0,1	2,6 ± 0,3	1,6 ± 0,3	0,0	0,0	0,0	0,0

AC ASC corresponde ao ácido ascórbico; RESV corresponde ao resveratrol; ETH corresponde à etilhexiltriazona. [a]$p<0,05$ em relação ao padrão AC ASC. [e]$p<0,05$ em relação ao padrão EHT. [r]$p<0,05$ em relação ao padrão resveratrol.

Em todas as concentrações analisadas, as substâncias FSN-1 e FSN-6 não apresentaram diferença significativa entre si e em relação ao padrão EHT para os resultados de atividade antioxidante. A substância FSN-5, por sua vez, apresentou-se mais ativa em relação ao padrão EHT e a estas substâncias. Ainda, a substância FSN-5 apresentou atividade similar à substância FSN-4 para todas as

concentrações avaliadas. Já as substâncias FSN-4 e FSN-7, por sua vez, são estatisticamente comparáveis em todas as concentrações e, à exceção da concentração de 10 μM, ambas apresentaram atividade superior ao padrão EHT (Tabela 9).

5.3.2. Estudo da atividade fotoprotetora

As substâncias hidrazônicas triplicadas (FSN-1 a FSN-8) foram avaliadas quanto ao efeito fotoprotetor usando espectrofotometria de UV por transmitância difusa com esfera integradora. Os protótipos *N*-acil-hidrazônicos empregados para obtenção das moléculas triplicadas e previamente sintetizados por Reis e colaboradores (2014) também foram submetidos ao mesmo ensaio para fins de comparação.

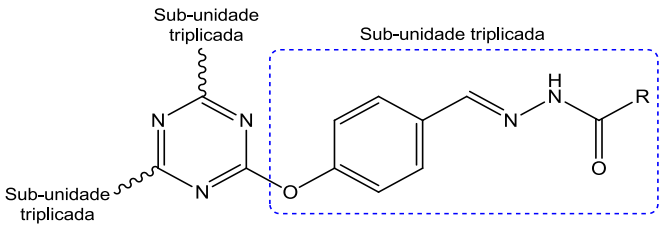
A Tabela 10 explicita as médias ± desvios-padrão dos resultados obtidos de FPS, FPUVA, razão UVA/UVB e λ_c no espectrofotômetro para os padrões (resveratrol e EHT), para as substâncias finais deste trabalho (FSN-1 a FSN-8) e para os protótipos obtidos no estudo desenvolvido por Reis e colaboradores (2014), incorporados em emulsão na concentração 5%.

A análise estatística mostrou que FSN-3 é a substância protetora mais efetiva contra as radiações UVA e UVB se comparado às demais substâncias sintetizadas, aos padrões empregados neste experimento e aos protótipos. Também merece destaque a substância FSN-7, que apresentou atividade superior aos padrões resveratrol e EHT, aos protótipos e também em relação às substâncias FSN-1, FSN-2, FSN-4, FSN-5, FSN-6 e FSN-8 para os parâmetros de FPS e FPUVA. Além disso, a atividade fotoprotetora contra as radiações UVA e UVB da substância FSN-1 se

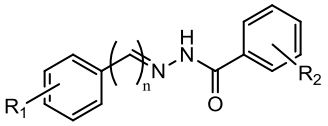
sobressaiu em relação aos padrões, aos protótipos e em relação às substâncias FSN-2, FSN-4, FSN-5, FSN-6 e FSN-8 (Tabela 10).

Tabela 10. Médias ± desvios-padrão dos resultados obtidos no espectrofotômetro para as substâncias FSN-1 a FSN-8 em relação aos padrões resveratrol e EHT, e para os protótipos (moléculas I a VIII) (Reis *et al.*, 2014), na concentração de 5% em emulsão.

MOLÉCULAS FSN-1 a FSN-8



MOLÉCULAS I a VIII



Substâncias	Parâmetros			
	FPS	FPUVA	UVA/UVB	λ_c
FSN-1: R = benzeno	9 ± 0,1[e,r]	5 ± 0,5[e,r]	0,6 ± 0,1	371 ± 2
FSN-2: R = 4-piridina	5 ± 0,2[r]	3 ± 0,1	0,4 ± 0,0	365 ± 2
FSN-3: R = 2-hidroxibenzeno	17 ± 0,6[e,r]	13 ± 0,9[e,r]	0,7 ± 0,0	371 ± 1
FSN-4: R = 3-hidroxibenzeno	4 ± 1,7	2 ± 0,3	0,4 ± 0,0	356 ± 3
FSN-5: R = 4-hidroxibenzeno	7 ± 0,8[e,r]	4 ± 0,5[r]	0,5 ± 0,0	363 ± 3
FSN-6: R = 4-nitrobenzeno	4 ± 0,2	3 ± 0,1	0,8 ± 0,0	383 ± 2
FSN-7: R = 4-*t*-butilbenzeno	14 ± 1,7[e,r]	7 ± 0,6[e,r]	0,5 ± 0,0	360 ± 1
FSN-8: R = 2,4-diidroxibenzeno	3 ± 0,2	2 ± 0,2	0,5 ± 0,1	382 ± 1
RESVERATROL	2 ± 0,2	2 ± 0,3	0,7 ± 0,1	359 ± 2
EHT	3 ± 0,3	3 ± 0,1	0,8 ± 0,0	382 ± 2
***I:** R1 = R2 = OH (*p*), n=1	2 ± 0,2	2 ± 0,2	0,8 ± 0,0	377 ± 1
***II:** R1 = OH (*m*, *m*), R2 = OH (*p*), n=1	3 ± 0,2	3 ± 0,2	0,6 ± 0,0	364 ± 0
***III:** R1 = OH (*m*, *m*), R2 = *t*-butil (*p*), n=1	2 ± 0,1	2 ± 0,2	0,5 ± 0,1	361 ± 1
***IV:** R1 = OH (*p*), R2 = *t*-butil (*p*), n=1	2 ± 0,1	2 ± 0,2	0,8 ± 0,1	381 ± 2
***V:** R1 = OCH_3 (*p*), R2 = OH (*p*), n=2	2 ± 0,2	2 ± 0,2	1,0 ± 0,1	387 ± 1
***VI:** R1 = OCH_3 (*p*), R2 = *t*-butil (*p*), n=2	3 ± 0,2	4 ± 0,2	1,0 ± 0,1	385 ± 0
***VII:** R1 = OCH_3 (*m*), OH (*p*), R2 = OH (*p*), n=2	3 ± 0,1	2 ± 0,1	1,4 ± 0,0	388 ± 0
***VIII:** R1 = OCH_3 (*m*), OH (*p*), R2 = *t*-butil (*p*), n=2	2 ± 0,1	2 ± 0,1	1,1 ± 0,0	387 ± 0

[e]p<0,05 em relação ao padrão EHT. [r]p<0,05 em relação ao padrão resveratrol. *: correspondem aos protótipos de resveratrol (Reis *et al.*, 2014).

As substâncias FSN-2, FSN-4 e FSN-6 não apresentaram diferença relevante entre si para os parâmetros FPS e FPUVA, sendo a substância FSN-2 mais ativa em relação ao resveratrol para FPS. Ainda, FSN-2 apresenta atividade fotoprotetora

UVA e UVB superior à substância FSN-8, e é estatisticamente comparável à substância FSN-5. Este, por sua vez, apresenta atividade fotoprotetora UVB mais efetiva que os padrões considerados e em relação aos protótipos, sendo mais ativo contra a radiação UVA quando comparado ao resveratrol.

6. Discussão

6.1. Síntese do 4,4',4"-((1,3,5-triazina-2,4,6-tril)tri(oxi))tribenzaldeído (intermediário 1)

O mecanismo reacional para a síntese do intermediário 1 envolveu a reação de substituição nucleofílica aromática, regido pela adição do nucleófilo seguido pela eliminação do grupo abandonador conforme representada na Figura 21 (Solomons *et al.*, 2009; Bruice, 2006; Zhou *et al.*, 2012).

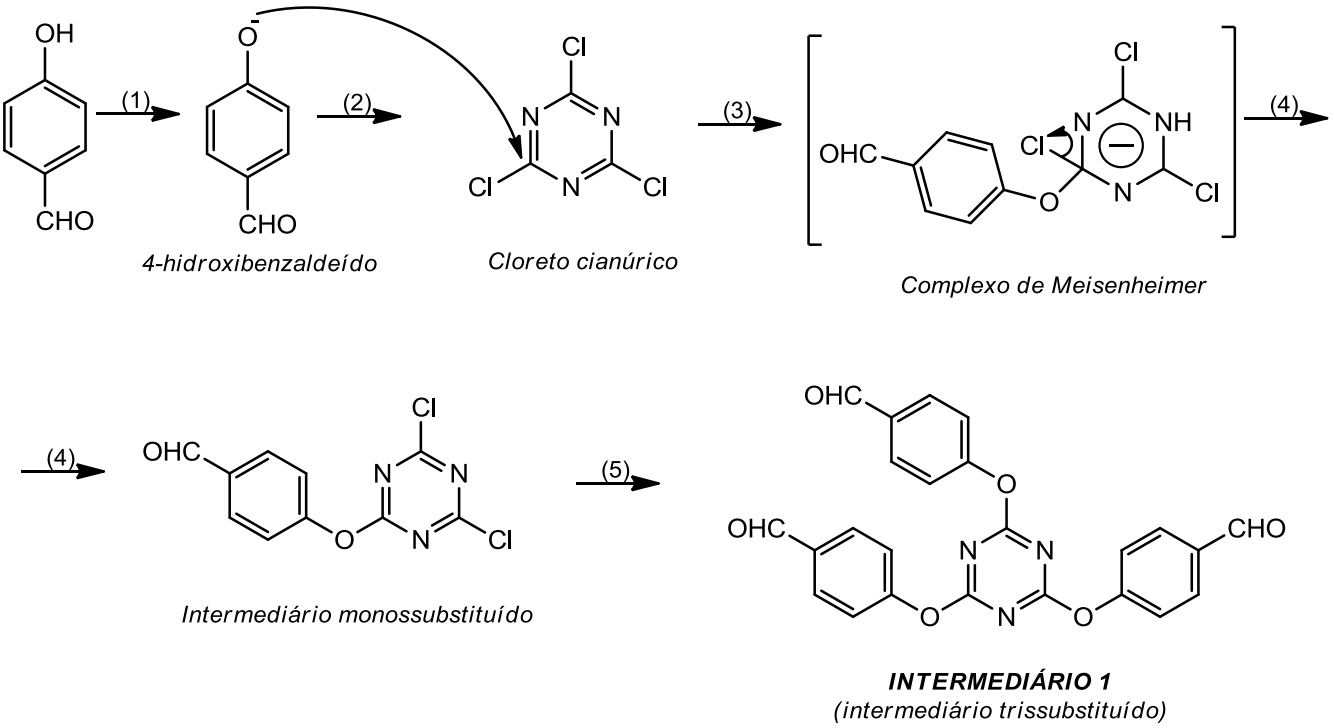


Figura 21. Mecanismo geral de formação do intermediário aldeídico funcionalizado.

Assim, inicialmente a função fenol presente no 4-hidroxibenzaldeído, quando em meio fortemente básico, é desprotonado transformando-se em um fenóxido que atua como nucleófilo da reação (etapa 1). O fenóxido promove, então, um ataque nucleofílico ao carbono sp^2 da triazina, o qual encontra-se em deficiência eletrônica

devido às espécies eletroatratoras adjacentes. Esta etapa lenta da reação é denominada etapa de adição (etapa 2). A etapa de adição produz um carbânion denominado *Complexo de Meisenheimer*, um intermediário aniônico estabilizado por ressonância (etapa 3). Em seguida, o anel benzênico sofre re-aromatização pela saída do grupo abandonador (etapa rápida de eliminação), formando o intermediário monossubstituído (etapa 4).

Para a obtenção de intermediários dissubstituídos e trissubstituídos do cloreto cianúrico, foi necessário fornecer energia ao sistema (temperatura de 60°C), incorporar o catalisador de paládio (paládio tetrakis trifenilfosfina) ao meio reacional e adequar a estequiometria para a formação do intermediário de interesse (intermediário 1) (etapa 5).

Inicialmente, o paládio tetrakis trifenilfosfina é reduzido e perde um ligante de sua estrutura. Em seguida, este paládio zero-valente é acoplado ao intermediário monossubstituído (previamente formado no meio reacional) por meio da reação de adição oxidativa. Posteriormente, ocorre a transmetalação, em que o halogênio se liga ao paládio formando o complexo de coordenação. A última etapa consiste na eliminação redutiva, em que o grupo de saída (cloro) coordenado ao paládio é eliminado, possibilitando a ligação ao 4-hidroxibenzaldeído e regeneração do paládio zero-valente, levando à formação do intermediário dissubstituído. A obtenção do intermediário trissubstituído (intermediário 1) se dá pelo mesmo mecanismo de reação (Fleckenstein *et al*., 2010; Nobre, 2008). A presença do paládio catalisa reações de acoplamento uma vez que, após formação do intermediário monossubstituído (Figura 21), há diminuição da eletrofilicidade dos carbonos sp^2 presentes no núcleo triazínico, o que dificultaria a substituição nucleofílica direta (como ocorre na obtenção do derivado monossubstituído).

6.2. Síntese das substâncias N-acil-hidrazônicas finais

O mecanismo da reação entre o derivado aldeídico (intermediário 1) e as hidrazidas é representada na Figura 22.

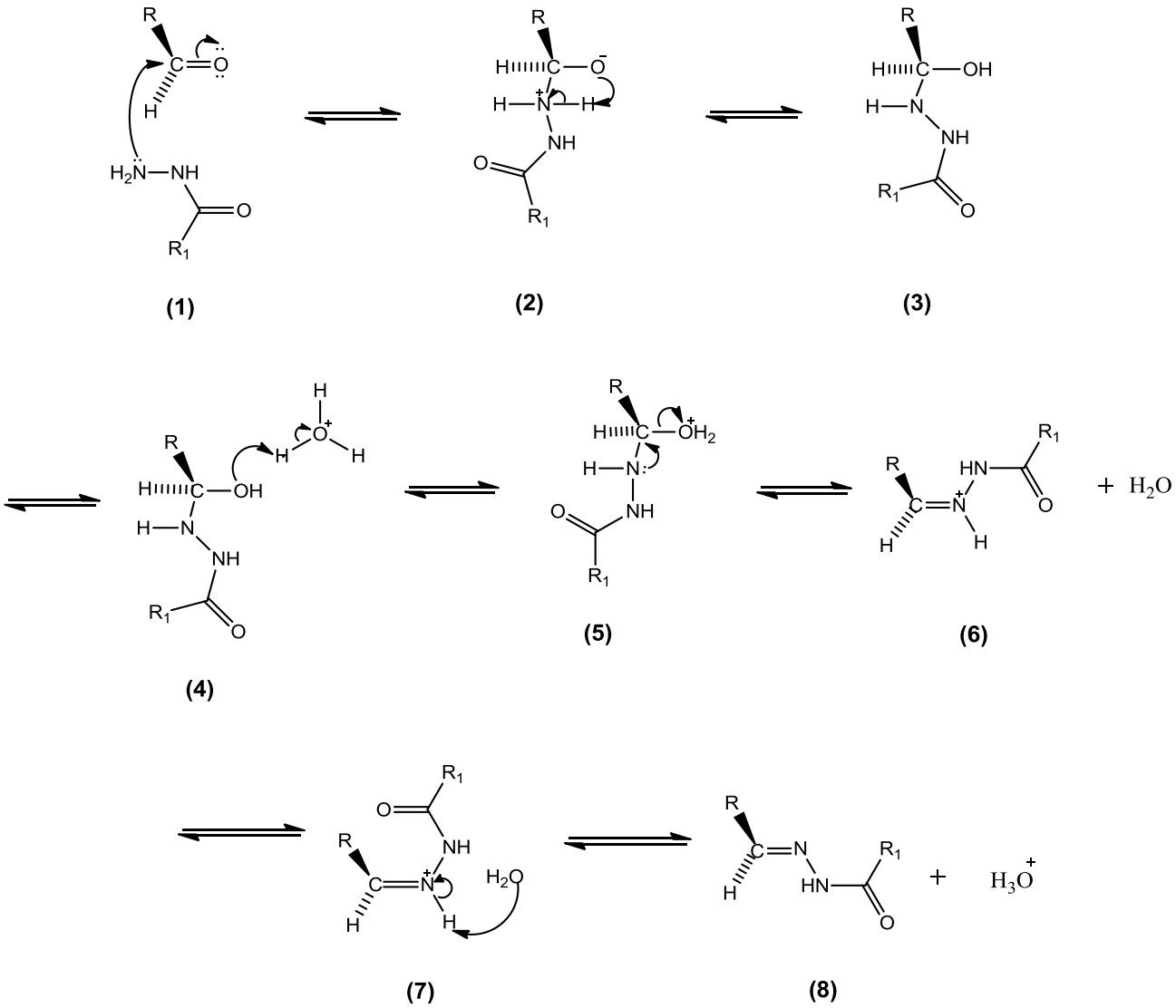


Figura 22. Mecanismo geral para obtenção de hidrazonas (Mcmurry, 2011).

Inicialmente, um ataque nucleofílico ao aldeído pelos pares de elétrons da amina hidrazídica (1) leva a um intermediário tetraédrico dipolar (2). O próton ligado ao nitrogênio é transferido ao oxigênio (2), formando a carbinolamina neutra (3). O catalisador ácido protona a hidroxila recém-formada (4), promovendo a desidratação

molecular (5) e subsequente formação do íon imínio (6). Este é desprotonado pelo reestabelecimento do catalisador ácido (7) permitindo, assim, a formação da hidrazona (8) (Mcmurry, 2011).

6.3. Estudo de Estabilidade Térmica

De acordo com a Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria (ICTAC), a análise térmica pode ser definida como um grupo de técnicas nas quais propriedades físicas ou químicas de uma substância são monitoradas em função da temperatura e tempo, enquanto a substância, sob atmosfera específica, é submetida a um programa controlado de temperatura. Estas técnicas viabilizam a obtenção de informações referentes à variação de massa, pontos de fusão e ebulição, calor de transição, pureza, diagramas de fase, cinética de reação, estudo de catalisadores, dentre outros (Ionashiro, 2004).

De modo geral, o estudo de estabilidade térmica é diretamente associado à atividade de uma substância, uma vez que variações de temperatura podem promover alterações químicas e físicas nas moléculas, podendo levar à redução significativa ou perda na atividade específica de uma substância, ou originar subprodutos tóxicos.

Dentre as técnicas termoanalíticas mais difundidas, encontram-se a análise termogravimétrica (TG) e a análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) (Ionashiro, 2004).

A análise termogravimétrica (TG) descreve o método experimental no qual as alterações na massa da substância (perda ou ganho) são determinadas em função da temperatura e tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. Esta técnica permite detectar quaisquer alterações que o

aquecimento possa promover na amostra, permitindo estabelecer e mensurar processos químicos (por exemplo, decomposição, oxidação e combustão) e físicos (por exemplo, desidratação e sublimação), que ocorrem quando a substância analisada é aquecida ou resfriada. Esta técnica tem sido amplamente empregada nas ciências farmacêuticas com o objetivo de mensurar o intervalo de temperatura em que a desidratação de determinadas substâncias ocorre, sendo em substância sólida ou incorporada a um sistema contendo excipientes (Craig *et al.*, 2007).

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é a técnica termoanalítica que permite mensurar as variações de energia térmica a fim de manter em equilíbrio as temperaturas da amostra e do material de referência enquanto submetidos a um sistema linear de aquecimento. Tais variações de energia térmica são provenientes da liberação ou absorção de calor, as quais ocorrem devido à alteração no estado físico ou químico da amostra durante o evento térmico (Souza, 2011). Deste modo, é possível avaliar as variações entálpicas que ocorrem em uma determinada substância durante o processo de aquecimento ou resfriamento, permitindo associar temperatura e energia a uma variedade de eventos térmicos. Em geral, transições de fase (fusão, ebulição, congelação e inversões de estrutura cristalina) e desidratações produzem eventos endotérmicos, enquanto cristalizações e oxidações produzem eventos exotérmicos; reações de decomposição podem promover eventos endo ou exotérmicos (Craig *et al.*, 2007; Ionashiro, 2004).

Assim, todas as substâncias sintetizadas (FSN-1 a FSN-8) apresentam eventos endotérmicos, resultantes do rompimento de ligações intermoleculares (fusão), e subsequentes eventos exotérmicos, resultantes do rompimento da estrutura cristalina de cada substância (decomposição).

Os termogramas de TG evidenciaram um evento de perda de massa de 5 a 10% para as substâncias FSN-1 a FSN-7 e de 80% para a substância FSN-8 a partir da temperatura ambiente até 100°C, sendo que este evento poderia ser atribuído à desidratação das amostras.

Todas as substâncias apresentaram perda de massa significativamente menor em relação ao padrão EHT, resultado evidenciado pela menor temperatura de fusão apresentada por este padrão (119,99°C) em detrimento das substâncias sintetizadas (acima de 218°C). Além disso, a menor perda de massa observada no primeiro evento térmico para as substâncias FSN-3, FSN-4 e FSN-5 (entre 11,62 e 19,61%) pode estar relacionada à presença do anel monohidroxilado presente nestas estruturas.

O estudo demonstra, também, que as substâncias FSN-2, FSN-3, FSN-5 e FSN-7 apresentaram eventos de fusão e decomposição ocorrendo simultaneamente, sendo que a temperatura de decomposição pode ser evidenciada no ínicio do primeiro evento de perda de massa de cada substância.

6.4. Ensaios in vitro

6.4.1. Estudo da atividade antioxidante

É sabido que a radiação ultravioleta aumenta a produção de radicais livres causando danos ao organismo. Assim, o efeito deletério promovido pelos radicais livres sobre as células e sua associação às doenças, atuando como causador ou agravante, impulsionou a busca por novas substâncias capazes de prevenir ou minimizar os danos oxidativos celulares (Alam *et al.*, 2013; Borut *et al.*, 2012; Halliwell *et al.*, 2010; Tinkel *et al.*, 2012).

Em virtude da diversidade de radicais livres e seus diferentes mecanismos de atuação nos organismos vivos, muitos protocolos e diretrizes têm sido estabelecidos no sentido de trazer concordância de resultados de modo rápido e simples.

Dentre os vários ensaios empregados para a determinação da atividade antioxidante de substâncias, alguns são comumente empregados, tais como: teste do radical DPPH, TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* ou teste do radical ABTS), método da co-oxidação do β-caroteno/ácido linoléico, sequestro do peróxido de hidrogênio, ORAC (*Oxygen-Radical Absorbancy Capacity* ou sequestro do radical peroxil) e SOD (Superóxido dismutase, ou sequestro de radical superóxido). Entretanto, tais metodologias apresentaram algumas limitações, inviabilizando seu uso para as substâncias sintetizadas neste trabalho (David *et al.*, 2010).

O ensaio TEAC, por exemplo, requer preparo de soluções de 12 a 16 h antes do início do ensaio. Além disso, substâncias com atividade antioxidante podem reagir com o oxidante responsável pela geração do radical ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, um sal de diamônio) levando à superestimação da capacidade antioxidante. Ainda, uma vez que os resultados obtidos para as substâncias antioxidantes apresentam diferentes comportamentos cinéticos entre si, o tempo de análise não é constante e, sendo assim, o tempo de reação é dependente da reação com cada substância, dificultando a padronização do método (Magalhães *et al.*, 2008; Prior *et al.*, 2005).

O principal inconveniente no emprego do método da co-oxidação do β-caroteno/ácido linoléico para avaliação das substâncias deste trabalho consiste na interação do β-caroteno com o oxigênio proveniente do meio, dificultando a interpretação dos resultados (David *et al.*, 2010; von Gadow *et al.*, 1997).

O sequestro do peróxido de hidrogênio é uma metodologia que consiste na oxidação da escopoletina pela peroxidase em presença de peróxido de hidrogênio. Assim, o substrato inicialmente fluorescente (escopoletina) produzirá uma substância isenta de fluorescência na presença de agente antioxidante. Entretanto, existe a necessidade de se verificar se a substância a ser avaliada não atua como substrato para a peroxidase, o que poderia influenciar na fluorescência por meio da competição com a escopoletina (Corbett, 1989; David *et al.*, 2010).

O método ORAC, ou sequestro do radical peroxil, também é um ensaio fluorimétrico e apresenta duas limitações principais: os indicadores fluorescentes empregados atualmente são reativos em presença de polifenóis, e pequenas variações de temperatura nos poços das microplacas podem afetar a reprodutibilidade do ensaio (Cao *et al.*, 1999; David *et al.*, 2010).

O método enzimático SOD utiliza o sistema xantina/xantina-oxidase para quantificação do potencial antioxidante das substâncias. Entretanto, a ausência de planaridade molecular e as interações estéricas presentes em polifenóis reduzem o efeito inibidor sobre a xantina-oxidase, produzindo, consequentemente, resultados inconsistentes (Barreiros *et al.*, 2006; Barreiro, 2001).

Uma das técnicas mais utilizadas para avaliar a capacidade antioxidante de substâncias consiste na utilização do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•). Devido à simplicidade, rapidez, consistência e reprodutibilidade, esta metodologia foi selecionada para a realização do *screening* das substâncias sintetizadas neste trabalho (Koleva *et al.*, 2002).

A molécula de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é caracterizada como um radical orgânico livre e estável em virtude da delocalização do elétron livre ao longo da molécula, porém com capacidade de se reduzir quando em solução alcoólica na

presença de um doador de hidrogênio (antioxidante). Visualmente, este efeito eletrônico resulta na intensa coloração violeta da solução inicial de DPPH que, após a redução, é convertido em derivado de coloração amarela, conforme representado na Figura 23 (Blois *et al.*, 1958).

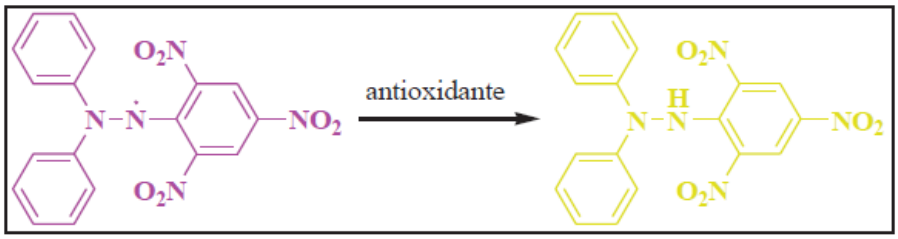


Figura 23. Reação do radical DPPH na presença de um agente antioxidante (Molyneux, 2004).

Este ensaio consiste na quantificação do DPPH radicalar remanescente em um comprimento de onda pré-determinado e fixado entre 515 e 528 nm, após um tempo de reação pré-definido. Os resultados de absorvância decrescem à medida que a redução radicalar ocorre e, sendo assim, o decréscimo nos resultados de absorvância são inversamente proporcionais à capacidade antioxidante da substância (Bondet *et al.*, 1997; Brand-William *et al.*, 1995; Koleva *et al.*, 2002; Molyneux, 2004; Török *et al.*, 2013).

Um estudo realizado por Török e colaboradores (2013) identificou que substâncias que apresentam estrutura eletrônica conjugada apresentam maior atividade antioxidante por serem potencialmente oxidáveis. Além disso, foi constatado que estruturas que apresentavam heteroátomo com pares de elétrons não ligantes sequestravam mais efetivamente os radicais livres.

Diversos estudos também relacionam o padrão de substituição e a quantidade de hidroxilas aromáticas ao potencial antioxidante da substância analisada. Neste contexto, Pannala e colaboradores (1998) demonstraram que os ácidos caféico,

clorogênico e ferúlico (Figura 24) apresentaram atividade antioxidante mais efetiva dentre todas as substâncias analisadas, por exibirem hidroxila na posição *para* do anel aromático. Neste mesmo trabalho, os pesquisadores atribuíram a menor atividade antioxidante do ácido ferúlico em relação aos ácidos caféico e clorogênico devido ao seu anel monohidroxilado (Pannala *et al.*, 1998; Pannala *et al.*, 2001; Török *et al.*, 2013).

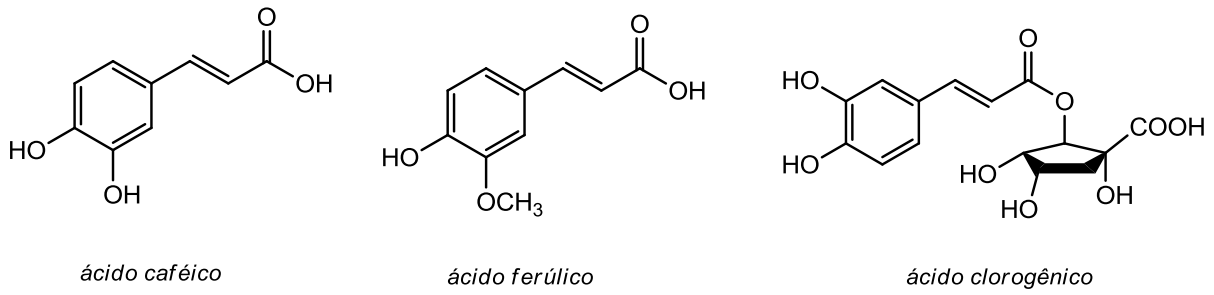


Figura 24. Representação estrutural dos ácidos caféico, ferúlico e clorogênico.

Assim sendo, a análise estatística mostrou que todas as substâncias sintetizadas apresentam capacidade antioxidante, provavelmente devido à presença de ligações duplas conjugadas estruturais. Entretanto, esta atividade foi inferior para todas as substâncias comparada ao ácido ascórbico.

A maior capacidade antioxidante da substância FSN-8 em relação às demais substâncias sintetizadas pode ser atribuída à presença de anéis aromáticos *o,p*-diidroxilados em sua estrutura. Neste mesmo contexto, à exceção da substância FSN-8, as substâncias FSN-2, FSN-4 e FSN-5 apresentaram maior atividade antioxidante em relação às demais, provavelmente pela presença de hidroxilas aromáticas (FSN-4 e FSN-5) e heteroátomos aromáticos em posição *para* (FSN-2) nestas estruturas.

Embora a substância FSN-3 apresente hidroxilas aromáticas, sua capacidade antioxidante é estatisticamente inferior à substância FSN-5 possivelmente devido à posição que estes grupamentos ocupam nos anéis aromáticos de cada substância, sendo a posição *para* (FSN-5) favorecida em detrimento da posição *orto* (FSN-3).

6.4.2. Estudo da atividade fotoprotetora

Diversas são as metodologias disponíveis na literatura para a avaliação do efeito fotoprotetor e, dentre estas, foi selecionado para este trabalho o método de espectrofotometria de UV por transmitância difusa com esfera integradora. Este método consiste na incidência de luz sob uma esfera integradora que coleta a luz dispersada em todos os ângulos. Esta esfera concentra toda a luz incidida e a direciona à amostra que, por sua vez, encontra-se uniformemente espalhada sobre uma superfície que mimetiza a pele humana. Esta metodologia apresenta boa correlação com resultados *in vivo* e, aliado ao baixo custo e confiabilidade quanto à medição dos filtros orgânicos incorporados, consiste no método de escolha para avaliações da atividade fotoprotetora *in vitro* realizadas em indústrias cosméticas durante a etapa de desenvolvimento de produtos (Springsteen *et al.*, 1999; Velasco *et al.*, 2011).

Para comprovar a eficácia *in vitro* dos fotoprotetores, este ensaio espectrofotométrico avalia os seguintes parâmetros analíticos: fator de proteção solar (FPS), fator de proteção contra radiação UVA (FPUVA), razão UVA/UVB (gradação de *Boots Star*) e comprimento de onda crítico (λ_c).

O fator de proteção solar (FPS) está intimamente associado à formação de eritema após a exposição à radiação UVB. Sendo assim, este parâmetro foi instituído na tentativa de fornecer um índice de proteção frente à radiação UVB de

uma determinada preparação. Por outro lado, o fator de proteção UVA (FPUVA) relaciona-se à pigmentação de pele após a exposição à radiação UVA e, assim sendo, este parâmetro fornece um índice de proteção frente à radiação UVA (Brasil, 2012). Uma vez que este ensaio espectrofotométrico é capaz de medir a transmitância espectral nos comprimentos de onda entre 290 e 400 nm, foi possível a obtenção de resultados de FPS e FPUVA.

Além destes parâmetros, é possível calcular a razão das áreas sobre a curva UVA em relação à UVB (UVA/UVB). De acordo com Springsteen e colaboradores (1999), este resultado pode ser expresso em asteriscos *(*gradação de *Boots Star)* e relacionado ao grau de proteção da radiação UVA em relação à radiação UVB, conforme representado no Quadro 2 (Springsteen *et al.*, 1999; Velasco *et al.*, 2011).

Quadro 2. Representação relacionada à razão UVA/UVB *(*gradação de *Boots Star)* (Springsteen *et al.*, 1999; Velasco *et al.*, 2011).

PROTEÇÃO CONTRA RADIAÇÃO UVA		
Razão UVA/UVB (r)	**Representação**	**Descrição[a]**
0,0 ≤ r < 0,2	------	Muito baixa
0,2 ≤ r < 0,4	*	Moderada
0,4 ≤ r < 0,6	**	Boa
0,6 ≤ r < 0,8	***	Superior
0,8 ≤ r < 0,9	****	Máxima
r ≥ 0,9	*****	Ultra

[a] relaciona a razão UVA/UVB (proteção contra a radiação UVA) à quantidade de asteriscos.

Além disso, é possível associar o comprimento de onda crítico (λ_c) à proteção UVA, conforme descrito no Quadro 3 (Springsteen *et al.*, 1999; Velasco *et al.*, 2011).

Quadro 3. Intervalo de comprimentos de onda críticos (λ_c) e sua relação com a razão UVA/UVB (Velasco *et al.*, 2011).

λ_c	Nível de proteção UVA (razão UVA/UVB)
340 nm ≤ λ_c < 370 nm	Intermediário
λ_c > 370 nm	Alto

De acordo com a RDC nº 30 publicada em junho/2012 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o comprimento de onda crítico (λ_c) é definido como "o comprimento de onda para o qual a área sob a curva integrada de densidade óptica que começa em 290 nm é igual a 90% da área integrada entre 290 e 400 nm". Para que um fotoprotetor seja considerado adequado à proteção UVA, deve apresentar valor de λ_c superior a 340 nm (Quadro 3). Porém, uma vez que este parâmetro não considera o espectro na sua totalidade, é possível que produtos com mesmos resultados de λ_c resultem em diferentes intensidades de proteção efetiva contra a radiação UVA (Springsteen *et al.*, 1999; Velasco *et al.*, 2011).

Em relação aos padrões de referência para esta análise, é relatado que o resveratrol e o EHT são filtros de proteção UVB. Entretanto, uma vez que seus λ_c apresentam valores compreendidos entre 340 e 370 nm, estes filtros podem apresentar proteção intermediária contra a radiação UVA (Quadro 3) (Afaq *et al.*, 2003; F'guyer *et al.,* 2003; Shnyder, 2011). Embora os padrões resveratrol e EHT não se classifiquem como filtros UVA característicos, estas substâncias foram submetidas à análise estatística quanto à FPUVA uma vez que os resultados obtidos indicaram proteção contra a radiação UVA como "intermediária" de acordo com a classificação relatada por Springsteen e colaboradores (1999) e Velasco e colaboradores (2011), além de serem classificados como um filtro UVA "superior" (***) em relação à radiação UVB, segundo a gradação de *Boots Star* (2004).

A análise inicial permitiu classificar todas as substâncias sintetizadas como potenciais filtros solares orgânicos, por apresentarem estruturas que possibilitam a transição de pares de elétrons livres devido à presença de sistemas aromáticos associados a grupos doadores de elétrons (preferencialmente *orto* ou *para*-aromáticos), sistemas conjugados e carbonilas (Cruz, 2008; Flor *et al.*, 2007; Shaat, 1997). Este tipo de configuração química permite a absorção em comprimentos de onda altamente energéticos, correspondentes ao espectro UV, e subsequente conversão em radiações de baixa energia (acima de 400 nm) (Correa, 2012). Assim, devido ao aumento do sistema conjugado em relação às moléculas protótipos I a VIII, observou-se um aumento na capacidade fotoprotetora (FPS e FPUVA) para as substâncias FSN-1, FSN-2, FSN-3, FSN-5 e FSN-7. As substâncias FSN-4, FSN-6 e FSN-8 tiveram resultados estatisticamente semelhantes ao protótipo VI (Tabelas 7 e 10).

Além disso, as substâncias FSN-3, FSN-5 e FSN-7 apresentaram resultados promissores para fotoproteção. Ainda, a substância FSN-3 apresentou resultado superior aos demais, provavelmente pela presença do grupamento *o*-hidroxilado, favorecendo a transição eletrônica (atuação como filtro UV), além de possibilitar a formação do isômero *enol*, responsável pela atividade de filtro UVA (Bahia, 2003; Shaat, 1997).

Embora a molécula FSN-1 não apresente substituição aromática, sua conjugação estrutural e a presença das carbonilas garantiram resultados promitentes de FPS e FPUVA para esta substância.

A estrutura *m*-hidroxilada, representada pela substância FSN-4, não apresentou resultados significativos se comparado às demais estruturas, provavelmente devido ao seu padrão de substituição (*m*-aromática). Além disso, foi

observado que substâncias que apresentam nitrogênio como substituição *p*-aromática formando heterociclos, como ocorre no anel 4-piridina da substância FSN-2, ou em nitrocompostos, como ocorre na estrutura FSN-6, apresentaram resultados inferiores de fotoproteção (FPS e FPUVA), em relação às substâncias *orto* (FSN-3) e *para*-hidroxilados (FSN-5).

Quanto às classificações anteriormente descritas (λ_c e gradação de *Boots Star*), a análise dos resultados permitiu agrupar todas as substâncias hidrazônicas sintetizadas como potenciais filtros UVA com proteção intermediária para esta radiação, à exceção das substâncias FSN-6 e FSN-8, uma vez que todas possuem λ_c no intervalo entre 340 e 370 nm (Quadros 2 e 3). As substâncias FSN-6 e FSN-8 apresentaram λ_c acima de 370 nm sugerindo alta proteção contra a radiação UVA (Quadros 2 e 3). Além disso, a eficácia dos potenciais filtros UVA pode ser comparada em relação à proteção UVB, de acordo com a Tabela 10. Assim, FSN-4 apresentou proteção UVA moderada (*) em relação à proteção UVB e FSN-3 e FSN-6 exibiram proteção superior (***) UVA em relação à proteção UVB. As demais substâncias (FSN-1, FSN-2, FSN-5, FSN-7 e FSN-8) exercem boa (**) atividade fotoprotetora UVA se comparada à proteção UVB. Tal informação é relevante para a classificação frente ao potencial fotoprotetor de cada substância analisada (incluindo os padrões resveratrol e EHT). Entretanto, o parâmetro λ_c empregado em ambas as classificações considera apenas 90% da curva integral de cada substância. Por outro lado, é importante salientar que o máximo de absorção na região do ultravioleta para todas as substâncias sintetizadas é dado na região do UVB, conforme descrito na Tabela 7. Uma vez que as substâncias apresentam máximo de absorção na região UVB (Tabela 7) e também são consideradas promissores filtros UVA (Tabela 10 e Quadros 2 e 3), a análise destes resultados sugere que todas as

substâncias apresentam amplo espectro de absorção e, assim sendo, apresentam atividade protetora em relação às radiações UVA e UVB, simultaneamente, com resultados que variam entre 2 e 17 quando considerados os parâmetros FPS e FPUVA.

7. Conclusões

Foram obtidos oito produtos finais inéditos pela estratégia de triplicação molecular, uma importante ferramenta que permitiu aumentar as ligações conjugadas de sistemas contendo ligações duplas (protótipos I a VIII), a fim de maximizar o poder absortivo das novas substâncias. Os rendimentos reacionais dos novos produtos obtidos variaram entre 52,6 e 88,4%.

Todos os produtos obtidos foram isolados e caracterizados usando métodos analíticos, como cromatografia em camada delgada, espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^{1}H e de ^{13}C (mono e bidimensionais), espectrometria de massas e espectrofotometria de absorção nas regiões de infravermelho e ultravioleta.

Todas as substâncias exibiram temperatura de fusão acima de 218°C, significativamente superior ao padrão EHT (119°C). Além disso, foi observada a decomposição das substâncias entre 236 (FSN-2) e 326°C (FSN-7), superior ao padrão EHT, sugerindo maior estabilidade térmica dos compostos em relação a este protótipo.

A substância FSN-8 apresentou capacidade antioxidante superior em relação às demais substâncias sintetizadas e aos padrões resveratrol e EHT. Além disso, as substâncias FSN-2, FSN-4, FSN-5 e FSN-7 também demonstraram atividade antioxidante, embora menos efetiva, se comparado à substância FSN-8 e ao padrão resveratrol.

Todas as substâncias apresentaram atividade protetora em relação às radiações UVA e UVB, simultaneamente, com resultados que variaram entre 2 e 17 quando considerados os parâmetros FPS e FPUVA. Particularmente, a substância FSN-3 exibiu a atividade fotoprotetora mais efetiva, com valores de FPS de 17 e

FPUVA de 13. A substância FSN-7 (FPS 14; FPUVA 7) apresentou-se mais ativa em relação aos padrões, aos protótipos sintetizados por Reis e colaboradores (2014) e às substâncias FSN-1, FSN-2, FSN-4, FSN-5, FSN-6 e FSN-8. O efeito fotoprotetor da substância FSN-1 é mais efetivo em relação aos padrões, às substâncias FSN-2, FSN-4, FSN-5, FSN-6 e FSN-8 e aos protótipos I, II, III, IV, V, VII e VIII sintetizados por Reis e colaboradores (2014).

Estes dados permitem concluir que as novas substâncias sintetizadas apresentam efeito fotoprotetor significativo, sobretudo FSN-3 e FSN-7, e constituem-se como promissores filtros solares, uma vez sua capacidade fotoprotetora foi superior ao ativo fotoprotetor utilizado comercialmente (EHT). Estes resultados tornam, portanto, as substâncias produzidas neste trabalho úteis na prevenção dos efeitos deletérios produzidos pela incidência de radiação UV na pele, sobretudo do fotoenvelhecimento e do câncer.

Referências

Addor FAS, Aoki V. Barreira cutânea na dermatite atópica. **An. Bras. Dermatol.** 2010; 85(2): 184-194.

Afaq F, Adhami VM, Ahmad N. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 2003; 186(1): 28–37.

Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutat. Res.** 2005; 571(1-2): 153-173.

Afaq F, Mukhtar H. **Nutrition for healthy skin:** strategies for clinical and cosmetic practice [Internet]. Berlim: Springer-Verlag; 2011, 51-56 [cited 2017 may 17]. Available from: <http://books.google.com.br/books?id=rUNZHmpBu2sC&pg=PA55&dq=resveratrol+sunscreens&hl=pt-BR&sa=X&ei=qtMOT_yPAufK0AG_k_nAAw&ved=0CEwQ6AEwAQ#v=onepage&q=resveratrol%20sunscreens&f=false>.

Aggarwal BB, Shishodia S. **Resveratrol in Health and Disease**. [Internet]. New York: Taylor & Francis Group; 2005, 684p [cited 2017 jan 15]. Available from: <https://books.google.com.br/books?id=g-HLBQAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=resveratrol&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwi3hZu58e7XAhUFDJAKHaUNC0kQ6AEIMDAB#v=onepage&q=resveratrol&f=false>.

Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **S. Pharmac. J.** 2013; 21(2): 143-152.

Allan KE, Lenehan CE, Ellis AV. UV light stability of *α*-cyclodestrin/resveratrol host-guest complexes and isomer stability at varying pH. **Austral. J. Chem.** 2009; 62(8): 921-926.

Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, Charrueau C. Administration of resveratrol: what formulation solutions to bioavailability limitations? **J. Control. Rel.** 2012; 158(2): 182-193.

Antille C, Tran C, Sorg O, Carraux P, Didierjean L, Saurat JH. Vitamin a exerts a photoprotective action in skin by absorbing ultraviolet b radiation. **J. Invest. Dermatol.** 2003; 121(5): 1163-1167.

Arshad, N et al. Electrochemical and spectroscopic investigations of isoniazide and its analogs with ds.DNA at physiological pH: Evaluation of biological activities. **Eur. J. Med. Chem.** 2012; 47(1): 452-461.

Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chem.** 2005; 89(1): 27-36.

Aust O, Stahl W, Sies H, Tronnier H, Heinrich U. Supplementation with tomato-based products increases lycopene, phytofluene, and phytoene levels in human serum and protects against UV-light-induced erythema. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.** 2005; 75(1): 54-60.

Bahia MF. **Protecção solar:** actualização [Internet]. Porto: Editora da Universidade do Porto; 2003, 23-39 [cited 2017 may 17]. Available from: < https://books.google.com.br/books?id=eRW1p0NfBCMC&printsec=frontcover&dq=Protec%C3%A7%C3%A3o+solar:+actualiza%C3%A7%C3%A3o&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwjkk9PMyu7XAhUFE5AKHdl9B9oQ6AEIJjAA#v=onepage&q=Protec%C3%A7%C3%A3o%20solar%3A%20actualiza%C3%A7%C3%A3o&f=false>

Barreiro EJ, Fraga CAM, Rodrigues CR, Miranda ALP. Estratégias em química medicinal para o planejamento de fármacos. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.** 2001; 37(3): 269-292.

Barreiro EJ, Fraga CAM, Rodrigues CR, Miranda ALP. Química medicinal de *N*-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Quím. Nova.** 2002; 25(1): 129-148.

Barreiro EJ, Fraga CAM. **Química medicinal**: as bases moleculares da ação dos fármacos. 3rd ed. Porto Alegre: Artmed; 2015. p. 347-523.

Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova.** 2006; 29(1): 113-123.

Barreiro EJ. Desenho de fármacos a partir de produtos naturais. In: Yunes RA, Calixto JB. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna.** Chapecó: Argos; 2001. p. 237-296.

Barth AL. **Fator de proteção solar versus coeficiente de carga de filtros solares químicos: avaliação fotobiológica de uma mistura de filtros solares químicos.** [dissertation]. [Rio de Janeiro]: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2000. 90 f.

Béliveau R, Gingras D. **Os alimentos contra o câncer:** a prevenção e o tratamento do câncer pela alimentação. Petrópolis: Editora Vozes; 2007. 214 p.

Berman AY, Motechin RA, Wiesenfeld MY, Holz MK. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. **NPJ Prec. Oncol.** 2017; 1: 35.

Bernerd F, Asselineau D. Successive alteration and recovery of epidermal differenciation and morphogenesis after specific UVB-damages in skin recontructed *in vitro*. **Dev. Biol.** 1997; 183(2): 123–138.

Berneburg M, Plettenberg H, Krutmann J. Photoaging of human skin. **J. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.** 2000; 16(6): 239–244.

Blois HS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, 1958; 181: 1199-1200.

Bodla RG, Gore S, Tadwee I, Manek H, Akoliya P, Khirsagar A. Suscreen actives: an overview. **Int. J. Parent. Dermatol.** 2017; 1(1): 1-12.

Böhm F, Edge R, Lange L, Truscott TG. Enhanced protection of human cells against ultraviolet light by anti-oxidant combinations involving dietary carotenoids. **J. Photochem. Photobiol. B.** 1998; 44(3): 211-215.

Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Lebensm. Wiss. Technol.** 1997; 30(6): 609-615.

Borut P, Raja D. Free radicals and extrinsic skin aging. **Dermatol. Res. Pract.** 2012; 2012: 1-4.

Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. Technol.** 1995; 28(1): 25-30.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução. RDC n. 69, 23 de março de 2016. Dispõe sobre regulamento técnico mercosul sobre lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes [Internet]. [cited 2016 nov 20]. Available from: < http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2863150/RDC_69_2016_COMP.pdf/5689ac91-e621-45b7-a122-b3163e4b3cc3>.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução. RDC n. 30, 01 de junho de 2012. Adendo II. Dispõe sobre o regulamento técnico Mercosul sobre protetores solares em cosméticos e dá outras providências [Internet]. [cited 2017 may 6]. Available from: < file:///C:/Users/Juliana/Downloads/resoluo%20rdc%20n%2030%202012%20-%20protetores%20solares%20em%20cosmticos.pdf>.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução. RDC n. 56, 09 de novembro de 2009. Dispõe sobre a proibição do uso de equipamentos de bronzeamento artificial [Internet]. [cited 2016 nov 19]. Available from: < http://www.mpsp.mp.br/portal/page/portal/cao_consumidor/legislacao/leg_saude/leg_sau_anvs/RDC-56-2009.pdf>.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução. RE n. 899, 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos [Internet]. [cited 2017 may 19]. Available from: <http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf>

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil [Internet]. [cited 2017 may 06]. Available from: <http://www.oncoguia.org.br/pub//10_advocacy/Estimativas_INCA.pdf>.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Pele não melanoma [Internet]. [cited 2017 may 06]. Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_nao_melanoma>.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Pele melanoma [Internet]. [cited 2017 may 06]. Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma>

Bruice PY. **Química Orgânica**. 4th ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall; 2006; 2. p. 61-63.

Bundgaard H, Rasmussen GJ. Prodrugs of peptides. 9. bioreversible n-alpha-hydroxyalkylation of the peptide bond to effect protection against carboxypeptidase or other proteolytic enzymes. **Pharm. Resv.** 1991; 3(8): 313-322.

Cabral LDS, Pereira SO, Partata AK. Filtros solares e fotoprotetores mais utilizados nas formulações no Brasil. **Rev. Cient. ITPAC.** 2011; 4(3): Pub. 4.

Cao G, Prior RL. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. **Meth. Enzymol.** 1999; 299: 50-62.

Corbett JT. The scopoletin assay for hydrogen peroxide: a review and a better method. **J. Biochem. Biophys. Meth.** 1989; 18(4): 297-307.

Castro IA. **Expressão da proteína p53 em diferentes níveis de fotoenvelhecimento da pele.** [dissertation]. [Porto Alegre]: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007. 75 f.

Castro M, Souza MCGM. Resveratrol: um promissor antioxidante ao alcance de todos. **UNIMAR Ciênc.** 2007; 16(1-2): 13-18.

Chaves AA, Joshi MS, Coyle CM, Brady JE, Dech SJ, Schanbacher BL, Baliga R, Basuray A, Bauer JA. Vasoprotective endotelial effects of a standardized grape product in humans. **Vascul. Pharmacol.** 2009; 50(1-2): 20-26.

Chin CM, Ferreira EI. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Quím. Nova.** 1999; 22(1): 75-84.

Choi SY, Kim S, Son D, Lee P, Lee J, Lee S, Kim DS, Park Y, Kim SY. Protective effect of (4-methoxybenzylidene)-(3-methoxynophenyl)amine against neuronal cell death induced by oxygen and glucose deprivation in rat organotypic hippocampal slice culture. **Biol. Pharm. Bull.** 2007; 30(1): 189-192.

Chun SS, Vattem DA, Lin YT, Shetty K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochem.** 2005; 40(2): 809-816.

Correa MA. **Cosmetologia:** ciência e técnica. São Paulo: Livraria e Editora Medfarma; 2012. p. 282-449.

Costa JE, Lacaz E. Fotoprotetores. **Med. Cután. Iber. Lat. Am.** 2001; 29(3): 145-152.

Craig DQM, Reading M. **Thermal analysis of pharmaceuticals.** New York: CRC Press; 2007. p. 1-50, 139-188.

Cruz FMDL. **Nanopartículas de sílica e ácido p-amino benzóico:** um estudo de associação para protetores solares**.** [dissertation]. [Araraquara]: Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"; 2008. 67 f.

Cunha AP, Silva AP, Roque OR, Cunha E. **Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2004. p. 17-32.

Darr D, Combs S, Dunston S, Manning T, Pinnell S. Topical vitamin C protects porcine skin from ultraviolet radiation- introduces damage. **Br. J. Dermatol.** 1992; 127(3): 247-253.

David JM, Clayton QA, David JP, Bahia MV, Aguiar RM. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Quím. Nova.** 2010; 33(10): 2202-2210.

Dyer, JR. **Aplicações da espectroscopia de absorção aos compostos orgânicos**. São Paulo: Edgard Blucher; 1969. p. 1-155.

Eller MS, Ostrom K, Gilchrest BA. DNA damage enhances melanogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1996; 93(3): 1087-1092.

Encyclopaedia Britannica. Johann Wilhelm Ritter [Internet]. Chicago: Encyclopaedia Britannica Inc; 1998. [cited 2013 nov 25]. Available from: <http://global.britannica.com/EBchecked/topic/504675/Johann-Wilhelm-Ritter>.

F'guyer S, Afaq F, Mukhtar H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.** 2003; 19(2): 56–72.

Field LD, Sternhell S, Kalman JR. **Organic Structures from Spectra.** Wiltshire: Wiley; 2008. p. 7-74.

Fleckenstein CA, Plenio H. Sterically demanding trialkylphosphines for palladium-catalyzed cross coupling reactions – alternatives to P*t*Bu$_3$. **Chem. Soc. Rev.** 2010; 39: 694-711.

Flor J, Davolos MR, Correa MA. Protetores solares. **Quim. Nova.** 2007; 30(1): 153-158.

Food and Drug Administration. Rules and Regulations. **Fed. Reg.** 2014; 79(105): 31205-31214.

Fulmer GR, Miller AJM, Sherden NH, Gottlieb HE, Nudelman A, Stoltz BM, Bercaw JE, Goldberg KI. NMR shifts of trace impurities: common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. **Organometallics.** 2010; 29(9): 2176-2179.

Gehm BD, Mcandrews JM, Chien P, Jameson JL. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the strogen receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 1997; 94: 14138-14143.

Godinho MM, Hudson HB, Niemeyer-Corbellini, JP, Silva, MR. Perfil dos filtros solares utilizados nos fotoprotetores no Brasil. **Surgic. Cosm. Dermatol.** 2017; 9(3): 243-246.

Grosse, Y *et al*. A review of human carcinogens – part A: pharmaceuticals. **The Lancet Oncol.** 2009; 10(1): 13-14.

Gruijl FR. Skin cancer and solar UV radiation. **Eur. J. Cancer.** 1999; 35(14): 2003-2009.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Antioxidants: molecules, medicines, and myths. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2010; 393(4): 561- 564.

Ham AW, Cormack DH. **Histologia**. 8th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1983. p. 577.

Hany J, Nagel R. Nachweis von UV-Filtersubstanzen in Muttermilch. **Deust. Leben.** 1995; 11: 341-345.

Heaney RP. Vitamin D in health and disease. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.** 2008; 3(5): 1535-1541.

Hebbel RP. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **J. Lab. Clin. Med.** 1986; 107(5): 401-404.

Hernandez M, Mercier-Fresnel MM. **Manual de cosmetologia.** 3rd ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter; 1999. p. 19-45.

Hexsel CL, Bangert SD, Hebert AA, LIM HW. Current sunscreen issues: 2007 Food and Drug Administration sunscreen labelling recommendations and combination sunscreen/insect repellent products. **J. Am. Acad. Dermatol.** 2008; 59(2): 316–323.

Hildesheim J, Awwad RT, Fornace AJJ. p38 mitogen activated protein kinase inhibitor protects the epidermis against the acute damaging effects of ultraviolet irradiation by blocking apoptosis and inflammatory responses. **J. Invest. Dermatol.** 2004; 122(2): 497-502.

Home E. On the black rete mucosum of the negro, being a defense against the scorching effects of the sun's rays. **Philos. Transac. Royal Soc. London.** 111; 1821: 1–6.

Horn FM, Zamin LL. O potencial do resveratrol como quimioterápico para o câncer de pele: uma revisão. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.** 2017; 16(2): 210-216.

Hu B, Yuesi W, Grangren L. Properties of ultravioleta radiation and the relationship between ultravioleta radiation and aerossol optical depth in China. **Atm. Res.** 2010; 98(2-4): 287-308.

Hughes MCB, Williams GM, Baker P, Green AC. Sunscreen and prevention of skin aging: a randomized trial. **Ann. Intern. Med.** 2013; 158(11): 781-790.

Hunter JAA, Savin JA, Dahl MV. **Clinical dermatology**. 3rd ed. Massachusetts: Editora Blackwell Science; 2002. p. 253-274.

Ichihashi M, Ueda M, Budiyanto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, Tsuru K, Horikawa T. UV-induced skin damage. **Toxicology.** 2003; 189(1-2): 21-39.

Ionashiro, M. **Giolito:** fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial. São Paulo: Giz Editorial; 2004. 82 p.

Jang M *et al*. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science.** 1997; 275(5297): 218–220.

Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian M. Phytoalexins from Vitaceae: biosyntesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. **J. Agric. Food Chem.** 2002; 50(10): 2731-2741.

Jin F, Wu Q, Lu YF, Gong QH, Shi JS. Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. **Eur. J. Pharmacol.** 2008; 600(1-3): 78–82.

Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia básica**. 11th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011. p. 66-370.

Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia básica**. 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. p. 354.

Karlsson I, Hillerström L, Stenfeldt AL, Martensson J, Börje A. Photodegradation of dibenzoylmethanes: potential cause of photocontact allergy to sunscreens. **Chem. Res. Toxicol.** 2009; 22(11): 1881-1892.

Kawanishi S, Hiraku Y. Sequence-specific DNA damage induced by UVA radiation in the presence of endogenous and exogenous photosensitizers. **Curr. Probl. Dermatol.** 2001; 29: 74-82.

Khoury E, Nakazawa TA, Silva AMQR. Fotoprotetores de alta eficiência. **Cosm. Toil.** 1995; 7: 41-46.

Khury E, Borges E. Protetores solares. **Rev. Bras. Med.** 2011; 68(4): especial cosmiatria e dermatologia 4-18.

Klann A, Levy G, Lutz I, Muller C, Kloas W, Hildebrandt JP. Estrogen-like effects of ultraviolet screen 3-(4-methylbenzylidene)-camphor (Eusolex 6300) on cell proliferation and gene induction in mammalian and amphibian cells. **Environ. Res.** 2005; 97(3): 274-281.

Koleva II, Van Beek TA, Linssen JP, Groot A, Eystatieva LN. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochem. Anal.** 2002; 13(1): 8–17.

Koo SW, Hirakawa S, Fujii S, Kawasumi M, Nghiem P. Protection from photodamage by topical application of caffeine after ultraviolet irradiation. **Br. J. Dermatol.** 2007; 156(5): 957-964.

Kootstra A. Protections from UV-B-induced DNA damage by flavonoids. **Plant. Mol. Biol.** 1994; 26(2): 771-774.

Kullavanijaya P, Lim HWJ. Photoprotection. **J. Am. Acad. Dermatol.** 2005; 52(6): 937-958.

Landau M. Exogenous factors in skin aging. **Curr. Probl. Dermatol.** 2007; 35: 1-13.

Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, Shi X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular response. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2003; 309(4): 1017-1026.

Lima LM *et al*. Synthesis and anti-platelet activity of novel arylsulfonate-acylhydrazone derivatives, designed as antithrombotic candidates. **Eur. J. Med. Chem.** 2008; 43(2): 348-356.

Liu L, Hudgins WR, Shack S, Yin MQ, Samid D. Cinnamic acid: a natural product with potential use in cancer intervention. **Int. J. Cance**r**.** 1995; 62(3): 345-350.

Lopes CR. **Síntese de amidas graxas:** uma nova família de lipídios biologicamente ativos. [dissertation]. [Rio Grande]: Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande; 2009. 148 f.

Lowe JS, Anderson PG. **Human Histology**. 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2015. p. 49-363.

Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Anal. Chim. Acta.** 2008; 613(1): 1–19.

Martinez MAR, Francisco G, Cabral LS, Ruiz IRG, Neto CF. Genética molecular aplicada ao câncer cutâneo não melanoma. **An. Bras. Dermatol.** 2006; 81(5): 405-419.

Matheus LGM, Kurebayashi AK. 2002. **Fotoproteção:** a radiação ultravioleta e sua influência na pele e nos cabelos. São Paulo: Tecnopress; 2002. p. 19-72.

Mayrinck C, Raphael E, Ferrari JL, Schiavon MA. Síntese, propriedades e aplicações de óxido de zinco nanoestruturado. **Rev. Virt. Quim.** 2014; 6(5): 1185-1204.

Mcmurry J. **Química orgânica**. 7th ed. São Paulo: Cengage Learning; 2011; 2: 668-670.

Milesi SS, Guterres SS. Fatores determinantes da eficácia de fotoprotetores. **Cad. Farm.** 2002; 18(2): 81-87.

Ming M, Han W, Maddox J, Soltani K, Shea CR, Freeman DM, He YY. UVB-induced ERK/AKT-dependent PTEN suppression promotes survival of epidermal keratinocytes. **Oncogene.** 2010; 29(4): 492–502.

Mitani H, Ryu A, Suzuki T, Yamashita M, Arakane K, Koide C. Topical application of plant extracts containing xanthine derivatives can prevent UV-induced wrinkle formation in hairless mice. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.** 2007; 23(2-3): 86–94.

Moan J *et al*. Solar radiation, vitamin D and survival rate of colon cancer in Norway. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** 2005; 78(3): 189-193.

Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Song. J. Sci. Technol.** 2004; 26(2): 211-219.

Montagner S, Costa A. Bases moleculares do fotoenvelhecimento. **An. Bras. Dermatol.** 2009; 84(3): 263-269.

Ndiaye M, Philippe C, Mukhtar H, Ahmad N. The grape antioxidant resveratrol for skin disorders: promise, prospects, and challenges. **Arch. Biochem. Biophys.** 2011; 508(2): 164-170.

Nichols JA, Katiyar SK. Skin photoprotection by polyphenols: anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repairs mechanisms. **Arch. Dermatol. Res.** 2010; 302(2): 71-83.

Nobre SM. **Reações de acoplamento C-C:** desenvolvimento de sistemas catalíticos, estudo do mecanismo e aplicação na síntese do trans-resveratrol. [thesis]. [Rio Grande]: Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande; 2008. 132 f.

Ohguchi K, Tanaka T, Kido T, Baba K, Iinuma M, Matsumoto K, Akao Y, Nozawa Y. Effects of hydroxystilbene derivatives on tyrosinase activity. **Biochem. and Biophys. Res. Commun.** 2003; 307(4): 861-863.

Olas B, Wachowicz B, Saluk-Juszczak J, Zielinski T. Effect of resveratrol, a natural polyphenolyc compound, on platelet activation induced by endotoxin or thrombin. **Thromb. Res.** 2002; 107(3-4): 141-145.

Oliveira LJN, Rocha IM, Guillo LA. Ensaio radiométrico de tirosinase. **Rev. Bras. Farm.** 2004; 85(1): p. 5-6.

Olsen WM, Huitfeldt HS, Eggset G. UVB-induced (6-4) photoproducts in hairless mouse epidermis studied by quantitative immunohistochemistry. **Carcinogenesis.** 1989; 10(9): 1669–1673.

Ovalle WK, Nahirney PC. **Netter:** bases da histologia. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 244.

Palm DM, O'donoghue NM. Update on photoprotection. **Dermatol. Ther.** 2007; 20(5): 360-376.

Pannala AS, Razaq R, Halliwell B, Sinhj S, Rice-Evans CA. Inhibition of peroxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycycinnamates: nitration or electron donation? **Free Radic. Biol. Med.** 1998; 24(4): 594-606.

Pannala AS, Chan TS, O'brien PJ, Rice-Evans CA. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2001; 282(5): 1161-1168.

Park K, Lee J. Protective effects of resveratrol on UVB-irradiated HaCaT cells through attenuation of the caspase pathway. **Oncol. Rep.** 2008; 19(2): 413-417.

Pavia DL *et al.* **Introdução à Espectroscopia.** 4th ed. São Paulo: Cengage Learning; 2010. 708 p.

Percival M. Antioxidants. **Clinic. Nutr. Ins.** 1998; 31: 1-4.

Poirier J, Dumas JLR, Catala M, André JM, Gherardi RK. **Histologia molecular**. São Paulo: Editora Santos; 2003. p. 183-187.

Polonini HC, Raposo NRB, Brandão MAF. Fotoprotetores naturais como instrumento de ação primária na prevenção do câncer de pele. **Rev. APS.** 2011; 14(2): 216-223.

Prior RL, WU X, Schaich K. Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary suplements. **J. Agric. Food Chem.** 2005; 53(10): 4290-4302.

Prota G. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. **J. Invest. Dermatol.** 1980; 75(1): 122-127.

Ravanat JL, Douki T, Cadet J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** 2001; 63(1-3): 88-102.

Rates SMK. Plants as source of drugs. **Toxicology.** 2001; 39(5): 603-613.

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.** 2008; 84(2): 415–421.

Reis JS, Correa MA, Chung MC, Santos JL. Synthesis, antioxidante and photoprotection activities of hybrid derivatives useful to prevent skin câncer. **Bioorg. Med. Chem.** 2014; 22(9): 2733-2738.

Ribeiro, C. **Cosmetologia aplicada à dermoestética**. 2nd ed. São Paulo: Pharmabooks; 2010. p. 101-161.

Rieger, M. M. Photostability of cosmetic ingredients on the skin. **Cosmet. Toilet.** 1997; 112(6): 65-72.

Robinson N. **Solar radiation**. Amsterdan: Elsevier Pub; 1966. 347 p.

Rodrigo FG, Rodrigo MJ. The sun, the beach and children's skin. Essential concepts. **Acta Pediátr. Port.** 2011; 42(2): 71-77.

Rosenstein BS, Mitchell DL. Action spectra for the induction of pyrimidine(64) pyrimidone photoproducts and cyclobutane pyrimidine dimers in normal human skin fibroblasts. **Photochem. Photobiol.** 1987; 45(S1): 775-780.

Ross M, Pawlina W. **Histologia**. 5th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 445-466.

Ross M, Pawlina W. **Histologia**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012. p. 498.

Salgado C, Galante MC, Leonardi GR. Filtros solares: mecanismos de ação e metodologias em preparações magistrais. **Int. J. Pharm. Compound.** 2004; 6(4): 224-236.

Sampaio SAP, Rivitti EA. **Dermatologia.** 3rd ed. São Paulo: Editora Artes Médicas. 2008. p. 1-37, 1237-1239.

Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WHI. Fillagrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. **J. Cell Sci.** 2009; 122: 1285-1294.

Santos CMS, Souza PHG. Avaliação da atividade fotoprotetora da curcumina. **Perspect. Ciênc. e Tecnol.** 2017; 9: 26-45.

Santos VM. **Preparação de filtros solares em nanossistemas visando à maior ação protetora.** [dissertation]. [São Carlos]: Faculdade de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo; 2007. 126 f.

Santos JL. **Síntese e avaliação farmacológica de protótipos candidatos a fármacos para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme.** [thesis]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"; 2009. 226 f.

Saraf S, Kaur CD. Phytoconstituents as photoprotective novel cosmetic formulations. **Pharmacogn. Rev.** 2010; 4(7): 1-11.

Sarveiya V, Stacey R, Benson HAE. Liquid chromatographic assay for common sunscreen agents: application to *in vivo* assessment of skin penetration and systemic absorption in human volunteers. **J. Chromat. B**. 2004; 803(2): 225-231.

Sasson CS. **Influência dos veículos cosméticos na permeação cutânea da associação de filtros solares e acetato de tocoferol.** [dissertation]. [Curitiba]: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná; 2006. 111f.

Schlumpf M *et al*. Developmental toxicity of UV filters and environmental exposure: a review. **Int. J. Androl.** 2008; 31(2): 144-151.

Schlumpf M, Cotton B, Conscience M, Haller V, Steinmann B, Lichtensteiger W. *In vitro* and *in vivo* estrogenicity of UV screens. **Environ. Health Persp.** 2001; 109(3): 239–244.

Schuch NJ, Garcia VC, Martini LA. Vitamina D e doenças endocrinometabólicas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** 2009; 53(5): 625-633.

Scotti L, Velasco MVR. **Envelhecimento cutâneo à luz da cosmetologia:** estudo das alterações da pele no decorrer do tempo e da eficácia das substâncias ativas empregadas na preservação. São Paulo: Tecnopress; 2003. p. 11-13, 33-39, 49-67.

Setlow RB, Carrier WL. Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's. **J. Molec. Biol.** 1966; 17(1): 237-254.

Sgarbi FC, Carmo ED, Rosa LEB. Radiação ultravioleta e carcinogênese. **Rev. Cienc. Méd. Campinas.** 2007; 16(4-6): 245-250.

Shaat NA. Ultraviolet filters. **Photochem. Photobiol. Sci.** 2010; 9(4): 464-469.

Shaat NA. Evolution of modern sunscreen chemicals. In: Lowe NJ, Shaat NA, Pathak MA. **Sunscreens:** development, evaluation, and regulatory aspects. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 1997. p. 3-33.

Shnyder, M. UV filter overview [pen drive]. São Paulo: Simpósio Internacional de Fotoproteção; 2011.

Shnyder, M. Trends and conceptions in photoprotection [pen drive]. São Paulo: Simpósio Internacional de Fotoproteção; 2011.

Silva LS, Monteiro MSSB. Avaliação da segurança de nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco em formulações antissolares. **Rev. Virt. Quím.** 2016; 8(6): 1963-1977.

Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7th ed. Rio de Janeiro: Editora LTC. 2006. 530 p.

Silverstein RM, Webster FX. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6th ed. Rio de Janeiro: Editora LTC. 2000. 460 p.

Sociedade Brasileira de Dermatologia. Câncer de pele [Internet]. Rio de Janeiro: SBD [cited 2017 may 06]. Available from: <http://www.sbd.org.br/doenca/cancer-da-pele/>.

Solomons TWG, Fryhle CB. **Química orgânica.** 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos. 1996; 1. 777 p.

Solomons TWG, Fryhle CB. **Química orgânica.** 9ª ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos. 2009; 2. p. 20-22, 107-115.

Solovchenko A, Schmitz-Eiberger M. Flavonoids and cardiovascular diseases. **J. Exp. Bot.** 2003; 54(389): 1977-1984.

Souza SPMC. **Determinação do teor de cálcio através da termogravimetria em medicamentos utilizados no tratamento da osteoporose: um estudo comparativo.** [dissertation]. [Natal]: Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2011. 114 f.

Springsteen A, Yurek R, Frazier M, Carr KF. *In vitro* measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. **Anal. Chem. Acta.** 1999; 380(2-3): 155-164.

Steinberg DC. Preservation of sunscreens formulations [pen drive]. São Paulo: Simpósio Internacional de Fotoproteção; 2011.

Steiner D. Photoaging and genetic sensitivity [pen drive]. São Paulo: Simpósio Internacional de Fotoproteção; 2011.

Strickland FM, Kuchel JM, Halliday GM. Natural products as aids for protecting the skin's immune system against UV damage. **Cutis.** 2004; 74(5 suppl): 24-28.

Taha M *et al*. Synthesis of novel benzohydrazone–oxadiazole hybrids as *β*-glucuronidase inhibitors and molecular modeling studies. **Bioorg. Med. Chem.** 2015; 23(23): 7394–7404.

Tangdenpaisal K *et al*. Factors affecting orthogonality in the deprotection of 2,4-di-protected aromatic ethers employing solid-supported acids. **Tetrahedron**. 2009; 65(22): 4316-4325.

Taylor CR, Stern RS, Leyden, JJ, Gilchrest BA. Photoaging/photodamage and photoprotection. **J. Am. Acad. Dermatol.** 1990; 22(1): 1-15.

Teixeira AP. **Avaliação *in vivo* da pele humana facial por espectroscopia raman confocal: ação de cosmético.** [dissertation]. [São José dos Campos]: Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba; 2013. 75 f.

Tinkel J, Hassanain H, Khouri SJ. Cardiovascular antioxidant therapy: a review of supplements, pharmacotherapies, and mechanisms. **Cardiol. Rev.** 2012; 20(2): 77-83.

Török B et al. Diaryl hydrazones as multifunctional inhibitors of amyloid self-assembly. **Biochemistry.** 2013; 52(7): 1137-1148.

Urbach, F. The historical aspects of sunscreens. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** 2001; 64(2-3): 99–104.

Van Etten HD, Mansfield JW, Bailey JA, Farmer EE. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus “phytoanticipins”. **Plant Cell.** 1994; 6(9): 1191-1192.

Velasco MVR, Balogh TS, Kaneko TM, Pedriali CA, Baby AR. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **An. Bras. Dermatol.** 2011; 86(4): 732-742.

Vellosa JCR, Barbosa VF, Oliveira OMMF. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Rev. Eletron. Farm.** 2007; 5(2): 119-130.

Vian MA, Tomao V, Gallet S, Coulomb PO, Lacombe JM. Simple and rapid method for cis- and trans-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using chromolith columns. **J. Chromatogr. A.** 2005; 1085(2): 224–229.

Viegas-Jr C, Danuello A, Bolzani VS, Barreiro EJ, Fraga CA. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Curr. Med. Chem.** 2007; 14(17): 1829-1852.

Vingtdeux V, Dreses-Werringloer U, Zhao H, Davies P, Marambaud P. Review: therapheutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease. **BMC Neurosci.** 2008; 9: suppl. 2-S6.

Vizioli EO, Chung MC, Menegon RF, Blau L, Santos JL, Longo MC, inventors; "Novel compounds derived from taurine, process of their preparation and pharmaceutical compositions containing these". Brasil patent **PCT/BR 2009/0409**, 2009 october 15, **WO/2009/124371**, 2009 april 09.

Von Gadow A, Joubert E, Hansmann CF. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos TEA (*Aspalathus linearis*), *α*-Tocopherol, BHT, and BHA. **J. Agric. Food Chem.** 1997; 45(3): 632–638.

Wang L, Lu L. Pathway-specific effect of caffeine on protection against UV irradiation–induced apoptosis in corneal epithelial cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 2007; 48(2): 652-660.

Wulf HC, Sandby-Moller J, Kobayasi T, Gniadecki R. Skin aging and natural photoprotection. **Micron.** 2004; 35(3): 185-191.

Yaar M, Glichrest B. A. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. **Br. J. Dermatol.** 2007; 157(5): 874-887.

Yamasaki PR. **Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos úteis como filtros solares.** [dissertation]. [Araraquara]: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"; 2012. 96 f.

Yasui H, Sakurai H. Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2000; 269(1): 131-136.

Yousef AE, Marth EH. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by ultraviolet energy. **J. Food Sci.** 1988; 53(2): 571-573.

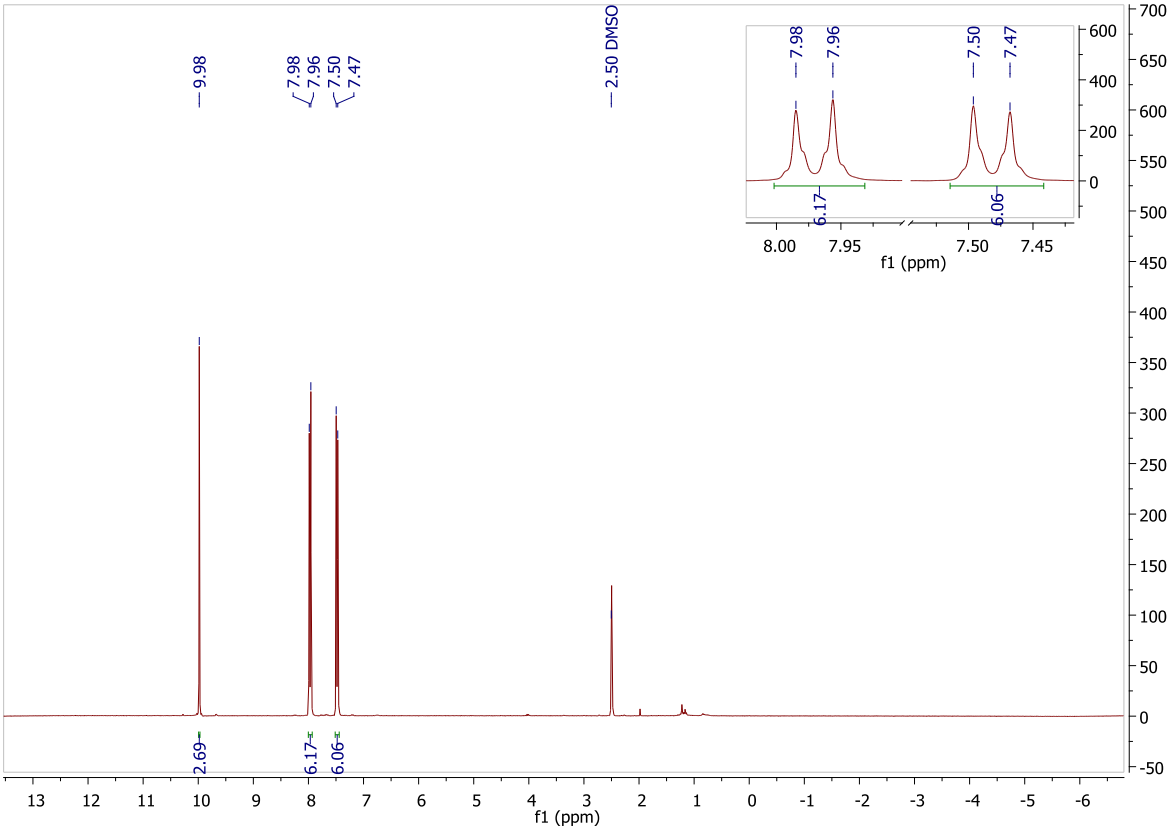
Zambrano VF. **Antineoplásico potencial: síntese de derivado de salicilato de octila e 5 fluoruracila para o tratamento de câncer de pele.** [dissertation]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"; 2006. 95 f.

Zhou H *et al*. 1, 3, 5-Triazine-cored derivatives dyes containing triphenylamine based two-photon absorption: synthesis, optical characterization and bioimaging. **Dry Pigm.** 2012; 94(3): 570-582.

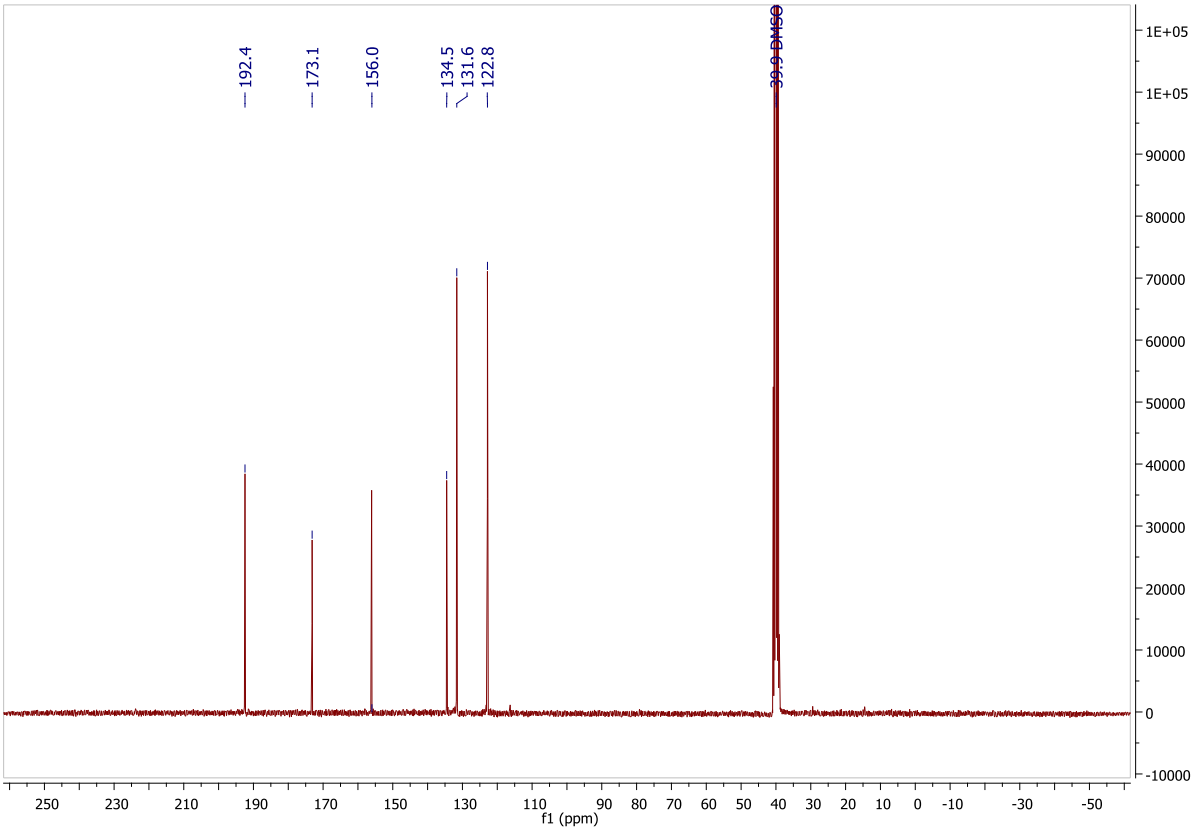
Apêndices

Todos os espectros de ressonância magnética nuclear de ^{1}H e ^{13}C mono e bidimensionais, infravermelho, ultravioleta e massas, bem como os termogramas obtidos pelas técnicas de TG e DSC encontram-se representados nesta seção.

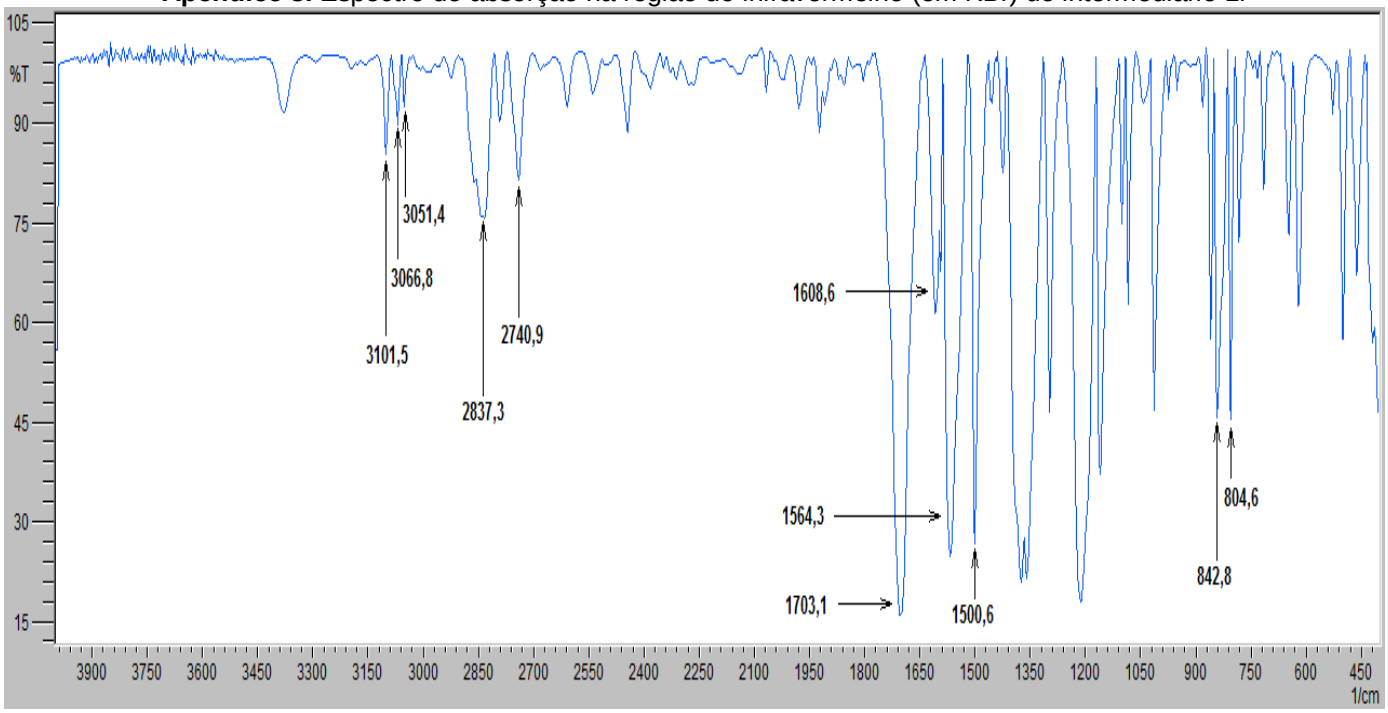
Apêndice 1. Espectro de RMN de ^{1}H (300 MHz, em DMSO-d_6) do intermediário 1.



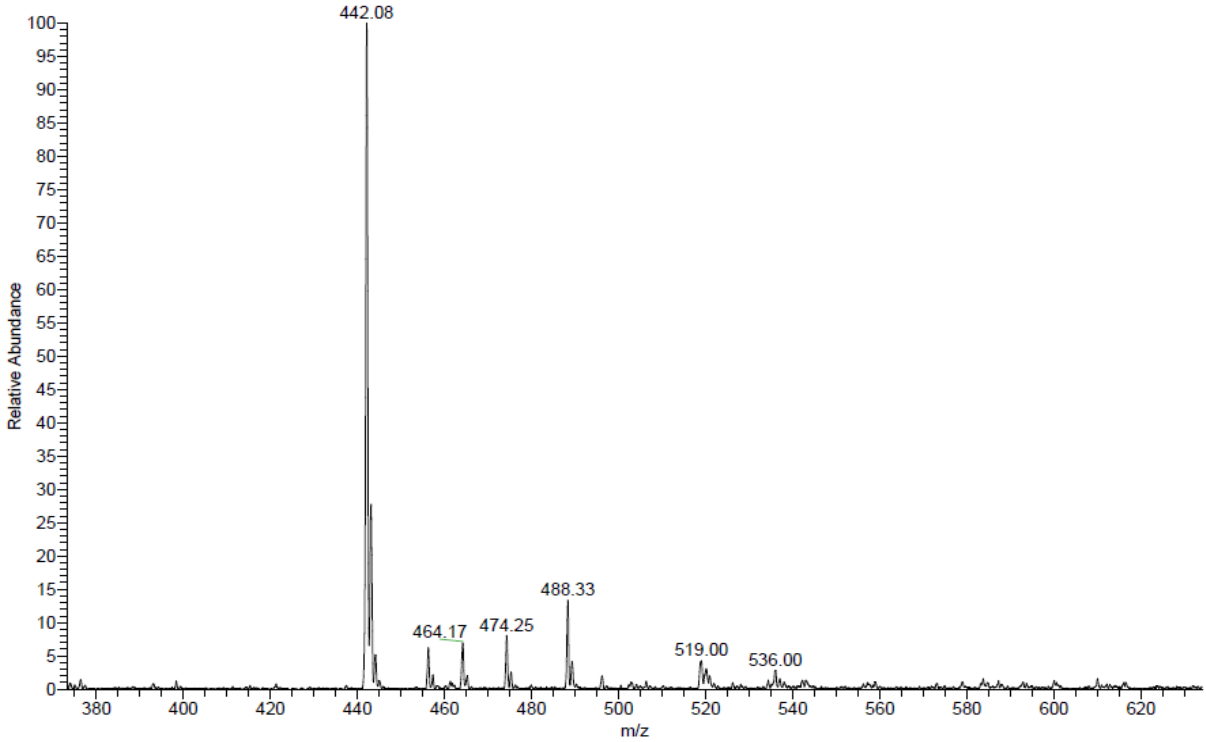
Apêndice 2. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em DMSO-d_6) do intermediário 1.



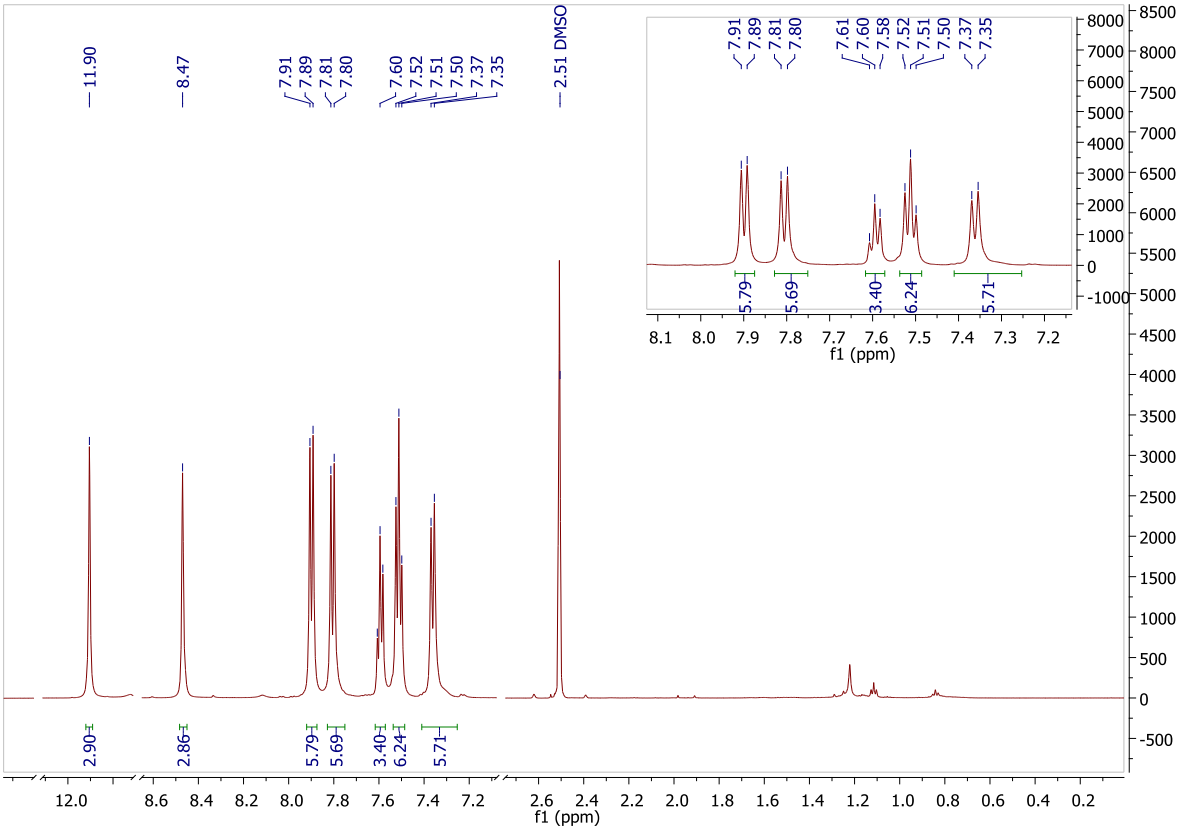
Apêndice 3. Espectro de absorção na região do infravermelho (em KBr) do intermediário 1.



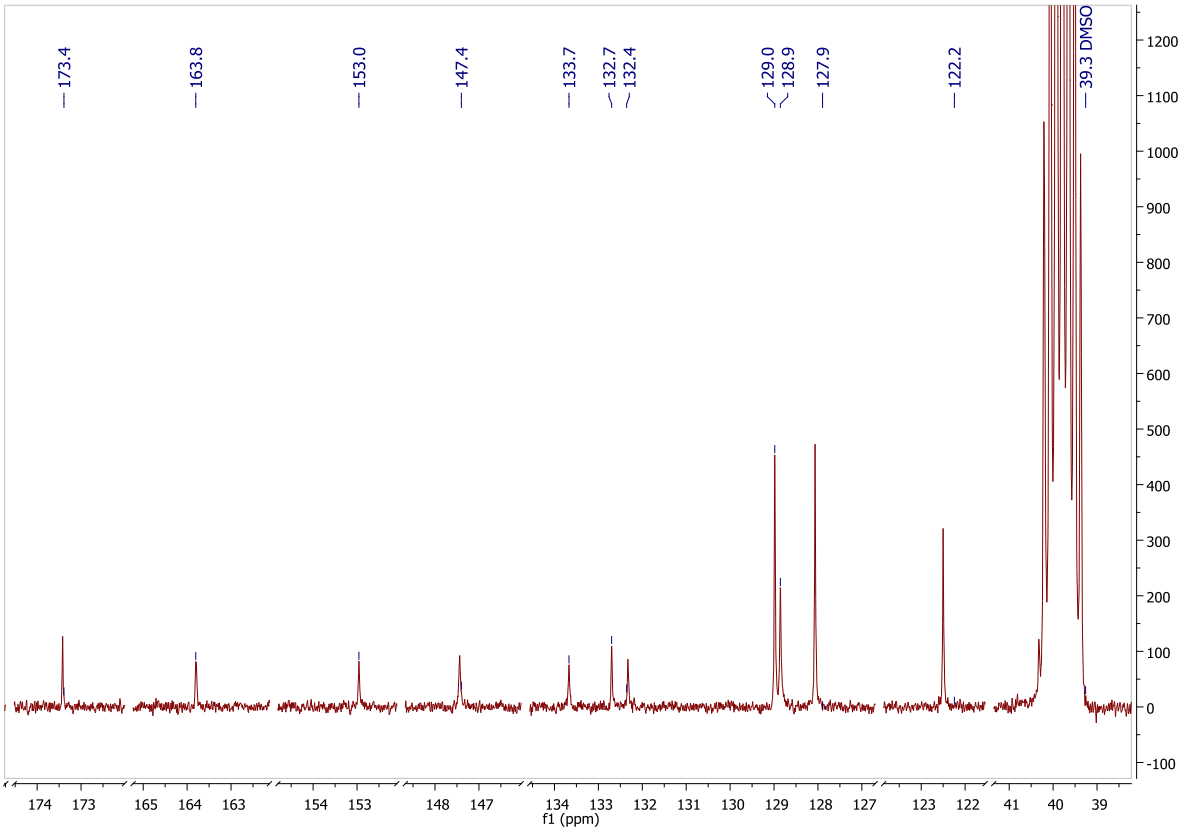
Apêndice 4. Espectro de massas (MicroTOF, infusão direta) do intermediário 1.



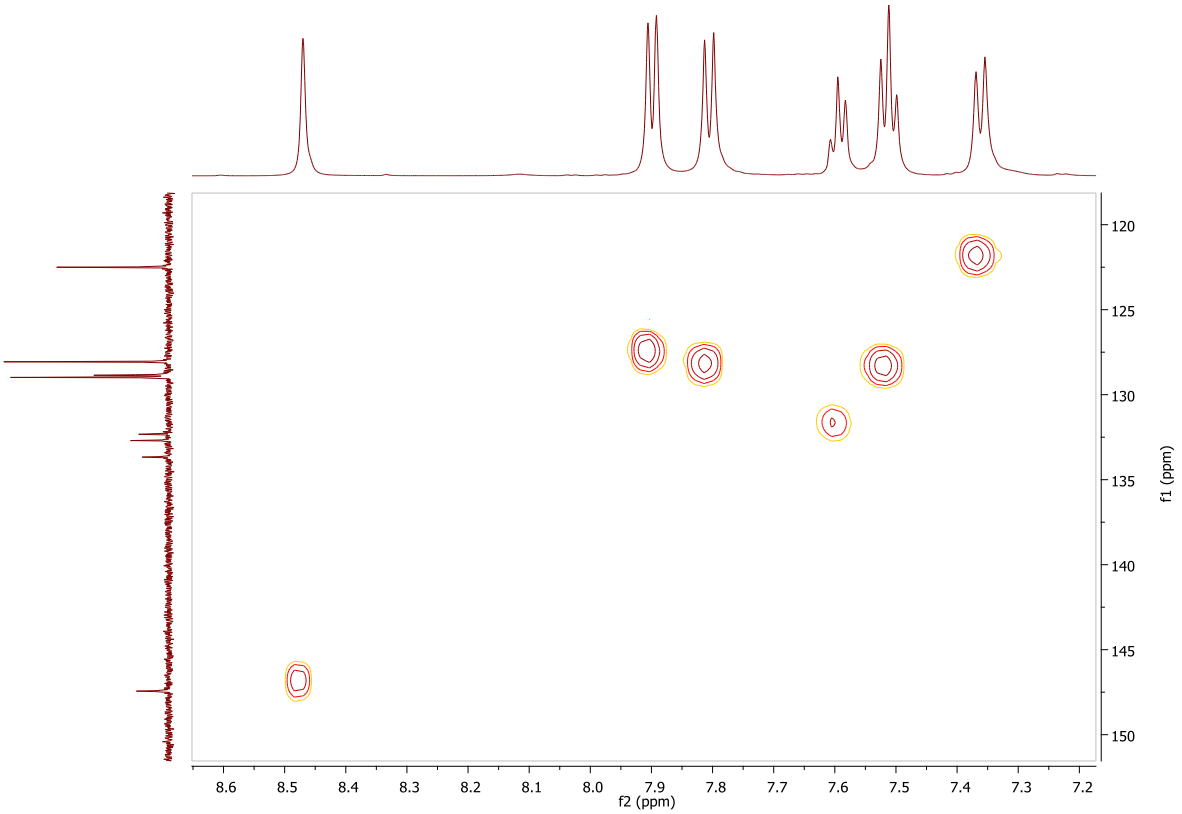
Apêndice 5. Espectro de RMN ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-1.



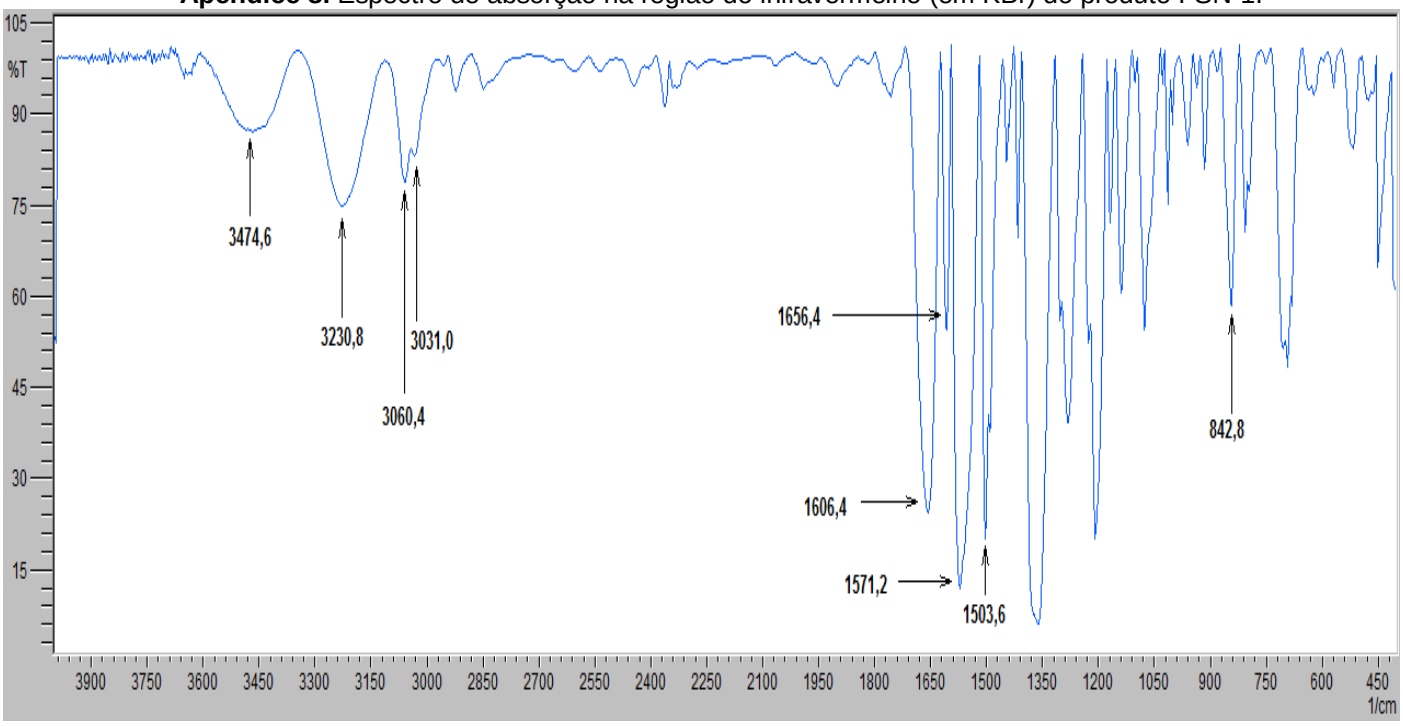
Apêndice 6. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-1.



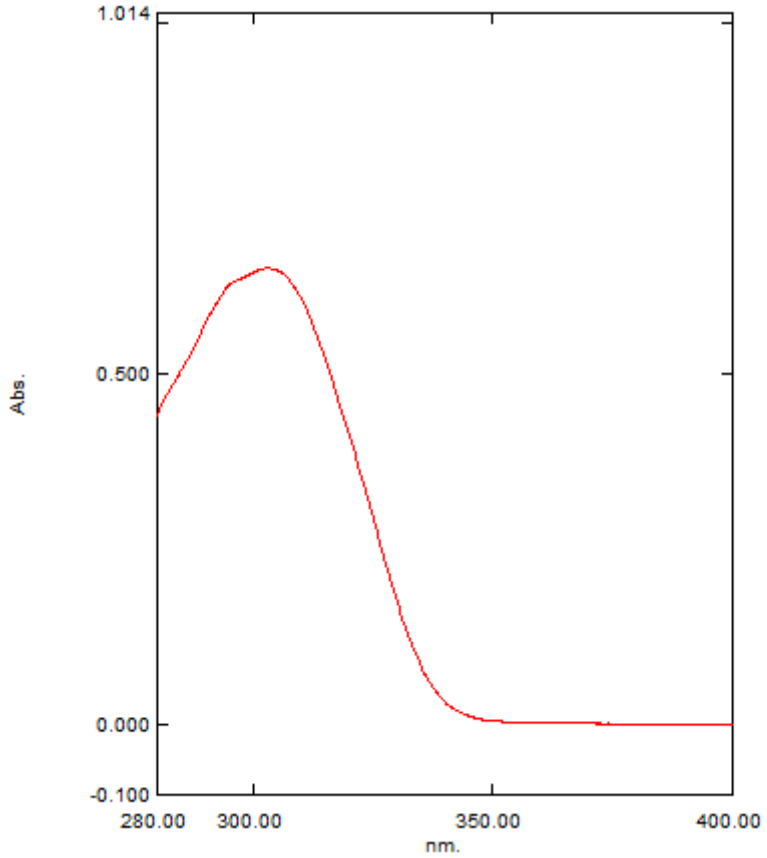
Apêndice 7. Espectro de RMN por HSQC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-1.



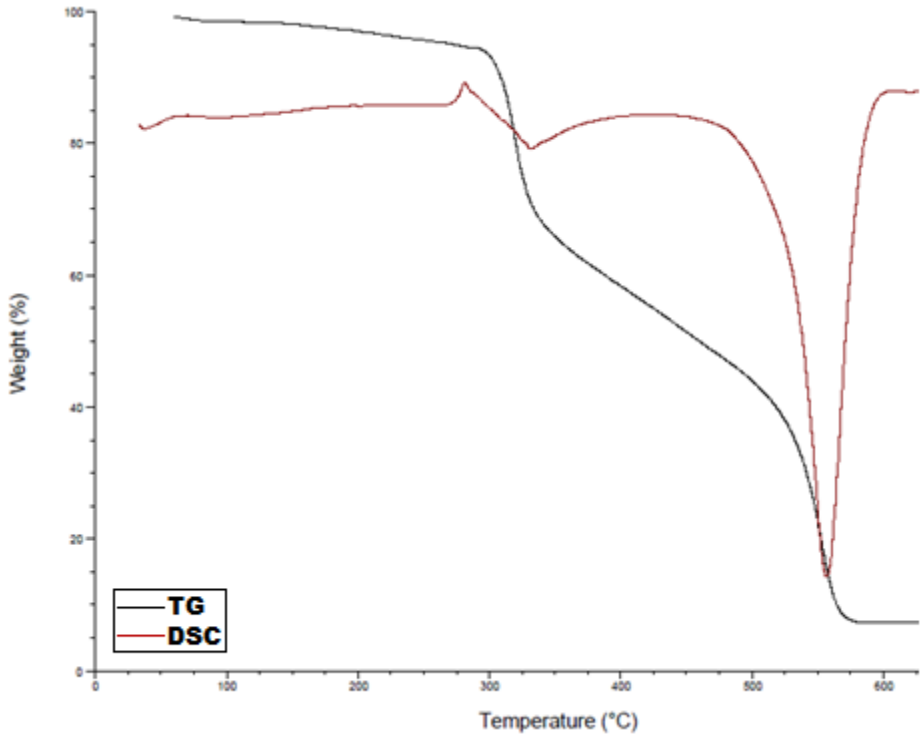
Apêndice 8. Espectro de absorção na região do infravermelho (em KBr) do produto FSN-1.



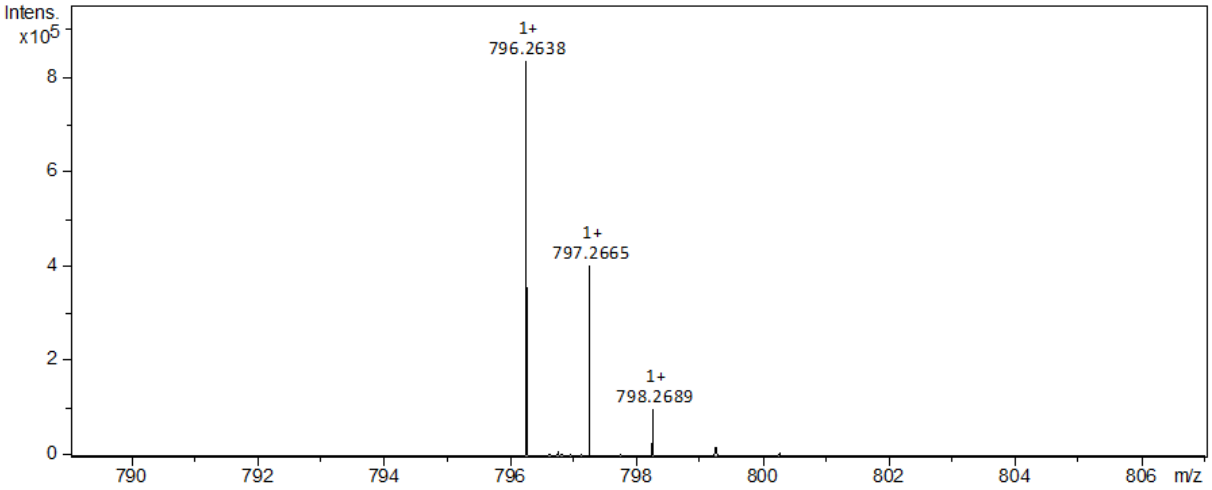
Apêndice 9. Espectro de absorção na região do ultravioleta (em DMSO/metanol) do produto FSN-1.



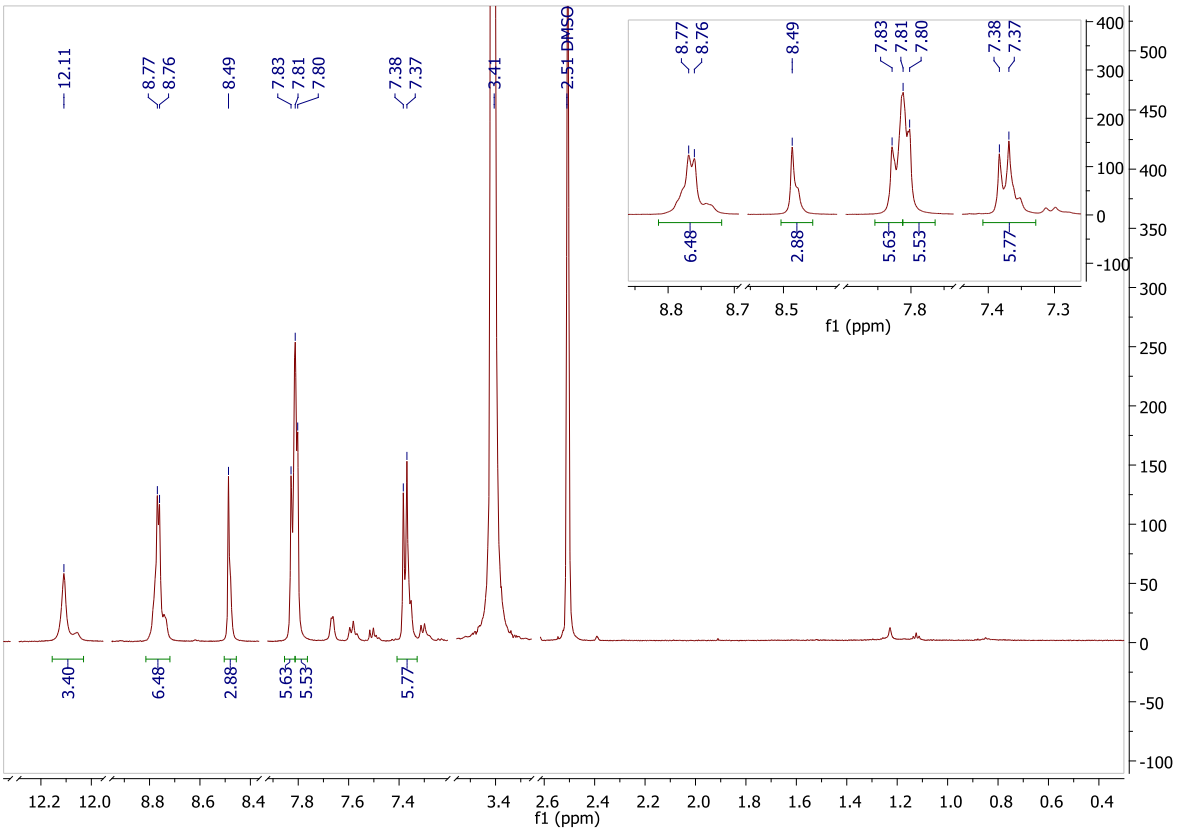
Apêndice 10. Curva térmica do produto FSN-1.



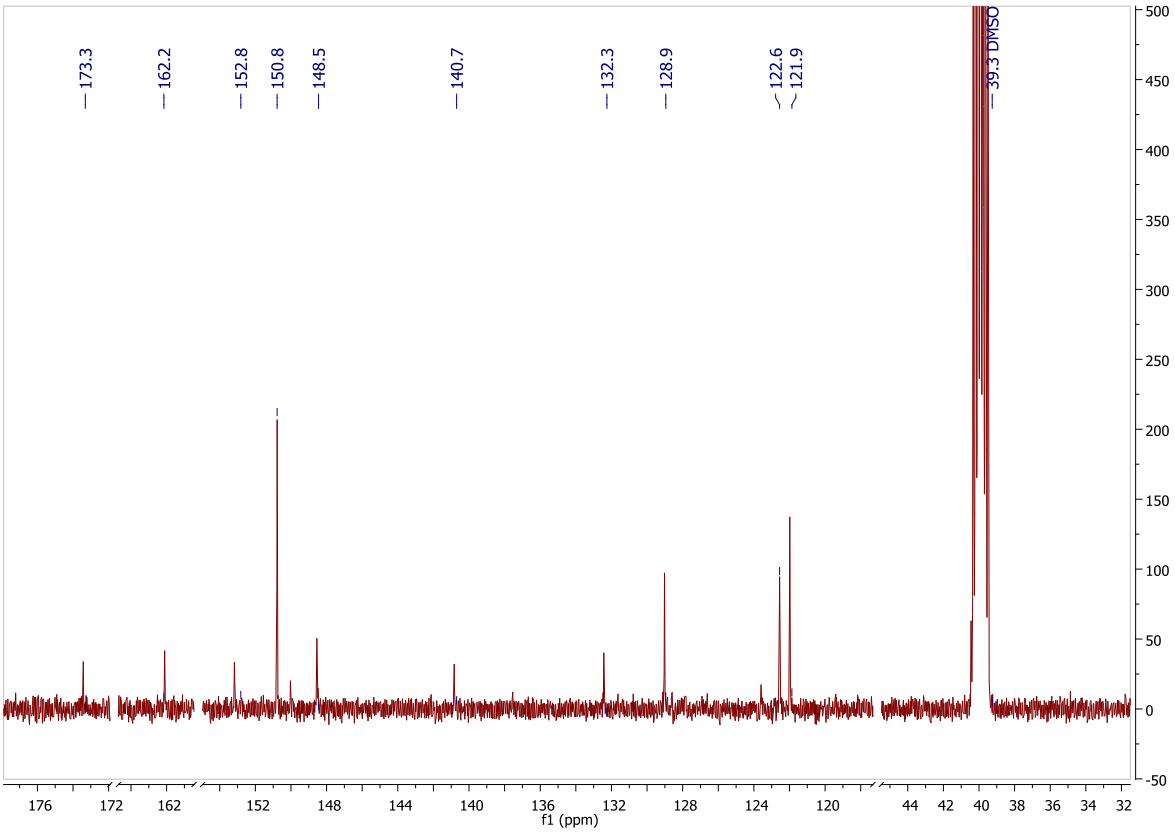
Apêndice 11. Espectro de massas (MicroTOF, infusão direta) do produto FSN-1.



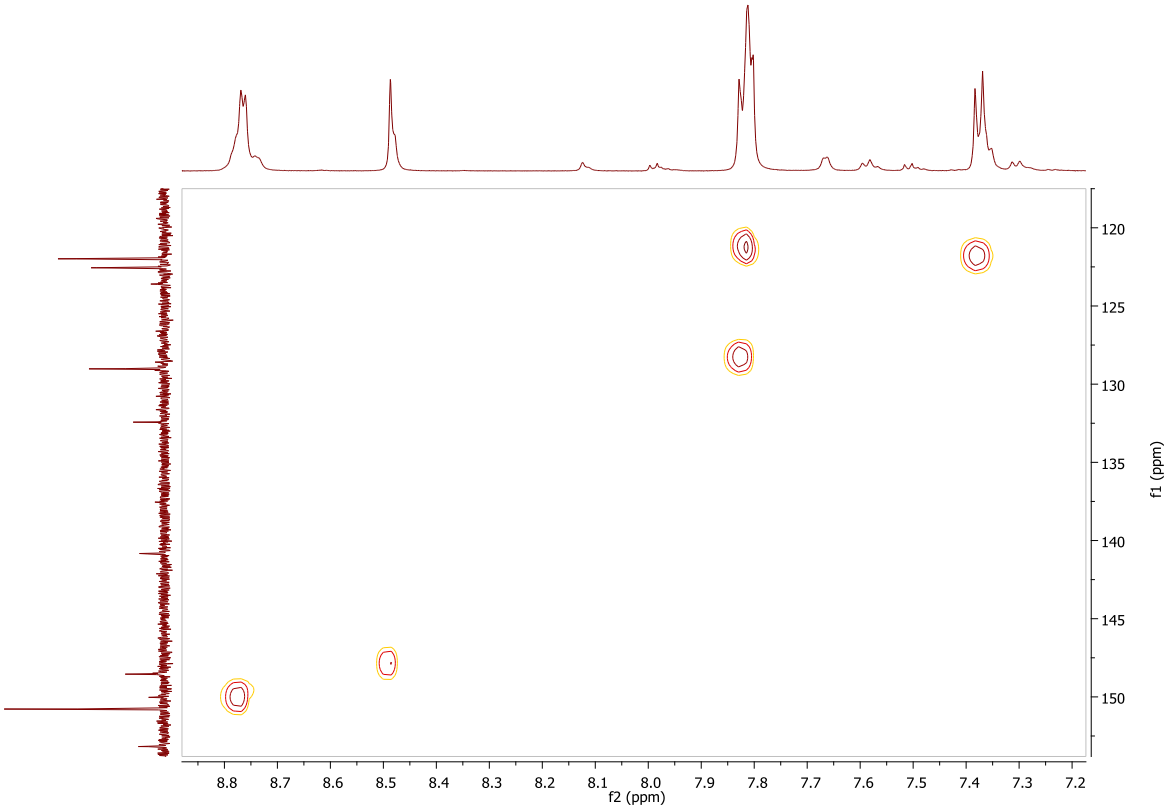
Apêndice 12. Espectro de RMN ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-2.



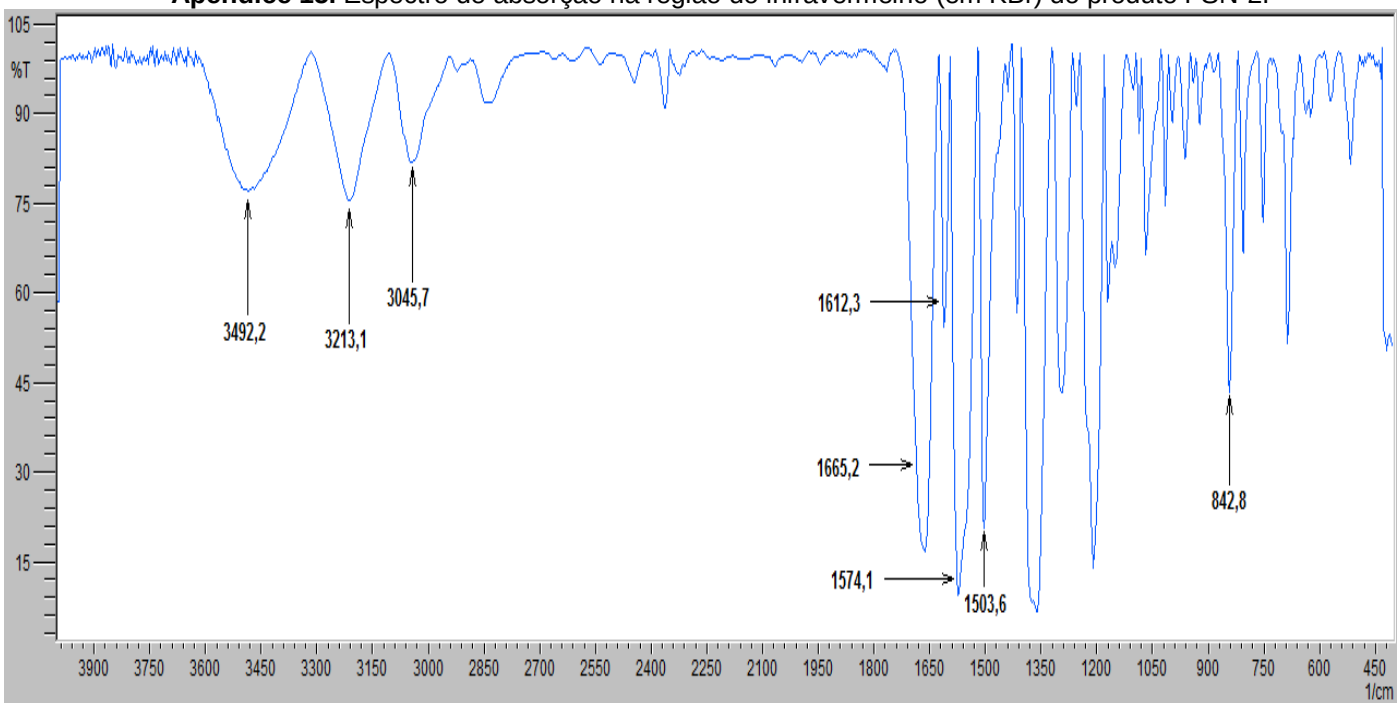
Apêndice 13. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-2.



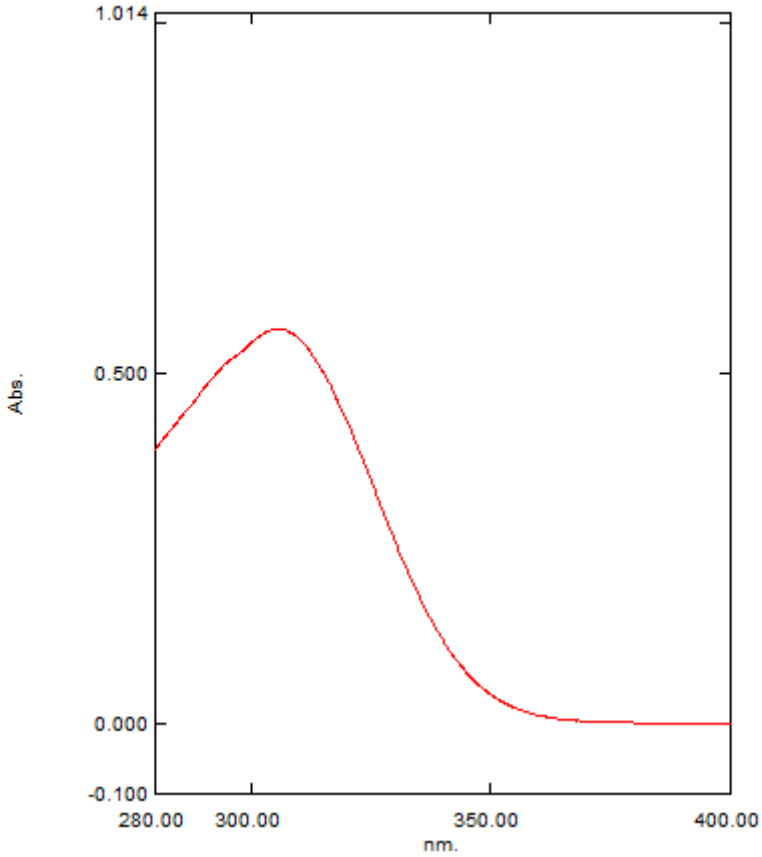
Apêndice 14. Espectro de RMN por HSQC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-2.



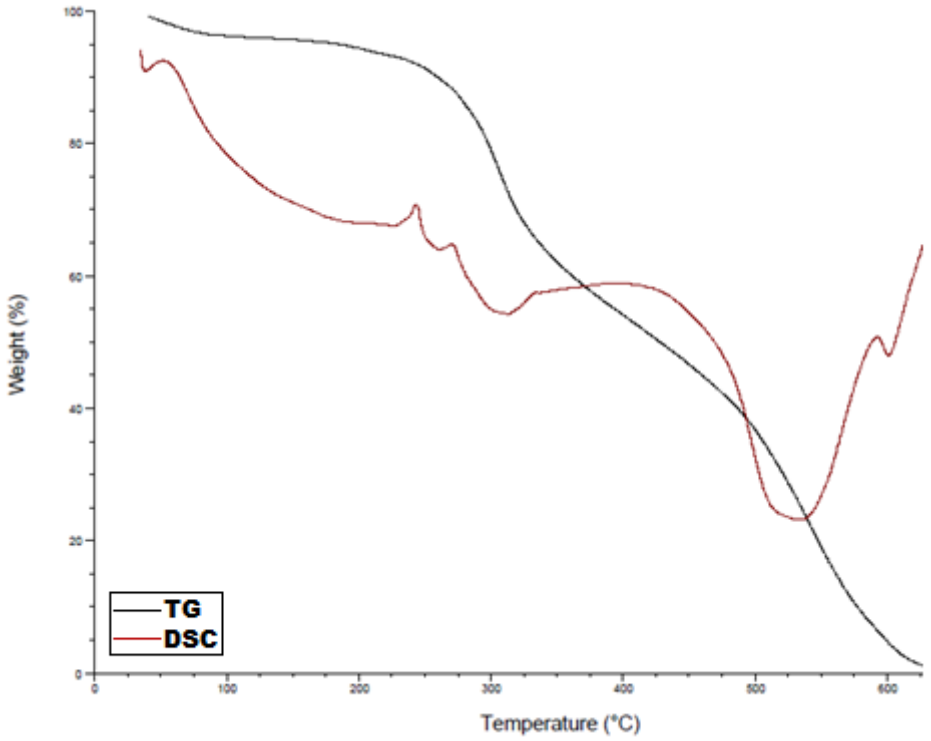
Apêndice 15. Espectro de absorção na região do infravermelho (em KBr) do produto FSN-2.



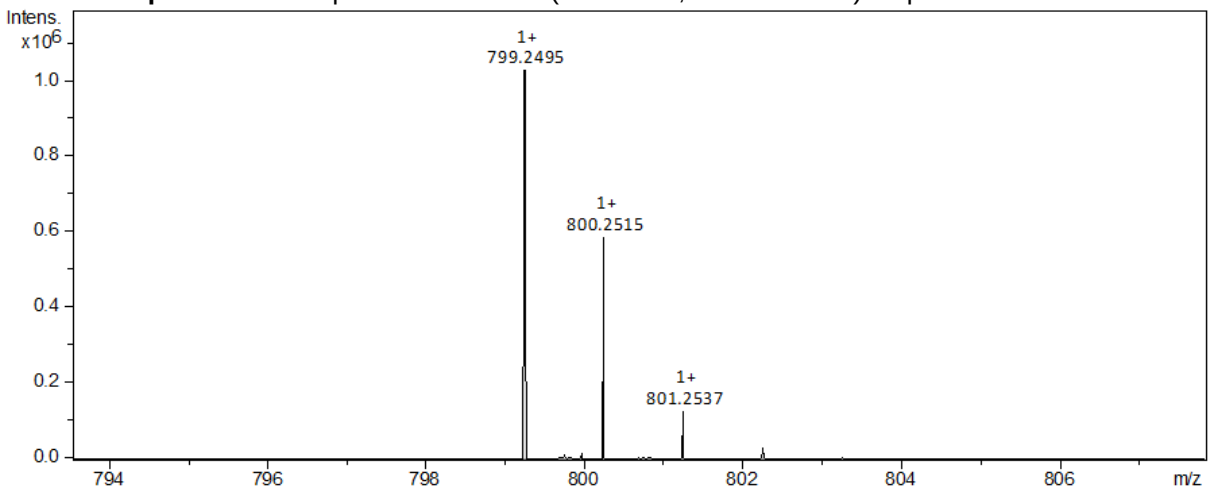
Apêndice 16. Espectro de absorção na região do ultravioleta (em DMSO/metanol) do produto FSN-2.



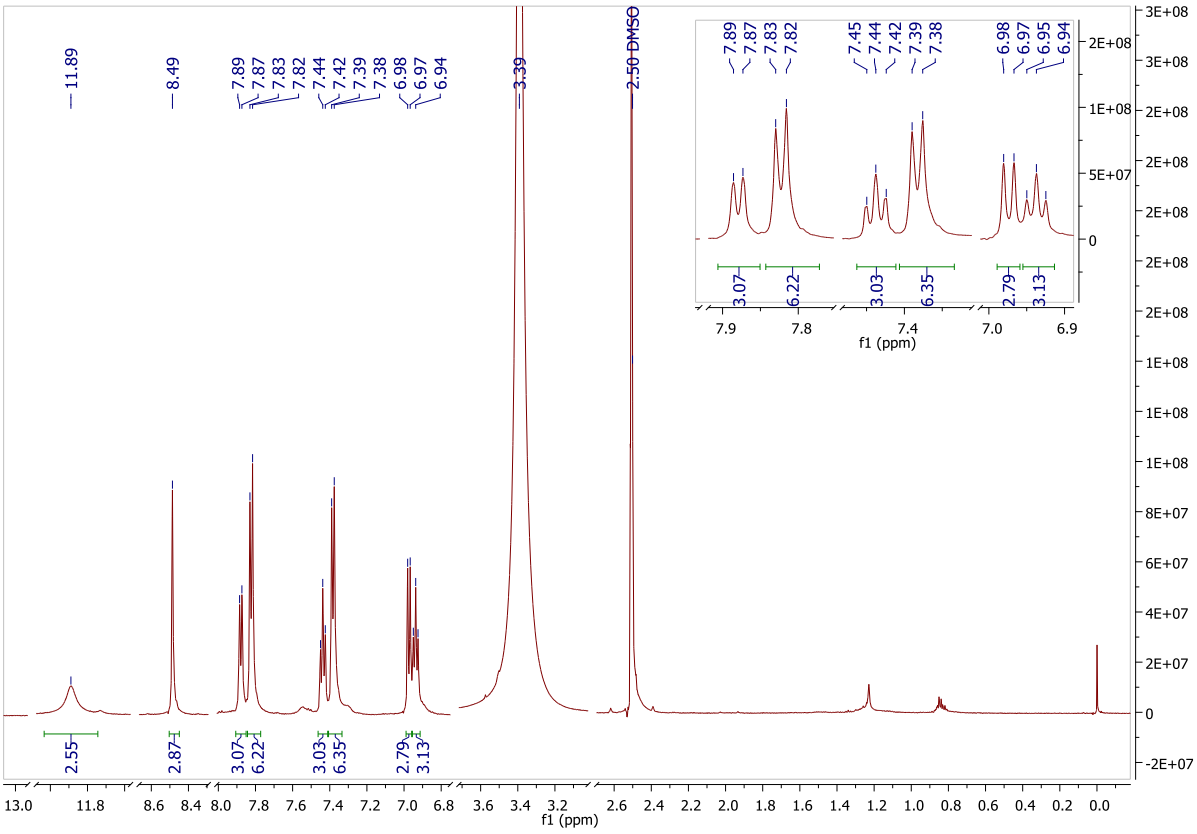
Apêndice 17. Curva térmica do produto FSN-2.



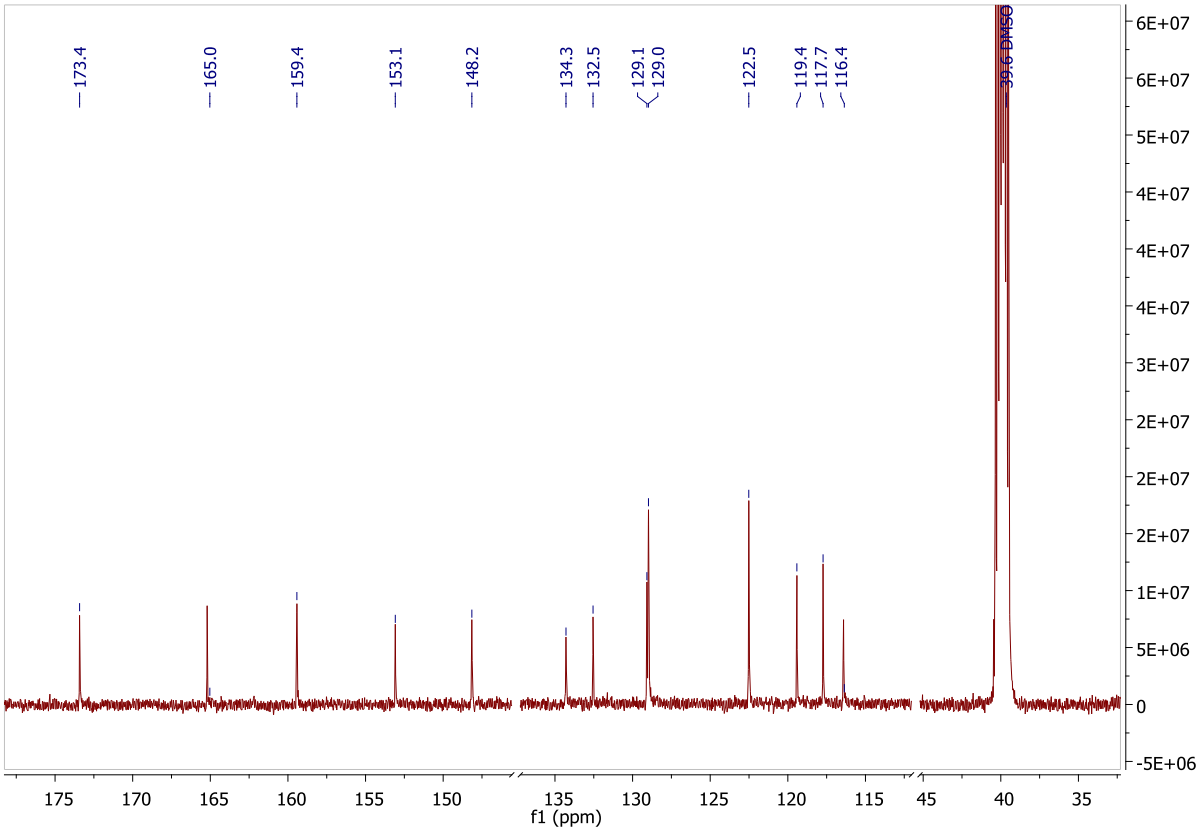
Apêndice 18. Espectro de massas (MicroTOF, infusão direta) do produto FSN-2.



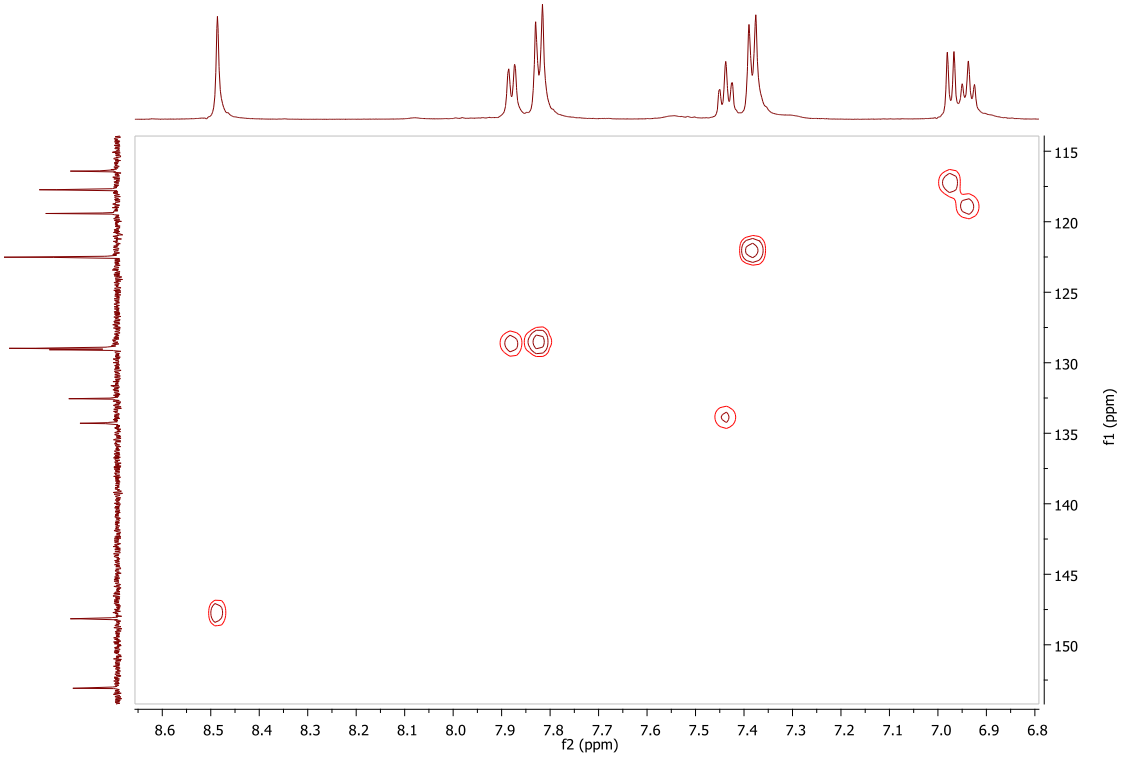
Apêndice 19. Espectro de RMN ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-3.



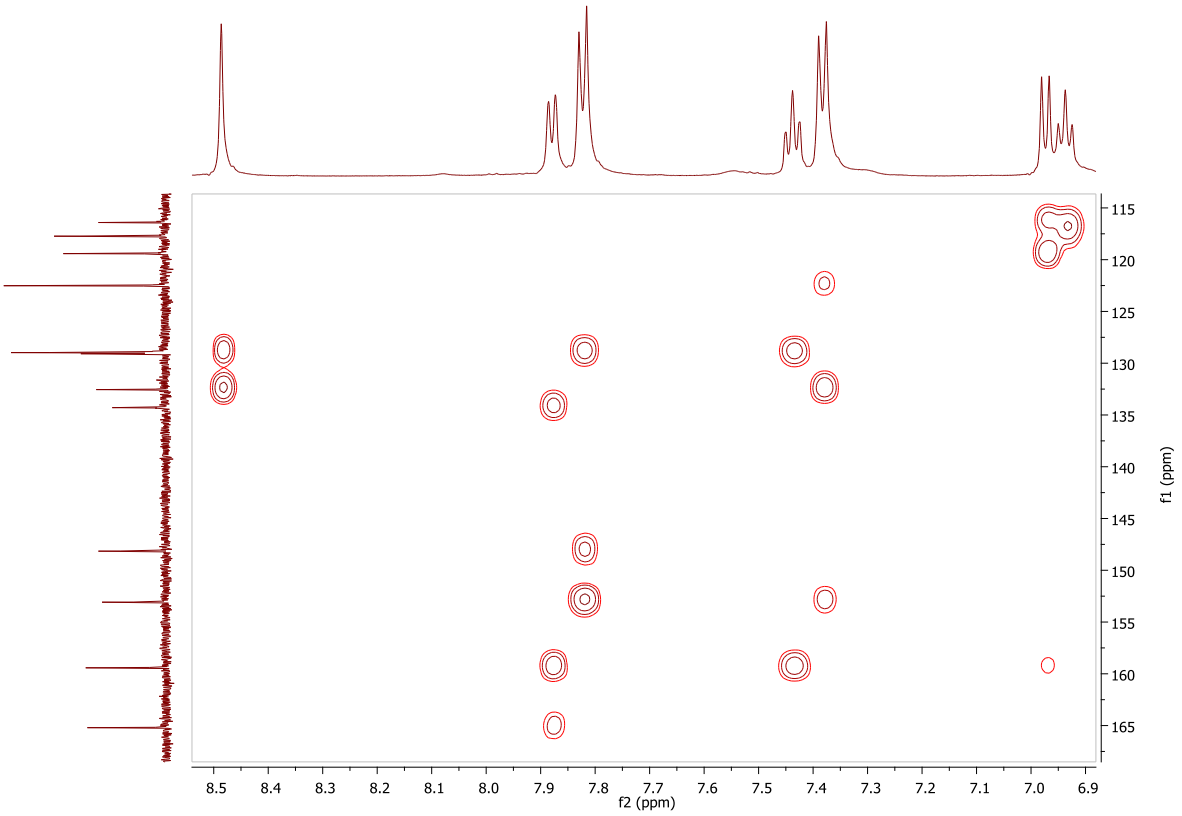
Apêndice 20. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-3.



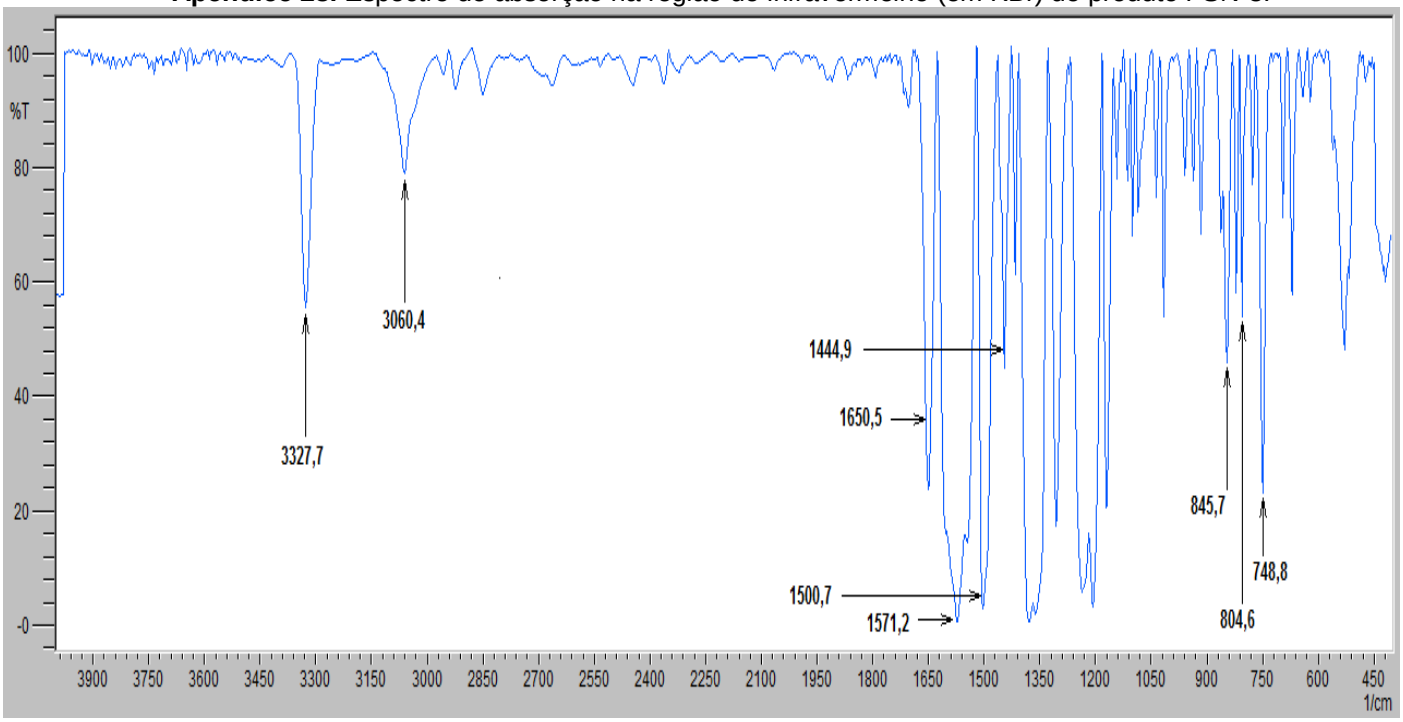
Apêndice 21. Espectro de RMN por HSQC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-3.



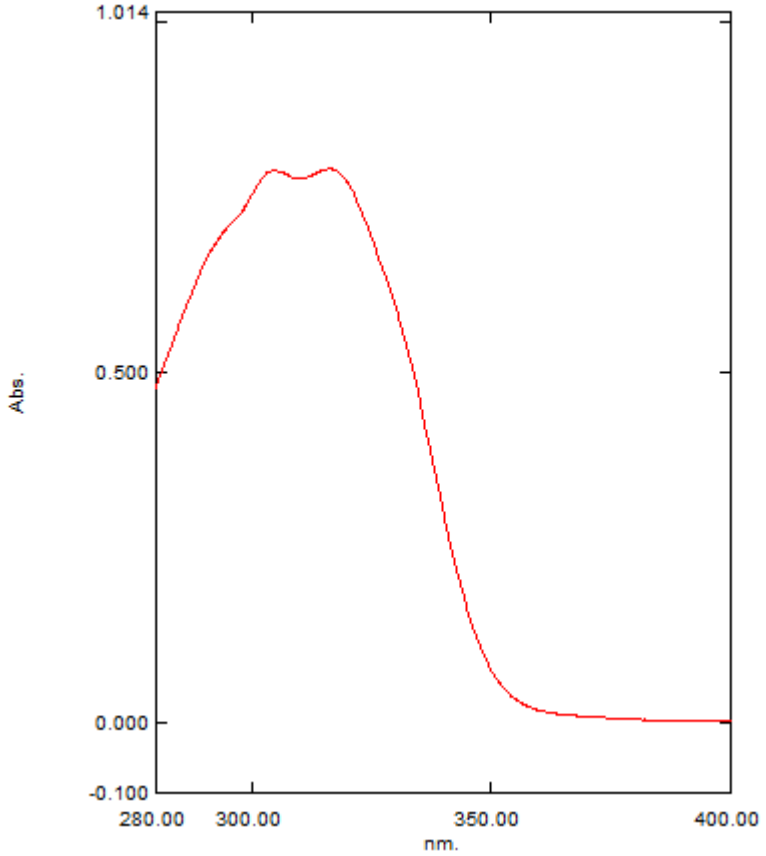
Apêndice 22. Espectro de RMN por HMBC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-3.



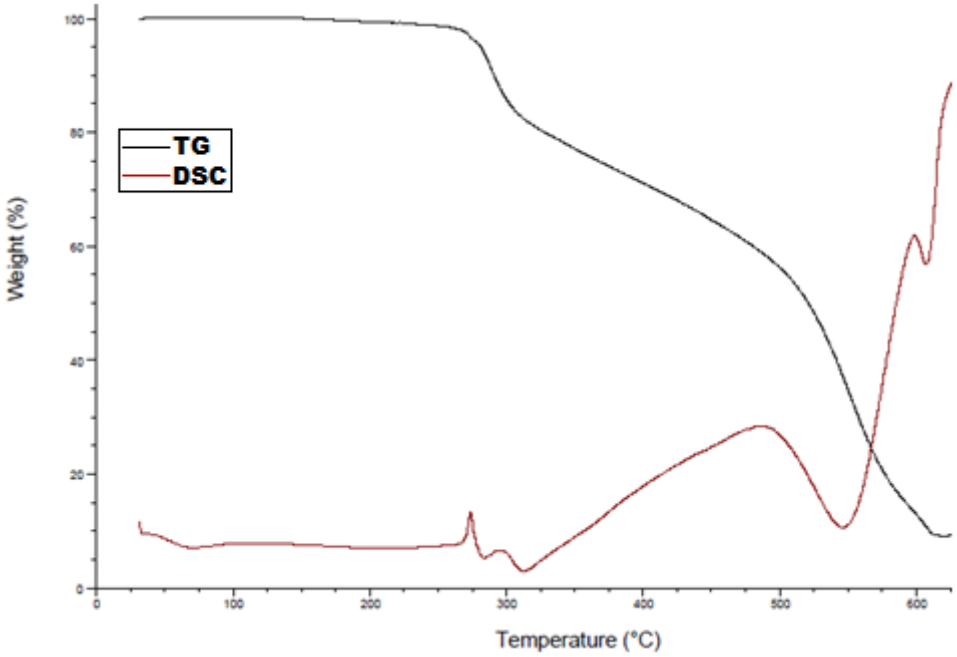
Apêndice 23. Espectro de absorção na região do infravermelho (em KBr) do produto FSN-3.



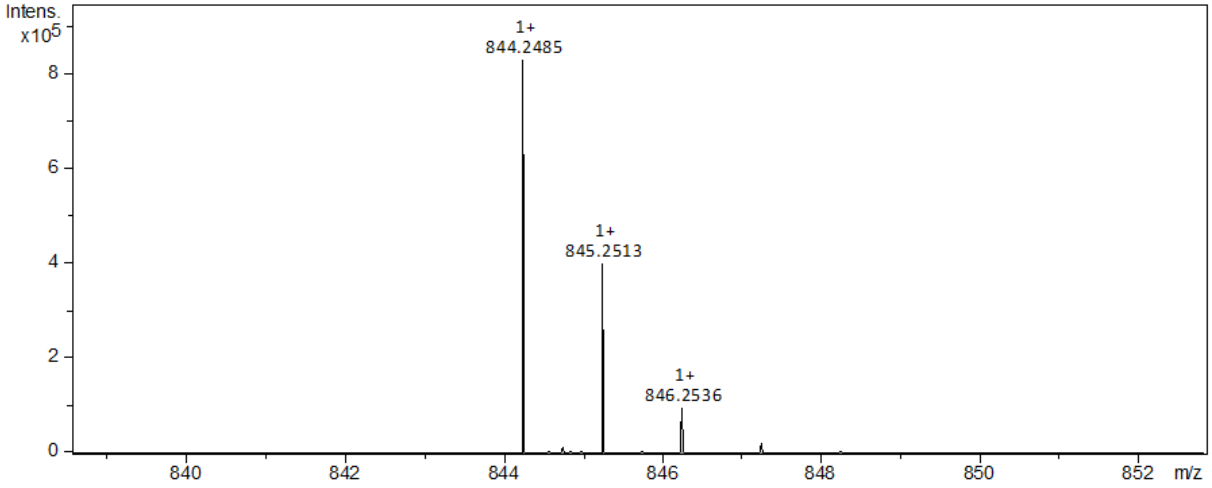
Apêndice 24. Espectro de absorção na região do ultravioleta (em DMSO/metanol) do produto FSN-3.



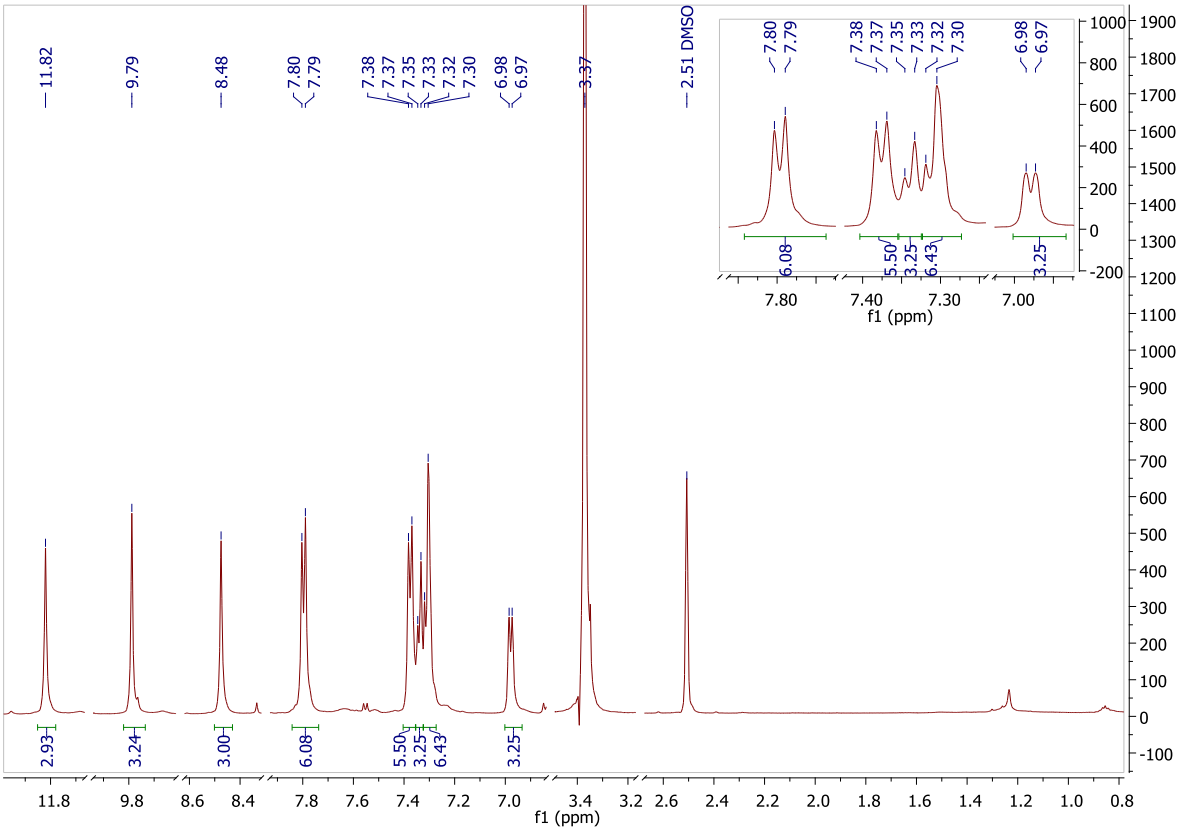
Apêndice 25. Curva térmica do produto FSN-3.



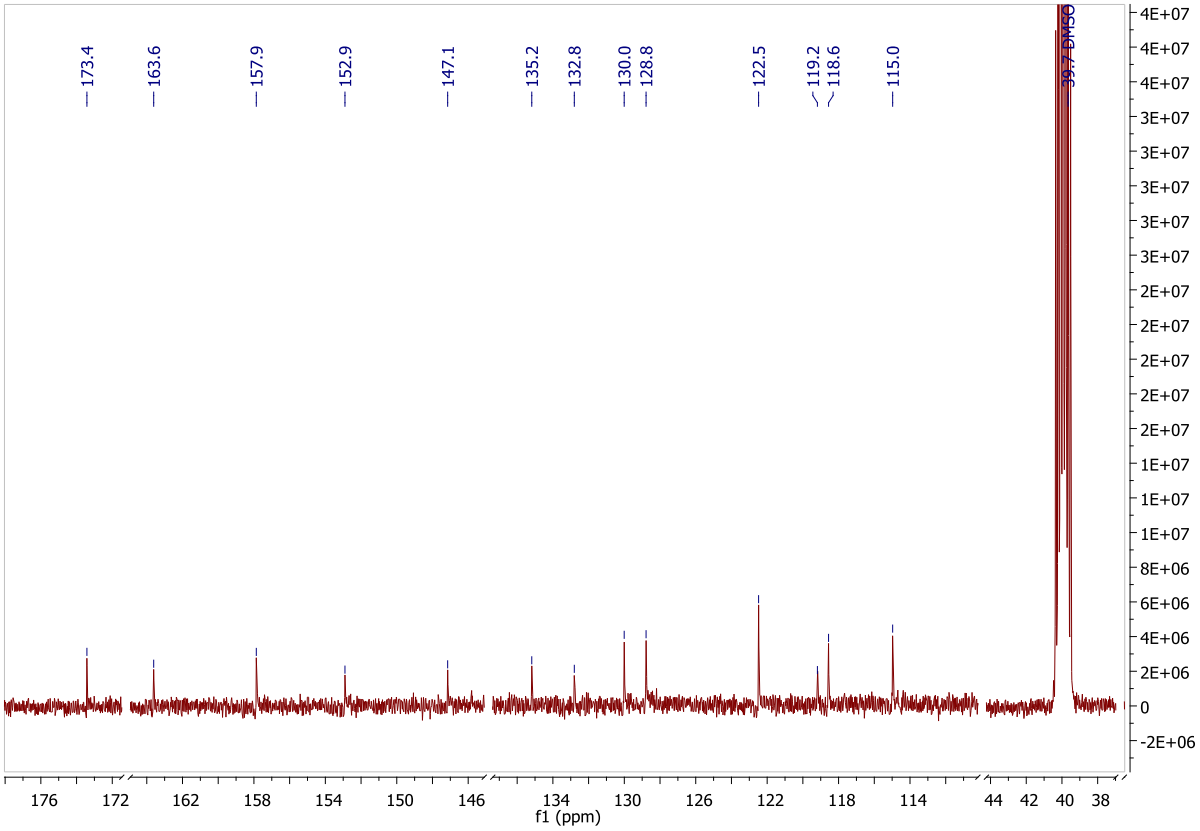
Apêndice 26. Espectro de massas (MicroTOF, infusão direta) do produto FSN-3.



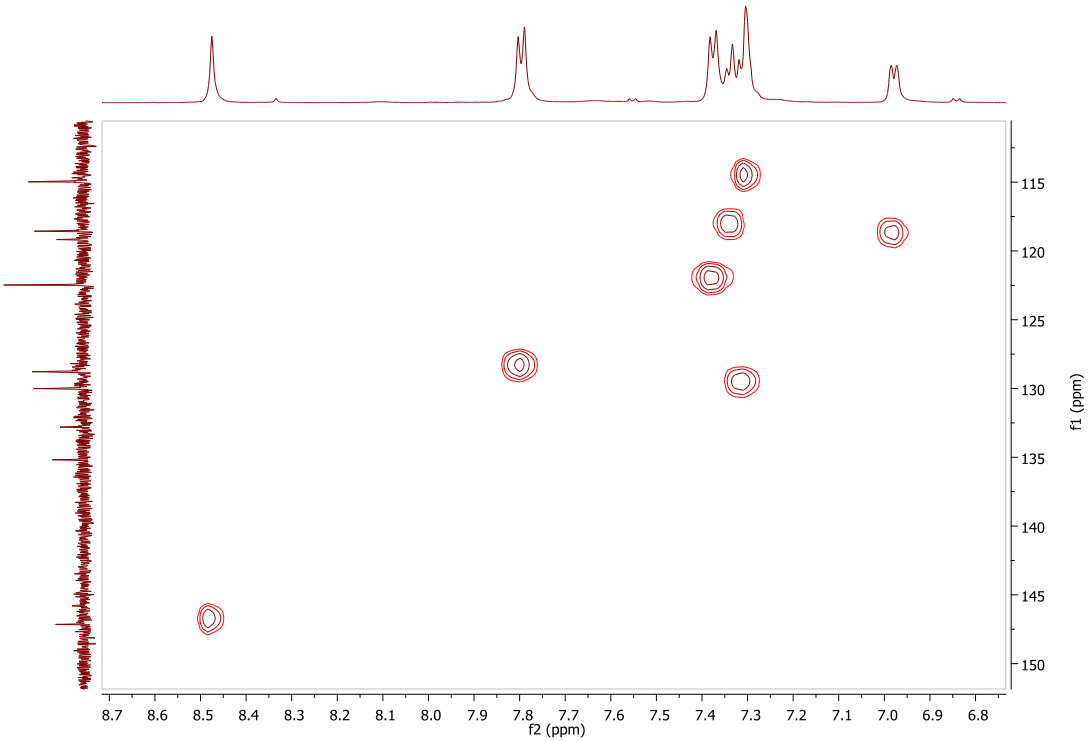
Apêndice 27. Espectro de RMN ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-4.



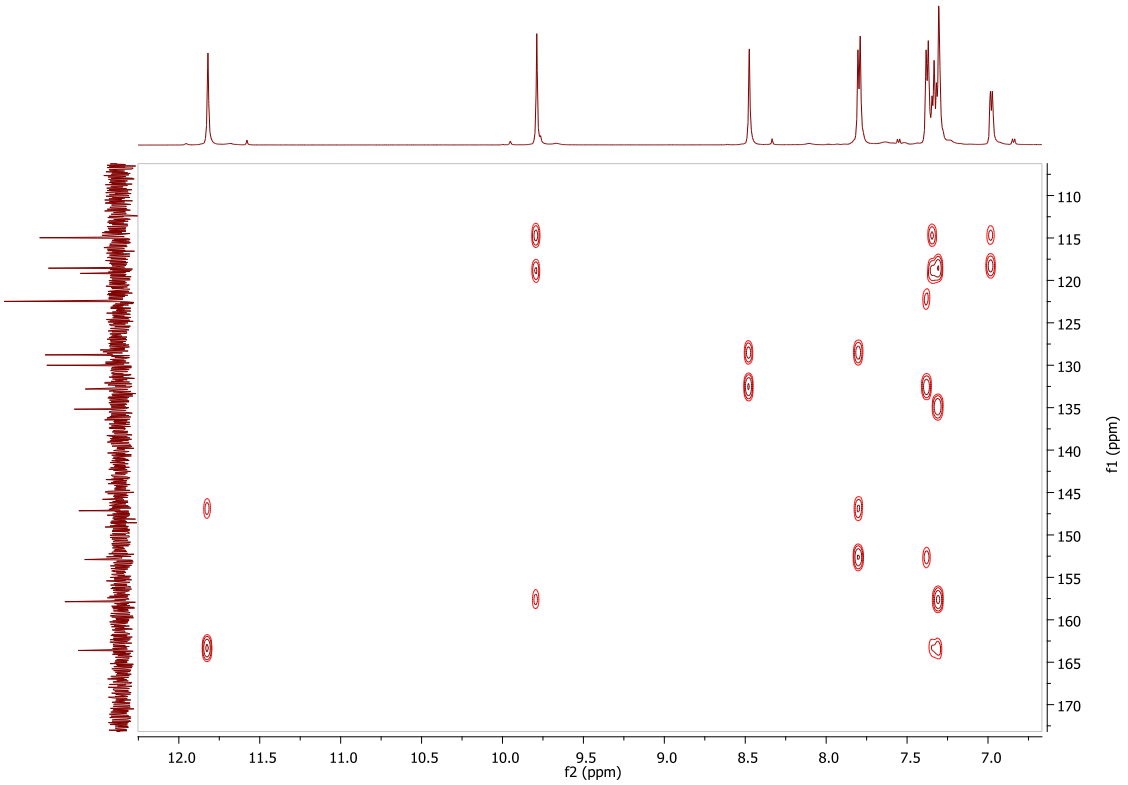
Apêndice 28. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-4.



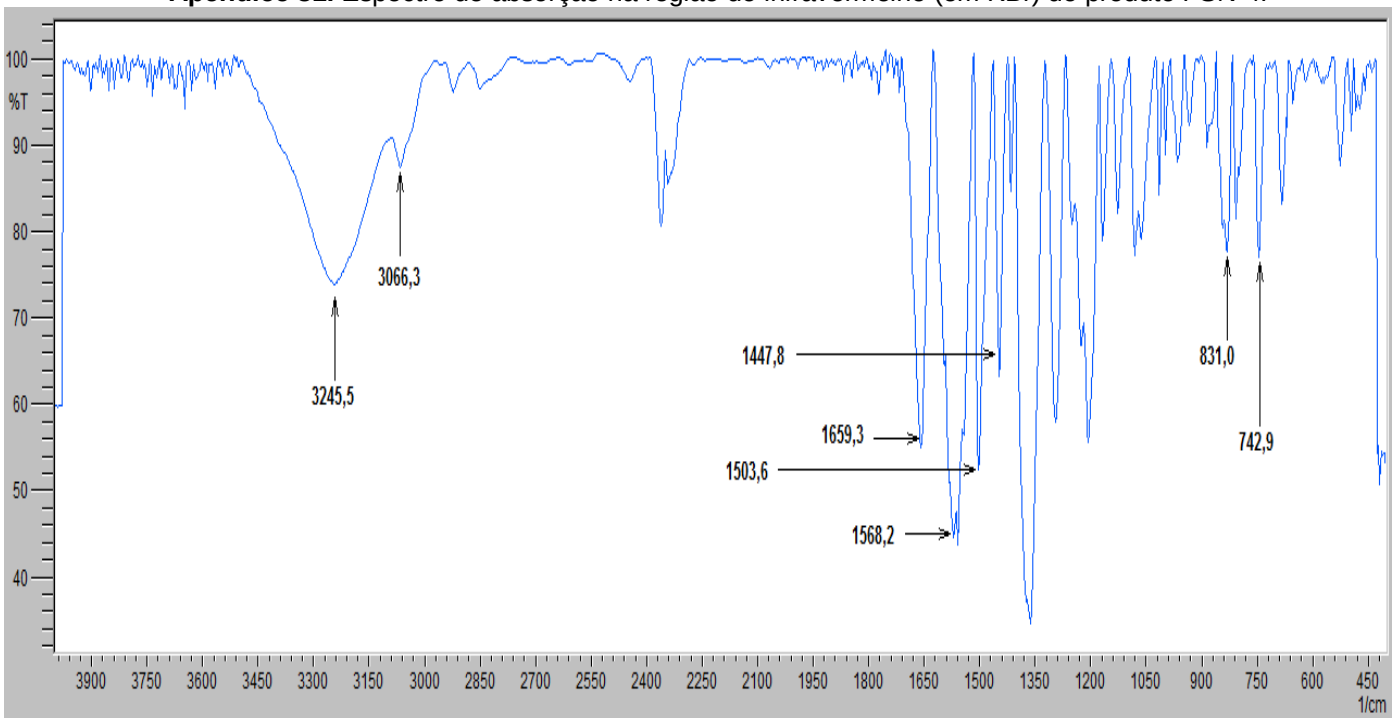
Apêndice 29. Espectro de RMN por HSQC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-4.



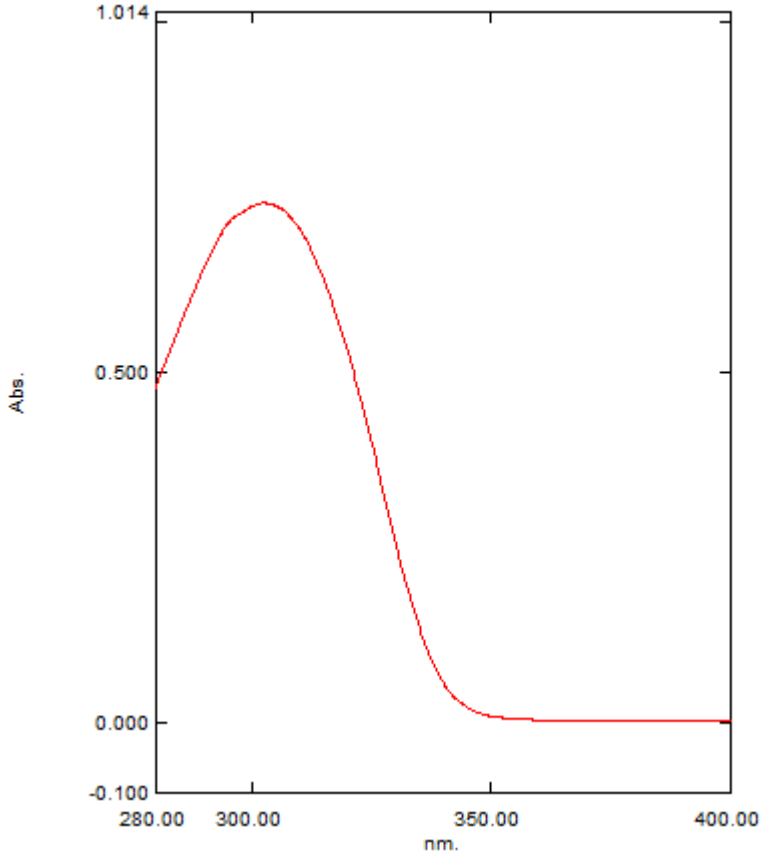
Apêndice 30. Espectro de RMN por HMBC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-4.



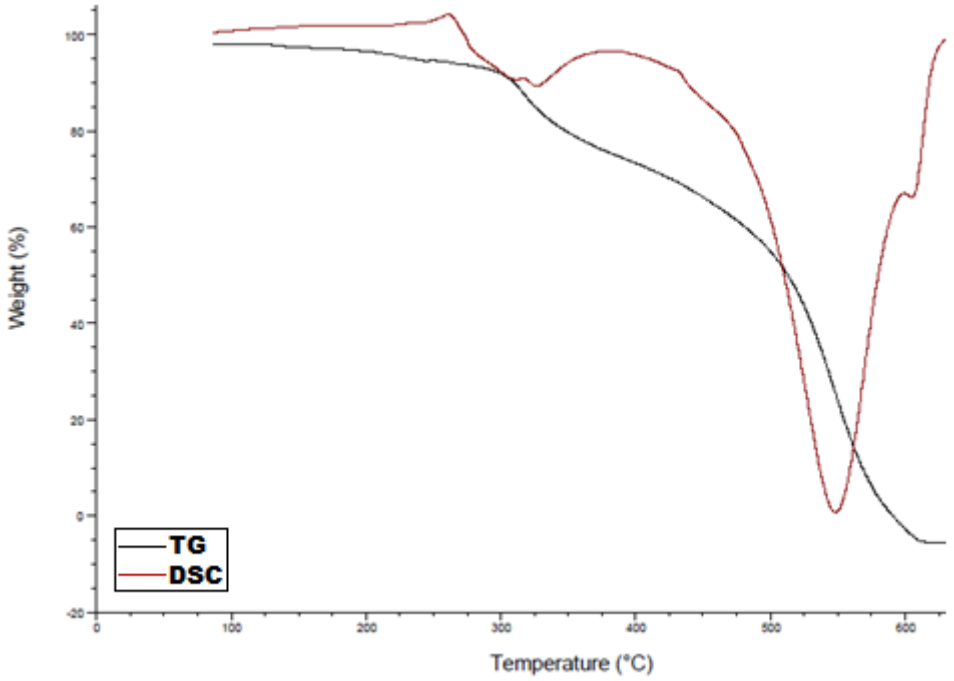
Apêndice 31. Espectro de absorção na região do infravermelho (em KBr) do produto FSN-4.



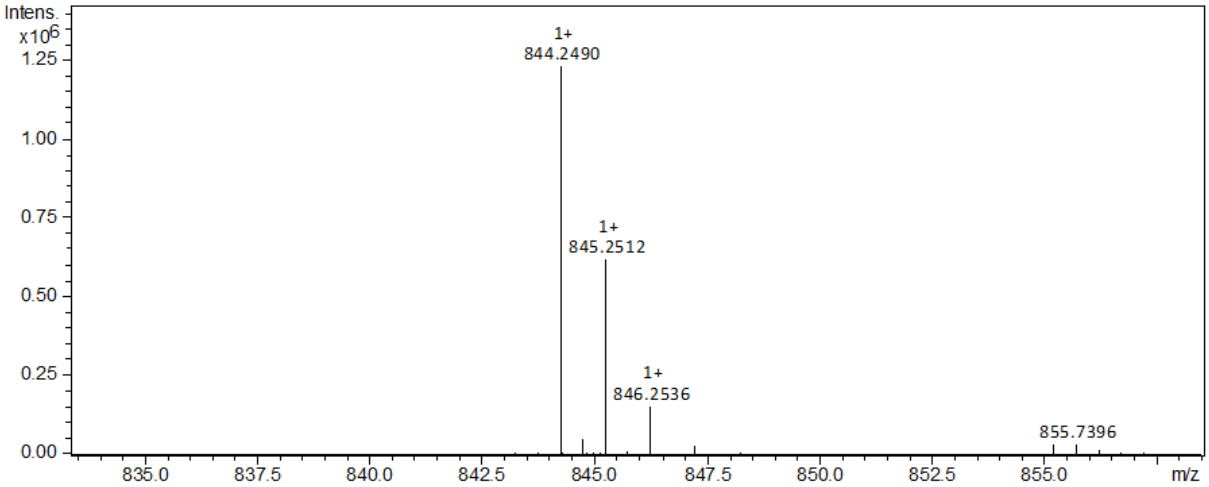
Apêndice 32. Espectro de absorção na região do ultravioleta (em DMSO/metanol) do produto FSN-4.



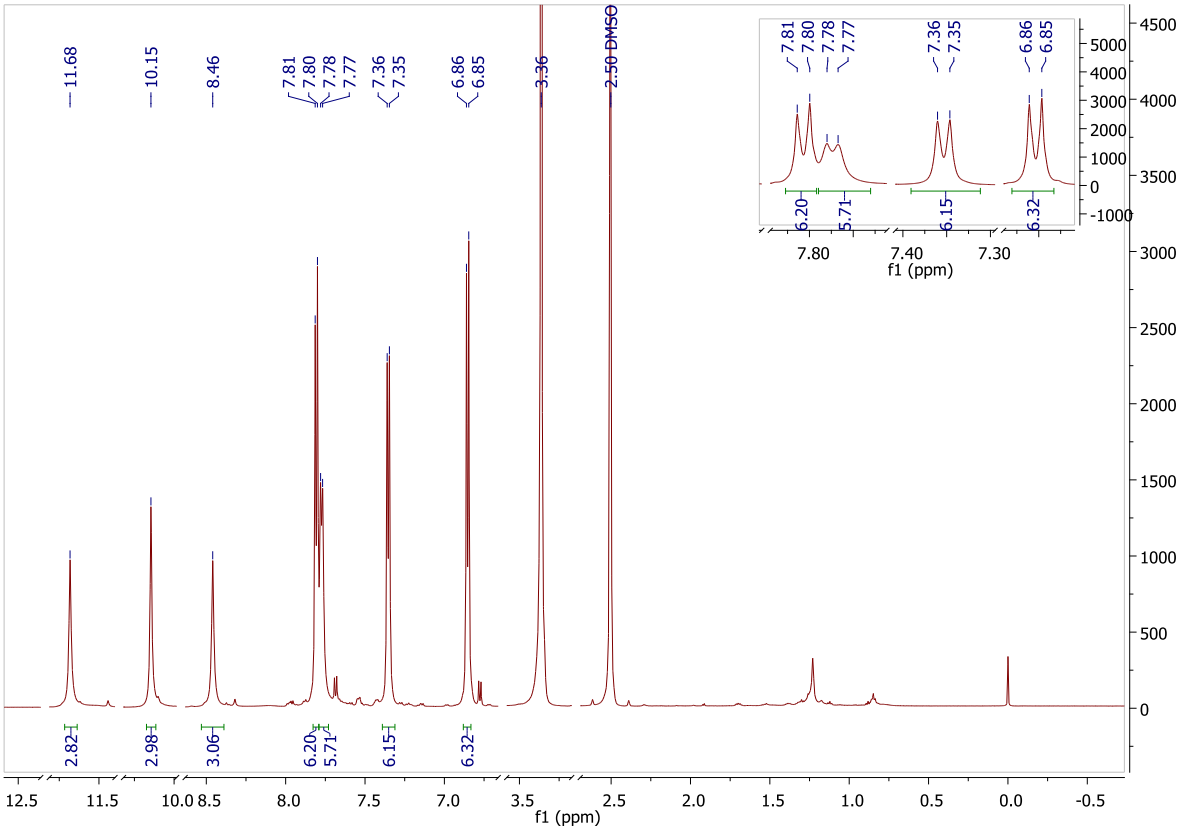
Apêndice 33. Curva térmica do produto FSN-4.



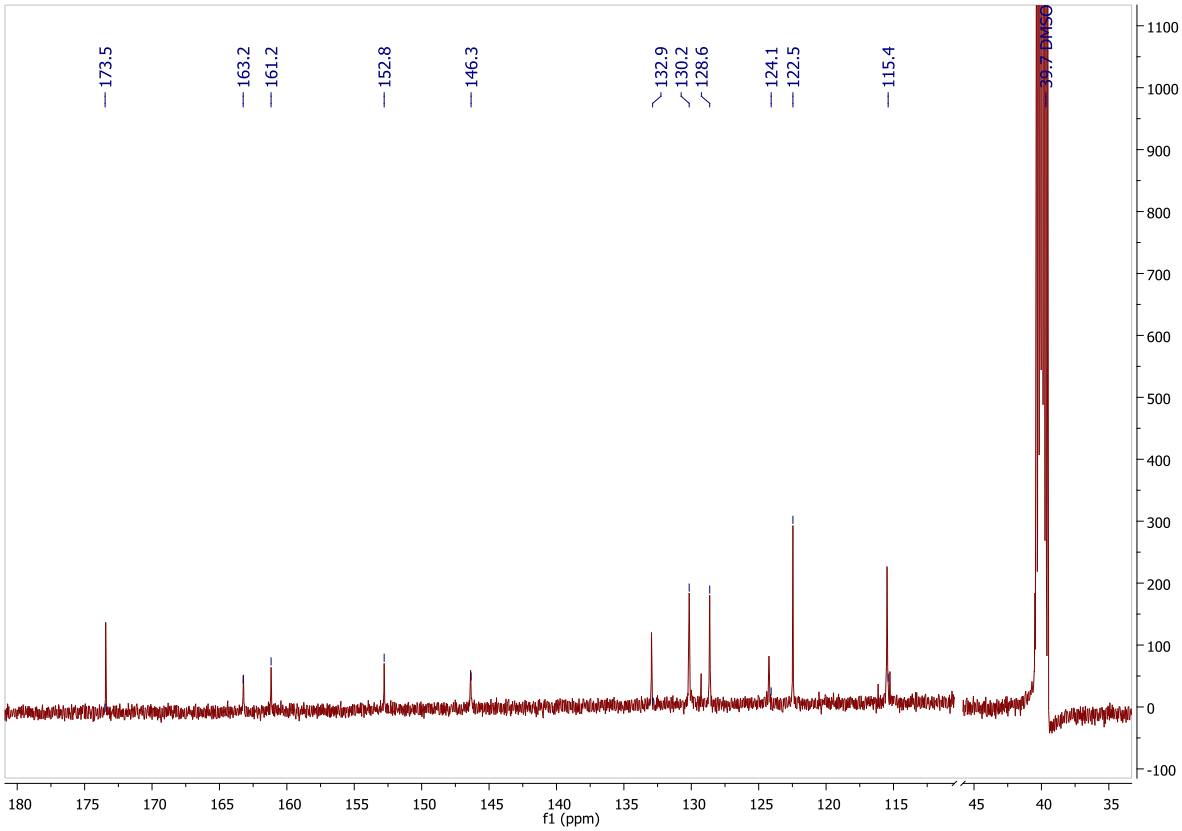
Apêndice 34. Espectro de massas (MicroTOF, infusão direta) do produto FSN-4.



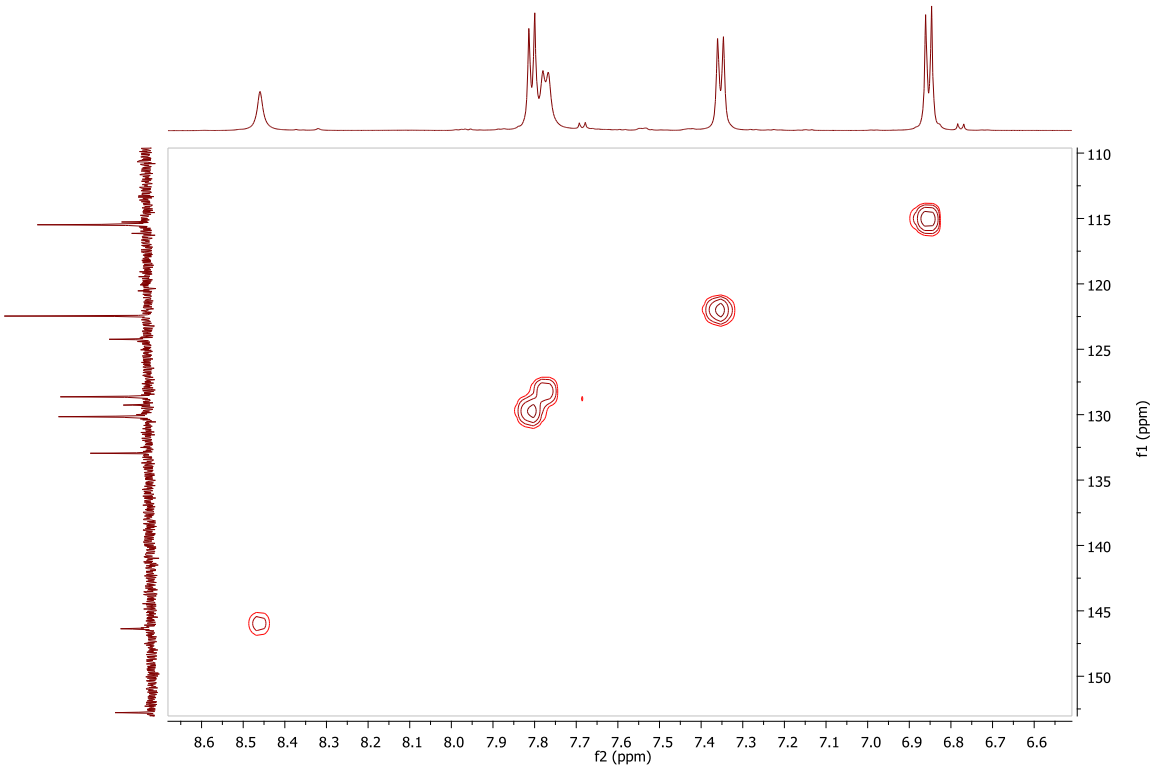
Apêndice 35. Espectro de RMN ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-5.



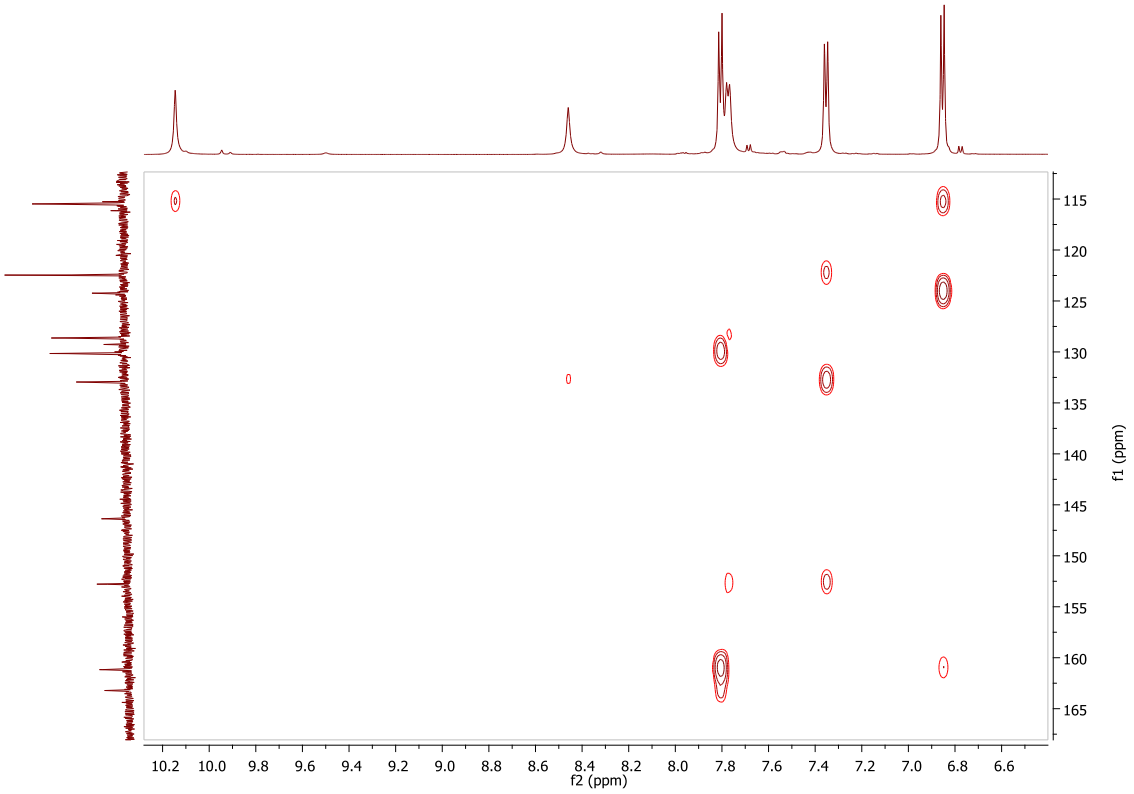
Apêndice 36. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-5.



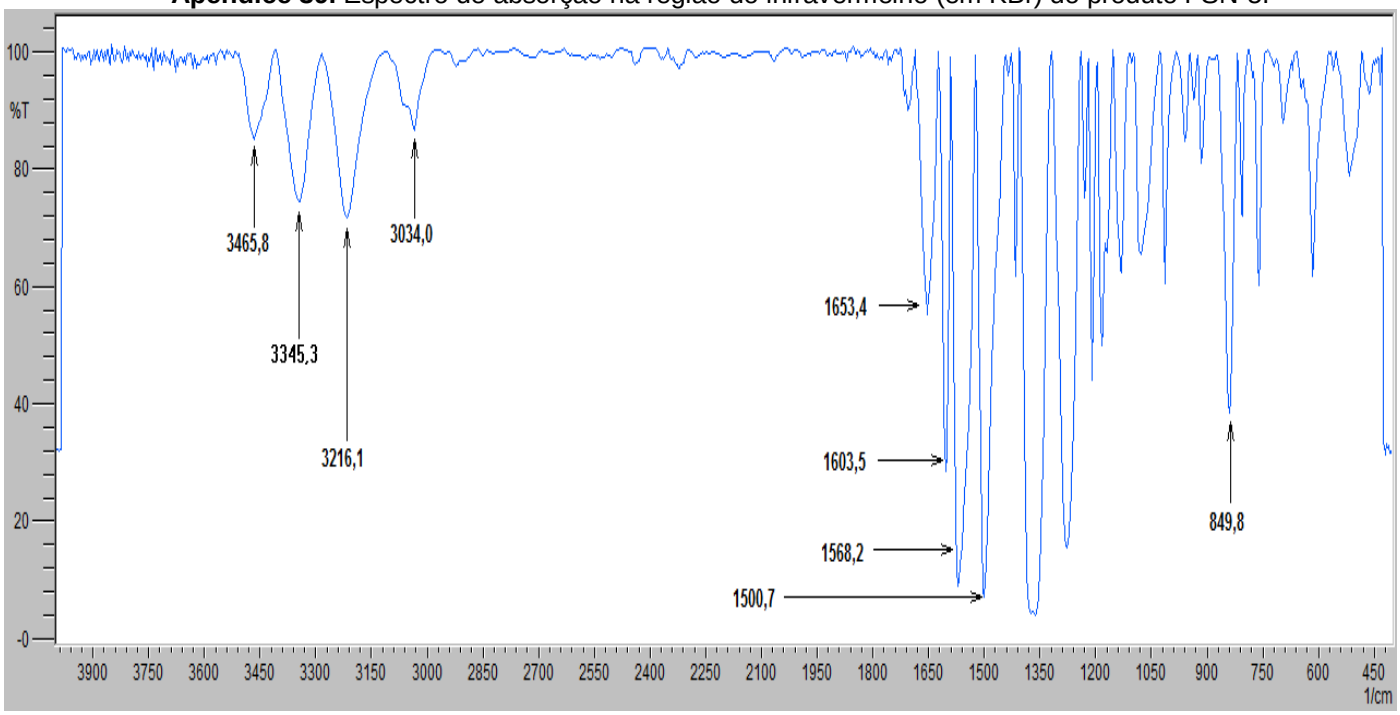
Apêndice 37. Espectro de RMN por HSQC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-5.



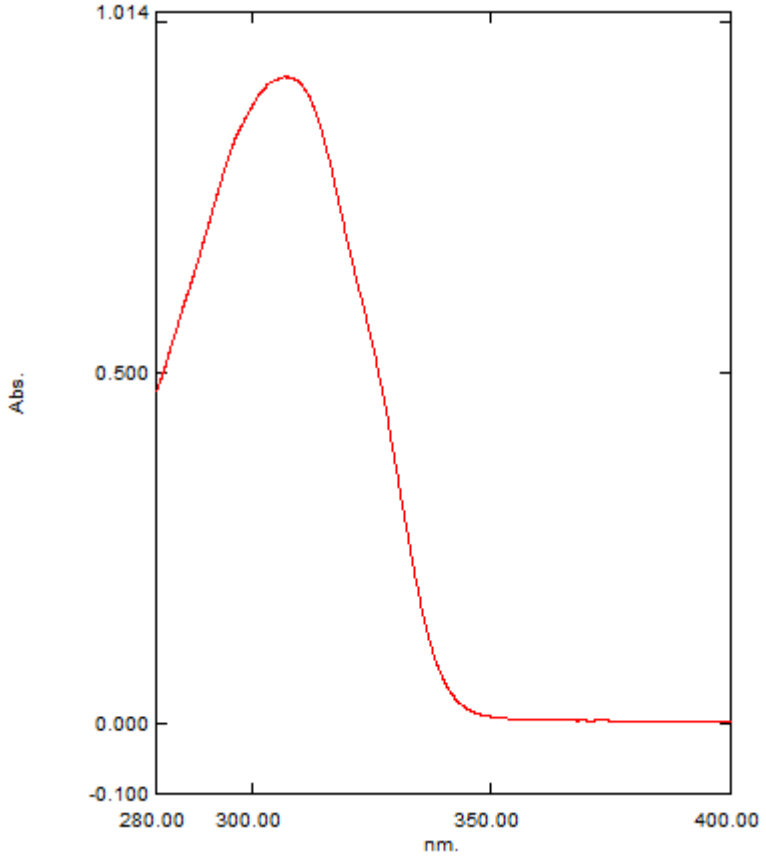
Apêndice 38. Espectro de RMN por HMBC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-5.



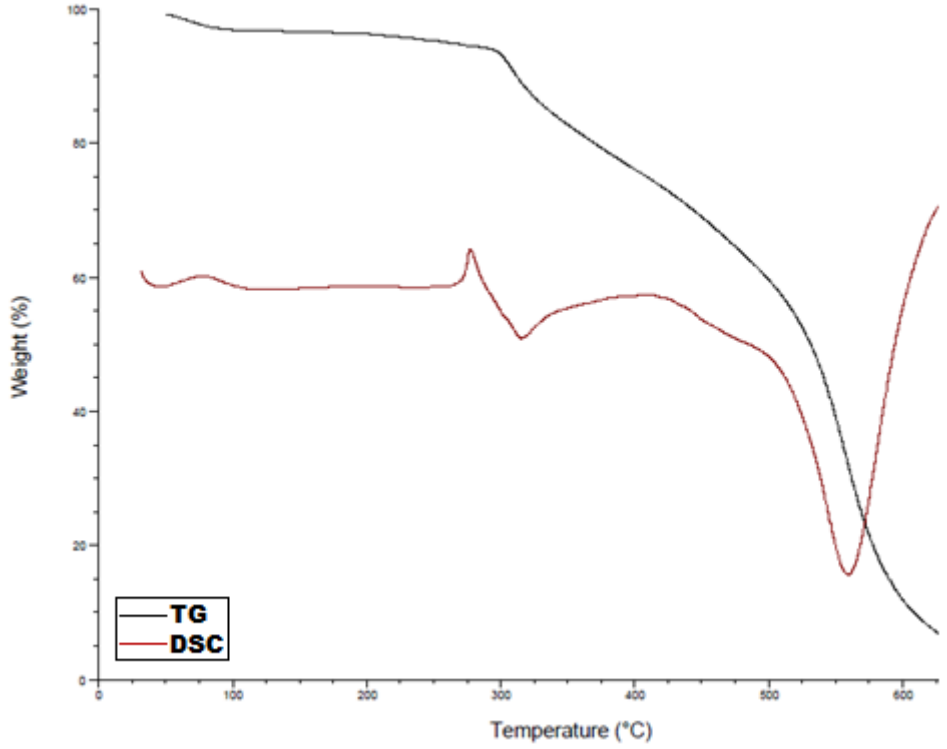
Apêndice 39. Espectro de absorção na região do infravermelho (em KBr) do produto FSN-5.



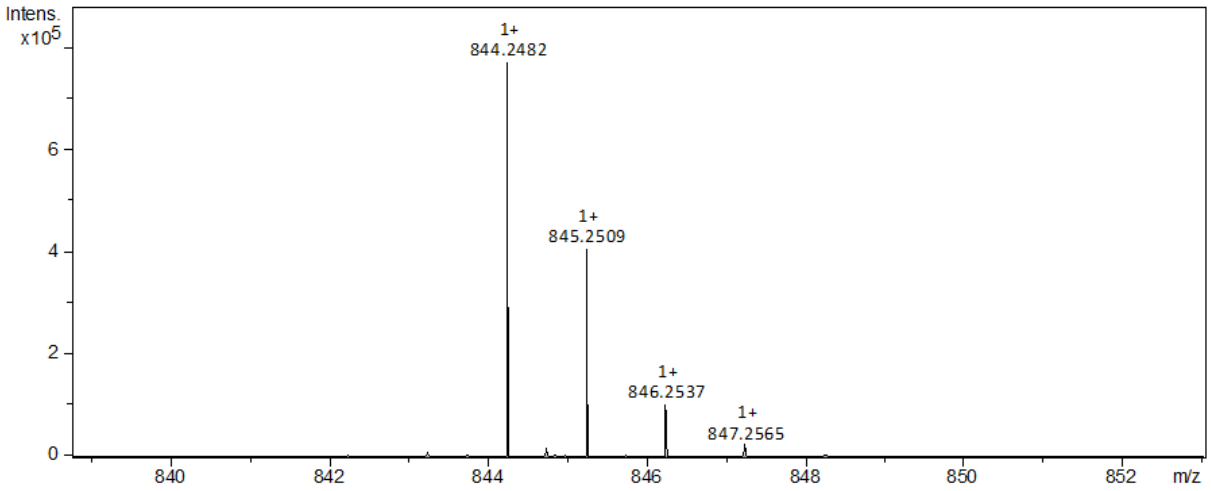
Apêndice 40. Espectro de absorção na região do ultravioleta (em DMSO/metanol) do produto FSN-5.



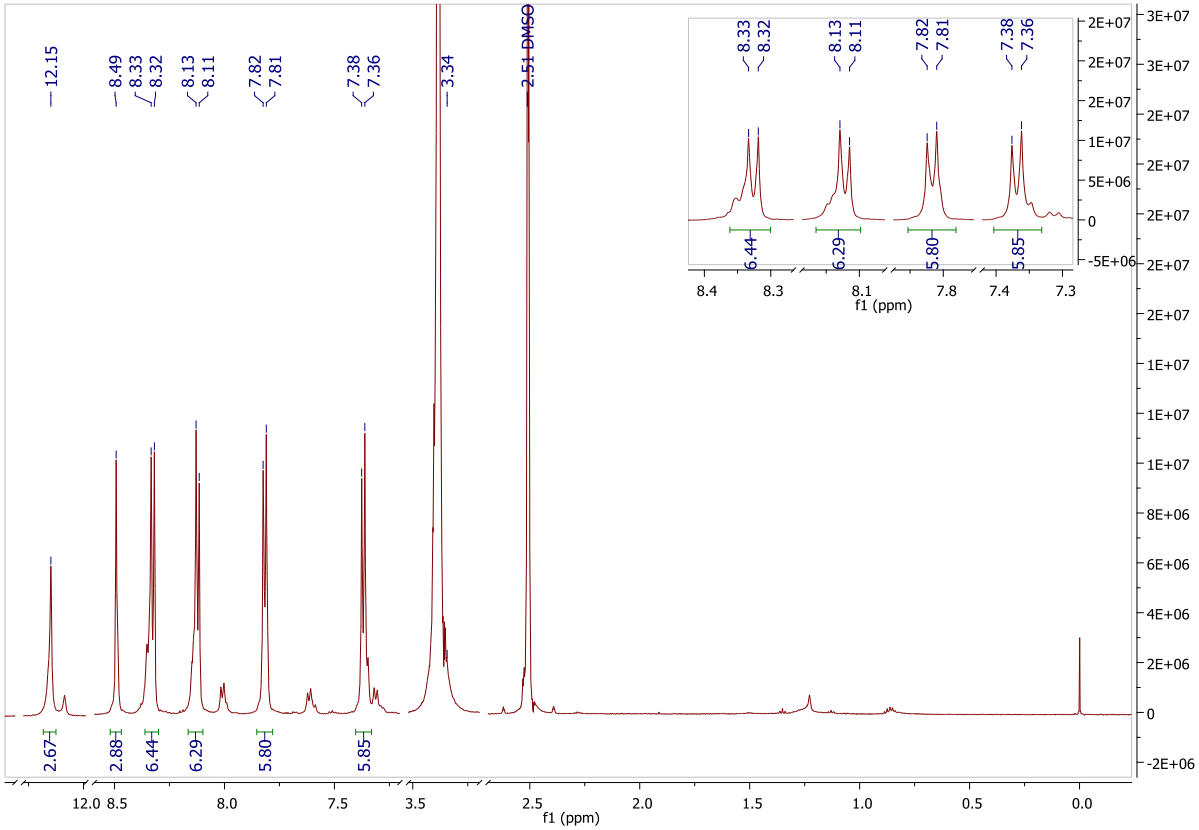
Apêndice 41. Curva térmica do produto FSN-5.



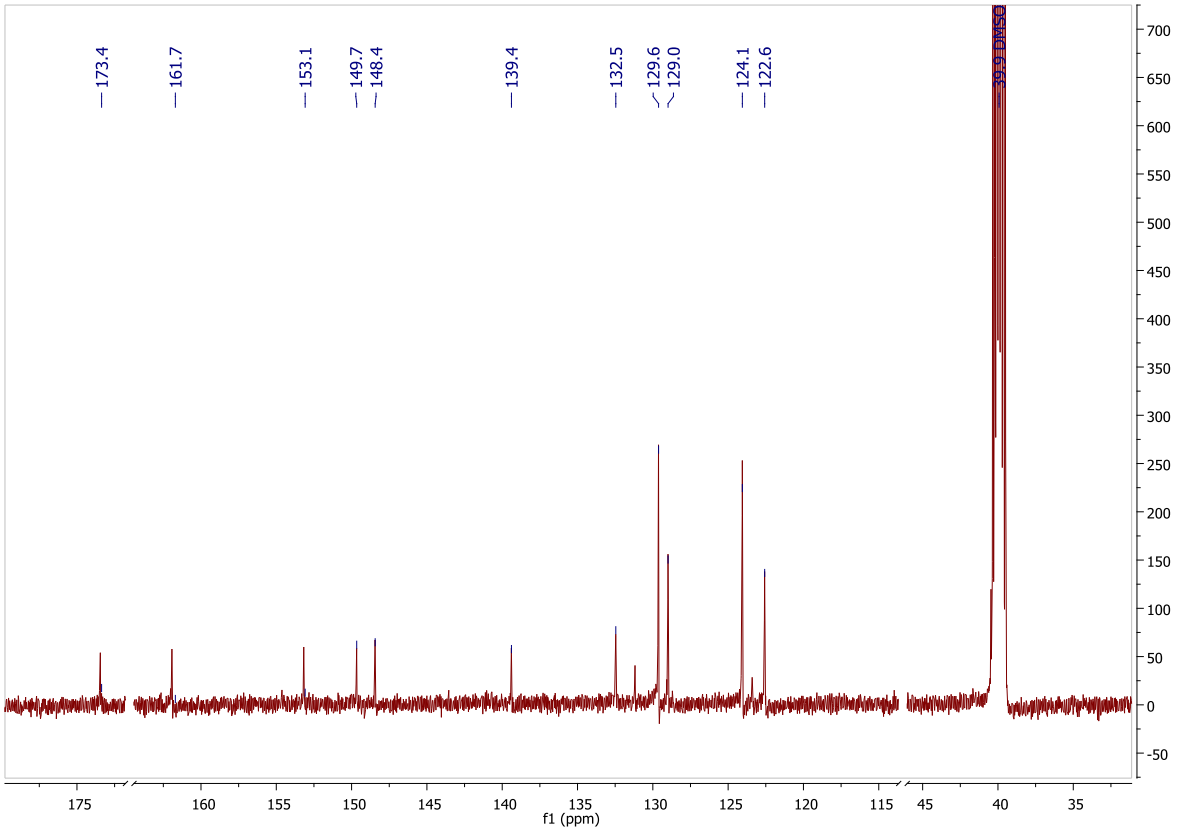
Apêndice 42. Espectro de massas (MicroTOF, infusão direta) do produto FSN-5.



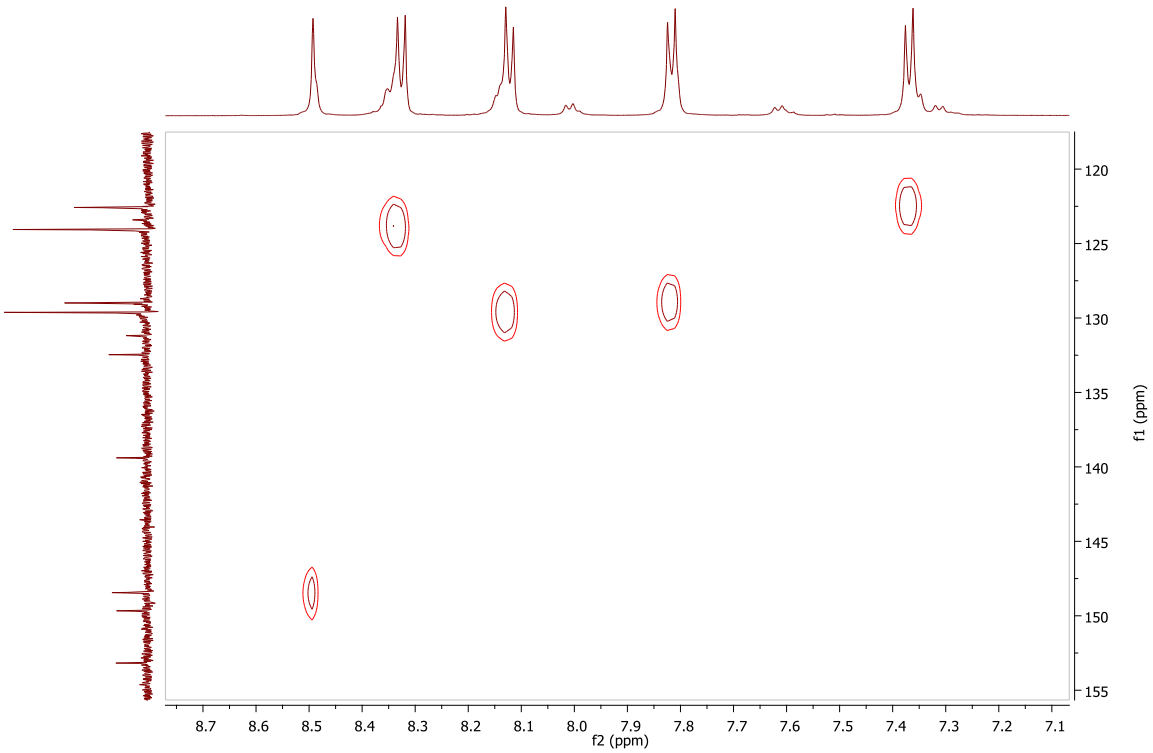
Apêndice 43. Espectro de RMN ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-6.



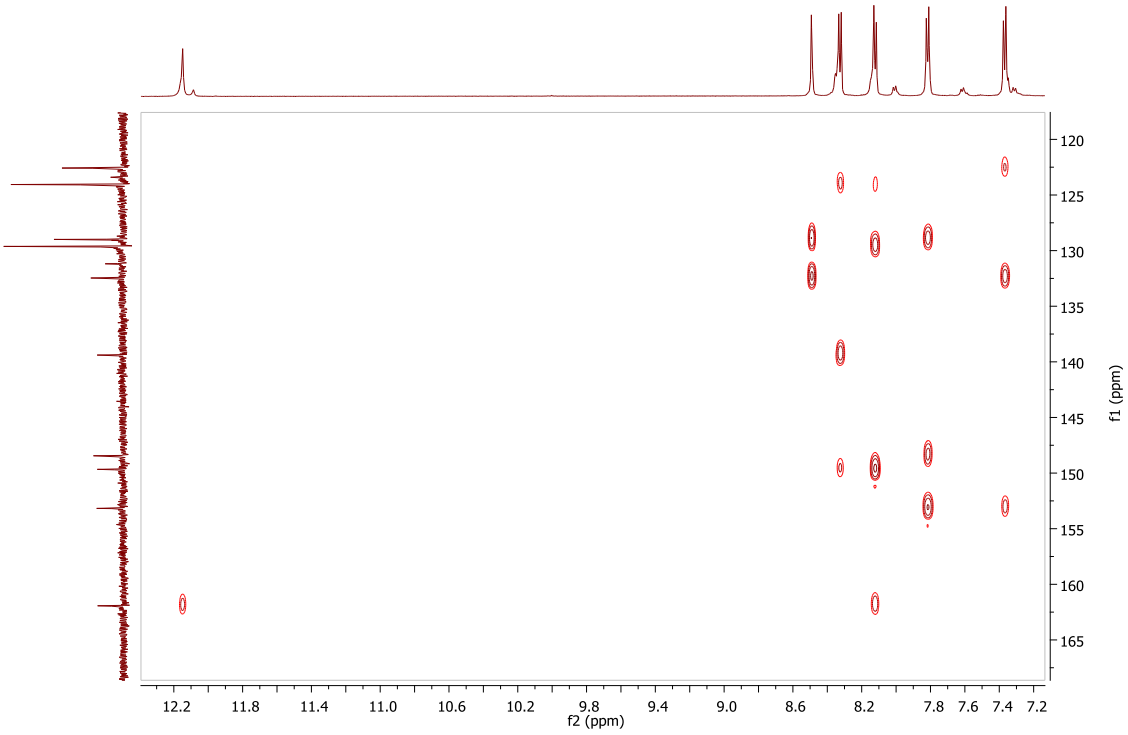
Apêndice 44. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-6.



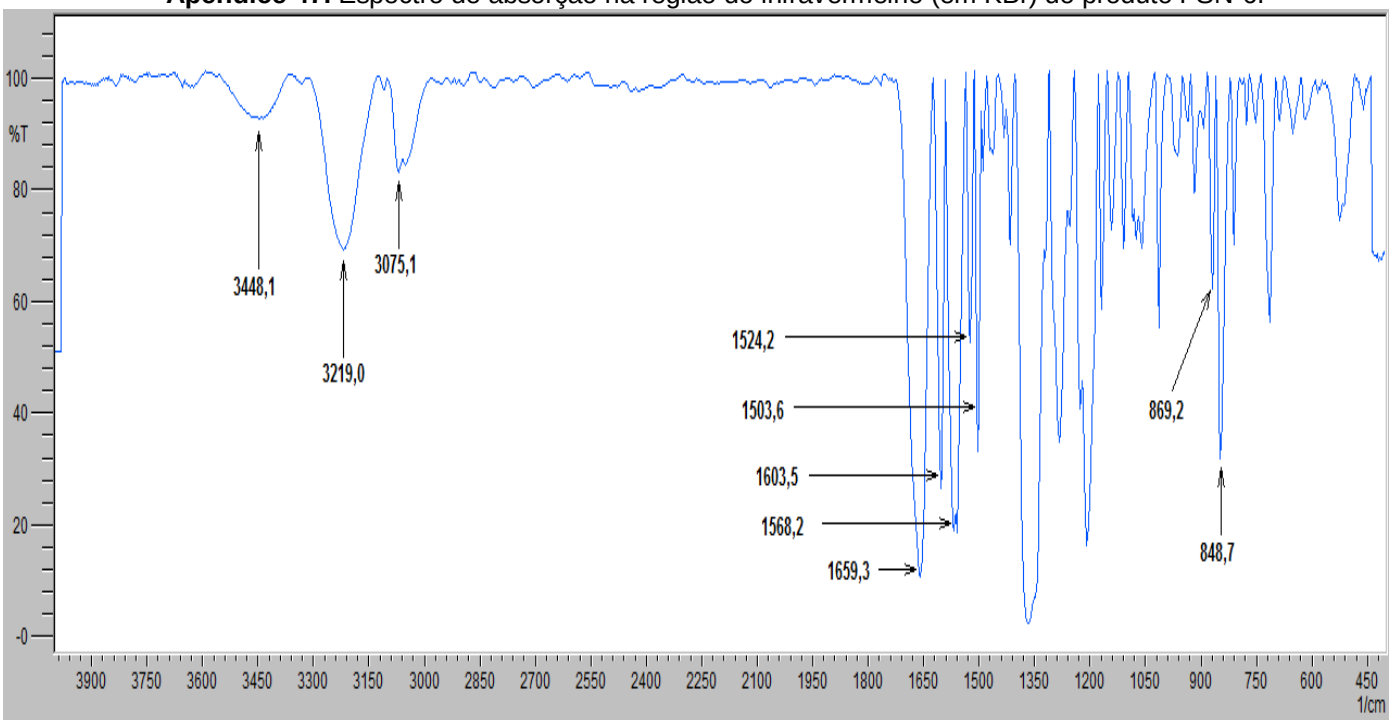
Apêndice 45. Espectro de RMN por HSQC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-6.



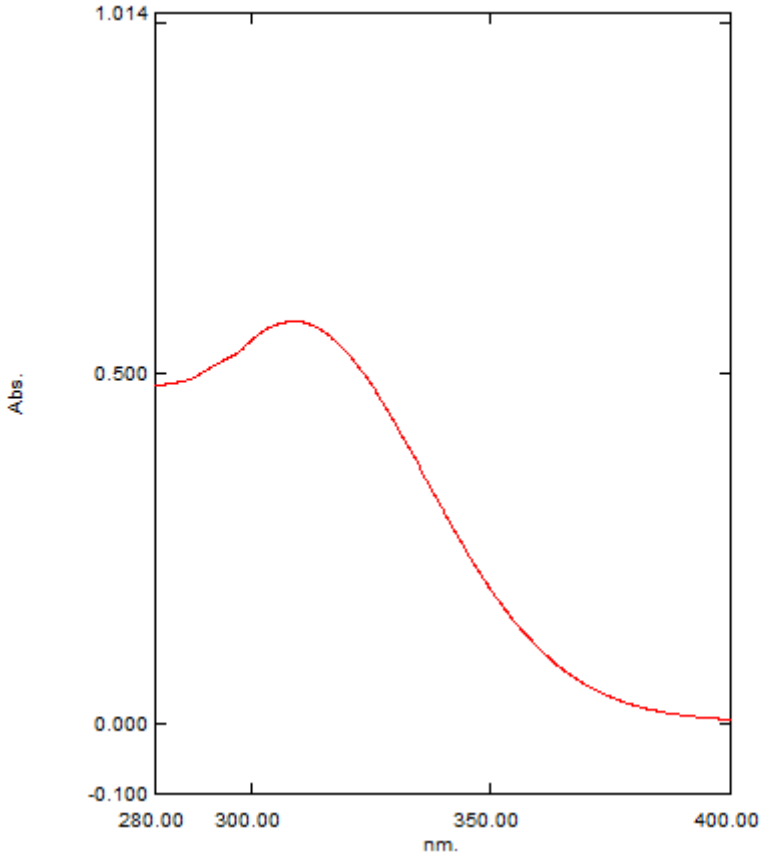
Apêndice 46. Espectro de RMN por HMBC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-6.



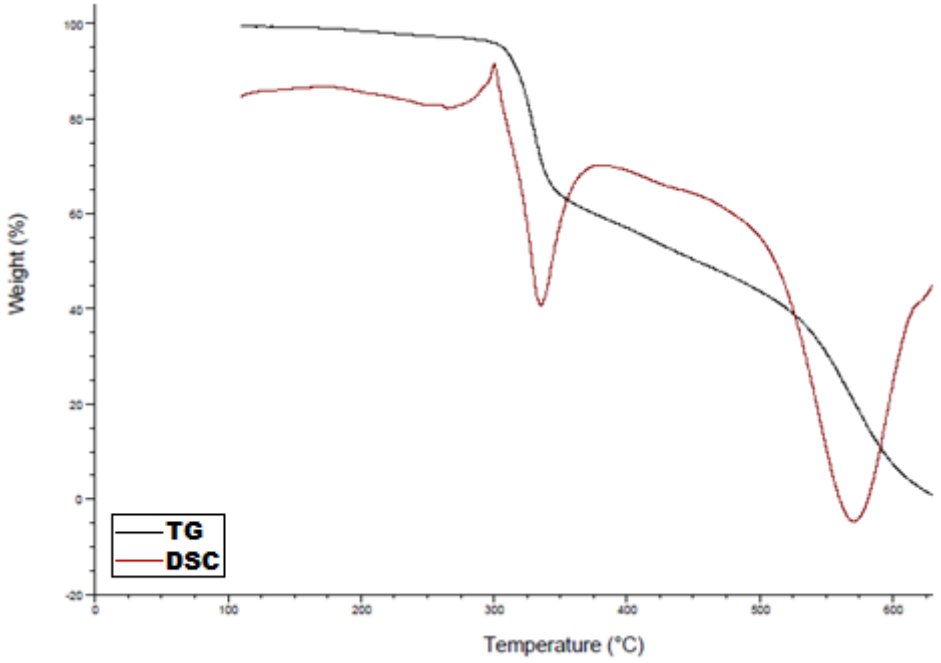
Apêndice 47. Espectro de absorção na região do infravermelho (em KBr) do produto FSN-6.



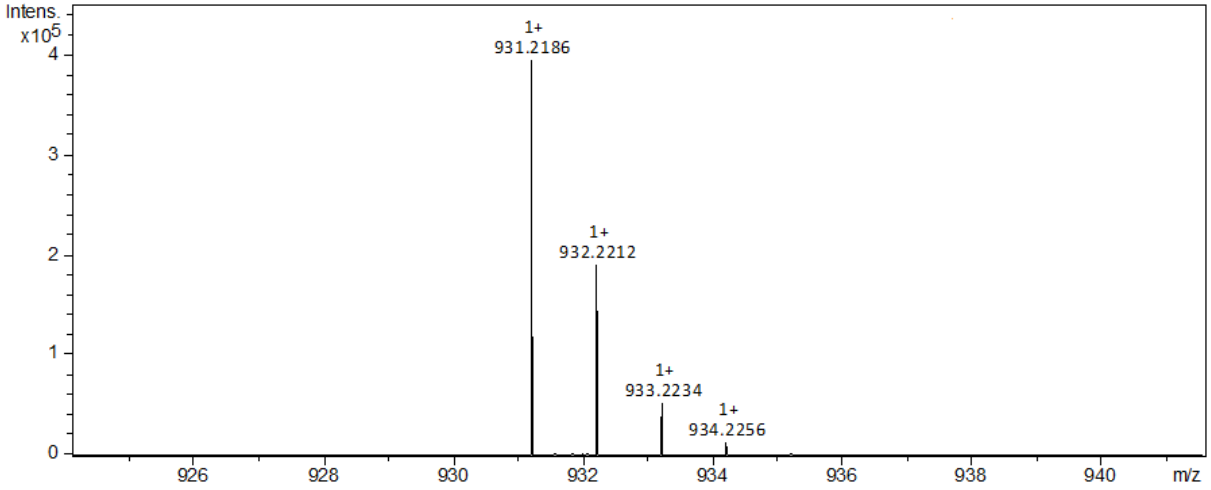
Apêndice 48. Espectro de absorção na região do ultravioleta (em DMSO/metanol) do produto FSN-6.



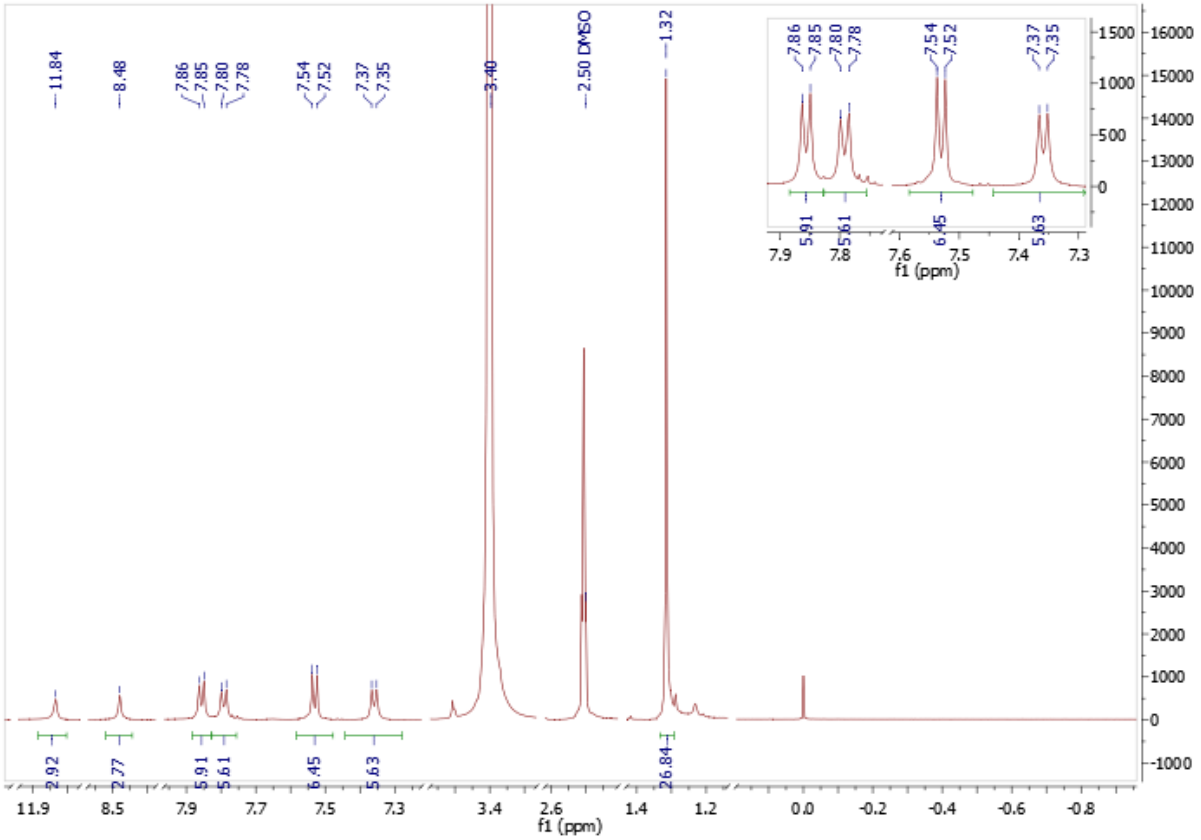
Apêndice 49. Curva térmica do produto FSN-6.



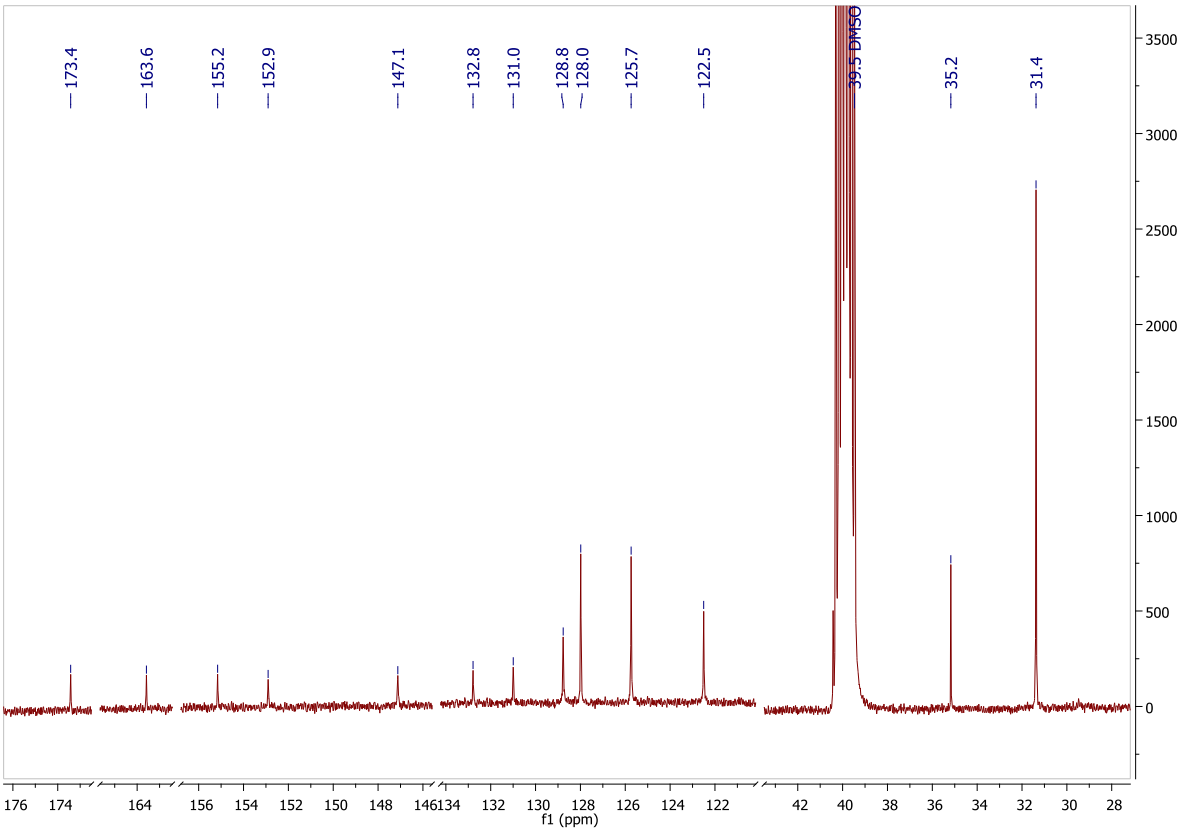
Apêndice 50. Espectro de massas (MicroTOF, infusão direta) do produto FSN-6.



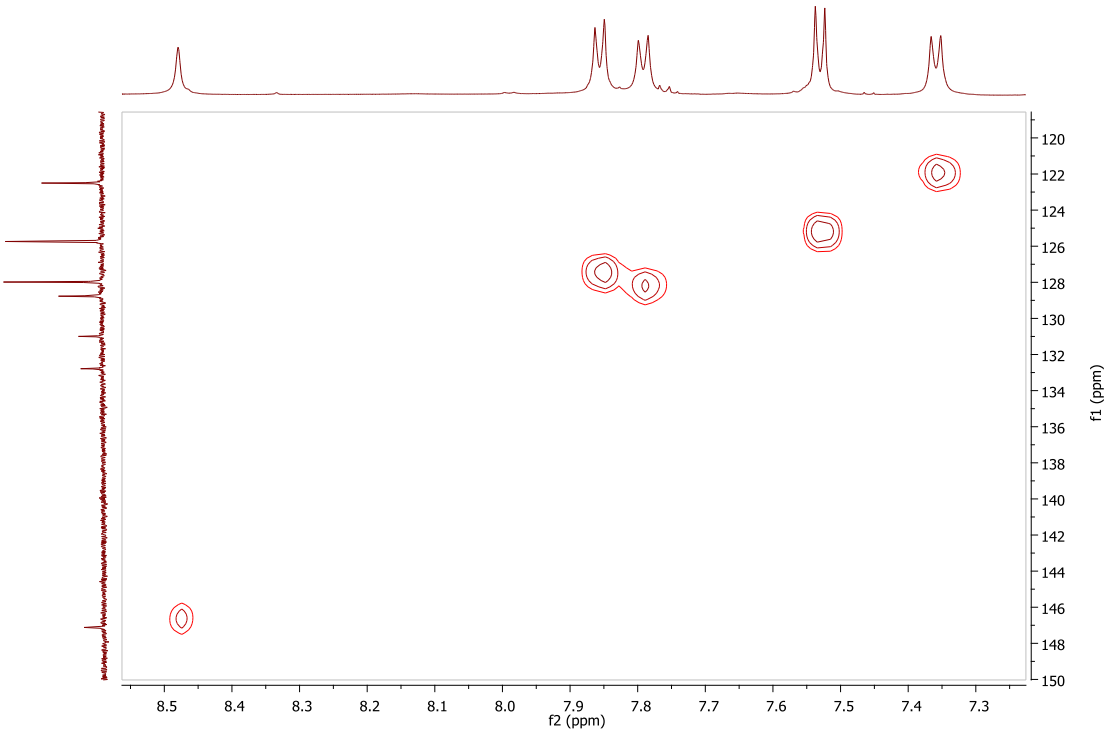
Apêndice 51. Espectro de RMN ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-7.



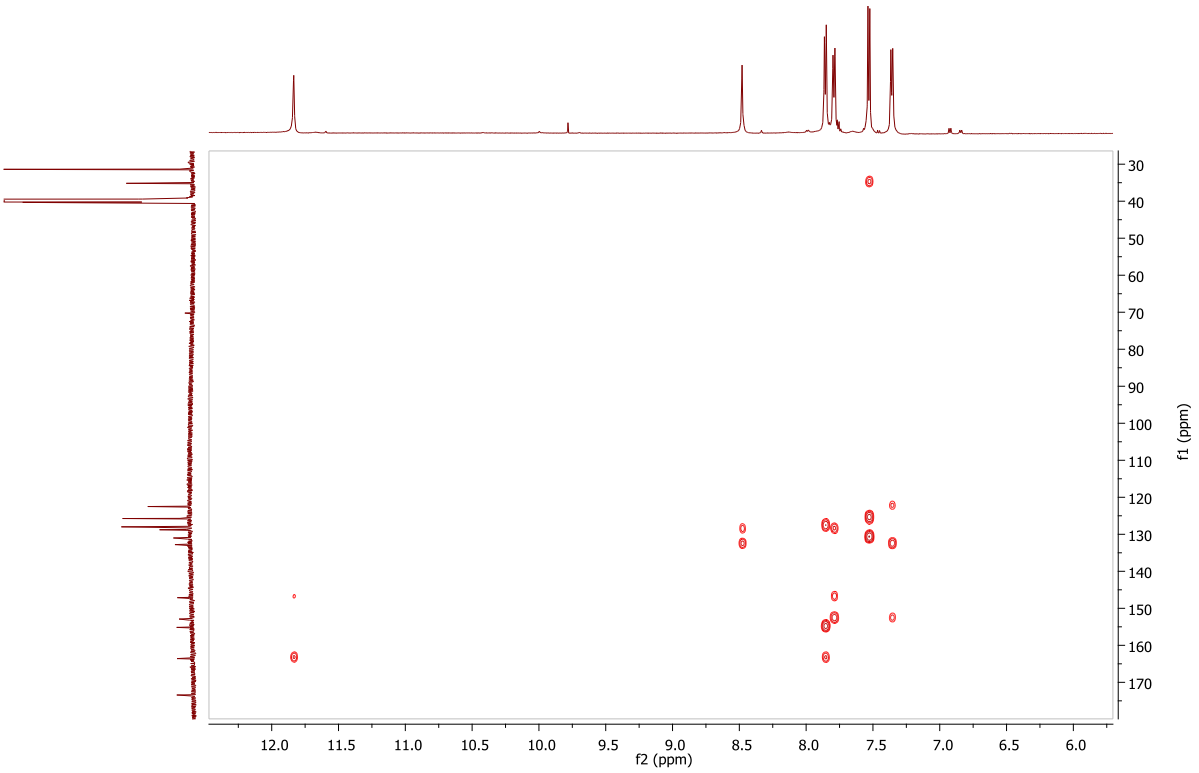
Apêndice 52. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-7.



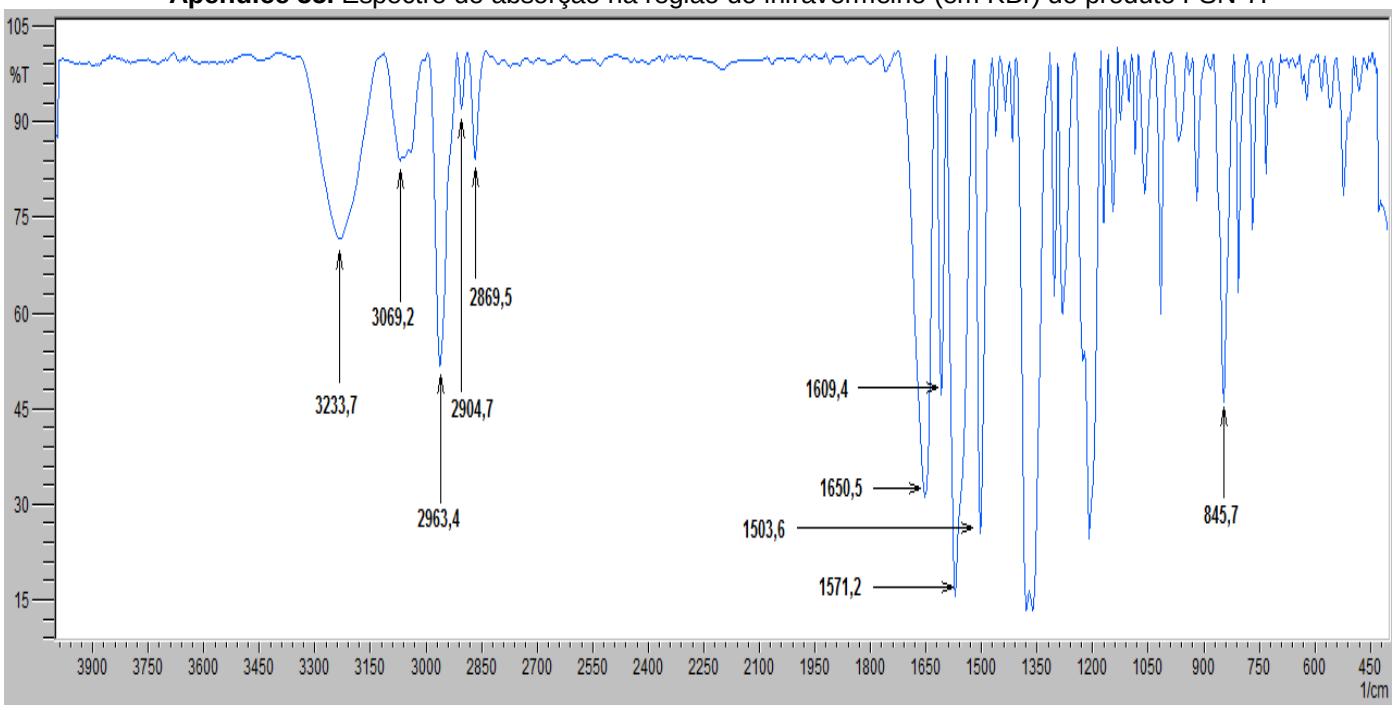
Apêndice 53. Espectro de RMN por HSQC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-7.



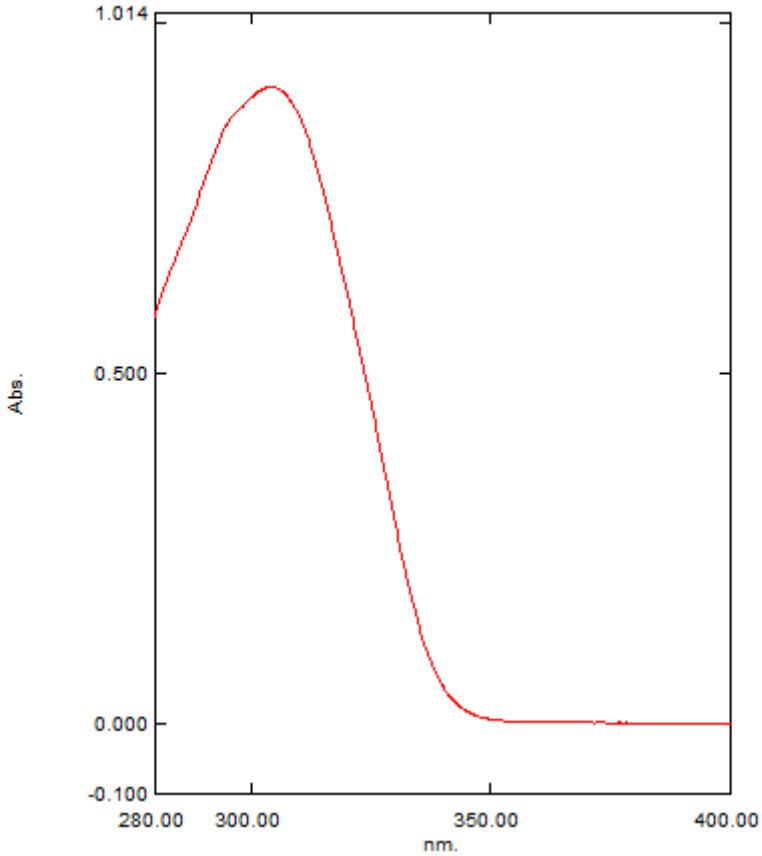
Apêndice 54. Espectro de RMN por HMBC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-7.



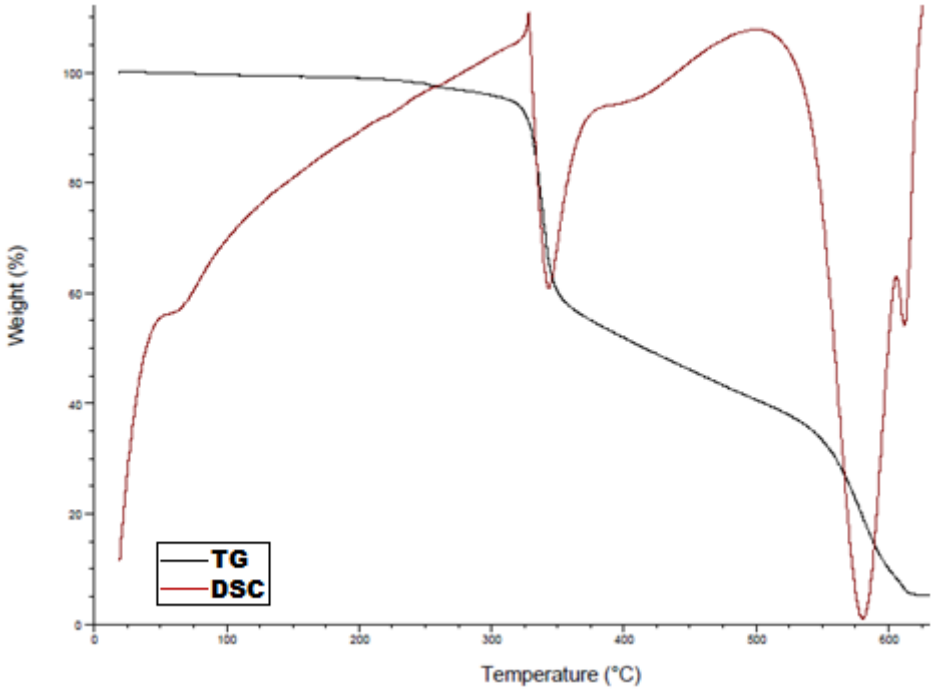
Apêndice 55. Espectro de absorção na região do infravermelho (em KBr) do produto FSN-7.



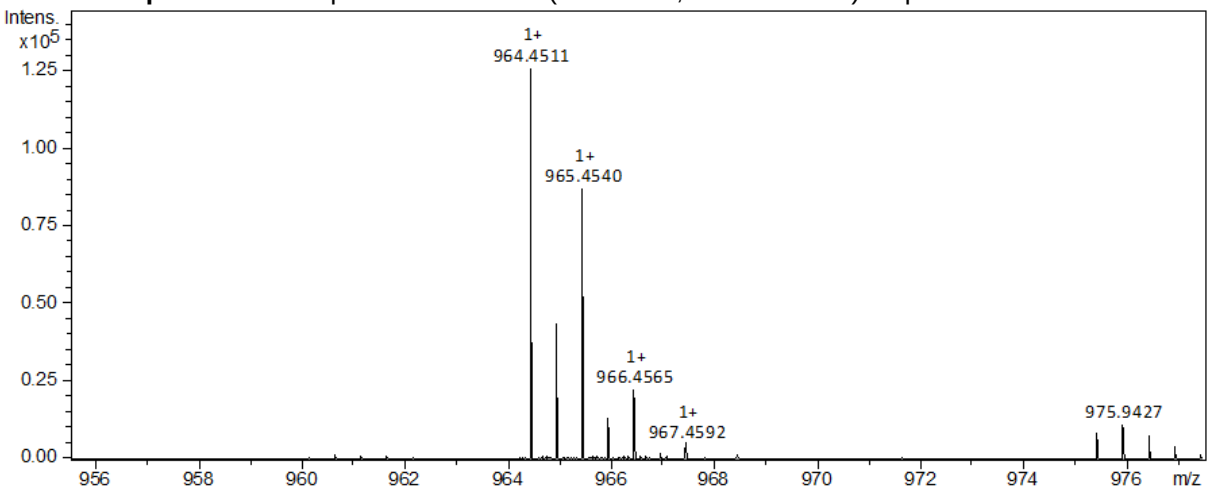
Apêndice 56. Espectro de absorção na região do ultravioleta (em DMSO/metanol) do produto FSN-7.



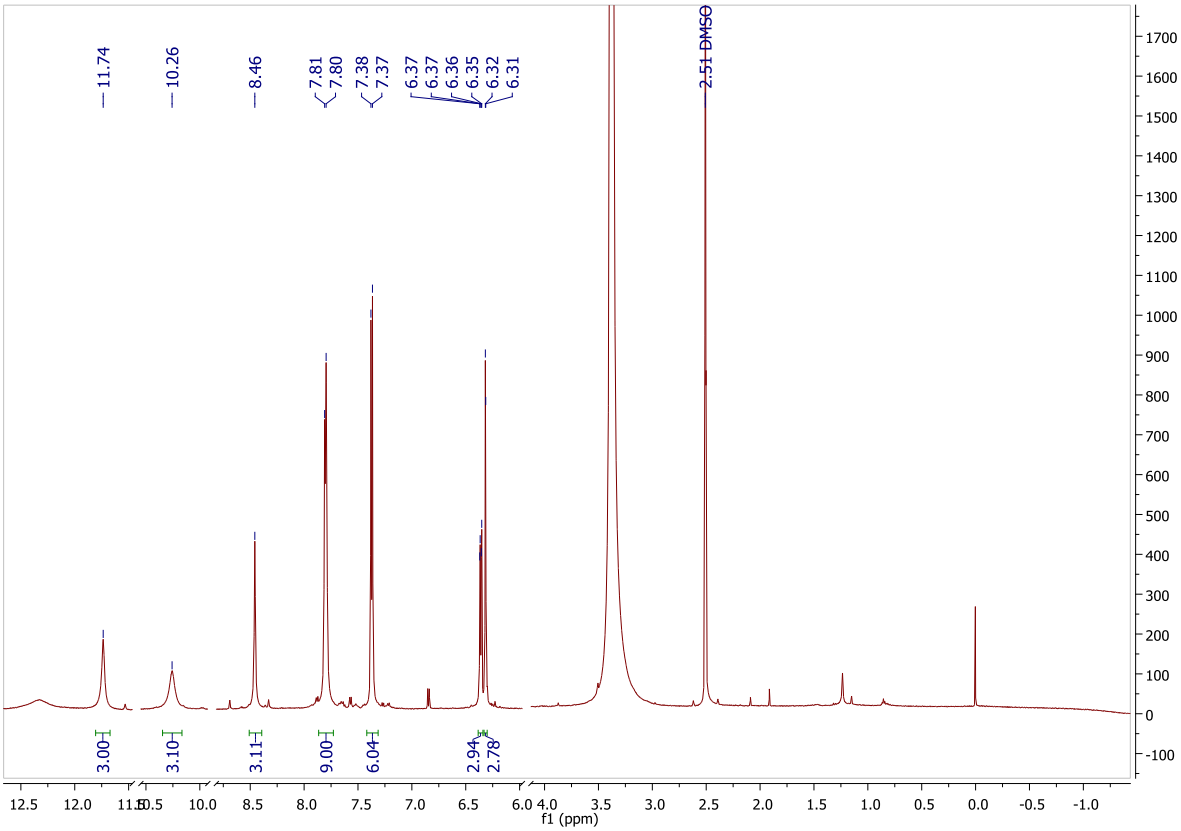
Apêndice 57. Curva térmica do produto FSN-7.



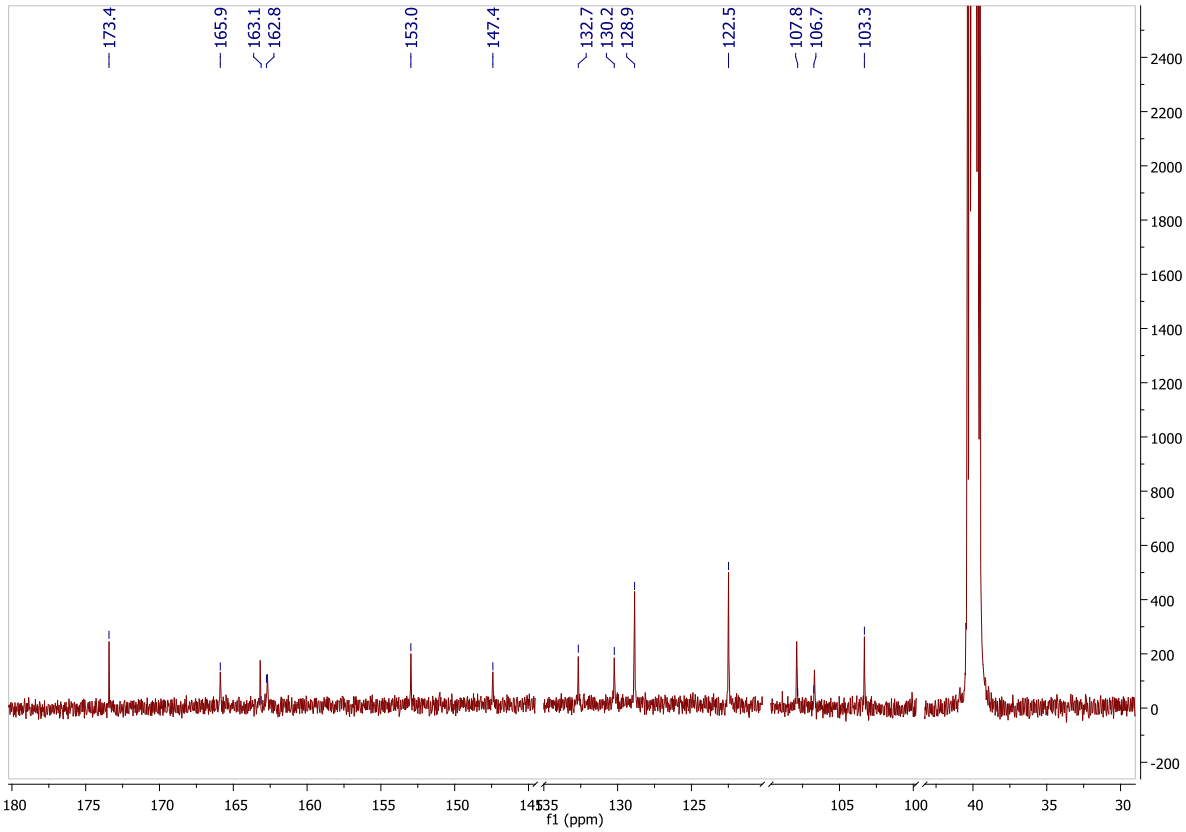
Apêndice 58. Espectro de massas (MicroTOF, infusão direta) do produto FSN-7.



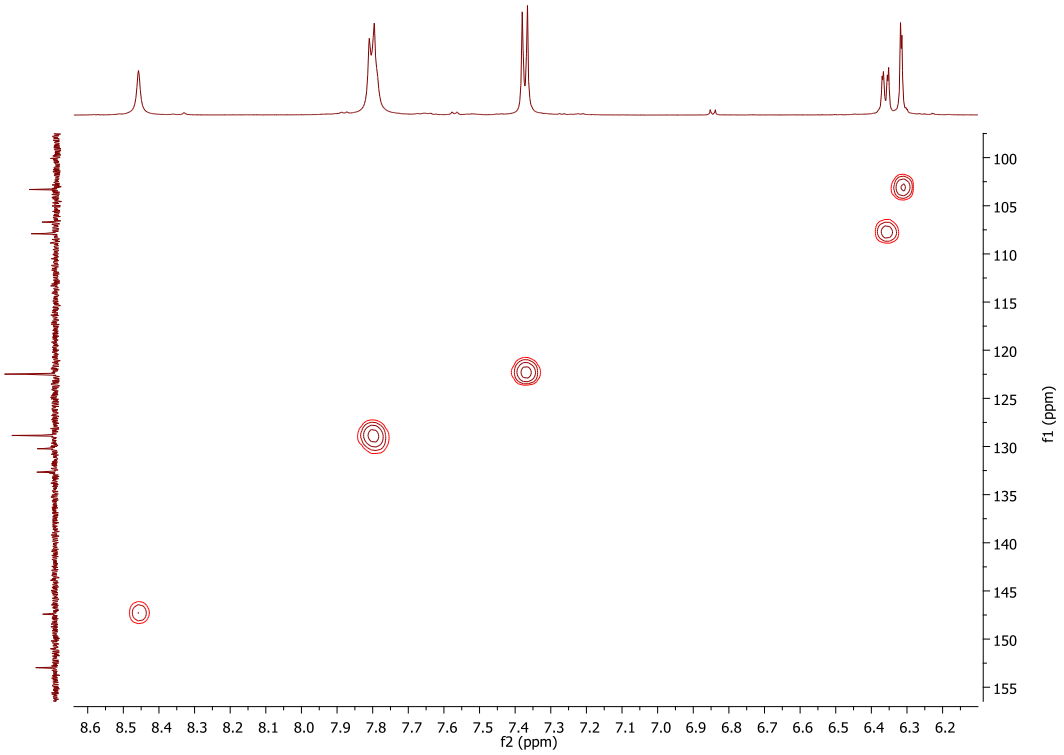
Apêndice 59. Espectro de RMN ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-8.



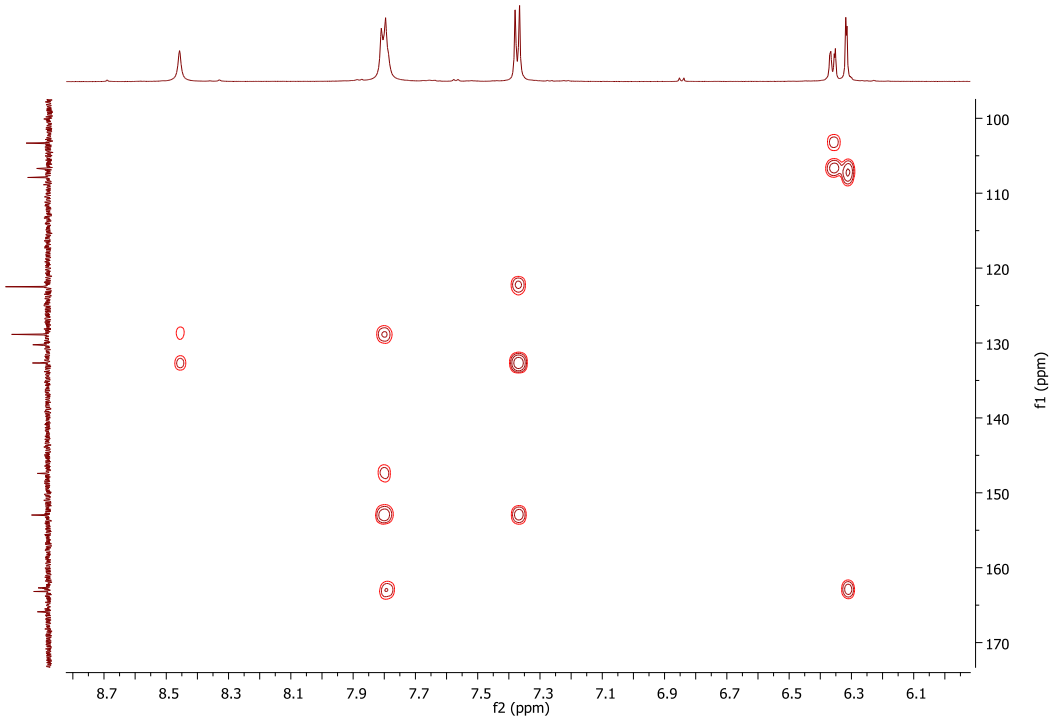
Apêndice 60. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-8.



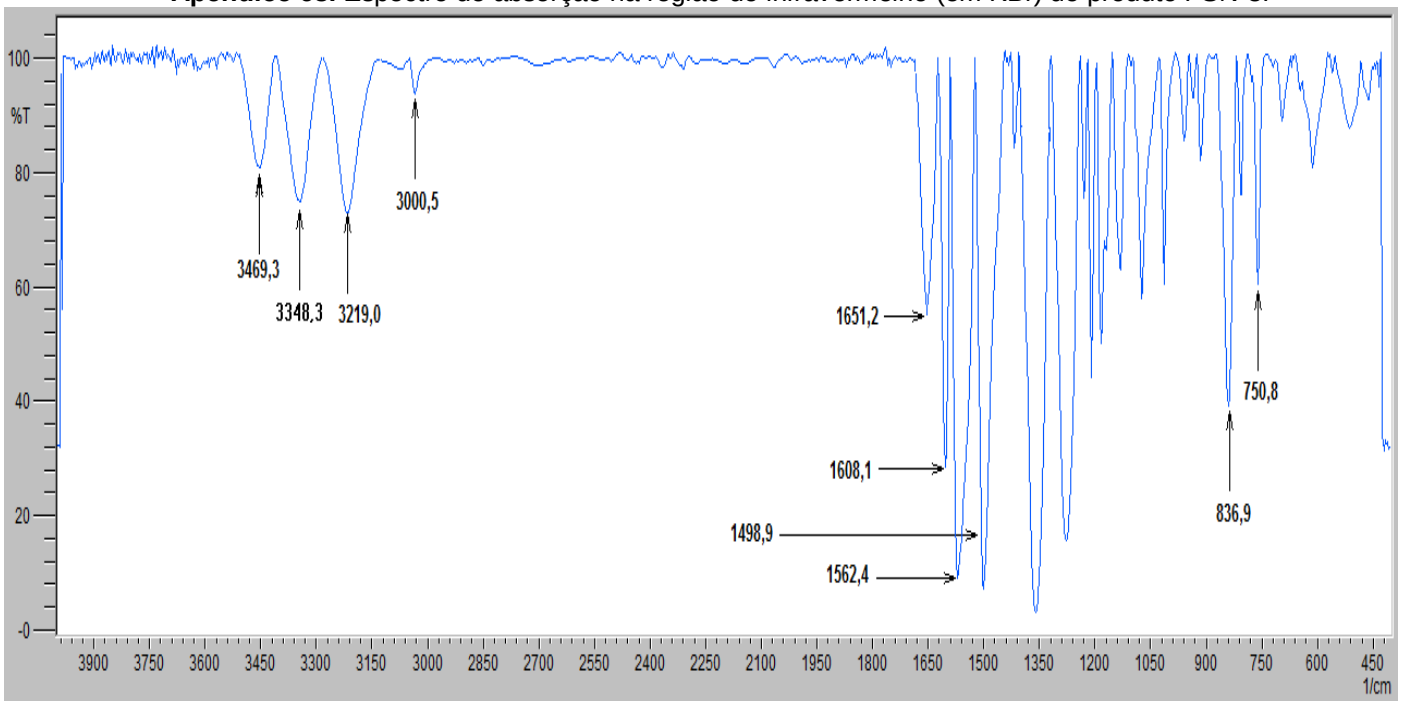
Apêndice 61. Espectro de RMN por HSQC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-8.



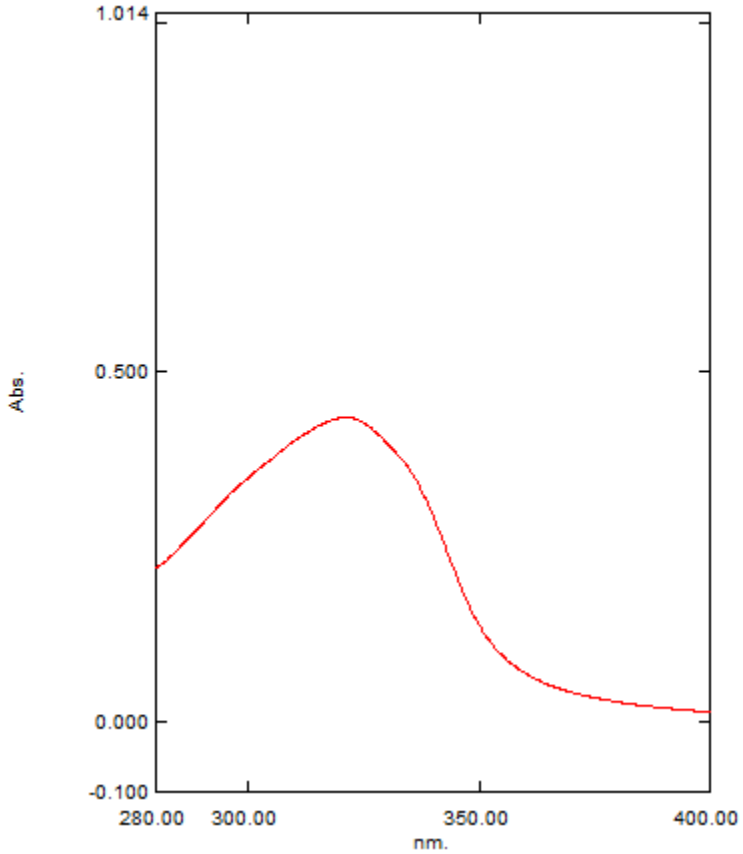
Apêndice 62. Espectro de RMN por HMBC de ^{1}H (600 MHz, em DMSO-d_6) e ^{13}C (150 MHz, em DMSO-d_6) do produto FSN-8.



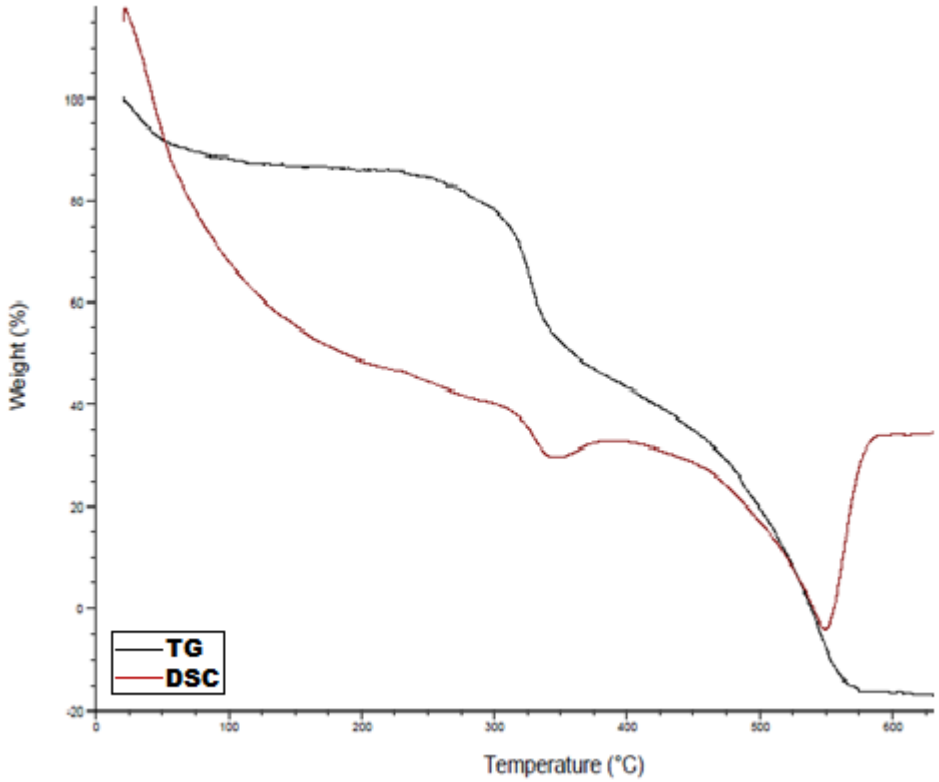
Apêndice 63. Espectro de absorção na região do infravermelho (em KBr) do produto FSN-8.



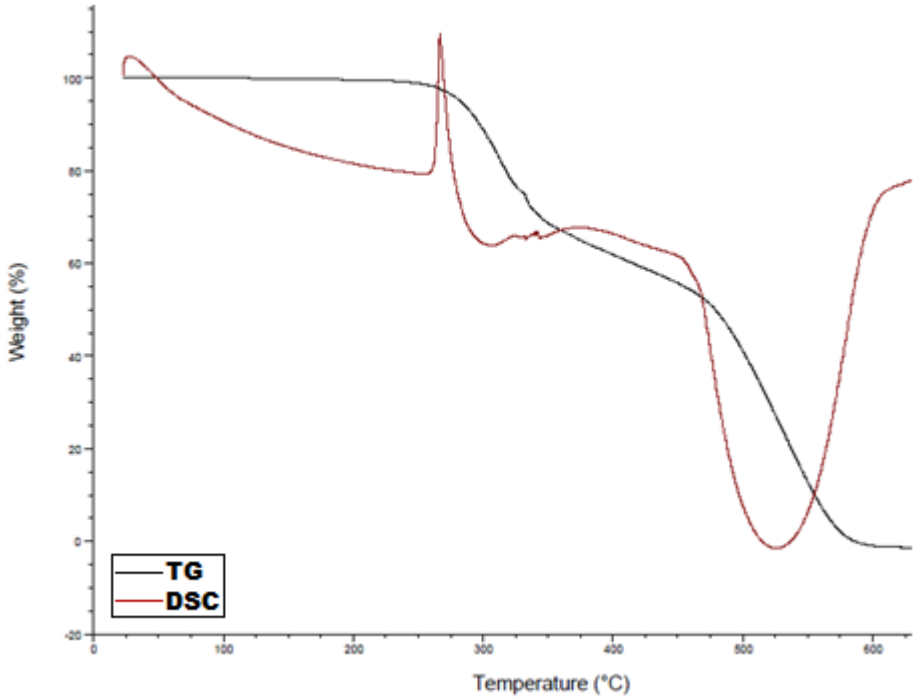
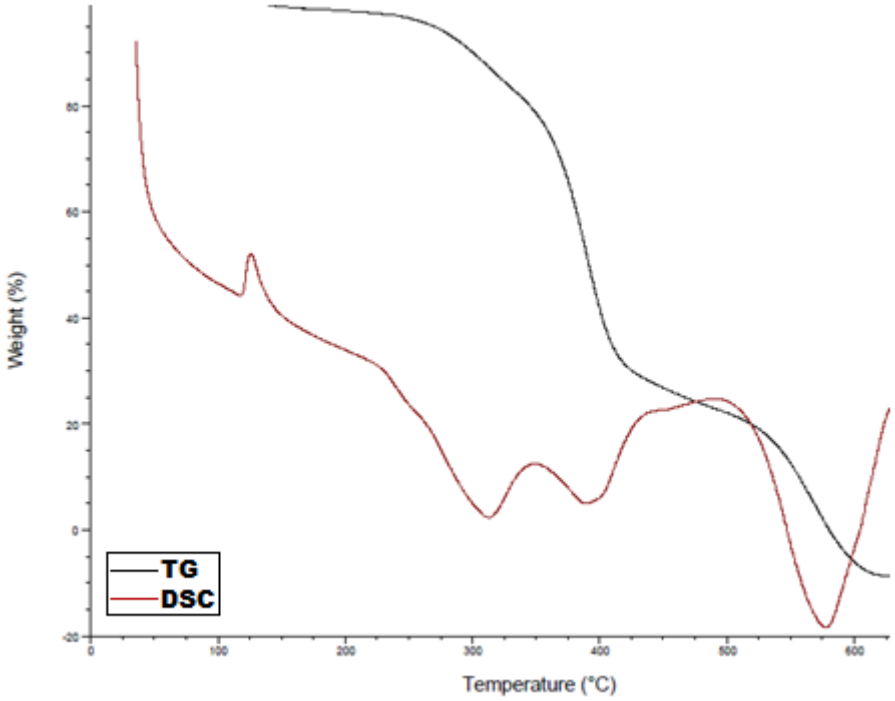
Apêndice 64. Espectro de absorção na região do ultravioleta (em DMSO/metanol) do produto FSN-8.



Apêndice 65. Curva térmica do produto FSN-8.



Apêndice 66. Curva térmica do padrão de Resveratrol.



Apêndice 67. Curva térmica do padrão de EHT.